



UNIVERSITAT^{DE}
BARCELONA

**Caracterització territorial i cel·lular de la planaria
Dugesia (G) tigrina mitjançant anticossos monoclonals:
aplicacions a l'estudi de la regeneració**

David Bueno Torrens



Aquesta tesi doctoral està subjecta a la llicència **Reconeixement 4.0. Espanya de Creative Commons.**

Esta tesis doctoral está sujeta a la licencia **Reconocimiento 4.0. España de Creative Commons.**

This doctoral thesis is licensed under the **Creative Commons Attribution 4.0. Spain License.**

042
DE
815
000

UNIVERSITAT DE BARCELONA
Divisió de Ciències experimentals i Matemàtiques
Facultat de Biologia
Departament de Genètica



**CARACTERITZACIO TERRITORIAL I CEL.LULAR DE LA
PLANARIA DUGESIA (G) TIGRINA MITJANÇANT ANTICOSSOS
MONOCLONALS. APLICACIONS A L'ESTUDI DE LA
REGENERACIO.**

DAVID BUENO TORRENS
Barcelona 1994



Departament de Genètica
Facultat de Biologia
Universitat de Barcelona

**CARACTERITZACIO TERRITORIAL I CEL.LULAR DE LA
PLANARIA *DUGESIA (G) TIGRINA* MITJANÇANT ANTICOSSOS
MONOCLONALS. APLICACIONS A L'ESTUDI DE LA
REGENERACIO.**

Memòria presentada per optar
al grau de Doctor en
Biologia per la Universitat
de Barcelona per

David Bueno Torrens



Vist i plau del Director de
la Tesi



Dr. Rafael Romero Benedí
Professor Titular del
Departament de Genètica de
la Facultat de Biologia de
la Universitat de Barcelona

Vist i plau del Tutor



Dr. Jaume Baguña Monjo
Catedràtic del Departament
de Genètica de la Facultat
de Biologia de la
Universitat de Barcelona

BIBLIOTECA DE LA UNIVERSITAT DE BARCELONA



0700184323

Barcelona, Abril de 1994.

AGRAIMENTS

Cap estel no estaria al lloc on està si no fos per la constant interacció d'atracció-repulsió amb els estels veïns. De la mateixa manera, aquesta Tesi no hagués arribar mai a bon port, no com una finalitat en sí mateixa sinó com un pas més en la meva vida, si no fos per tota la gent que al llarg de 29 anys ha anat interaccionant (i molts d'ells seguint interaccionant) amb mí. A tots a aquestes persones (a tots vosaltres), moltes gràcies.

A tota la meva família: avis, pares, oncles i cosins.

A tots els mestres i educadors que he tingut la sort de conèixer des de que vaig començar a anar a escola. M'agradaria fer menció especial a: Jordi Camprubí, Pare Pau, Josep Saiz, Eusebi Simó, Pare Valls, Toni Valls.

A tots els amics que he tingut i tinc. Amb un especial sentiment: Valentí Castell i Mònica Gorrero, Pere Feliu i Anna Fèlix, Santi Martínez, Guillem Viu i Lourdes Mostazo.

Als companys que tant m'han ajudat en la realització d'aquesta Tesi: Lauro Sumoy (en una primera etapa), Eduard Batlle, Lluís Espinosa i Marc Aureli Soriano (durant la major part d'aquest treball), i darrerament Francesc Cebrià, Yolanda Espinosa, Sònia-Vanina Forcales, Rocío Jiménez.

A tota la resta de gent d'Epigenètica: Carme Auladell, José Ramón Bayascas, Ferran Burgaya, Salvador Carranza, Andreu Casali, Joan Collet, Montserrat Coromines, Jordi Garcia, Anna Muñoz, Maria Ribes, Marta Riutort, Emili Saló, Florenci Serres, Joan Anton Vela.

A tots els components del grup de Molecular: Ricard Albalat, Silvia Atrian, Susana Balcells, Mònica Bayés, Neus Cols, Bru Cormand, Joan Fibla, Roser González-Duarte, Laura Gort, Daniel Grinberg, Teresa Luque, Gemma Marfany, Amàlia Martínez, Miquel Taron, Lluís Vilageliu.

A tots els membres del grup d'Evolució: Montserrat Aguadé, Amaya Amador, Joan Balaña, Susana Cirera, Josep Maria Comerón, Elvira Juan, Anna Llopart, David Lorenzo, Jesús Martín, Francesc Mestres, Agustí Monté, Aurea Navarro, Dorcas Orengo, Montserrat Papasseit, Marta Pascual, Dr. A. Prevosti, Sebastià Ramos, Julio Rozas, Carme Segarra, Lluís Serra.

A totes aquelles persones d'altres Departaments o del Servei Científic-tècnic que han contribuït al desenvolupament d'aquesta Tesi: Isidre Casals, Núria Cortadellas, Mercé Durfort, Anna Ribera, Eduardo Soriano, Senen Vilaró, Ramon Vilella, Antonio Zorzano.

A tots els companys de les Escoles Grimm, amb els que vaig compartir tres anys molt enriquidors. Permeteu-me que esmenti Anna Maria Serratosa com a representant de tots vosaltres, però feu-vos extensiu a tots el meu agraïment.

A en Jaume Baguñà, per la seva inestimable col.laboració i seguiment no tant sols en el treball realitzat sinó també en la meva formació científica.

A en Rafael Romero, en Rafa, amb qui he tingut el plaer de tenir una estreta relació tant personal com professional, molt enriquidora en tots dos aspectes, per la qual cosa el considero "jefe", company i, sobre tot, amic. Tanmateix per la dedicació en la seva tasca com a director d'aquesta Tesi.

A la meva estimada esposa, la Maria, que ha estat sempre al meu costat durant els anys en què he relitzat aquesta Tesi...

Als meus pares

A la Maria

"Som com nens entrant en una colossal biblioteca. Les parets estan cobertes fins el sostre de llibres en moltes llengües diferents. Els nens saben que algú deu haver escrit aquests llibres. No se sap qui ni com. Les llengües en les que han estat escrits no són conegudes. Però els nens noten un pla definit en l'ordenació dels llibres - un ordre misteriós que no és comprès, i del qual tant sols es tenen llambregades confoses."

Albert Einstein
(1879-1955)



INDEX

	<u>pàgina</u>
PROLEG.....	1
INTRODUCCIO.....	5
1 - Descripció de l'organisme.....	7
1.1 - Organisme.....	7
1.2 - Estructura i morfologia interna.....	7
2 - Creixement, decreixement i regeneració a planària.....	13
2.1 - Fenòmens de creixement i decreixement....	13
2.2 - Regeneració.....	14
3 - El neoblast, la cèl.lula soca.....	19
4 - Estratègies d'estudi en Biologia del Desenvolupament.....	23
5 - Els anticossos.....	25
5.1 - Concepte d'anticòs monoclonal.....	27
5.2 - Concepte d'anticossos policlonals.....	27
5.3 - Obtenció d'anticossos monoclonals.....	27
5.3.1 - Mètodes basats en mutagènesi.....	28
5.3.2 - Mètodes basats en hibridació cel.lular.....	28
5.4 - Anticossos monoclonals vs anticossos policlonals.....	29
OBJECTIUS.....	33
MATERIAL I METODEDES.....	37
6 - Espècies i manteniment.....	39
6.1 - Espècies.....	39
6.2 - Condicions de manteniment.....	39
6.3 - Obtenció de regenerants.....	40

6.4 - Alteració del patró mitjançant agents químics.....	41
7 - Tipus d'immunògens utilitzats.....	43
7.1 - Immunògens emprats.....	43
7.2 - Obtenció dels immunògens.....	44
7.2.1 - Antígens totals de planària.....	44
7.2.2 - Antígens de blastemes de regeneració.....	44
7.2.3 - Macerats cel.lulars.....	45
7.2.4 - Dissociats cel.lulars.....	45
7.2.5 - Poblacions cel.lulars enriquides en neoblasts.....	46
7.2.6 - Membranes i nuclis de neoblasts..	46
7.2.7 - Fraccions proteiques obtingudes mitjançant gels d'electroforesi (SDS-PAGE).....	47
7.2.8 - Absorció d'antígens sobre anticossos monoclonals i policlonals ja generats.....	48
7.2.9 - Conjugació d'haptens a BSA.....	48
8 - Immunització.....	51
8.1 - Espècie i soca immunitzada.....	51
8.2 - Rutes d'introducció dels immunògens.....	51
8.3 - Protocol de immunització "in vivo".....	52
8.4 - Protocol de immunització "in vitro".....	54
9 - Obtenció d'hibridomes productors d'anticossos...	57
9.1 - Medis de cultiu.....	57
9.2 - Soques mielòmiques emprades.....	58
9.3 - Manteniment de les soques mielòmiques....	58
9.4 - Obtenció de limfòcits B.....	58
9.5 - Protocol d'obtenció d'hibridomes (fusió cel.lular)....	59
9.6 - Selecció de les cèl.lules híbrides.....	61
9.7 - Clonatge dels hibridomes.....	62
9.8 - Crioconservació cel.lular.....	63
9.9 - Descongelació de línies cel.lulars.....	63
9.10 - Contaminacions.....	66
9.11 - Test de micoplasmes.....	67

10 - Producció d'anticossos monoclonals.....	69
10.1 - Producció "in vitro" en medis amb sèrum fetal boví (FCS).....	69
10.2 - Producció "in vivo" mitjançant tumors ascítics.....	69
10.3 - Producció "in vitro" en medis sense sèrum fetal boví (FCS(-)).....	70
10.4 - Rendiments.....	71
10.5 - Titulació dels anticossos.....	72
11 - Tècniques de crivellatge dels sobrenedants d'hibridomes.....	73
11.1 - Tècnica d'ELISA.....	73
11.2 - Tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques emprades.....	76
12 - Tècniques immunohistoquímiques.....	77
12.1 - Mètodes de fixació.....	77
12.2 - Organismes inclosos en parafina.....	77
12.2.1 - Inclusió en parafina i obtenció de seccions.....	77
12.2.2 - Immunotinció de seccions incloses en parafina.....	78
12.2.3 - Mètodes de detecció indirecta...	79
12.3 - Seccions incloses en Lowicryl.....	82
12.3.1 - Inclusió en Lowicryl i obtenció de seccions semifines i ultrafines.....	82
12.3.2 - Immunotinció de seccions semifines.....	82
12.3.3 - Immunotinció de seccions ultrafines.....	83
12.4 - Immunotinció d'organismes processats "in toto".....	84
13 - Tècniques immunocitoquímiques.....	85
13.1 - Obtenció de macerats cel.lulars.....	85
13.2 - Immunotinció de macerats cel.lulars.....	85
13.3 - Obtenció de dissociats cel.lulars.....	86
13.4 - Immunotinció de dissociats cel.lulars...	86
14 - Tècniques electroforètiques.....	87
14.1 - Gels d'electroforesi (SDS-PAGE).....	87

Index

14.2	- Tinció proteica total amb Comassie Brilliant Blue R-250.....	88
14.3	- Tinció proteica total amb nitrat de plata.....	88
14.4	- Transferència de proteïnes a filtres de nitrocel.lulosa: Western blot.....	89
14.5	- Immunodetecció d'antígens sobre filtres de nitrocel.lulosa.....	90
14.5	- Extracció acètica d'antígens separats mitjançant gels de poliacrilamida (SDS-PAGE).....	91
15	- Caracterització bàsica d'antígens.....	93
15.1	- Purificació d'antígens per cromatografia d'immunoafinitat.....	93
15.1.1	- Obtenció d'antígens.....	93
15.1.2	- Purificacions prèvies amb columnes de Sephadex G-50.....	93
15.1.3	- Unió dels anticossos i antígens a la columna d'immunoafinitat.....	94
15.1.4	- Elució dels antígens de la columna d'immunoafinitat.....	95
15.1.5	- Purificacions posteriors mitjançant HPLC.....	97
15.2	- Detecció de glucoproteïnes sobre filtres.....	97
15.3	- Anàlisi de C i N i confecció d'aminogrames.....	98
15.4	- Deglicosilació d'antígens.....	99
15.5	- Digestió d'antígens amb proteases.....	100
15.6	- Digestió d'antígens amb DNAasa.....	100
16	- Nomenclatura relativa a fusions, anticossos i antígens.....	101
17	- Tampons i solucions diverses.....	103
17.1	- Tampons generals.....	103
17.2	- Tampons i solucions per immunohistoquímica i immunocitoquímica.....	103
17.3	- Tampons i solucions d'electroforesi i ELISA.....	105
17.4	- Tampons i solucions d'obtenció d'immunògens.....	108

17.5 - Tampons i solucions de detecció de glicoconjugats.....	109
17.6 - Tampons de deglicosilació.....	110
RESULTATS.....	111
18 - Fusions realitzades.....	113
18.1 - Característiques, resultats i rendiments de les fusions.....	113
18.2 - Resultats i rendiments de les fusions en funció dels paràmetres variables.....	130
18.2.1 - Immunògens.....	130
18.2.2 - Immunitzacions.....	136
18.2.3 - Soques mielòmiques emprades.....	138
18.2.4 - Protocols de fusió.....	139
18.2.5 - Mètodes de crivellatge.....	139
19 - Descripció de l'especificitat bàsica dels anticossos obtinguts.....	143
19.1 - Classificació dels anticossos en funció de la seva especificitat.....	144
19.2 - Anticossos específics de tipus cel.lulars.....	153
19.2.1 - Anticossos específics de cèl.lules epidèrmiques.....	153
19.2.2 - Anticossos específics de cèl.lules goblet.....	155
19.2.3 - Anticossos específics de cèl.lules gastrodèrmiques.....	157
19.2.4 - Anticossos específics de cèl.lules secretores.....	159
19.2.5 - Anticossos específics de cèl.lules musculars.....	162
19.2.6 - Anticossos específics de cèl.lules nervioses.....	168
19.2.7 - Anticossos específics d'altres tipus cel.lulars.....	170
19.3 - Anticossos específics de subtipus cel.lulars.....	170
19.3.1 - Anticossos específics de subtipus de cèl.lules cianòfiles.....	170
19.3.2 - Anticossos específics de subtipus de cèl.lules musculars.....	174

19.3.3 - Anticossos específics de subtipus de cèl.lules epidèrmiques.....	176
19.3.4 - Anticossos específics de subtipus cel.lulars de difícil classificació.....	177
19.4 - Anticossos específics comuns a diferents tipus cel.lulars.....	178
19.5 - Anticossos amb especificitat subcel.lular.....	182
15.5.1 - Anticossos específics de làmina basal.....	182
15.5.2 - Anticossos específics de nuclis i DNA.....	182
19.6 - Anticossos amb especificitat regional...	184
20 - Aplicació dels anticossos generats en regeneració.....	185
20.1 - Anticossos monoclonals específics de cèl.lules musculars.....	185
20.2 - Anticossos monoclonals específics de cèl.lules epidèrmiques.....	188
20.3 - Anticossos monoclonals amb especificitat regional.....	189
20.4 - Anticossos monoclonals específics d'altres tipus cel.lulars.....	189
21 - TCEN-49, l'anticòs monoclonal que detecta regions molecularment restringides en planària.....	191
21.1 - L'anticòs monoclonal TCEN-49.....	191
21.2 - Descripció del marcatge de TCEN-49 en organismes intactes.....	192
21.2.1 - Seccions d'organismes inclosos en parafina.....	192
21.2.2 - Organismes processats "in toto".	200
21.2.3 - Macerats cel.lulars.....	200
21.2.4 - Seccions semifines.....	202
21.2.5 - Seccions ultrafines (microscopia electrònica).....	204
21.3 - Canvis en la proporcionalitat de les regions molecularment definides durant el creixement i decreixement.....	210

21.4 - Aparició i modificació del marcatge de TCEN-49 durant la regeneració.....	212
21.5 - Alteracions del marcatge de TCEN-49 mitjançant agents químics.....	228
21.6 - Caracterització bàsica de TCEN-49Ag.....	234
21.6.1 - Massa molecular aparent.....	234
21.6.2 - Naturalesa de TCEN-49Ag.....	237
DISCUSSIO.....	241
22 - Consideracions tècniques.....	243
22.1 - Obtenció d'hibridomes productors d'anticossos específics.....	243
22.1.1 - Factors variants.....	243
22.1.1.1 - Soca parental.....	243
22.1.1.2 - Protocol d'immunització..	244
22.1.1.3 - Immunogen.....	245
22.1.2 - Factors invariants.....	249
22.2 - Mètodes de crivellatge.....	251
22.2.1 - La tècnica d'ELISA.....	251
22.2.2 - Les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques.....	253
22.3 - Altre mètodes.....	255
22.3.1 - Les seccions semifines i ultrafines.....	255
22.3.2 - Les tècniques electroforètiques.	256
23 - Patrons d'immunoreacció dels anticossos obtinguts.....	257
23.1 - Criteris d'especificitat bàsica.....	258
23.2 - Especificitats generades.....	260
23.2.1 - Tipus cel.lulars que han generat anticossos específics.....	260
23.2.2 - Subtipus cel.lulars que han generat anticossos específics.....	263
23.2.3 - Relacions antigèniques entre tipus cel.lulars diferents.....	265
23.2.4 - Especificitat subcel.lular.....	266
23.3 - Tipus cel.lulars vs subtipus cel.lulars.....	267
23.4 - Antígens de determinació vs antígens de diferenciació.....	268

23.5 - Per què alguns tipus cel.lulars han generat pocs clons? El cas de les cèl.lules nervioses.....	269
23.6 - Per què alguns tipus cel.lulars no han generat cap cló específic i exclusiu d'elles? El cas dels neoblasts.....	270
23.7 - Per què algunes estructures no han generat cap cló específic d'elles? El cas dels blastemes de regeneració.....	272
24 - TMUS-13, de la diferenciació cel.lular a les diferències filètiques.....	275
24.1 - TMUS-13 reconeix un determinant antigènic específic de Filum.....	275
24.2 - TMUS-13, marcador de la diferenciació de neoblasts en cèl.lules musculars.....	276
25 - Les restriccions moleculars a planària.....	279
25.1 - Les regions de planària.....	279
25.2 - Creixement i decreixemnt: canvis en les proporcions regionals.....	280
25.3 - L'expressió de TCEN-49Ag en organismes intactes.....	281
25.4 - Evolució de l'expressió de TCEN-49Ag en organismes regenerants.....	286
25.5 - "Posteriorització" de planària amb àcid retinoic.....	289
25.6 - Inferències sobre la possible funció de TCEN-49Ag.....	290
25.7 - Implicacions sobre la formació i manteniment del patró axial a planària...	292
25.7.1 - La formació del patró axial.....	292
25.7.2 - Els neoblasts de la regió central.....	293
25.7.3 - La regulació de l'expressió de TCEN-49Ag.....	294
26 - Perspectives.....	301
CONCLUSIONS.....	303
BIBLIOGRAFIA.....	307

PROLEG

Un dels molts camps fascinants de la Biologia moderna, del que encara queden moltes preguntes sense respondre, és el de la Biologia del Desenvolupament en totes les seves vessants: desenvolupament embrionari, regeneració, etc. De fet, una de les preguntes clau és com es generen les estructures de l'organisme a partir de la informació continguda en el DNA (és a dir, el pas d'una informació unidimensional a unes estructures tridimensionals). Es dins aquest amplíssim camp, la Biologia del Desenvolupament, on s'emmarca aquesta Tesi, en un intent de col·laborar, des de les tècniques emprades i els resultats obtinguts, a aportar algunes dades noves que contribueixin al seu avanç.

Es per aquest propòsit que s'ha escollit com a model d'estudi un organisme que presenta algunes característiques que el fan avantatjós per aquests tipus de treballs: les planàries d'aigua dolça (apartat 1 de la Introducció). Les planàries són conegudes per la seva gran plasticitat plasmada en la capacitat de créixer i decreixer en funció de les condicions ambientals (temperatura, disponibilitat d'aliment, etc.) i, molt especialment, per la seva gran capacitat de regeneració (apartat 2 de la Introducció). Aquests dos processos són possibles gràcies a l'existència de cèl·lules soca, totipotents i pluripotents, que mantenen l'organisme en un constant estat de renovament cel·lular (apartat 3 de la Introducció).

El fenomen de la regeneració té molts paral·lelismes amb el desenvolupament embrionari pel que fa referència a la formació del patró, establiment i manteniment de la polaritat (anteroposterior, dorsoventral), determinació i diferenciació cel·lular, llinatges cel·lulars, ... Es per aquest motiu que un coneixement més profund de la regeneració i dels processos que l'acompanyen ens pot fer entendre millor molts dels processos del desenvolupament embrionari.

El primer que cal tenir per tal de fer un seguiment d'aquests fenòmens són marcadors adients (apartat 4 de la Introducció). Experiments realitzats d'incorporació de timidina H^3 i bromdeoxiuridina (BrdU), que s'incorporarien a cèl·lules en divisió (els neoblsts, apartat 3 de la Introducció), no han reeixit amb èxit. Els anticossos monoclonals (apartat 5 de la introducció) s'han revelat com unes eines molt útils i versàtils en aquests tipus d'estudis, tant com a marcadors moleculars per a fer-ne el seguiment com per detectar i aïllar possibles molècules implicades. Es per aquest motiu que s'han escollit com a marcadors moleculars en un intent de tenir una eina per a aprofundir en el coneixement d'aquest sistema.

INTRODUCCIO

1 - DESCRIPCIÓ DE L'ORGANISME

1.1 - Organisme

Els organismes en els que s'ha centrat aquest treball són les planàries d'aigua dolça. Bàsicament s'ha utilitzat una raça asexual de l'espècie *Dugesia(G)tigrina* (fig. 1) (Filum Plathelminthes, Classe Turbellaria, Ordre Seriata, Subordre Triclàdida i Infraordre Paludicola) que, malgrat ser d'origen americà arribada a Europa a principis de segle, està distribuïda ubiquament per Catalunya (Baguñà i col, 1980; Ribas, 1990). Aquesta espècie presenta també races sexuals al continent americà i, com a cas excepcional, a l'Illa de Mallorca (Ribas, 1990). El tipus de reproducció que utilitza la raça asexual és la fisiparitat (reproducció per escissió d'una part de l'organisme) seguida de la regeneració (restitució de parts desaparegudes) de les estructures que li manquen en ambdós "descendents".

1.2 - Estructura i morfologia interna

A l'igual que la resta dels Plathelminths, són organismes amb una morfologia general bastant senzilla, amb absència de sistemes circulatoris, respiratoris i esquelètics. Són triblàstics, acelomats, no segmentats, amb polaritat anteroposterior, dorsoventral i simetria bilateral.

La raça asexual a la qual ens referirem des d'ara presenta uns 12-15 tipus cel·lulars descrits segons criteris morfològics obtinguts mitjançant macerats i dissociats cel·lulars, microscòpia òptica amb talls semifins i microscòpia electrònica (Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987). Aquests tipus cel·lulars són: epitelials, musculars, parenquimàtiques, secretores de tipus cianòfil i acidòfil, flamígeres, nervioses, columnars gastrodèrmiques, cèl·lules tipus goblet, rabdítiques, pigmentàries, de la glia i cèl·lules indiferenciades, anomenades neoblasts. D'aquests darrers provenen tots

Introducció

els altres tipus cel.lulars per diferenciació; és més, aquests organismes estan en un estat de renovació cel.lular constant a partir d'aquests neoblasts (per una visió més amplia del neoblast, veure apartat 3 d'aquesta Introducció).

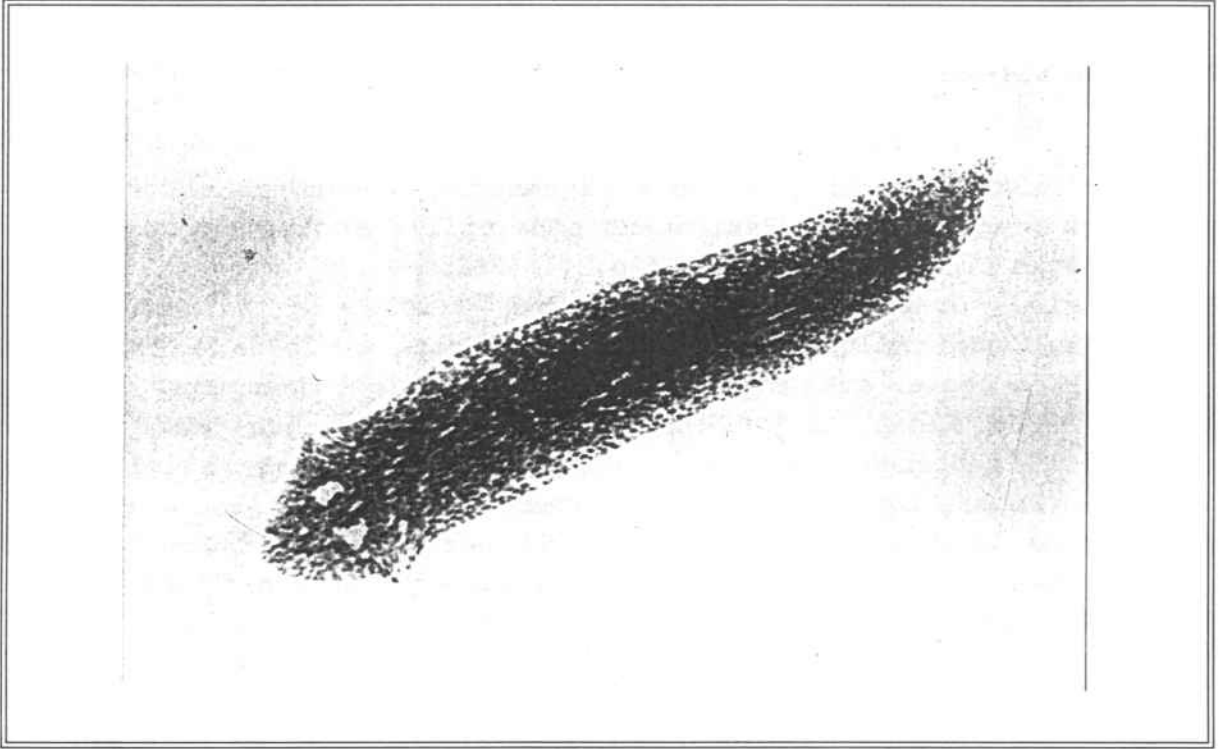


Fig. 1: Raça assexuada de *Dugesia(G)tigrina*

Tots aquests tipus cel.lulars es troben formant els diversos teixits i/o òrgans de la planària o bé immersos en ells. Estructuralment, l'organisme té un epiteli monoestratificat que descansa sobre una làmina basal (fig. 2) composta de colàgena de tipus IV i laminina. Aquest epiteli està contituit per cèl.lules fortament adherides entre elles en el seu extrem apical (Klima, 1969). L'epiteli dorsal difereix del ventral per presentar un gran nombre de cèl.lules amb rabdits (formacions proteiques allargades, riques en arginina. Romero, 1987) i per ser més gruixut. En canvi, l'epiteli ventral és molt més ciliat (Baguñà, 1973; Saló, 1984).

Sota la làmina basal hi ha dues capes musculars formades per musculatura llisa, encara que alguns autors (Sarnat, 1984) consideren que la musculatura de planària té característiques de llisa i estriada alhora. La capa més externa està formada per fibres de musculatura circular i la capa més interna per fibres longitudinals (ambdues orientacions respecte l'eix anteroposterior). Entre aquestes dues capes perpendiculars hi ha fibres musculars obliqües.

L'aparell digestiu (fig. 3) està format per tres diverticles intestinals (que suposa un criteri de classificació: Triclads) cecs i molt ramificats, connectats entre sí i a la faringe, que és l'òrgan per on ingereix l'aliment. Els cecs intestinals estan constituïts bàsicament per dos tipus cel·lulars (Pedersen, 1959a, 1959b; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987) (fig.2): les cèl·lules columnars gastrodèrmiques i les cèl·lules goblet, de tipus secretor (Specian i Oliver, 1991, per a una revisió general de cèl·lules goblet).

En canvi, la faringe, que és un òrgan evaginable especialitzat en la captura i digestió prèvia de l'aliment i a través del qual l'intestí es comunica amb l'exterior mitjançant un porus bucal, presenta una gran complexitat. Està limitada externament per un epitelí monoestratificat ciliat que descansa sobre una làmina basal, sota la qual hi ha els nuclis de les cèl·lules epitelials que estan units a la part apical de la cèl·lula per un peduncle (Baguñà, 1973; Espinosa, 1993). Internament està limitada per un epitelí monoestratificat ciliat en els seu terç distal (el més proper al porus bucal), i no ciliat però amb molts microvilli en el seu terç proximal, que connecta amb l'epitelí intestinal de manera contínua. Aquest epitelí intern descansa també sobre una làmina basal. Sota la làmina basal d'ambdós epitelis faringis hi ha dues capes musculars, longitudinal la més externa i circular la més interna (fig. 2).

Omplint els espais entre les estructures esmentades del cos i de la faringe trobem un parènquima compacte:

- El parènquima que omple el cos de l'organisme està format per diversos tipus cel·lulars: cèl·lules parenquimàtiques, secretores de tipus cianòfil i acidòfil, musculars dorsoventrals, musculars obliqües, musculars envoltant els diverticles intestinals, rabdítiques subepidèrmiques (precursoras de les epitelials), pigmentàries (responsables de la coloració de l'organisme), flamígeres (amb funció excretora) i neoblasts (Dubois, 1949; Pedersen, 1959a, 1959b; Bronsted, 1969; Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987; Rieger i col, 1991; Romero i Baguñà, 1991).

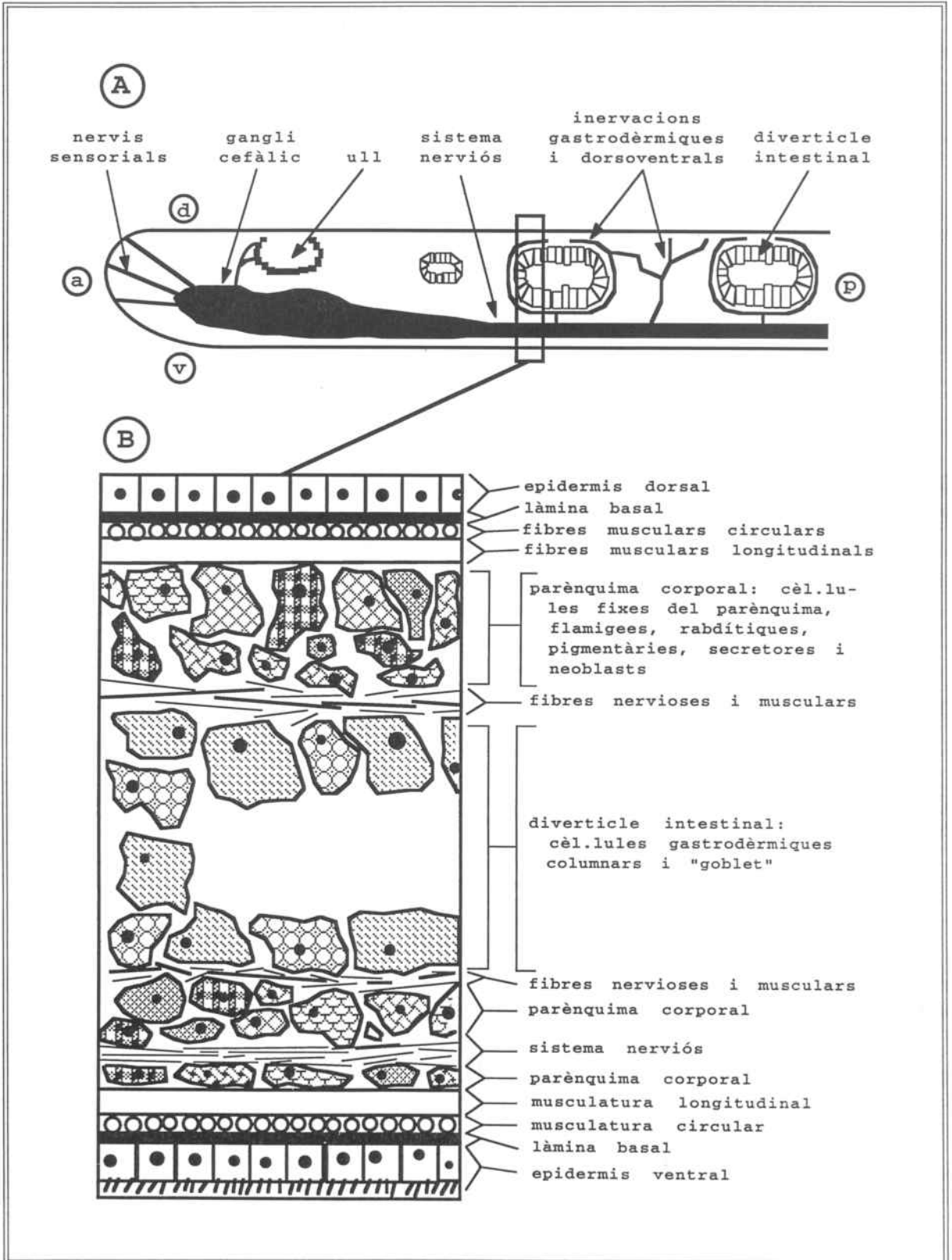


Fig. 2: Esquema de l'estructura i morfologia interna de la raça assexuada de *Dugesia(G)tigrina*. Secció sagital i ampliació. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral.

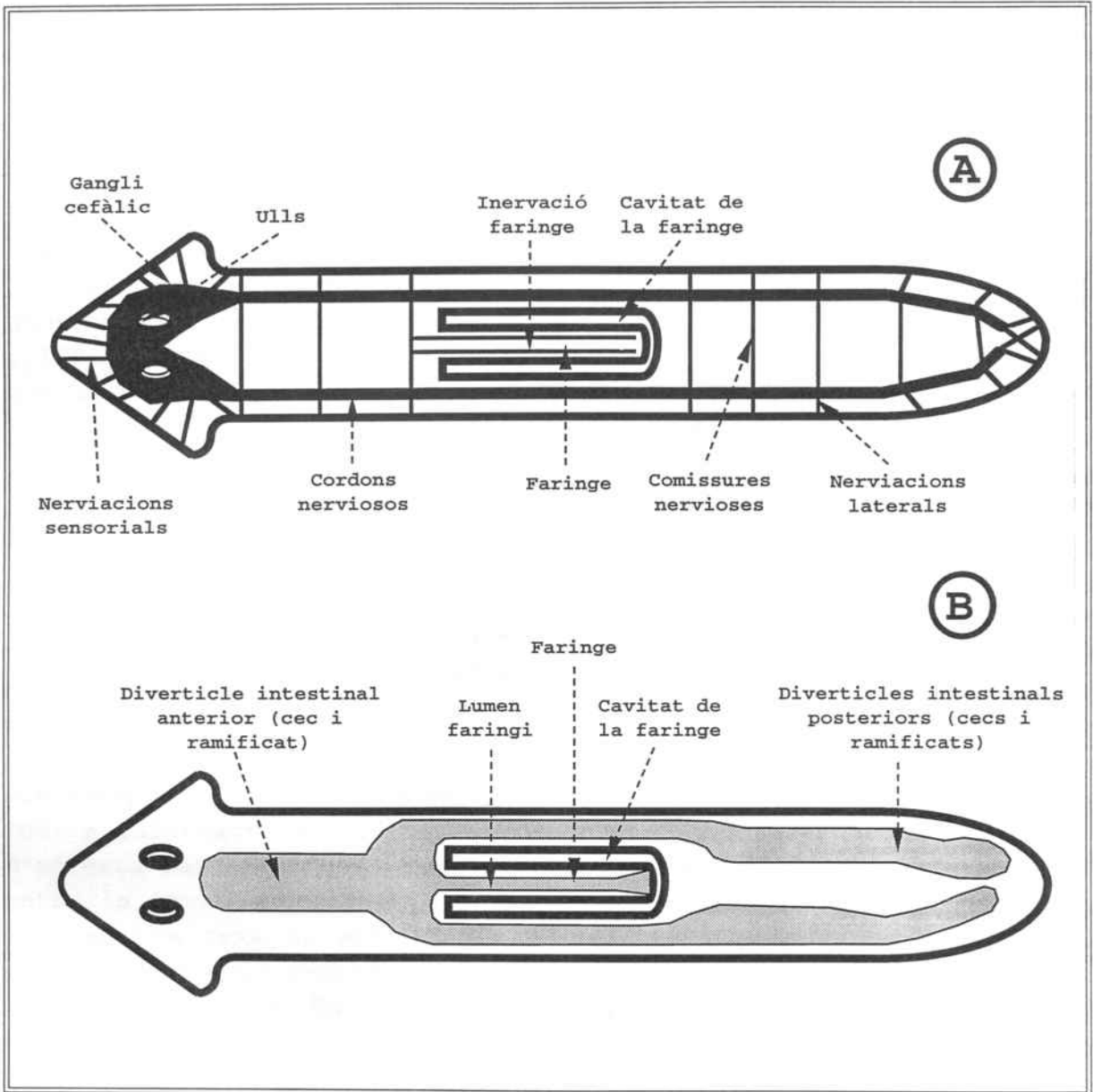


Fig. 3: Esquema del sistema nerviós (A) i de l'aparell digestiu (B) de planària.

En posició ventral i entre les cèl.lules que componen el parènquima hi ha el sistema nerviós central (que actua com a sistema neuroendocrí) (fig. 2) format per diversos tipus cel.lulars (Baguña i Ballester, 1978; Rieger i col, 1991). El sistema nerviós central està format per dos ganglis cefàlics units per una comisura, dels quals surten dos cordons nerviosos que recorren cap a la part posterior (fig. 3). Aquests cordons nerviosos estan també units entre ells per comisures, i tant d'ells com dels ganglis cefàlics surten inervacions

Introducció

cap als òrgans sensorials, diverticles intestinals, faringe, etc. (Baguñà, 1973). La planària disposa d'òrgans sensorials quimiorceptors en la zona cefàlica, especialment en les aurícules, i d'òrgans fotoreceptors concentrats en un parell d'ulls en posició cefàlica sobre els ganglis cefàlics.

- El parènquima que omple la faringe està format majoritàriament per cèl.lules de tipus secretor, amb un gran nombre de prolongacions ramificades que s'extenen des de la base de la faringe, on acostumen a estar els seus nuclis, fins a les zones distals (Baguñà, 1973). Immersos en aquest parènquima hi ha un gran nombre de fibres musculars radials que uneixen les capes musculars internes i externes, convertint la faringe en un òrgan fortament musculat. Dins aquest parènquima hi ha també els dos anells circulars concèntrics del sistema nerviós faringi (Baguñà i Ballester, 1978; Rieger i col, 1991). Es important destacar l'absència de neoblasts en la faringe.

La faringe està allotjada en una cavitat faríngia recoberta per un epiteli monoestratificat. Es comunica amb l'exterior per un porus faringi situat en posició ventral, per on surt la faringe a l'exterior per captar l'aliment.

2 - CREIXEMENT, DECREIXEMENT I REGENERACIO A PLANARIA

2.1 - Fenòmens de creixement i decreixement

Tal i com s'ha esmentat al Pròleg, les planàries tenen la facultat de créixer i decreixer en llargada i volum corporal, principalment per hiperplàsia (nombre de cèl.lules) més que per hipertròfia (volum cel.lular) ,en funció, entre d'altres, de la temperatura i la freqüència d'alimentació (Romero, 1987; Romero i Baguñà, 1988). En condicions de baixes temperatures i una alta freqüència d'alimentació (condicions òptimes per les planàries), l'organisme creix (augmenta en llargada, volum corporal i nombre de cèl.lules) mentre que en condicions inverses, l'organisme decreix. La base d'aquest fenomen (Baguñà i Romero, 1981; Baguñà i col., 1990; Romero i Baguñà, 1991) rau en el balanç entre la mort cel.lular i la proliferació, ja que tots els tipus cel.lulars diferenciats, post-mitòtics i amb un període vital de 30-60 dies (Romero i Baguñà, 1988), són reemplaçats continuadament per diferenciació a partir de neoblasts (per a informació adicional, veure apartat 3 d'aquesta Introducció). D'aquesta manera, l'organisme creix o decreix en funció del resultat entre la taxa de mort cel.lular i la de proliferació. En condicions òptimes, la taxa de mort cel.lular es veu superada per la taxa de proliferació dels neoblasts, la qual cosa es tradueix en un creixement net de l'organisme. En condicions oposades a les òptimes, el balanç net és l'invers i es tradueix en un decreixement de l'organisme (Romero, 1987; Romero i Baguñà, 1988).

Aquesta dinàmica natural de creixement i decreixement comporta canvis en les proporcions corporals, tissulars i cel.lulars. Respecte aquests canvis cal esmentar que el volum del sistema nerviós, de la faringe i el nombre de neoblasts decreixen (proporcionalment) respecte el volum total o al nombre de cèl.lules durant el creixement dels organismes (Baguñà, 1973; Baguñà i col., 1990, per una revisió general). En canvi, la gastrodermis i el parènquima incrementen el seu volum proporcional durant el creixement. Al mateix temps s'observen canvis alomètrics de posició dels teixits i òrgans respecte l'eix antero-posterior durant el creixement i decreixement. D'aquesta manera, per exemple, els ganglis cefàlics i la faringe es veuen desplaçats

Introducció

anteriorment durant el creixement (proporcionalment respecte la longitud total de l'organisme).

Els fenòmens de creixement i decreixement junt amb els canvis en les proporcions corporals descrits a planària suposen, en cert sentit, uns processos d'envelliment (creixement) i rejuveniment (decreixement) continuats que han de suposar una despesa energètica elevada (que malgrat tot és molt rentable ja que els permet sobreviure en èpoques desfavorables; Romero, 1987) i una regulació d'aquests fenòmens molt important. El/s mecanisme/s de regulació dels canvis alomètrics observats en proporcions corporals, tisulars, cel·lulars i de posició durant el creixement i decreixement a planària no són coneguts, malgrat potser podria existir a planària una substància equivalent al "factor d'activació de proporcions" (Proportion activating factor, PAF), descrit a cnidaris per Plickert (1990), actuant d'una manera molt fina sobre els fluxes de diferenciació dels neoblasts en les diferents posicions de l'organisme.

2.2 - Regeneració

Les planàries tenen també una gran capacitat de regeneració, de vital importància per a les races asexuals ja que que l'utilitzen com un dels passos de la seva reproducció (apartat 1.1). Es un fenomen que, tot i que ha estat força estudiat i que ha generat moltes controvèrsies, presenta encara actualment diverses qüestions obertes. En aquesta línia cal esmentar els treballs pioners de Morgan (1901), els treballs de Pedersen (1958), Kido (1961), Wolff (1962), Bronsted (1969), Baguñà (1973), Saló (1984) Romero (1987) i les revisions generals de Gremigni (1988) i Baguñà i col. (1988, 1990).

Dels mecanismes generals de regeneració (**epimòrfic**: on totes les noves estructures provenen de la regió del blastema de regeneració, i adoptat pels amfibis en regenerar extremitats; **morfalàctic**: on totes les noves estructures es formen dins els territoris preexistents del regenerant, i adoptat pels celenterats), s'ha proposat per planària un model mixte epimòrfic-morfalàctic (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984). En aquest model, el patró d'estructures es forma morfalàcticament en una estreta banda de teixit (0-500µm) a la zona adjacent a la ferida i que abarca un període de 0 a 2 dies. Aquest patró d'estructures apareixeria en aquesta banda de forma simultània o en ràpida seqüència.

Emprant tècniques de transplantament, es va establir que la determinació de la regió cefàlica en regenerants anteriors es fa entre les 6-24 hores a 17°C, i la de la faringe entre les 12 i 36 hores. En el període comprès entre els dies 3 i 8 de regeneració, aquest patró d'estructures es veu amplificat i modulat per la formació d'un blastema de regeneració, que porta implícits fenòmens de proliferació, migració i diferenciació cel.lular, i que donaria un caràcter epimòrfic a la regeneració. De fet, potser no hi ha diferències tant clares entre el model epimòrfic i el morfolàctic com tradicionalment s'ha pensat que ajudarien a integrar-los en un sol model epimòrfic-morfolàctic o, com apunta Espinosa (1993) en el cas concret de la regeneració de la faringe a planàries, un model "encara no epimòrfic / ja no morfolàctic".

La seqüència de successos durant la regeneració a planària seria la següent (fig. 4): quan es talla transversalment una planària a qualsevol nivell de l'eix antero-posterior, es produeix una ràpida i forta contracció muscular de les fibres circulars i longitudinals properes a la ferida. Les cèl.lules epitelials que hi ha en els epitelis propers a la ferida s'extenen per damunt de les cèl.lules parenquimàtiques formant un epiteli de 1µm de gruix que cicatritza la ferida en 30-45 minuts (Saló, 1984; Ribas i Baguñà, 1986). A partir d'aquest moment, i amb més intensitat a partir de les 6-12 hores, es van acumulant neoblasts sota aquest epiteli de cicatrització. Aquests neoblasts provenen de les zones properes del parènquima, on es formen a partir d'altres neoblasts per divisió cel.lular. Aquest acúmulo de neoblasts forma el blastema de regeneració que és visible ja a les 24 hores.

El nombre de cèl.lules del blastema va creixent fins a estadis tardans de la regeneració. Aquest creixement no es produeix per activitat mitòtica de les cèl.lules del blastema (Morita i Best, 1984; Saló i Baguñà, 1984) sinó que es produeix per l'entrada contínua de cèl.lules indiferenciades des del postblastema (zona del regenerant propera al blastema) (Saló i Baguñà, 1989).

Les estructures que manquen al regenerant comencen la seva diferenciació dins el blastema i postblastema a partir del 3^{er} dia de regeneració, i les proporcions correctes dels diferents òrgans i teixits s'assoleixen a partir de la 2^{na}-4^{ta} setmana (Saló, 1984). Aquest temps no depèn tant sols de la temperatura de regeneració, sinó també del nivell de tall del regenerant, sent més lenta la regeneració caudal

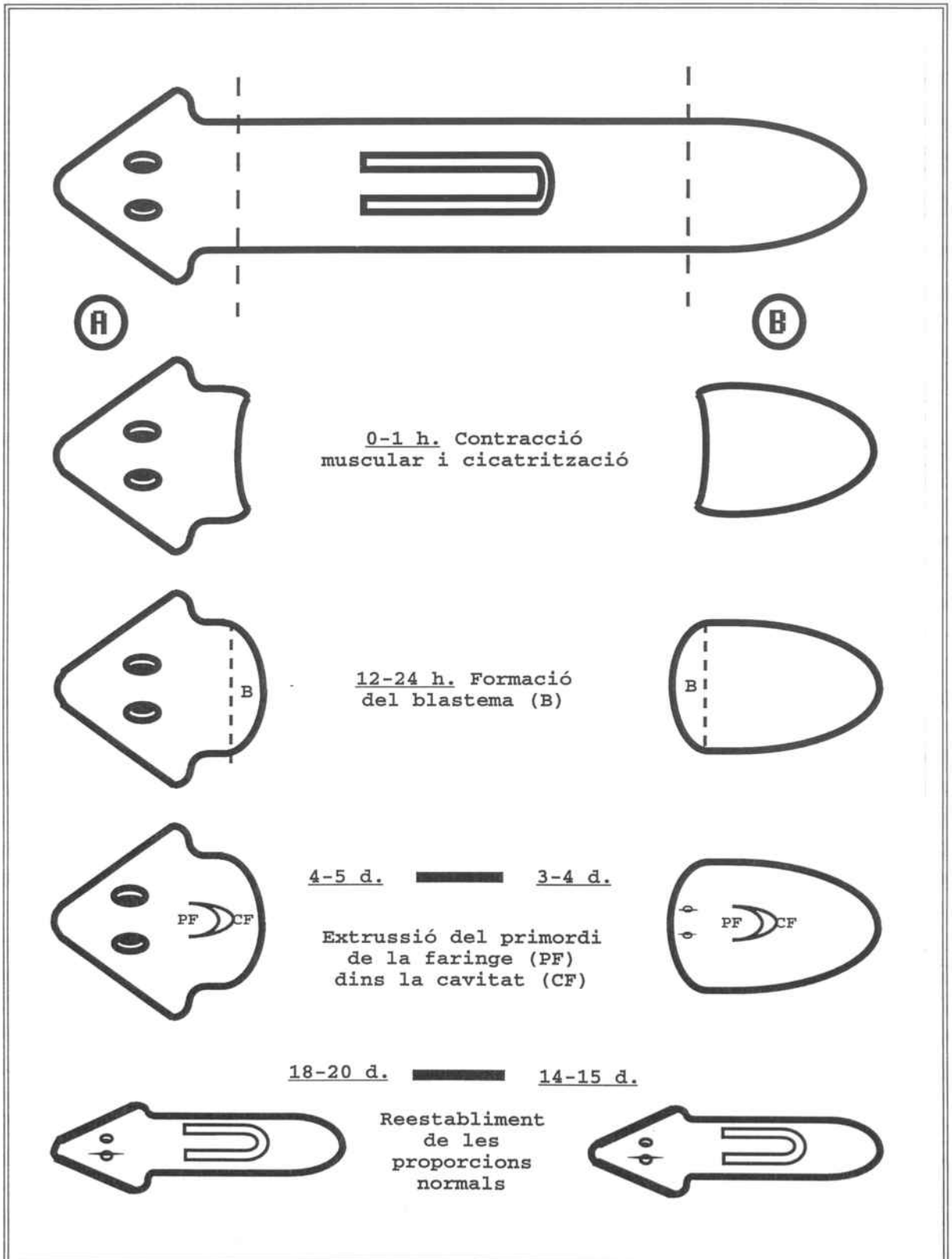


Fig. 4: Esquema de la regeneració en planària: A) regeneració caudal d'un cap regenerant. B) regeneració cefàlica d'una cua regenerant.

en caps regenerants (fig. 4a) que la regeneració cefàlica en cues regenerants (fig. 4b).

Respecte l'origen de les cèl.lules del blastema, hi ha l'opinió generalitzada de que totes les cèl.lules que el formen provenen de cèl.lules indiferenciades del regenerant (Baguñà, 1981; Saló, 1984; Baguñà i col., 1989), o si més no la majoria. De totes maneres, i fins que no s'emprin els marcadors adients, no es poden descartar fenòmens restringits de desdiferenciació i/o transdiferenciació (Gremini, 1988).

Una qüestió que queda encara sense resposta malgrat totes les dades que es tenen, és com es manté la polaritat anteroposterior i com es determinen les estructures en l'ordre i la posició correctes al llarg d'aquest eix. Es poden establir tres grans grups de models sobre el manteniment d'aquesta polaritat:

1) Els que suposen l'existència d'un substrat estructural, ja sigui en forma de polarització cel.lular individual o bé, tal i com proposa Bronsted (1969), que el sistema nerviós, amb les seves diferències quant a nombre de neurones al llarg de l'eix anteroposterior, pugui ser la base de la polaritat cefalo-caudal a planària.

2) Els que suposen interaccions cel.lulars entre regions frontera, que postulen que s'estableixen valors posicionals per interaccions cèl.lula-cèl.lula entre regions frontera, com descriu Maden (1977) per les extremitats d'amfibis. Segons Chandebos (1980) l'epidermis podria ser la regió frontera a planària, de forma que la polaritat vindria donada pel tipus de recobriment epidèrmic de la zona de la ferida en la regeneració (dorsal en regeneració anterior i ventral en posterior).

3) Els que suposen l'existència de gradients de diferents característiques, com de metabolits (Child, 1911), d'induccions-inhibicions (Wolff i col., 1964), de reacció-difusió (Gierer i Meinhardt, 1972), dels quals s'han elaborat models matemàtics cada cop més complexos i tenint presents diferents factors, com el de Cummings (1990) o com el model de control del patró de *pair-rule* en *Drosophila* per reacció-difusió en un sistema de quatre morfògens (Lacalli, 1990).

A d'altres organismes han estat detectats alguns d'aquests morfògens, com és el cas del producte del gen *bicoid* (*bcd*) o del morfogen *dorsal* (*dl*) en l'embriogènesi de *Drosophila*, que induiria diversos teixits en trobar llocs d'unió amb diferents activitats i per

interacció amb altres molècules com el bHLH (Jiang i Levin, 1993). En altres casos, com l'àcid retinoic endogen en l'extremitat de pollet, està encara en discussió si és un morfogen produït per les ZPA (centre d'activitat polaritzant), o si les ZPA són induïdes per l'àcid retinoic i elles indueixen les cèl.lules veïnes per interaccions cèl.lula-cèl.lula (Wanek i col., 1991; Noji i col., 1991; Bryant i Gardiner, 1992; Tamura i col., 1993). I, finalment, en alguns sistemes s'especula sobre l'existència de gradients de morfògens o d'informació posicional per interaccions cèl.lula-cèl.lula mitjançant dades indirectes, com és el cas de *Caenorabditis elegans* amb l'expressió del gen *mab-5*, que podria actuar com a mediador d'un gradient d'informació posicional (Kenyon, 1986) donant identitat a les cèl.lules de la regió posterior del cos, o del producte de *Chox-4* en pollet (Nohno i col., 1991), que manté un senyal posicional induït per un hipotètic gradient. Més clara semblaria l'existència d'un gradient de morfogen en el desenvolupament de les taques oculars de papallones (French i Brakefield, 1992).

Durant el procés de regeneració, aquests tres grups de models implicarien respectivament: 1) la reestructuració del substrat estructural; 2) el reestabliment de la regió frontera distal a l'extrem del blastema seguit de la intercalació dels valors posicionals per interaccions cèl.lula-cèl.lula; o 3) el reestabliment dels gradients de morfogen dins el territori del regenerant i l'establiment dels gradients dins el blastema.

També s'ha de tenir present l'actuació de gens amb seqüències homeòtiques, ampliament distribuïts pels diferents Filums, ja que molts d'ells estan involucrats en el control de la formació del patró, i en la determinació i diferenciació cel.lular, (Gehring, 1987; Bürglin, 1993 per a una revisió general).

Malgrat totes aquestes dades en altres organismes i sistemes i al fet que s'hagin aïllat gens amb homeobox i POU-box a planària (Garcia-Fernandez i col., 1991; Miralles, 1992; Saló i col., 1993; Orii i col., 1993) no es coneixen encara els gens ni molècules implicades en aquest procés en planària ni els seus mecanismes d'actuació. De fet, és molt probable que el mecanisme real de determinació i manteniment de la polaritat antero-posterior sigui una combinació d'elements dels diferents models, com ja avançava Wolff i col. al 1966 en combinar els models de regió frontera i gradients d'activadors-inhibidors per planària, on potser caldria donar també algú paper al sistema nerviós (que actua com a neuroendocrí).

3 - EL NEOBLAST, LA CEL.LULA SOCA

Els neoblasts, cèl.lules indiferenciades totipotents i pluripotents (Dubois, 1949; Wolff, 1962; Bronsted, 1969; Baguñà, 1973, 1981; Baguñà i Romero, 1981; Ehlers, 1985), amb una morfologia típica (cèl.lules petites i arrodonides, amb una relació volum nucli / volum cel.lular molt alta), representen un 20-30% del total cel.lular, depenent de la grandària corporal, la temperatura i l'estat d'alimentació (Baguñà i Romero, 1981).

Estan distribuïts per tot el parènquima de la planària sense formar cap teixit especial, excepte en la faringe on, al menys en els 2/3 distals, no s'ha detectat la seva presència (Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981). Aquesta distribució pel parènquima no és, però, uniforme, sent més baixa en zones cefàliques que en zones mitjanes-caudals, la qual cosa ajuda a explicar perquè els caps regenerants prenen més temps a refer les estructures perdudes que les cues regenerants.

Els neoblasts poden ser considerats com autèntiques "cèl.lules soca" (stem cells) segons la definició de cèl.lula soca de Potten i Loeffler (1990) que figura en la seva revisió sobre aquest tema. Segons aquests autors, una cèl.lula soca definida pels seus atributs funcionals és aquella cèl.lula indiferenciada capaç de:

- a) proliferar
- b) automantenir-se
- c) produir un gran nombre de cèl.lules diferenciades en la seva progènie
- d) regenerar un teixit després d'una lesió
- e) mostrar flexibilitat en el compliment de les anteriors premisses.

Malgrat les dificultats en definir acuradament molts d'aquests termes, els neoblasts compleixen totes aquestes premisses:

- a) Formen el compartiment proliferatiu de planària, en contraposició al compartiment funcional o diferenciat format per la resta de tipus cel.lulars, tots ells diferenciats i aparentment sense capacitat de proliferació (Baguñà, 1981; Baguñà i col, 1983).

Introducció

- b) S'autorrenoven per mitosi.
- c) Tots els tipus cel.lulars de planària provenen dels neoblasts per diferenciació.
- d) Regeneren totes les estructures perdudes en una lesió.
- e) Els fluxes de diferenciació/proliferació/regeneració estan finament regulats en funció de factors extrínsecs (ambientals) i intrínsecs (estat de l'organisme). (Per a una revisió general, veure Baguñà i col., 1990).

En sistemes de renovament cel.lular més estudiats i coneguts de mamífers, com l'hematopoiètic, el de l'epiteli intestinal i el de l'epidermis, la major part d'aparents cèl.lules soca no són tals sinó que es troben en el compartiment d'amplificació amb una limitada capacitat de autorenovament. En l'epidermis de mamífers, per exemple, sols el 10% dels queratinocits són autèntiques cèl.lula soca. La resta, un 90%, es troben en compartiments d'amplificació (50%) o en estadis postmitòtics dirigits cap a fases terminals de diferenciació (40%). En el sistema hematopoiètic menys del 0.4% són autèntiques cèl.lula soca (Hall i Watt, 1989, per a una revisió general).

Seguint aquestes mateixes consideracions, la població de neoblasts morfològicament tipificats (el 20-30% del total cel.lular) pot ser un conjunt molt heterogeni de cèl.lules. Efectivament, més del 50% de neoblasts són postmitòtics (Baguñà, 1973) i sols el 10% estan en G2 (Saló i Baguñà, 1984). Una anàlisi morfomètrica i funcional dels neoblasts (Auladell, 1990) i una comparació amb d'altres sistemes amb característiques similars indica que només un 3-5% d'ells són autèntiques cèl.lules soca.

Fig. 5: Hipotètics models de llinatge cel.lular durant el renovament cel.lular a planàries. A) Model d'amplificació simple sense determinació de llinatges i amb diferenciació estocàstica de cèl.lules potencialment equivalents cap a qualsevol tipus cel.lular diferenciat. B) Model d'amplificació de compromís progressiu dels progenitors amb autorenovament cel.lular incert (sageta circular). *S*, neoblast veritable; *C*, inici del compromís dels progenitors, mantenint un determinat grau de pluripotencialitat; *C1-2* ..., progressiu compromís de les cèl.lules envers diversos llinatges i subllinatges; *sageta gruixuda*, indica hipotètics fenòmens de desdiferenciació; *doble sageta gruixuda*, indica hipotètics fenòmens de transdeterminació. Models extrets i modificats de Baguñà i col. (1990).

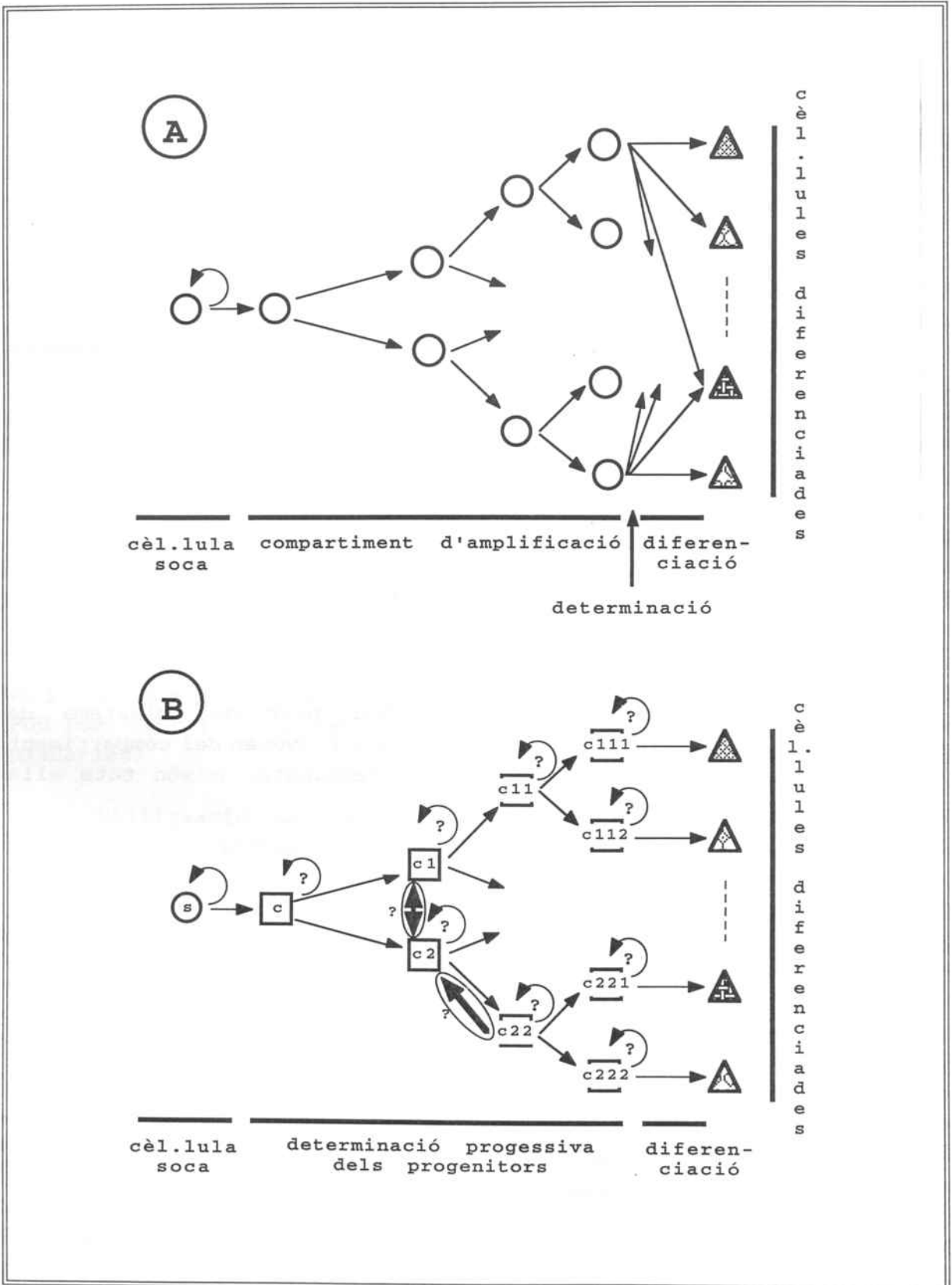


Fig.5

Hi ha encara moltes preguntes sense resposta en el sistema de renovament cel.lular de planària (fig. 5):

- Les cèl.lules del compartiment d'amplificació, són potencialment equivalents i es determinen i diferencien al final d'aquest compartiment (fig. 5a), o pel contrari segueixen uns llinatges marcats des del moment en que entren al compartiment d'amplificació (fig. 5b)?

- Si segueixen uns llinatges ben marcats, quins són aquests llinatges?

- Existeixen fenòmens, encara que en una baixa freqüència, de desdiferenciació a planària (fig. 5b, sageta gruixuda)? Si és així, fins a quin estadi del compartiment d'amplificació és això possible?

- Existeixen fenòmens, encara que en una baixa freqüència, de transdeterminació a planària (fig. 5b, doble sageta gruixuda)? Si és així, fins a quin estadi del compartiment d'amplificació és això possible?

- Els neoblasts que van a formar part del blastema de regeneració, són autèntiques cèl.lules soca o provenen del compartiment d'amplificació? Si és així, estan ja determinats, o són tots ells equivalents?

4 - ESTRATEGIES D'ESTUDI EN BIOLOGIA DEL DESENVOLUPAMENT

Per intentar endinsar-nos en la problemàtica plantejada (formació del patró, manteniment de la polaritat, llinatges cel.lulars durant el renovament cel.lular i la regeneració, etc.) es poden utilitzar diverses estratègies, totes elles probablement efectives en determinades qüestions i problemàtiques en d'altres. Algunes d'aquestes estratègies poden ser:

- Marcatge cel.lular i posterior anàlisi clonal (amb molècules fluorescents lligades a dextrà, com descriuen Bryant i Fraser (1988) en discs imaginals de *Drosophila*, o amb bromdeoxiuridina (BrdU) com descriuen Plickert i Krockes (1988) en hidra).

- Anàlisi genètica per inducció de mutants (en races sexuades) (com descriuen Kenyon (1986), Chisholm (1991) i Clark i col. (1993) en hidra, o Lewis (1978) i Kaufman i col. (1980) en *Drosophila*).

- Utilització de marcadors genètics, detectant i aïllant seqüències homòlogues de gens implicats en aquestes qüestions en el DNA de planària a partir de sondes d'altres organismes (gens amb homeobox, POU-box, etc.) (com descriuen Garcia-Fernandez i col. (1991) en planàries)

- Utilització de marcadors moleculars de determinació i/o diferenciació. L'obtenció d'aquests marcadors moleculars es pot fer per:

- Detecció i aïllament de missatgers per crivellatge de llibreries de cDNA diferencials (com descriuen Liang i Pardee (1992)).

- Detecció i aïllament de polipèptids específics d'estadis cel.lulars, regions, etc. per electroforesi bidimensional (2D-PAGE) (com descriu Collet (1990) en planàries).

- Obtenció d'anticossos monoclonals que reconeguin específicament tipus, subtipus i estadis cel.lulars, regions, etc. (com descriuen Dunne i col. (1985), Schawaller i col (1988), Heimfeld i col. (1990) i Javois (1990) en hidra, Denburg (1989) en escarabat, Vielmetter i col. (1991) en carpa, o Goldhamer (1989) en tritó, entre molts altres autors).

Alguns d'aquests marcadors ja han estat detectats i aïllats. Cal esmentar els polipèptids específics de cèl.lules indiferenciades, òrgans, etc. detectats a partir d'electroforesi bidimensional (2D-PAGE) per Collet (1990), dels quals cap ha estat estudiat en detall, i els marcadors genètics aïllats per Garcia-Fernandez i col. (1991), Miralles (1992) i Burgaya (1992), cap dels quals ha donat encara informació nova sobre les qüestions aquí plantejades.

Per altra banda, intents de marcatge cel.lular (neoblasts) realitzats amb BrdU o timidina H³ a fi de fer anàlisi clonal no han reeixit amb èxit, ja que en cap cas s'ha detectat incorporació dels marcadors per part dels organismes tractats.

Donat que la immunohistoquímica ha estat emprada per identificar molècules implicades en el desenvolupament, molècules de determinació i diferenciació cel.lular, seguiment de llinatges cel.lulars, etc., a mitjans de 1988 es va obrir una nova línia dins el grup de Genètica del Desenvolupament que tenia com a objectiu obtenir anticossos monoclonals que reconeguessin tipus i subtipus cel.lulars, territoris, antígens implicats en la regeneració i en llinatges cel.lulars, antígens de determinació territorial i de determinació/diferenciació cel.lular i, en general, que poguessin ser utilitzats com a marcadors per a estudis de regeneració, establiment del patró, etc.

El poder disposar d'una col.lecció suficientment àmplia d'aquests marcadors esdevé una eina molt útil a l'hora d'intentar respondre les qüestions que aquests fenòmens plantegen. Aquest treball està emmarcat dins aquesta estratègia, en l'intent d'aportar noves eines i noves dades que ajudin a entendre-les.

5 - ELS ANTICOSSOS

Els anticossos són proteïnes del sistema immunitari (immunoglobulines, Ig) produïdes en resposta a la presència de molècules estranyes, i que tenen la capacitat de reconèixer-les i unir-se a elles (els seus antígens). Són sintetitzades per cèl.lules plasmàtiques, un estadi terminal del llinatge dels limfòcits B, i circulen a través del sistema sanguini i limfàtic unint-se als antígens estranys. Aquesta unió permet a altres tipus cel.lulars i molècules del sistema immunitari desfer-se dels antígens estranys. Estructuralment estan compostats per una o més subunitats amb una característica forma de Y. Cada una d'aquestes subunitats conté quatre polipèptids iguals 2 a 2: una parella són les anomenades cadenes pesades i l'altra les anomenades cadenes lleugeres. Depenent del nombre de subunitats i del tipus de cadenes pesades podem agrupar els anticossos en cinc grups: IgG, IgM, IgA, IgE i IgD. De tots ells, el més abundant en sang i l'utilitzat en la realització d'aquesta Tesi (veure Material i Mètodes) és el grup de les IgG.

Les IgG estan formades per una subunitat i presenten tres dominis (fig. 6a). Dos dels dominis, els Fab (ab, ja que contenen el "antigen binding site" o lloc d'unió a l'antigen), són idèntics i formen els braços de la Y. El lloc d'unió entre els dominis Fab i el domini Fc (c ja que cristal·litza) fa la funció de frontissa, donant flexibilitat a la molècula (fig. 6b) (per a revisions generals sobre el tema, veure: Galli, 1973; Amzel i Poljak, 1979; Davis i Metzger, 1983; Jeske i Kapra, 1984). El lloc d'unió a l'antigen ve donat per cada cadena lleugera associada a l'extrem aminoterminal d'una cadena pesada (fig. 6a). Les cadenes estan unides entre sí per ponts disulfur (fig. 6a).

L'especificitat que presenten els anticossos pels seus antígens és deguda a l'existència de variabilitat tant en les cadenes pesades com en les lleugeres en la zona d'unió a l'antigen. Aquesta variabilitat és deguda a recombinacions del complex gènic que codifica per aquestes immunoglobulines durant el procés de maduració dels limfòcits B (per a revisions generals sobre el tema, veure Tonegawa i col, 1977; Tonegawa, 1983).

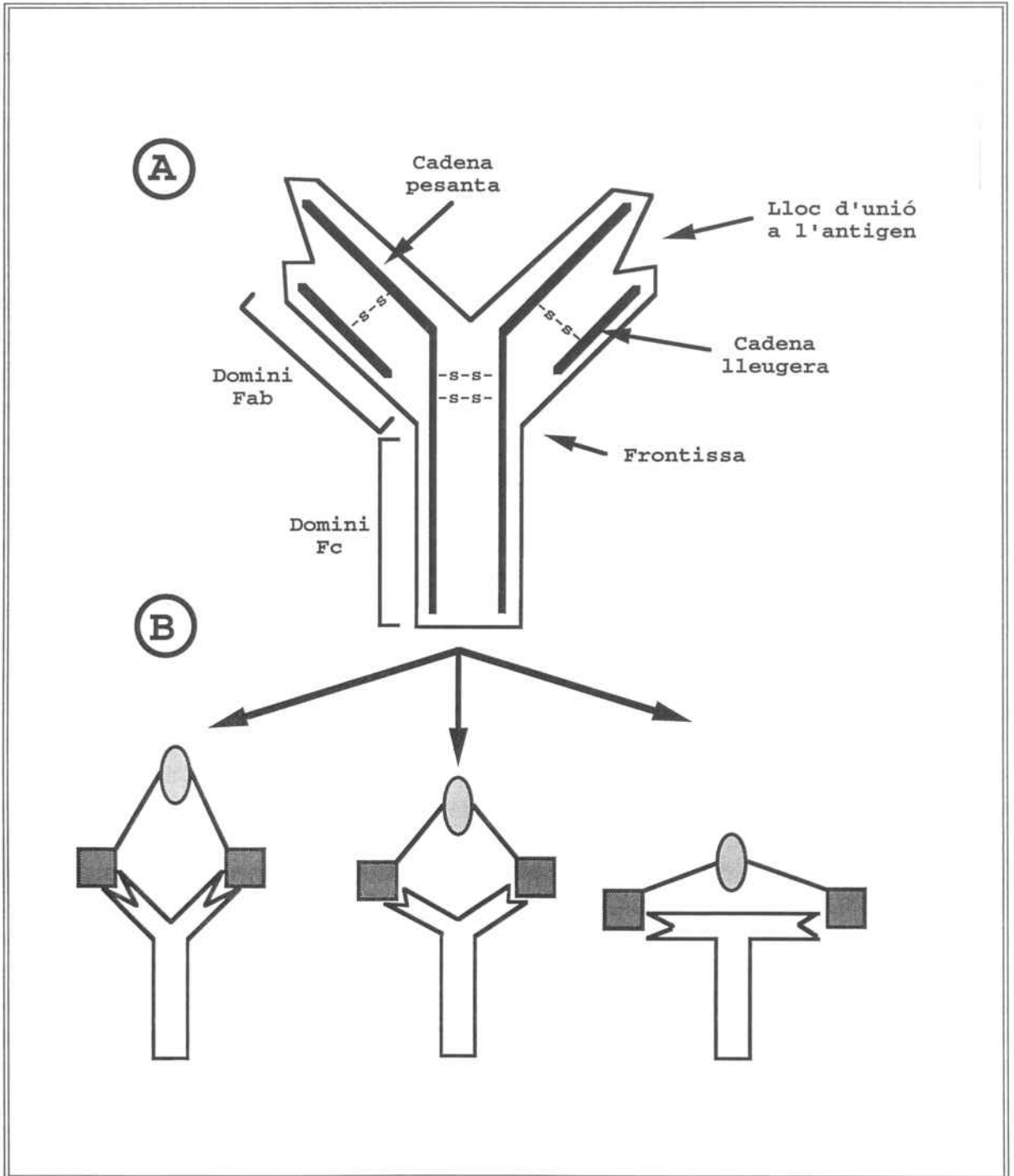


Fig. 6: Estructura i flexibilitat de les immunoglobulines. A) Estructura d'una IgG. B) Flexibilitat d'una IgG en el reconeixement de l'antigen donada per la regió frontissa. s-s, ponts disulfur.

5.1 - Concepte d'anticòs monoclonal

Cada limfòcit B activat (cèl.lula plasmàtica) que integra el sistema immunològic està capacitat per a sintetitzar anticòssos amb una determinada especificitat (Nossal i Lederberg, 1958). Cada un d'aquests limfòcits B pot generar un cló (la seva progènie cel.lular). Totes les cèl.lules d'una mateixa clona produeixen el mateix tipus d'anticòs, idèntic, amb la mateixa especificitat, constituint una població homogènia de molècules d'anticòs. Els anticòssos d'aquesta població homogènia s'anomenen anticòssos monoclonals (MAbs) (anticòssos que provenen d'un mateix cló).

5.2 - Concepte d'anticòssos policlonals

Els antisèrums convencionals estan integrats per molècules molt heterogènies, com a resultat de molts MAbs barrejats, amb diferents especificitats i pertanyents a diferents classes, subclasses i tipus d'immunoglobulines. Normalment s'obtenen per immunització d'animals amb l'antigen objecte d'estudi, i globalment reconeixen aquest antigen. Cada un dels seus determinants antigènics estimula la proliferació de limfòcits B, cada un dels quals generarà un cló de cèl.lules plasmàtiques productores d'un MAb característic (Burnet, 1957). Tots aquests MAbs barrejats donaran l'antisèrum, que serà per tant un reactiu molt complex. Aquesta complexitat de l'antisèrum junt amb la possible complexitat del sistema antigènic fan que en determinades circumstàncies (depenent de les característiques de l'antigen i del treball a realitzar) es faci necessari obtenir poblacions homogènies d'anticòssos (MAbs), amb una determinada especificitat (Kraux, 1970) (aquesta qüestió és ampliada al punt 5.4 d'aquesta Introducció).

5.3 - Obtenció d'anticòssos monoclonals

Van ser Kohler i Milstein (1975, 1976) qui van descriure el primer mètode general per a l'obtenció de MAbs, basat en la generació de cèl.lules híbrides (o hibridomes) a partir d'una cèl.lula

mielomatosa capacitada per créixer "in vitro" i un limfòcit B/cèl.lula plasmàtica, i que posseïssin les característiques de les seves predecessores: créixer "in vitro" i produir anticossos.

Es pot parlar de dos grups de mètodes per obtenir clons productors de MAb's: els de mutagènesi i els d'hibridació cel.lular.

5.3.1 - Mètodes basats en mutagènesi

En aquests mètodes s'utilitzen limfòcits B procedents d'organismes prèviament immunitzats a fi d'enriquir la població total de limfòcits B de la melsa amb els d'una especificitat particular. Aquests limfòcits B són transformats per mutagènesi o mitjançant virus per tal que adquireixin la capacitat de proliferació permanent. N'és un exemple la utilització del virus Epstein-Barr per transformar cèl.lules humanes. En un futur proper, la utilització d'oncogens pot donar noves avantatges a aquests mètodes (Jonak i col., 1988).

5.3.2 - Mètodes basats en hibridació cel.lular

Aquests mètodes, que corresponen als descrits per Kohler i Milstein (1975, 1976), es basen en la possibilitat de fusionar cèl.lules experimentalment. Originalment aquestes fusions cel.lulars es realitzaven amb l'ajut d'algun virus amb aquesta propietat (probablement deguda a la seva habilitat en penetrar membranes cel.lulars), com per exemple el virus Sendai. Actualment l'ús de virus per produir fusions cel.lulars s'ha substituït per l'ús de polietilenglicol (PEG). El mecanisme pel qual el PEG produeix fusions cel.lulars no ha estat encara plenament explicat, però té a veure amb les seves capacitats com a detergent per dissoldre els lípids de membrana. També es poden produir fusions cel.lulars amb camps elèctrics pulsants (Zimmermann, 1982), constituint un mètode més complex que el que utilitza PEG.

La fusió en sí mateixa no transforma les cèl.lules normals; segueixen vives un temps i després moren. Per tal d'obtenir MAb's

mitjançant fusions cel·lulars s'utilitza també una població de limfòcits B "enriquits" mitjançant immunització (que pot fer-se tant "in vivo" com "in vitro"). Aquests limfòcits B es fusionen amb cèl·lules d'una línia permanent, mielòmica, de manera que es combinin les propietats de síntesi d'anticòs i de proliferació permanent. Per que es combinin amb èxit aquestes dues propietats cal que els dos tipus de cèl·lules a fusionar procedixin del mateix llinatge. Així i tot, el fet que les cèl·lules fusionades o hibridomes tinguin dos o més jocs de cromosomes amb els corresponents centriols perjudica la regulació de la divisió cel·lular, fent que tant sols unes poques de les cèl·lules híbrides puguin créixer i dividir-se. Aquestes ho fan inicialment de manera irregular fins que per atzar alguns hibridomes fills es divideixin normalment sense haver perdut la capacitat de sintetitzar anticòs, donat que en aquest procés es produeixen pèrdues de cromosomes.

5.4 - Anticossos monoclonals vs anticossos policlonals

Tal i com s'esmenta als apartats 3.1 i 3.2, els MAb's estan constituïts per una població homogènia de molècules d'anticòs, mentre que els antisèrums (amb anticossos policlonals) estan integrats per molècules molt heterogènies com a resultat d'anticossos amb diferents especificitats i pertanyents a diferents classes, subclasses i tipus d'immunoglobulines. Això fa que mentre els MAb's reconeixen un sol determinant antigènic (el seu epítop) de la molècula antigènica, els antisèrums reconeixen tots els determinants antigènics que recobreixen tota la superfície de l'antigen, com a resultat de la suma de tots els anticossos que l'integren. Aquestes diferències fan que la tria entre obtenir MAb's o antisèrums sigui molt important i depengui del tipus de treball a realitzar. Hi ha set punts que convé valorar (Harlow i Lane, 1988; Peters i Baumgast, 1992, per a una revisió general):

1) Si es disposa de l'antigen que es vol immunodetectar amb un grau suficientment alt de puresa, es poden produir indistintament MAb's o antisèrums i la tria dependrà de les exigències que el treball a realitzar imposi (veure els altres punts). Si, per altre banda, no es disposa de l'antigen pur, ja sigui per que no es pot purificar suficientment o per que ni tant sols es coneixen quin antigen és (sistemes antigènics molt complexes), llavors únicament es poden utilitzar els MAb's per reconèixer antigens individuals.

Introducció

2) Si es pot utilitzar tant un antisèrum com un MAb, cal pensar que l'antisèrum és molt més econòmic (en temps, recursos tècnics i econòmics) d'obtenir que un MAb.

3) Si interessa detectar una molècula independentment de petites variacions (petites desnaturalitzacions, polimorfismes genètics, variacions en el grau de glicosilació, etc.) serà millor emprar un antisèrum. En canvi, si el que es vol és detectar petites variacions dins una mateixa molècula, l'elecció correcta serà utilitzar MABs.

4) S'ha de tenir present també que la unió antígen-anticòs en un antisèrum i la seva resistència a certs tractaments acostuma a mantenir-se estable dins un ampli marc de condicions (pH entre 4 i 9, concentració salina entre 0 i 1 M, unió a enzims o fluorocroms, etc.) ja que aquestes variacions afectaran a alguns dels anticossos integrants de l'antisèrum, però no a tots. En canvi, la unió d'un MAb al seu epítop pot veure's fortament afectada per algun d'aquests canvis. El mateix es podria considerar pels efectes del emmagatzematge, possibilitat de que es produeixin autoagregats, solubilitat, activitat biològica, etc.

5) La presència de reaccions creuades també ha de ser valorada en les dues possibles vessants:

a) Les reaccions creuades que presenten els antisèrums amb altres antígens degut a possibles semblances estructurals entre alguns dels determinants antigènics.

b) Les reaccions creuades inesperades observades amb alguns Mabs no depenents d'analogies estructurals entre els antígens reconeguts són probablement degudes a analogies estructurals no demostrades (Lane i col., 1982) o bé al fet que un mateix Mab pot reconèixer epítops diferents (unió multiespecífica, Richards i col., 1975).

Les reaccions creuades es poden solucionar emprant MABs o absorcions sobre l'antigen que dóna aquest tipus de reacció (la qual cosa comporta una pèrdua de potència de l'antisèrum).

6) Una altra qüestió important és que els antisèrums només conserven les mateixes característiques quan formen part d'un mateix lot (entent per lot d'antisèrum l'antisèrum extret d'un animal en una extracció), ja que aquestes característiques varien durant el procés

de resposta immunitària i també entre animals diferents. En canvi, un cop clonat un hibridoma productori es poden obtenir, sempre amb les mateixes característiques, quantitats teòricament il·limitades del Mab que produeix.

7) Finalment, en els assajos "in vivo" en que es vulguin utilitzar, per exemple, els anticossos com agonistes en receptors o bé marcar molècules sense modificar la seva activitat (per tant, lluny del domini funcional), no s'utilitzaran els antisèrums i s'haurà de recórrer a l'ús dels MAbs.

L'elecció d'emprar MAbs o antisèrums per a un treball determinat dependrà, per tant, d'una anàlisi profunda de tots aquests factors. En aquest treball, aquesta anàlisi porta a la utilització de MAbs donat que es parteix d'un sistema antigènic complex del qual no es coneixen quines són les substàncies implicades en els processos de determinació, diferenciació cel·lular, regeneració, etc.

OBJECTIUS

Objectius metodològics:

- 1) Posar a punt i optimitzar les tècniques de producció d'anticossos monoclonals per tal de ser utilitzats com a marcadors a planària.
- 2) Posar a punt les tècniques immunoquímiques (immunohistoquímiques i immunocitoquímiques) aplicades a planària.

Objectius d'aplicació a curt i llarg termini:

3) Obtenir hibridomes productors d'anticossos per ser utilitzats com a eines moleculars a fi d'immunodetectar els diferents tipus cel·lulars de planària, l'existència de possibles subtipus (poblacions) cel·lulars, determinants antigènics específics de regions i estadis de regeneració.

4) Obtenir una bateria suficientment àmplia d'hibridomes productors d'anticossos que puguin ser emprats en aquest i altres treballs com a marcadors moleculars per abordar els diferents aspectes del desenvolupament a planària:

- renovament cel·lular
- llinatges cel·lulars
- regeneració
- determinació, formació i manteniment del patró axial
- detecció i caracterització de substàncies implicades en aquests fenòmens i aïllament dels gens implicats

5) Portar a la monoclonalitat aquells hibridomes que es considerin especialment interessants per l'especificitat dels anticossos que produeixin.

6) Fer la caracterització fonamental de l'especificitat dels anticossos que hagin estat portats a la monoclonalitat mitjançant les tècniques de crivellatge immunoquímiques i immunocitoquímiques escaients.

7) Aplicar com a marcadors en el procés de regeneració en organismes regenerants els anticossos monoclonals obtinguts que puguin tenir més rellevància.

Objectius

8) Realitzar, en aquells casos en que es consideri especialment significatiu, la caracterització bàsica dels antígens reconeguts pels anticossos monoclonals obtinguts.

9) Inferir dades sobre els mecanismes de renovament cel.lular, regeneració, determinació, formació i manteniment del patró axial a partir dels resultats obtinguts.

MATERIAL I METODES

6 - ESPECIES I MANTENIMENT

6.1 - Espècies

S'han utilitzat especímens d'una raça assexuada de l'espècie *Dugesia(G)tigrina* (Girard) (Filum Platielminthes, Classe Turbellaria, Ordre Seriata, Subordre Tricladida, Infraordre Paludicola, Família Dugesidae, Subgènere Girardia) capturats en la riera de Calders al seu pas per Monistrol de Calders, pertanyents al biotip A d'aquesta espècie (Ribas, 1990). En alguns casos molt concrets s'han emprat també organismes d'altres espècies de planària d'aigua dolça (*Dugesia(S)mediterranea* i *Dugesia(S)polichroa* del subgènere Schmidtea, *Dugesia(D)ibèrica* i *Dugesia(D)gonocephala*, ambdues del subgènere *Dugesia*, *Dendrocoelum lacteum* i *Planaria torva*), especímens de planària marina (*Discozelis tigrina*, de l'Ordre Polycladida), organismes de l'Ordre Rhabdocoela i de l'Ordre Digenia (*Fasciola hepatica*, Classe Trematoda), tots ells pertanyents al Filum Platielminthes. S'han utilitzat també organismes d'altres Filums, com del Filum Nemertinea (*Prostoma s.p.*), Filum Arthropoda (*Drosophila melanogaster*, Classe Insectes), del Filum Molusca (*Mytilus edulis*) i del Filum Chordata (*Gallus domesticus*, Classe Avia), tots ells provinents de l'àmbit dels Països Catalans, així com organismes d'una raça sexuada de *Dugesia(G)tigrina* provinents de l'Uruguay.

6.2 - Condicions de manteniment

La població de *Dugesia(G)tigrina* es manté en cubetes de vidre de 1-5 litres de capacitat en aigua mineral comercial, en la foscor i a una temperatura constant de 4-6°C. Els organismes són alimentats amb fetge de vedella un cop cada 3-4 setmanes, i se'ls canvia l'aigua immediatament després de la ingesta i al cap de 12 hores. Tots els especímens emprats en els diversos protocols porten un mínim de 15 dies de dejú per tal d'estandaritzar el seu estat metabòlic (Baguñà, 1976) i per tal d'evitar la presència de restes de menjar en els seus cecs intestinals que poguessin interferir amb els antigens propis de

l'organisme. A més a més, els individus utilitzats no presenten mai cap ferida ni blastema de regeneració, exepte en els experiments de regeneració (apartat 6.3), per tal que no es modifiqui quantitativament ni qualitativa els antígens presents.

Cada 3-5 mesos, temps en que s'esgota la població procedent d'una captura, es fa una de nova. Durant les captures, les planàries són recollides amb cura de sota les pedres, fulles i tiges on habiten amb petits pinzells i són transportades al laboratori en bidons amb l'aigua del lloc on habiten. Un cop al laboratori, es posen en cubetes de vidre, es netegen per tal de treure els altres organismes i es substitueix progressivament (durant 3 a 5 dies) l'aigua del riu per aigua mineral a fi d'evitar la seva lisi, al mateix temps que es porten a la temperatura de manteniment.

6.3 - Obtenció de regenerants

Tots els regenerants s'obtenen en condicions estandaritzades, tallant planàries de 7-9 mm pels nivells de tall proposats per Saló (1984) (fig.7), als quals s'hi ha afegit tres nivells més. Els nivells de tall són els següents: A'', sobre les taques oculars; A', a la base de les taques oculars; A, a la base del cap, just sota les aurícules; C, a la zona prefaríngia; D, a la zona postfaríngia; E, a la zona caudal; i F, a la base de la faringe, afectant-la tant sols a ella.

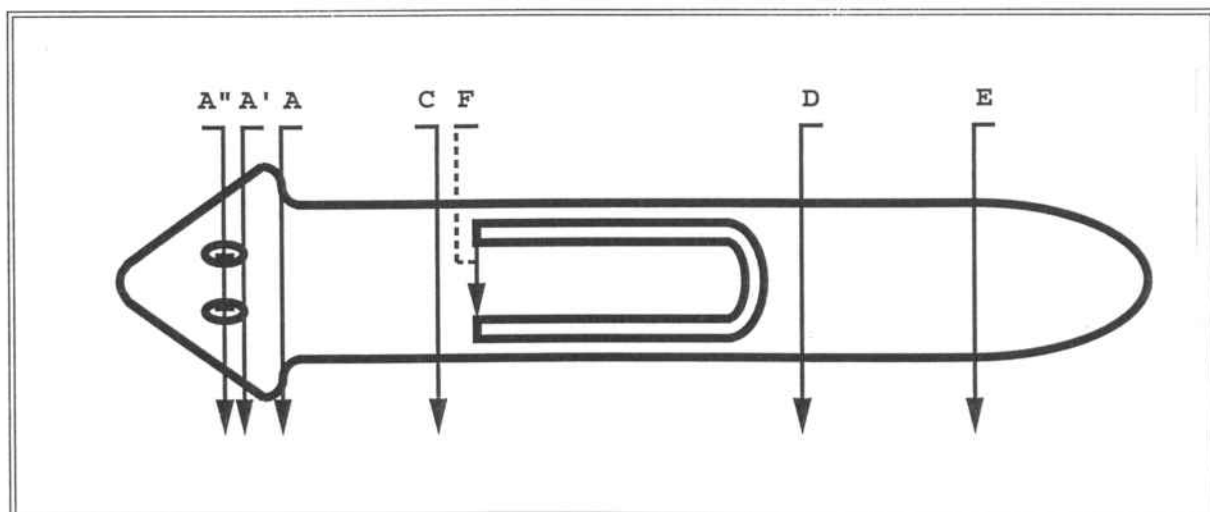


Fig. 7: Esquema dels nivells d'obtenció de regenerants.

Un cop els organismes són tallats es mantenen a $21 \pm 1^\circ\text{C}$ o bé a $17 \pm 1^\circ\text{C}$ depenent dels experiments en aigua mineral amb $50 \mu\text{gr/ml}$ de gentamicina, per evitar possibles infeccions, sense ser alimentats. Entre els dies 0 i 10 de regeneració i a intervals de 12-24 hores (depenent del nivell de tall i de l'estadi de regeneració) els regenerants són fixats per fer estudis immunohistoquímics, o bé són homogenats per obtenir antígens a les 0.5, 1, 3 i 48 hores de regeneració.

6.4 - Alteracions del patró mitjançant agents químics

Organismes intactes i regenerants de nivell E han estat tractats amb 1,2-dioctanoyl-*sn*-glicerol (DG, Sigma), amb àcid araquidònic (AAq, Sigma) i àcid retinòic (AR, Sigma).

El tractament amb AAq i/o DG s'ha fet segons el procediment descrit per Müller i col. (1993). El DG ha estat subministrat a una concentració final de 0.1mM i 0.5mM obtinguda a partir d'una solució mare 100mM en etanol, i l'AAq a una concentració final de 0.1mM a partir d'una solució mare 100mM en metanol, sent dissoltes en l'aigua de manteniment.

El tractament s'ha fet dissolent l'AR en l'aigua en que es mantenen els organismes a una concentració final de 0.5mM a partir d'una solució mare 100mM en etanol (Denker i col., 1990; Utsumi, 1990; Ferreti i col., 1991), en lloc de ser subministrat impregnant boles microtransportadores amb AR i insertant-les en l'organisme receptor, com descriu Wanek i col. (1991).

En tots els casos s'han fet polsos diaris de 2 hores a 17°C en un volum d'aigua que permetés el contacte entre l'agent químic, que queda a la part superior, i els organismes. Després de cada pols se'ls canvia l'aigua i es mantenen a aquesta mateixa temperatura. Els controls s'han fet amb organismes tractats amb la mateixa concentració final de solvent (etanol o metanol, segons els casos).

7 - TIPUS D'IMMUNOGENS UTILITZATS

7.1 - Immunògens emprats

Els immunògens emprats per l'obtenció d'anticossos monoclonals han estat els següents:

- a) Homogenats totals o parcials
 - Antígens totals de planària (apartat 7.2.1)
 - Antígens totals de caps de planària (apartat 7.2.1)
 - Antígens totals de caps de planària fixats (apartat 7.2.1)
 - Antígens totals de faringes de planària (apartat 7.2.1)
 - Antígens totals de blastemes de regeneració (apartats 7.2.1 i 7.2.2)

- b) Macerats cel.lulars
 - Macerats cel.lulars (apartat 7.2.3)
 - Antígens totals obtinguts de macerats cel.lulars (apartat 7.2.1 i 7.2.3)
 - Macerats cel.lulars: població enriquida en neoblasts (apartats 7.2.3 i 7.2.5)

- c) Dissociats cel.lulars
 - Dissociats cel.lulars (apartat 7.2.4)
 - Dissociats cel.lulars: població enriquida en neoblasts (apartats 7.2.4 i 7.2.5)
 - Antígens totals de la població cel.lular enriquida en neoblasts dissociats (apartats 7.2.1, 7.2.4 i 7.2.5)

- d) Fraccions cel.lulars
 - Membranes de la població cel.lular enriquida en neoblasts dissociats (apartats 7.2.4, 7.2.5 i 7.2.6)
 - Nuclis de la població cel.lular enriquida en neoblasts dissociats (apartats 7.2.4, 7.2.5 i 7.2.6)

- e) Antígens enriquits
 - Antígens totals de planària enriquits per absorció sobre anticossos monoclonals ja generats (apartats 7.2.1 i 7.2.8)

- Antígens totals de la població cel.lular enriquida en neoblasts dissociats enriquits per absorció sobre anticossos monoclonals ja generats (apartats 7.2.1, 7.2.4, 7.2.5 i 7.2.8)
- Antígens totals de la població cel.lular enriquida en neoblasts dissociats enriquits per absorció sobre anticossos monoclonals ja generats conjugats a BSA (com a haptens) (apartats 7.2.1, 7.2.4, 7.2.5, 7.2.8 i 7.2.9)
- Fraccions proteiques específiques de neoblasts (o majoritàries de neoblast) obtingudes mitjançant SDS-PAGE (apartat 7.2.7)
- Fraccions proteiques específiques de sistema nerviós (o majoritàries de sistema nerviós) obtingudes mitjançant SDS-PAGE (apartat 7.2.7)

7.2 - Obtenció de immunògens

7.2.1 - Antígens totals de planària

Els antígens de planària s'han obtingut per sonicació (homogeneització) en fred (4°C) a partir de planàries intactes, blastemes de regeneració, caps de planària, caps fixats de planària (veure protocol de fixació, apartat 11.3.1), fraccions enriquides de neoblasts i macerats cel.lulars en tampó fosfat salí 100mM (PBS; apartat 17). L'homogeneització per sonicació s'ha fet en tres polsos de 30 segons cada un amb un sonicador Sonifier B-12 (Branson Sonic Power Company), a una potència de 30 Watts, en intervals de 2-3 minuts entre ells i mantenint la mostra en gel per tal que la temperatura d'aquesta romanguí constant.

7.2.2 - Antígens de blastemes de regeneració

Els blastemes de regeneració s'obtenen a partir de planàries regenerants a diversos temps i nivells de regeneració tallant la zona

del blastema i homogenant-los segons el mètode descrit a 7.2. Els temps de regeneració han estat 0.5 hores, 1 hora, 3 hores 1 dia, 2 dies i 3 dies, moments en els que hi ha un pic de síntesi de RNA i proteïnes (Saló, 1984). Els nivells de regeneració han estat el C i el D. Els regenerants de menys d'un dia s'han injectat per separat depenent del temps de regeneració i de si la regeneració és cefàlica o caudal, i els de 1 o més dies de regeneració s'han injectat conjuntament independentment del temps de regeneració i del nivell de tall.

7.2.3 - Macerats cel.lulars

Organismes tractats amb una solució de clorur de cisteïna (CysCl) a l'1% en PBS (pH 7) durant 1 minut a temperatura ambient a fi d'eliminar la mucositat. Es renten amb PBS i es posen a macerar a temperatura ambient amb solució maceradora aquosa (Baguñà i Romero, 1981; apartat 17) i a una concentració de 4 planàries/ml. A les 2 hores s'agita molt suaument el flascó per separar les cèl.lules, ja macerades, sense que es trenquin. Per eliminar la solució maceradora (ja que aquesta provocaria la mort dels animals immunitzats), es centrifuguen a 200g 10 minuts, s'elimina el sobrenedant i es resuspenen en PBS. Els macerats cel.lulars així obtinguts poden ser injectats directament (apartat 8), homogenats (apartat 7.2.1) o enriquits en determinats tipus cel.lulars (apartat 7.2.5).

7.2.4 - Dissociats cel.lulars

Organismes tractats amb CysCl seguint el mateix procediment que per a l'obtenció de macerats cel.lulars són tallats en trossos petits (tant petits com sigui possible) en una solució lliure de calci i magnesi (CMF; Baguñà 1973; apartat 17) i es deixen agitant per inversió en un agitador orbital de 2 a 12 hores a 4°C. Després de deixar reposar el contingut del flascó uns minuts perquè sedimentin les restes de teixit, es recupera el sobrenedant i es centrifuga a 200g durant 10 minuts. Es treu el CMF (sobrenedant) i es resuspenen les cèl.lules dissociades amb el tampó escaient. Aquestes cèl.lules poden ser injectades directament (apartat 8), homogenades (apartat 7.2.1) o enriquides en determinats tipus cel.lulars (apartat 7.2.5).

7.2.5 - Poblacions cel.lulars enriquides en neoblasts

Cèl.lules provinents de dissociats o macerats cel.lulars (en CMF o solució maceradora aquosa respectivament, per evitar la formació d'agregats) són filtrades per malles de porus de diàmetre decreixent segons el protocol descrit per Saló (1984) fins arribar a malles amb porus de 10 µm de diàmetre (180 µm, 50 µm, 20 µm i 10 µm (x2)). D'aquesta manera tant sols les partícules de menys de 10 µm passaran a través de l'última malla, sent aquestes majoritàriament neoblasts. Vesícules i restes cel.lulars passen a través d'aquesta última. Tanmantaix algunes cèl.lules musculars i cèl.lules nervioses poden travessar-la si ho fan longitudinalment. Per tal d'evitar que les cèl.lules es trenquin, es fa passar la suspensió cel.lular per gravetat a través de la malla muntada en un portafiltres. Amb aquest procediment es poden obtenir pureses de neoblasts superiors al 80% (Auladell, 1990).

D'altra banda, si hi ha una gran abundància de vesícules i altres restes cel.lulars en la suspensió final, situació que no es dona gairebé mai en macerats cel.lulars però és freqüent en dissociats cel.lulars, es convenient treure'ls de la suspensió donat que aquests antígens, i molt especialment els de les vesícules amb un alt contingut glucídic, són molt immunogènics i desviarien la resposta immune cap a ells (K. Assai, comunicació personal). L'eliminació d'aquestes restes cel.lulars es fa mitjançant una purificació per gradients discontinus de Ficoll 400 (Pharmacia). Es prepara Ficoll 9%, 6% i 3% en CMF a pH 7.2-7.4 i es diposita per aquest ordre en un tub de centrífuga, amb cura de no trencar les interfases que es van formant. Es dipositen els dissociats cel.lulars prèviament filtrats en malles sobre el Ficoll 3% i es centrifuga a 2000g durant 45 minuts a 4°C. Els neoblasts, retinguts a la interfase 6-9% (Saló, 1984; Auladell, 1990) per la seva densitat, són recollits amb una pipeta Pasteur, centrifugats a 2500g i resuspendos en el tampó escaient per immunitzar (apartat 8) o homogenar (apartat 7.2.1).

7.2.6 - Membranes i nuclis de neoblasts

Poblacions de neoblasts enriquits (80%) pel mètode de filtració seqüencial (apartat 7.6) provinents d'un dissociat cel.lular són centrifugats (200g, 15 minuts, 4°C) per reemplaçar el tampó. El pellet

és resuspès en tampó borat pH 11 (apartat 17) amb agitació suau per tal de produir petits trencaments a la membrana cel·lular. Es fa una primera centrifugació a 2000g durant 20 minuts a 4°C per fer sedimentar els nuclis. El sobrenedant, un cop separat del pellet, es centrifuga a 41000g a 4°C durant 1 hora per que sedimentin les membranes. Tots dos pellets (els nuclis provinents de la centrifugació a 2000g i les membranes provinents de la centrifugació a 41000g) són resuspesos en PBS, quedant a punt per ser injectats (apartat 8).

7.2.7 - Fraccions proteiques obtingudes mitjançant gels d'electroforesi (SDS-PAGE)

Per tal d'obtenir fraccions proteiques diferencials de neoblasts i cèl·lules nervioses, descrites per Collet (1990) mitjançant tècniques electroforètiques (SDS-PAGE, 2D-PAGE), s'obtenen poblacions de neoblasts enriquits (80%) per filtració seqüencial (apartat 7.6) i ganglis cefàlics per dissecció. Aquests són homogeneitzats segons el protocol descrit per Collet (1990):

1) Congelar les mostres en tampó de solubilització (TITX; apartat 17) amb inhibidors de proteases (EDTA 2 mM, Mn Cl₂ 1 mM, Leupeptina, 0.5 µgr/ml, PMSF 150 µgr/ml) dins un tub Eppendorff per immersió en N₂ líquid, i descongelar-les al mateix temps que s'homogeneitzen amb una vareta de vidre, fent vibrar tot el conjunt sobre un vortex i repetint aquest procés (congelació-descongelació-homogeneització) 3 cops.

2) Centrifugar l'homogenat a 20000g durant 30-45 minuts a 4°C per eliminar les restes cel·lulars.

3) Barrejar l'homogenat amb el tampó de càrrega (Laemmli, 1970; apartat 17) i posar-lo en un bany a 100°C durant 5 minuts.

4) Centrifugar 1 minut a 20000g i carregar en el gel d'electroforesi (SDS-PAGE, concentrador 4% acrilamida-bisacrilamida, separador 12% acrilamida-bisacrilamida; apartat 17) (els protocols d'electroforesi estan àmpliament comentats a l'apartat 13.1).

Al mateix temps, i amb el mateix protocol, s'obté un homogenat de faringes i cues de planària, com a controls de "no-neoblast" i "no-nerviós" respectivament, per tal de comparar el patró de bandes proteiques i cercar bandes diferencials. Les farínges són emprades com

a control de no-neoblast ja que és l'únic òrgan de planària amb una quasi total absència de neoblasts (Baguñà, 1974).

Un cop corregut el gel es tenyeix amb Comassie Brilliant Blue R-250 (el protocol de tinció amb Comasie Brilliant Blue R-250 està comentat a l'apartat 13.2), i les bandes obtingudes de Neoblast/"no-Neoblast" i Nerviós/"no-Nerviós" són comparades. Les bandes diferencials obtingudes, amb diferències quantitatives i no qualitatives (amb concordança amb els resultats obtinguts per Collet (1990), veure Resultats), són tallades amb una fulla de bisturí i homogenades en presència de PBS dins un homogeneitzador de vidre (Tracy i col., 1983) quedant en condicions de ser injectades en l'organisme a immunitzar. Aquestes bandes diferencials s'han obtingut a partir de gels d'una dimensió donada la dificultat d'obtenir una suficient reproductibilitat en gels de dues dimensions.

7.2.8 - Absorció d'antígens sobre anticossos monoclonals i policlonals ja generats

Antígens totals de planària o antígens totals provinents de poblacions de neoblasts dissociats obtingudes per filtració seqüencial (apartat 7.2.5) són obtinguts per homogeneització (apartat 7.2.1) i absorbits sobre anticossos monoclonals ja generats per tal d'extreure del conjunt total d'antígens aquells responsables d'una major resposta immune per part de l'organisme immunitzat. Es potencien així aquells antígens menys immunogènics. El protocol seguit és una modificació del mètode "en cascada" (Campbell, 1984; Thalhamer i Freund, 1984). Anticossos monoclonals que reconeixen antígens molt immunogènics o majoritaris provinents de fusions anteriors són fixats en una placa microtiter d'ELISA 12 hores a 4°C. Els llocs actius lliures dels pous de la placa són saturats amb una solució de llet desnatada en pols (Molico, Nestlé) al 5% en PBS durant 2 hores a 37°C. Es renta la placa tres cops amb tampó de rentat (MTP; apartat 17) i aquesta s'incuba amb l'homogenat molt diluït, per tal de no saturar els llocs d'unió dels anticossos, durant 2 hores a 37°C. Es recull el sobrenadant dels pous i es concentra per liofilització, quedant a punt per a la immunització.

7.2.9 - Conjugació d'haptens a BSA

Antígens procedents de poblacions de neoblasts obtingudes pel mètode de filtració seqüencial (apartat 7.6) homogeneitzades per sonicació (apartat 7.2) i absorbits sobre anticossos monoclonals ja generats (apartat 7.9) han estat conjugats a BSA (emprats com haptens) per potenciar aquells antígens molt poc o gairebé gens immunogènics (haptens), ja sigui per la seva conformació o pel seu tamany (Harlow i Lane, 1988). Es segueix el protocol descrit per Catty i Raykundalia (1988) i per Harlow i Lane (1988) que utilitza glutaraldehyd com agent de conjugació. A una solució de 10 mgr/ml de BSA (0.15 M aproximadament) s'afegeix glutaraldehyd, per "activar-lo", a una concentració final del 5% (condicions saturants), i es manté 2 hores a 4°C agitant-se en un orbital. Es separa el glutaraldehyd sobrant amb una columna de Sephadex G-25 (Pharmacia), i s'afegeix l'haptè a una molaritat similar. Es manté 2 hores a 4°C agitant-se en un orbital, quedant ja a punt per a la immunització.

8 - IMMUNITZACIO

8.1 - Espècie i soca immunitzada

S'han emprat ratolins (*Mus musculus*) de la soca Balb/C mantinguts en condicions d'estabulament standard i constants per a les immunitzacions, l'obtenció d'anticossos policlonals, l'obtenció de limfòcits B/cèl.lules plasmàtiques productores d'anticossos, l'obtenció de cèl.lules acompanyants ("Feeder-layer"), l'obtenció de sèrums preimmunes i per a la generació de tumors ascítics (per aspectes legals sobre la manipulació i utilització d'animals, cal consultar la legislació vigent).

8.2 - Rutes d'introducció dels immunògens

L'elecció de la ruta d'introducció d'immunògens ve condicionada per tres factors: 1) volum a injectar; 2) tampons i altres components que acompanyin l'immunogen; i 3) rapidesa a la que es desitja que arribi l'immunogen a la circulació i òrgans limfàtics (Allen, 1967). En el cas de ratolins, volums grans d'immunògens sols poden ser injectats intraperitonealment vagin o no acompanyats d'adjuvant (veure apartat 8.3 per als diversos aspectes de l'adjuvant). Amb volums petits, l'injecció es pot fer via intravenosa. Si el què es vol és un alliberament lent i progressiu de l'immunogen, la millor ruta d'introducció és la intramuscular o intradermal (per a una revisió general sobre rutes i tècniques d'injecció, veure Herbert i Eristen, 1986; i Poole, 1987).

La ruta emprada per a l'obtenció dels anticossos monoclonals descrits en aquesta Tesi és majoritàriament la intraperitoneal i en alguns casos la intravenosa. Les diferències entre els resultats obtinguts en aquestes dues rutes estan exposats a Resultats i posteriorment discutits.

Les injeccions intravenoses es realitzen punxant la vena de la cua amb una agulla de diàmetre igual o inferior a 0.5 mm i injectant volums de l'ordre de 10-25 µl mentre es manté el ratolí en un petit contenidor del qual només surt la cua. Les injeccions intraperitoneals es duen a terme fent arribar l'agulla a la cavitat intraperitoneal per la base de l'abdomen, en sentit postero-anterior, mentre es manté el ratolí ben subjectat per la part dorsal. El diàmetre de l'agulla depèn del tipus d'immunogen a injectar (cèl.lula sencera o no) i/o de si va acompanyat d'adjuvant. Per injectar cèl.lules senceres o immunògens acompanyats d'adjuvant o acrilamida s'utilitzen agulles de 0.8-0.9 mm de diàmetre, i pels altres casos s'utilitzen les de 0.5 mm de diàmetre. Els volums injectats són de l'ordre de 200-300 µl/punxada.

8.3 - Protocol de immunització "in vivo"

Els animals immunitzats han estat sempre famelles de la soca Balb/C d'unes 8 setmanes d'edat en perfecte estat de salut (Hu i col., 1990). Els protocols d'immunització emprats estan fonamentats en l'existència de 5 fases diferenciades durant la resposta immune en el decurs de la immunització (Rathjen i col., 1986):

Fase 0: abans de la immunització

Fase 1: assoliment de la màxima titolació d'anticòs durant la resposta primària

Fase 2: devallada del títol d'anticòs durant la resposta primària

Fase 3: assoliment de la màxima titolació d'anticòs durant la resposta secundària

Fase 4: devallada del títol d'anticòs durant la resposta secundària

Les fases 3 i 4 es van repetint cada cop que s'indueix una nova resposta secundària per immunització, assolint-se cada cop una titolació més alta d'anticòs durant la fase 3 fins a l'assoliment del plató màxim (fig. 8). Els clons específics més productors s'aconsegueixen a l'inici de la resposta secundària (fase 3), i el

major nombre de clons específics s'aconsegueixen en respostes secundàries successives.

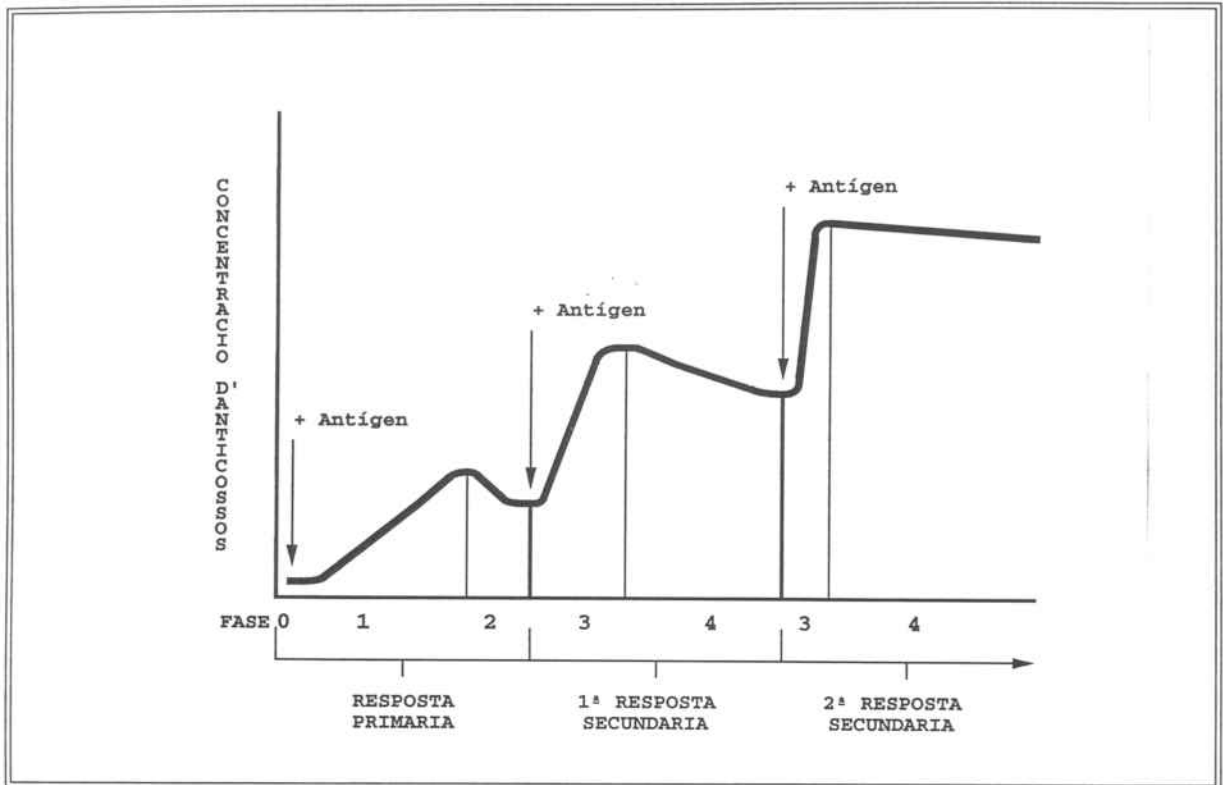


Fig. 8: Fases de la resposta immunitària en funció de la concentració d'anticossos en sèrum.

Seguint aquestes generalitats, els protocols d'immunització emprats consten d'una immunització primària (fase 0, 1 i 2) seguida d'un mínim de 2 immunitzacions de recordatori inductores de resposta secundària (fase 3 i 4) amb 10-20 dies de separació entre elles (10 dies per les immunitzacions ràpides i 20 dies per les lentes, segons criteris de Peters i Baumgasten (1992)). 10-20 dies després de l'últim recordatori, s'immunitzen novament els ratolins 2-3 cops en 2-3 dies consecutius, amb la finalitat d'incrementar al màxim el nombre de limfòcits productors específics. L'endemà de l'última immunització es procedeix al sacrifici del ratolí, extracció de la melsa i fusió cel.lular (apartat 9). En tota la sèrie d'activació de la resposta immunitària s'injecta 20-100 μ gr d'immunogen per injecció, depenent de la disponibilitat de l'antigen, o bé unes 10^6 cèl.lules quan s'empen cèl.lules senceres com a immunogen.

La immunització primària i els recordatoris successius es fan intraperitonealment, mentre que les 2-3 últimes immunitzacions consecutives es fan intraperitonealment en algunes immunitzacions i

Material i Mètodes

intravenoses en d'altres (veure Resultats). Aquestes últimes s'han fet sempre tenint l'immunogen únicament en PBS, excepte aquelles en que s'injecten bandes proteiques provinents de gels d'electroforesi (SDS-PAGE) on l'antigen va sempre acompanyat d'acrilamida. En canvi, la immunització primària s'ha fet en algunes fusions tenint l'antigen únicament en PBS i en d'altres en PBS i Adjuvant Complert de Freund (ACF) 1:1, emulsionats per sonicació (30 Watts, 30 segons). Les immunitzacions de recordatori (a l'interfase 2-3) s'han fet també en algunes fusions tenint l'immunogen solament en PBS i en d'altres en PBS i Adjuvant Incomplert de Freund (AIF) 1:1, emulsionats per sonicació (30 Watts, 30 segons).

L'adjuvant de Freund (Freund i McDermott, 1942; Freund, 1957) és una emulsió d'aigua en oli preparada amb olis minerals no metabolitzables que indueixen febre i reaccions locals d'inflamació que ajuden a estimular el sistema immunitari. L'ACF (Difco) porta a més a més bacteris de l'espècie *Mycobacterium tuberculosis* inactivats per calor.

8.4 - Protocol d'immunització "in vitro"

Per a la immunització "in vitro" s'ha seguit el protocol descrit per Campbell (1985). A un ratolí de 8 setmanes d'edat s'injecta l'immunogen per via intraperitoneal a fi d'activar els limfòcits B. El mateix dia que són activats els limfòcits B del ratolí, s'extreuen 5 timus de ratolins de 4-6 setmanes d'edat de la mateixa soca. Es disgreguen pel mateix procediment que les melses (apartat 9.4) i es mantenen durant 15 dies amb medi DMEM suplementat amb 20% de sèrum fetal boví (FCS) (veure apartat 9.1 pels medis) i 5×10^{-5} M de β -mercaptoetanol (5×10^6 cèl.lules/ml) en una placa de Petri de 10 ml tractada per cultiu cel.lulars.

15 dies després de la immunització i de l'inici del cultiu de timòcits, s'extreu la melsa en condicions estèrils, es disgrega (veure l'apartat 9.4 per a l'obtenció de limfòcits B), es neteja per centrifugació i es manté en una placa de Petri per cultius cel.lulars de 10 ml amb medi de cultiu DMEM suplementat amb un 10% de FCS (veure apartat 9.1 pels medis de cultiu).

A la placa amb limfòcits B s'afegeix un volum igual de sobrenedant del cultiu de timòcits i immunogen homogenat en alcohol absolut (per esterilitzar-lo) a una concentració de 5 µgr/ml. 5 dies després es procedeix a la fusió cel.lular (apartat 9.5).

9 - OBTENCIO D'HIBRIDOMES PRODUCTORS D'ANTICOSSOS

9.1 - Medis de cultiu

Els medis de cultiu emprats tenen com a base el medi essencial DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, Gifco) suplementat amb diversos aditius en funció de les cèl.lules a cultivar:

a) Per als rentats cel.lulars (limfòcits B, hibridomes i mielomes) així com per les fusions, s'empra únicament medi DMEM.

b) Per al manteniment de les soques mielòmiques, el medi DMEM és suplementat amb 2mM de glutamina (Sigma), 1mM de piruvat sòdic (Sigma), 2% d'aminoàcids no essencials (Gifco) i 0.1% de gentamicina i amb un 15% de sèrum fetal boví (FCS, Myoclon, Gifco) al que prèviament s'ha inactivat el Complement (30 minuts a 56°C), (**DMEM complet**).

c) Per al cultiu d'hibridomes un cop feta la selecció, s'empra el medi DMEM amb els mateixos aditius que per al cultiu de les soques mielòmiques i a més a més 0.1mM d'hipoxantina (Fluka), 0.016mM de timidina (Sigma) i 0.003mM de glicina (Sigma) (**medi HT**).

d) Per a fer la selecció de les cèl.lules híbrides després de la fusió s'empra medi DMEM suplementat com el medi HT i a més a més 1% de metotraxat sòdic parenteral (Cyanamide Ibèrica) o bé d'aminopterina (Gibco) (**medi HAT**).

e) Per a seleccionar les cèl.lules mielòmiques a fi d'evitar la presència de revertents, s'empra medi DMEM complet suplementat amb 0.1mM de 8-azaguanina (Sigma).

Tots els aditius que s'afegeixen al medi DMEM, que ve en condicions estèrils, són esterilitzats per filtració mitjançant un filtre de 0.22 µm exepete el FCS (que també ve en condicions estèrils). Quan el medi està convenientment suplementat, es testa en plaques de cultiu per tal de garantir l'esterilitat.

9.2 - Soques mielòmiques emprades

Inicialment es van emprar 2 soques mielòmiques parentals diferents, la soca NP3 cedida pel Dr. Enjuanes (CBM-UAM) i la soca NS1 cedida pel Dr. Vilella (Dep. Immunologia, Hosp. Clínic Provincial de Barcelona), ambdues defectives per l'enzim Hipoxantin Guanin Fosforibosil Transferasa (HGPRT(-)), no secretores d'immunoglobulines i obtingudes a partir de soques Balb/C. Els percentatges d'obtenció d'hibridomes, amb els protocols emprats (apartat 9.5), eren lleugerament superiors utilitzant mielomes de la soca NS1 (P3-NS1-1; Vilella, 1986) (veure Resultats). La major part de fusions s'han realitzat amb cèl.lules mielòmiques d'aquesta soca.

9.3 - Manteniment de les soques mielòmiques

Les soques mielòmiques es cultiven i s'expansionen amb medi DMEM complet en càpsules de Petri de 10 ml de capacitat tractades per cultius cel.lulars. Abans que els cultius arribin a confluència, els mielomes són resuspendes amb una pipeta de 10 ml mitjançant una pistola xucladora o una pipeta automàtica P-5000 i són amplificats en noves plaques de Petri. El mieloma no utilitzat s'elimina en un bany de lleixiu.

9.4 - Obtenció de limfòcits B

Els limfòcits B (tant els procedents de melses immunitzades com els procedents de melses preimmunes que s'utilitzen com a cèl.lules acompanyants o "Feeder-layer") s'obtenen per dissecció estèril del ratolí prèviament sacrificat en una atmòsfera de CO₂. Un cop s'ha extret la melsa es posa en una placa de Petri amb medi DMEM, es neteja de possibles acúmuls de greix (especialment abundants en melses immunitzades) i s'homogenitza per pressió amb un èmbol de xeringa de plàstic. Seguidament, es posa la suspensió cel.lular en un tub de centrífuga, es centrifuga 10 minuts a 800g i es resuspèn el pellet

(limfòcits B) en el medi adequat, DMEM si són per fusió i HT si són per cèl.lules acompanyants (fig.9). En tots els casos, els medis han de ser preescalfats al bany Maria a 37°C.

9.5 - Protocol d'obtenció d'hibridomes (fusió cel.lular)

Inicialment es va emprar el protocol descrit per Nowinski i col. (1979) i modificat per Sanz i col. (1985). Degut al baix rendiment d'hibridomes que s'obtenien es decidí adoptar desde la 5^{ena}. fusió i fins a l'actualitat una modificació del protocol descrit per Galfre i col. (1977) i revisat per Harlow i Lane (1988) (fig. 9).

1) Es resuspenen cèl.lules mielòmiques en fase de creixement exponencial, es centrifuguen 10 minuts a 800g i es resuspenen en medi DMEM per tal de treure el FCS (ja que aquest dificulta la fusió cel.lular).

2) Al mateix temps, s'obtenen limfòcits B de la melsa immunitzada (apartat 9.4) i es resuspenen en medi DMEM un cop centrifugats 10 minuts a 800g.

3) Es barregen els limfòcits B i les cèl.lules mielòmiques en un tub de centrífuga a raó de 3:1 (aproximadament 150×10^6 limfòcits B i 50×10^6 cèl.lules mielòmiques) i es centrifuguen 10 minuts a 800g.

4) Es treu el sobrenedant i es descompacta el pellet donant una sèrie de copets secs a la base de tub, quedant les cèl.lules a punt per la fusió pròpiament dita.

5) La fusió es realitza mantenint el tub sempre a 37°C al bany Maria i es mediatitza amb una solució de polietilenglicol (PEG-1000) 50% (v/v) en medi DMEM. El protocol està esquematitzat a la figura 9.

6) Les cèl.lules acabades de fusionar es centrifuguen ràpidament durant 10 minuts a 800g per tal de treure el PEG. Es resuspèn el pellet en medi HAT i es reparteixen amb una pipeta multicanal 200 µl de suspensió cel.lular a cada un dels pous d'una placa de cultius cel.lulars de 96 pous de fons pla (Costar). Amb la suspensió cel.lular procedent de la fusió dels limfòcits B d'una melsa immunitzada s'omplen aproximadament unes 5 plaques de 96 pous.

7) Les plaques que contenen les cèl.lules postfusió es posen en un incubador (7% CO₂, 37°C, atmòsfera humida).

temps total en minuts	temps parcial en minuts	
minut 0	1 minut	Posar 1 ml de PEG 50% en medi DMEM, gota a gota durant 1 minut, agitant el tub molt suaument.
minut 1	1 minut	Deixar reposar totalment.
minut 2	2 minuts	Afegir 2 ml de medi DMEM, gota a gota, a raó de 1 ml/min, agitant molt suaument de tant en tant.
minut 4	3.5 minuts	Afegir 7 ml de medi DMEM, gota a gota, a raó de 2 ml/min, agitant molt suaument de tant en tant.
minut 7.5	2 minuts	Afegir 10 ml de medi DMEM, gota a gota, a raó de 5 ml/min, agitant molt suaument de tant en tant.
minut 9.5		Fusió finalitzada.

Fig. 9: Protocol de fusió cel.lular: temporització i volums.

Els dies 2^{on}, 4^{art} i 6^è després de la fusió es canvien 100 µl de medi de cadascun dels pous per medi nou (HAT), a fi d'anar treient els restes cel.lulars produïts per l'alta mortalitat cel.lular (procés de selecció de les cèl.lules fusionades, apartat 9.6) d'aquesta primera setmana.

Entre els dies 10 i 14 després de la fusió, els clons d'hibridomes hauran crescut i produït suficient anticòs per fer el primer crivellatge.

9.6 - Selecció de les cèl.lules híbrides

El procés de selecció de les cèl.lules híbrides es fa en medi HAT, mantenint-se en ell fins 12-15 dies després de la fusió. En aquest procés les cèl.lules no fusionades moren: els limfòcits B moren per no ser cèl.lules immortalitzades i les cèl.lules mielòmiques moren per ser HGPRT(-) (fig. 10). Solament els híbridomes (limfòcit B + cèl.lula mielòmica) són cèl.lules immortalitzades i HGPRT(+). Per tant són les úniques que sobreviuran al procés de selecció (per una àmplia revisió dels mecanismes d'actuació del medi HAT, veure Peters i Baumgarten, 1992).

TIPUS CEL.LULAR	HGPRT	IMMORTA-LITAT	SELECCIO EN MEDI HAT
NS1	HGPRT(-)	SI	MOREN
LIMFOCIT B	HGPRT(+)	NO	MOREN EN POCS DIES
FIBROCIT	HGPRT(+)	NO	VIUEN, NO ES DIVIDEIXEN
MACROFAG	HGPRT(+)	NO	VIUEN, NO ES DIVIDEIXEN
NS1 x NS1	HGPRT(-)	SI	MOREN
LIMF.B x LIMF.B	HGPRT(+)	NO	MOREN EN POCS DIES
NS1 x LIMF.B	HGPRT(+)	SI	VIUEN I ES DIVIDEIXEN

Fig. 10: Selecció en medi HAT de les cèl.lules obtingudes postfusió.

Quan els clons d'híbridomes han crescut suficient com per fer el crivellatge (10-14 dies), se'ls substitueix la meitat del medi HAT (selectiu) per medi HT (no selectiu), i al moment de fer el clonatge (entre els dies 12 i 15 després de la fusió) es sembren únicament en medi HT (fig. 11). És convenient no deixar els híbridomes en medi HAT més de 20 dies ja que aquest comporta a més a més altres efectes que conduirien a la mort dels híbridomes (Goding, 1983).

9.7 - Clonatge dels híbridomes

Un cop seleccionats pels mètodes de discriminació (crivellatge) més escaients (apartat 11), els híbridomes productors d'anticossos considerats interessants han de ser clonats fins assolir la monoclonalitat dels anticossos que produeixen. Els híbridomes són clonats per dilució límit. Es resuspenen les cèl.lules del pou on hi ha el cló productor i es sembren en plaques de 96 pous sobre una capa de cèl.lules acompanyants, que generaran factors de creixement. Les cèl.lules acompanyants (limfòcits B preimmunes) s'extreuen de melses segons el mètode de l'apartat 9.4, i es sembren a $30-50 \times 10^6$ limfòcits B/placa de 96 pous. Aquesta capa acompanyant formarà un microclima que ajudarà a créixer els híbridomes, especialment als que siguin sembrats aïllats.

La sembra dels híbridomes es fa amb dilucions 1/2 tant en les files com en les columnes de la placa, de manera que un quadrant queda amb una concentració relativament alta d'híbridomes, dos quadrants queden amb una concentració mitjana i l'últim quadrant amb una concentració baixa d'híbridomes. Convé que aquest últim quadrant quedi amb una concentració màxima d'1 híbridoma/pou.

Quan els nous clons han crescut suficient (10-15 dies), es fa un comptatge de clons/pou i un nou crivellatge amb el sobrenedant dels cultius. Es considera que els clons són suficientment grans quan es poden veure com un punt (petit) per la part de sota de la placa, vigilant que no arribin mai a confluïr. Dels pous que donen positiu en el nou crivellatge (productors de l'anticòs en qüestió), es clonen per dilució límit aquells que tenen un nombre més baix de clons i, si pot ser, un sol cló (fig. 11).

Es considera que els anticossos que produeixen són ja anticossos monoclonals quan:

1) S'han fet 3 o més clonatges consecutius o 5 alterns en els que s'han clonat híbridomes de pous amb un sol cló.

2) A més a més tots els pous amb clons han de ser positius i tots els pous sense clons negatius.

Aquest procés de clonatge té dues finalitats. Una és assolir la monoclonalitat dels anticossos i l'altra donar el temps suficient a les cèl.lules híbrides per estabilitzar-se. Tot el procés, des de la fusió i fins que els hibridomes es poden començar a amplificar per tal de produir anticossos monoclonals en grans quantitats (apartats 9 i 10), comporta, anant tot bé, un mínim de 3-4 mesos.

9.8 - Crioconservació cel.lular

Els hibridomes productors d'anticossos que no són clonats però que es considera poden ser d'interès en altres treballs, així com les rèpliques dels hibridomes clonats i els stocks de cèl.lules mielòmiques són emmagatzemats per congelació en N₂ líquid.

Les cèl.lules destinades a ser crioconservades són resuspeses del pou de cultiu, centrifugades 10 minuts a 800g i resuspeses en una solució 10% DMSO (dimetil sulfòxid) en FCS. Es posen en un tub de crioconservació (Nunc) un mínim de 24 hores a -70°C dins un contenidor de plàstic expandit a fi de que es congelin molt a poc a poc. Passat aquest temps, s'emmagatzemen definitivament en un contenidor de N₂ líquid.

9.9 - Descongelació de línies cel.lulars

Per descongelar les diferents línies cel.lulars tant d'hibridomes com de mielomes, es treuen del contenidor de N₂ líquid i, amb celeritat, es descongelen al bany Maria a 37°C. Un cop descongelats, es centrifuguen 10 minuts a 800g, es resuspenen en el medi de cultiu escaient i es sembren en plaques de cultiu. Si cal, abans de sembrar-les es poden sembrar cèl.lules acompanyants.

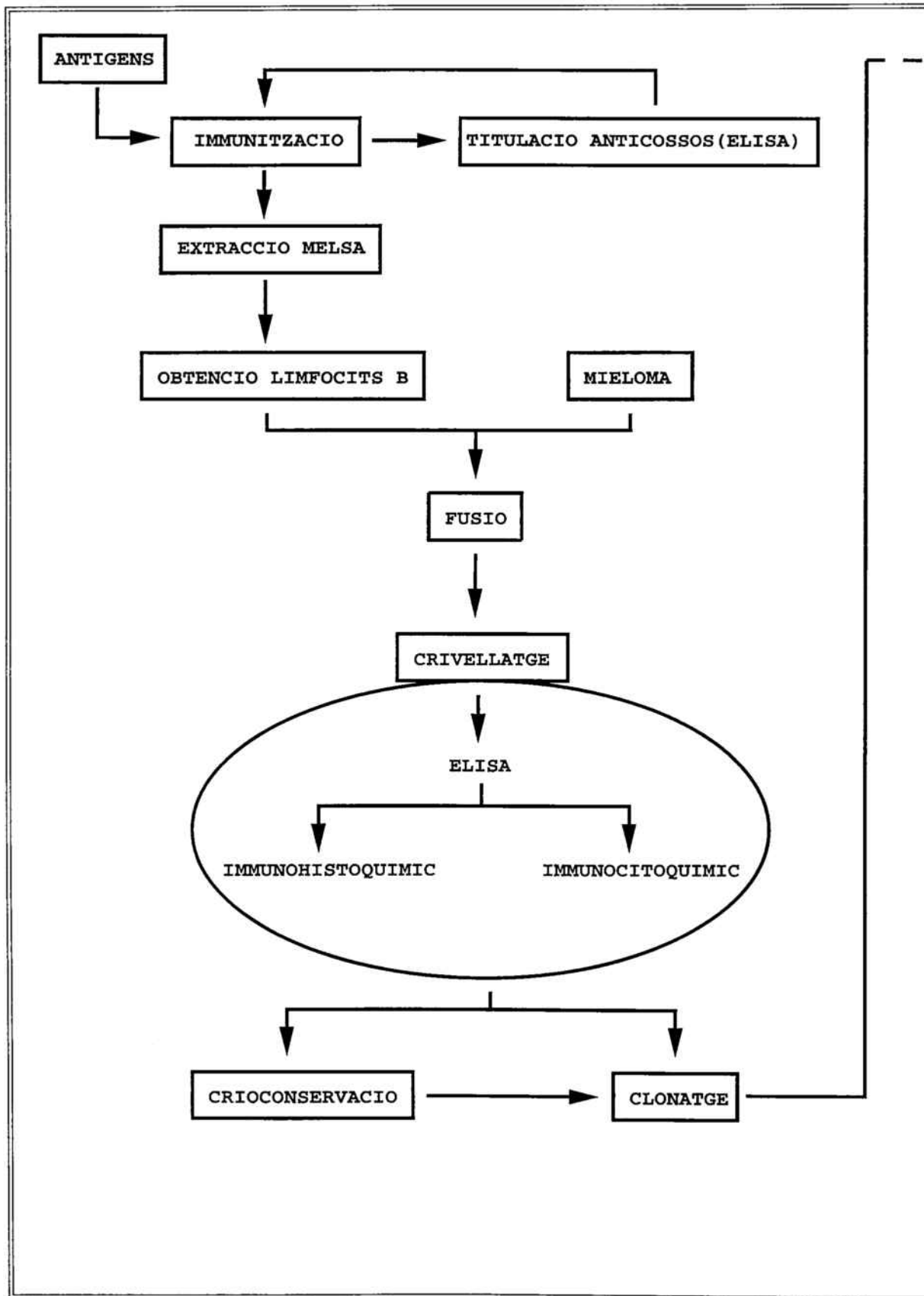
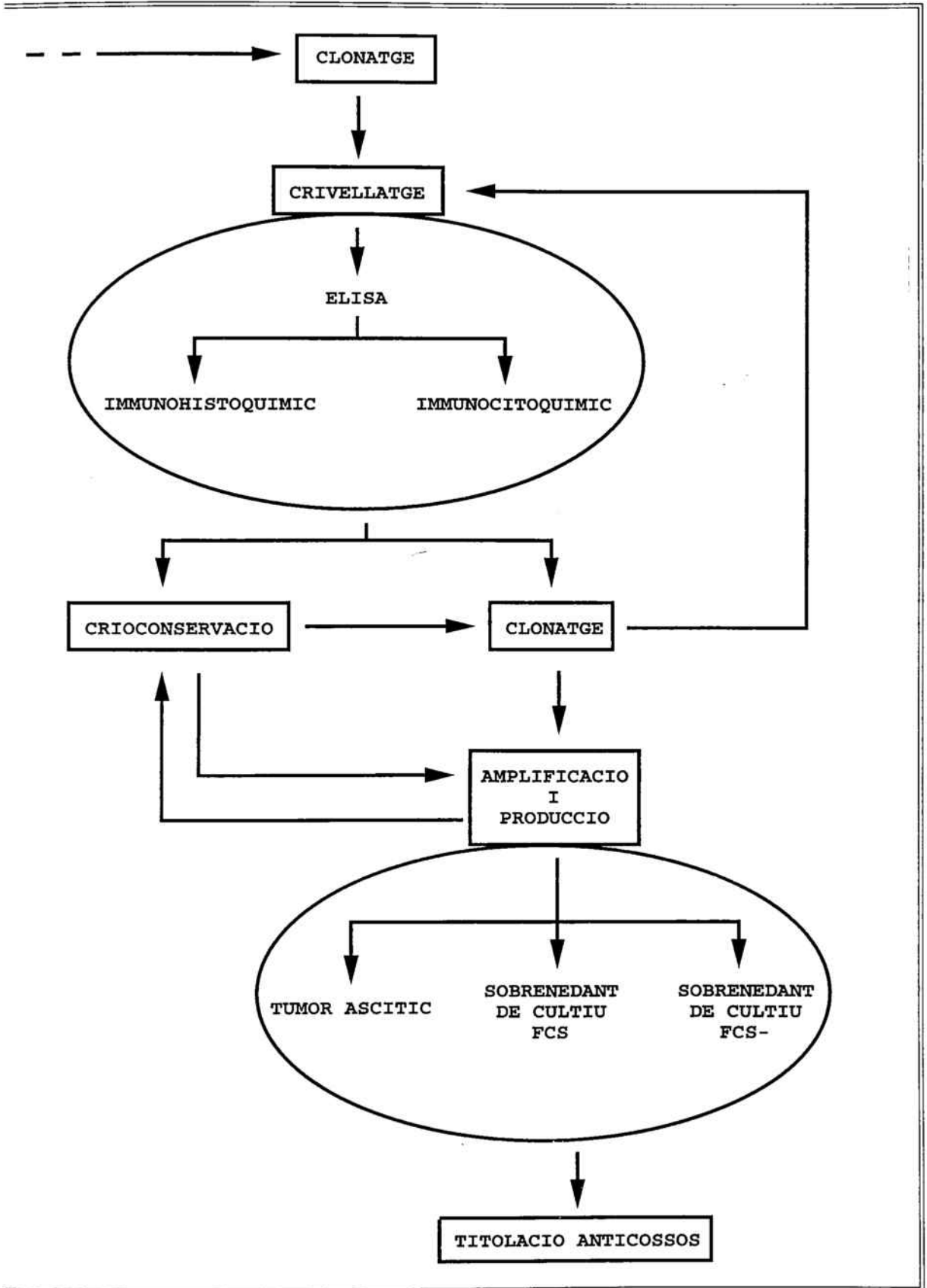


Fig. 11: Esquema general d'obtenció i producció d'anticossos monoclonals.



9.10 - Contaminacions

Encara que no freqüents, les contaminacions dels cultius no són inusuals. L'agent contaminant més freqüent, i gairebé l'únic, que s'ha detectat en la cambra de cultiu on s'han desenvolupat els d'aquesta Tesi han estat els llevats. Si la detecció es fa en un estadi de poca concentració dels llevats. Aquests poden ser eliminats en bastantes ocasions.

Es renten els pous contaminats amb medi DMEM complert, HT o HAT segons correspongui tantes vegades com sigui convenient (més de 10 - 15 cops). Es resuspenen finalment les cèl.lules i es clonen per dilució límit. D'aquesta manera és possible trobar algun pou amb hibridomes (o mielomes, segons el cas) però no llevats. Aquest pou és rescatat de la placa i clonat novament.

Les contaminacions per bacteries, molt menys freqüents a la Cambra de Cultius, es poden intentar subsanar de la mateixa manera. La concentració d'antibiòtic (gentamicina, apartat 9.1) del medi de cultiu es pot incrementar fins al doble.

En el cas de detectar la contaminació en un estat molt avançat, el millor és treure el medi dels pous afectats i substituir-lo per NaOH 1N. En tots els casos és molt convenient segellar les plaques per evitar l'avanç de la contaminació.

Un tractament especial mereixen les contaminacions degudes a micoplasmes ja que no es veuen en el microscopi invertit (són intracel.lulars) i passen per un filtre de 0.22 μm (per les especials característiques de la seva paret cel.lular). Aquest tipus de contaminació ha estat detectada en una ocasió en el decurs d'aquesta Tesi. Va ser provocada per una tanda de FCS contaminat. El primer indici de contaminació per micoplasmes es produeix quan els clons, en arribar a un nombre de 40-70 cèl.lules amb normalitat, sobtadament deixen de créixer i moren (Vilella, 1986). Si es confirma la presència de micoplasmes amb el test adequat (apartat 9.10), el millor que es pot fer és llençar tots els cultius contaminats (tractats prèviament amb lleixiu) i esterilitzar estrictament la Cambra de Cultius. Si el cultiu cel.lular afectat es considera ireemplaçable, es pot injectar a un ratolí com a tumor ascític (apartat 10.3), recuperar-lo de 7 a 15 dies més tard i sembrar-lo novament en plaques de cultiu. L'eficiència del procés, durant el qual és el propi sistema immunitari del ratolí el que

elimina els micoplasmes, s'acosta al 80% (Harlow i Lane, 1988). Aquest mateix procés es pot fer també amb cultius contaminats per altres soques bacterianes o per llevats.

L'esterilització de la cambra de cultius per prevenir contaminacions massives s'ha fet periòdicament amb vapors de paraformaldehíd i per sulfatació de tots els aparells amb sulfat de coure 10%.

9.11 - Test de micoplasmes

El test emprat és el de tinció amb colorant Hoechst 33258 (Harlow i Lane, 1988). Es treu el medi de cultiu de la placa o pou de cultiu on es vagi a fer el test, es renta dos cops amb PBS sense que es resuspenguin les cèl.lules i s'incuba 10 minuts a temperatura ambient amb àcid acètic 25% - metanol 75%. Es neteja la placa 3 cops amb PBS i s'incuba amb el colorant (Hoechst 33258 0.05 µgr/ml i azida sòdica 0.02% en medi DMEM) 10 minuts a temperatura ambient i en la foscor. Es neteja la placa tres cops amb H₂O d i s'observa a una longitud d'ona de 360 nm. Els cultius contaminats es detecten per la tinció del DNA dels micoplasmes que s'observa com punts brillants en el citoplasma de les cèl.lules. Aquest test es realitza periòdicament per evitar danys irreparables als cultius cel.lulars.

10 - PRODUCCIO D'ANTICOSSOS MONOCLONALS

La producció d'anticossos monoclonals, un cop assolida la monoclonalitat dels mateixos, es pot fer per dues vies diferents: "in vitro" en medi de cultiu amb FCS o en medi de cultiu sense FCS, i "in vivo" mitjançant la producció de tumors ascítics.

10.1 - Producció "in vitro" en medis amb sèrum fetal boví (FCS)

Un cop assolida la monoclonalitat d'un anticòs, es resuspèn el cló productor i s'amplifica en medi HT en una placa de cultius cel.lulars de 24 pous. Abans que arribi a confluència, es resuspenen els hibridomes i es tornen a amplificar en medi HT en una placa de Petri per cultius cel.lulars de 10ml de capacitat. A partir d'aquest moment, començarà la producció de grans volums de medi amb anticòs (fig. 11). Es recull el medi de la placa de Petri just abans que els hibridomes arribin a confluència, es centrifuga 10 minuts a 1000g per treure possibles restes cel.lulars, i es congela a -20°C. Si convé es pot afegir 0.02% d'azida sòdica per tal d'inhibir el creixement bacterià i tampó (Tris HCl o PBS, pH 7.2) 1 M a una relació 1:20.

Els hibridomes que resten a la placa poden ser amplificats en medi HT (3-4 plaques noves per cada 1 placa vella) o bé es poden eliminar 1/4-2/3 dels hibridomes. Quan torni a estar apunt per arribar a la confluència, es torna a treure el sobrenedant.

10.2 - Producció "in vivo" mitjançant tumors ascítics

El protocol seguit és el descrit per Hoogenraad i Wraight (1986), revisat per Harlow i Lane (1988) (fig. 11):

1) A una femella Balb/C de 6-8 setmanes d'edat s'injecta 0.5 ml d'Adjuvant Incomplert de Freund (AIF) intraperitonealment (Lieberman

Material i Mètodes

i col, 1960; Mueller i col, 1986; Gillette, 1987) per tal d'irritar la cavitat intraperitoneal i estimular la producció de nutrients, monocits i limfocits, creant així un bon entorn pels híbridomes.

2) 7-14 dies després, s'injecten, prèviament rentats en PBS, 5×10^5 - 5×10^6 híbridomes que es trobin en fase de creixement exponencial en 0.5 ml de PBS.

3) 7-14 dies després de la injecció es pot començar a recollir fluid ascític punxant amb una agulla de 0.9 mm de diàmetre. Generalment el fluid ascític surt espontàniament degut a l'alta pressió a que es troba dins la cavitat intraperitoneal. Si no surt per pressió, es pot xuclar amb una xeringa de 5 ml. En una sola extracció d'un ratolí es poden obtenir 10 ml de fluid ascític. Es poden anar fent extraccions successives fins a la mort de l'animal.

4) Un cop extret el fluid ascític, s'incuba 1 hora a 37°C i 24 hores més a 4°C.

5) Es centrifuga a 3000g durant 10 minuts i es congela el sobrenedant a -20°C. Es pot afegir azida sòdica 0.02% i no cal afegir tampó.

La producció d'anticossos monoclonals per aquest procediment té el gran avantatge de produir anticossos a altes concentracions amb un mínim de feina i cost. Té tanmateix l'inconvenient dels efectes que un tumor ascític produeix al ratolí.

10.3 - Producció "in vitro" en medis sense sèrum fetal boví (FCS(-))

En alguns casos es fa imprescindible disposar d'anticossos monoclonals amb una puresa relativa, respecte altres anticossos contaminants, del 100% (veure apartat 15). No és aquest el cas dels anticossos monoclonals produïts amb medi amb FCS, que van acompanyats dels anticossos del FCS (apartat 10.4), ni dels anticossos monoclonals produïts "in vivo", que van acompanyats d'altres anticossos de ratolí (apartat 10.4). La producció d'anticossos monoclonals amb una puresa relativa, respecte altres anticossos del 100%, s'ha fet amb medi HT sense FCS (HT FCS(-)) (fig.11).

El procés és bàsicament el mateix que el descrit per medis amb FCS (apartat 10.1). La dificultat radica en trobar hibridomes capaços de créixer i produir anticossos en medi HT FCS-. Es sembren hibridomes en medi HT en una placa de 24 pous i, quan es troben en creixement exponencial, es substitueix progressivament el medi HT per medi HT FCS(-) (HT 5% FCS durant 24 hores, HT 1% FCS durant 24 hores, HT FCS(-)). Un cop superada l'etapa inicial de mortalitat cel.lular, cal fer un crivellatge per veure quins dels pous continuen produint anticossos. Aquest pous han de ser clonats per dilució límit en medi HAT FCS(-) per tal de separar els possibles hibridomes no productors dels productors. Després del crivellatge preceptiu, els clons productors són amplificats i el seu medi recollit segons el procés de l'apartat 10.1.

10.4 - Rendiments

Els rendiments que es poden obtenir en la producció d'anticossos monoclonals pels mètodes descrits estan especificats a la fig. 12 (Harlow i Lane, 1988).

FONT D'ANTICOSSOS	CONCENTRACIO TOTAL D'ANTICOSSOS (mgr/ml)	CONCENTRACIO D'ANTICOSSOS ESPECIFICS (mgr/ml)	ANTICOSSOS CONTAMINANTS
Medi HT	1	0.05 (5%)	anticossos de vedella
Medi HT FCS-	0.05	0.05 (100%)	no n'hi ha
Fluid ascític	1-10	0.9-9 (90%)	anticossos de ratolí

Fig. 12: Producció d'anticossos monoclonals: rendiments i puresa. Taula adaptada de Harlow i Lane (1988).

10.5 - Titolació dels anticossos

Els nivells d'anticòs (títol) s'estimen per a cada tanda d'anticòs i per a cadascun dels procediments on s'han d'utilitzar.

Per a tècniques d'ELISA (apartat 11.1), el títol d'anticòs s'estima com la dilució d'anticòs (mantenint constant l'antigen fixat a placa) que dóna un valor de densitat òptica del 50% del valor màxim.

Per procediments immunohistoquímics i immunocitoquímics el títol d'anticòs s'estima com la dilució màxima d'anticòs que dóna un senyal específic clar i nítid amb el mínim soroll de fons possible.

11 - TECNIQUES DE CRIVELLATGE DELS SOBRENEDANTS D'HIBRIDOMES

En les immunitzacions realitzades no s'ha pogut disposar mai d'un antigen pur, ja que ni tant sols es coneixien els antigens contra els quals es generaven anticossos (veure apartats 4 i 5.4 de la Introducció). Es per això que pel crivellatge dels sobrenedants de cultius s'ha utilitzat:

1^{er}) La tècnica d'ELISA (apartat 11.1) per detectar els hibridomes productors d'immunoglobulines (IgG).

2^{on}) Les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques (apartat 11.2) per determinar l'especificitat dels anticossos produïts en tots els pous que contenen hibridomes productors de IgG.

11.1 - Tècnica d'ELISA

L'immunoassaig enzimàtic (ELISA) és la tècnica que s'ha triat per posar de manifest la presència o absència d'immunoglobulines, i més concretament d'IgG, en els sobrenedants de cultius d'hibridomes. D'aquesta manera únicament passen a etapes posteriors de crivellatge (especificitat dels anticossos, fig. 11) aquells sobrenedants que continguin IgG (ja que són les immunoglobulines de producció més estable per part dels hibridomes). D'aquesta manera no s'esmercen esforços en clonar hibridomes productors d'altres immunoglobulines, especialment les IgM, que molt probablement es perderan (deixaran de ser produïdes) i donaran bastants problemes d'inespecificitat.

El mètode d'ELISA seguit està basat en el descrit per Miles i Hales (1968a,b) amb algunes modificacions. La idea general del protocol és immobilitzar en la fase sòlida els anticossos procedents del sobrenedant de cultiu. Aquests són detectats per un anticòs específic anti IgG marcat amb peroxidasa de rave (HRP) que permetrà valorar la quantitat d'anticossos del sobrenedant de cultiu amb la corresponent reacció enzimàtica (fig. 13a).

Material i Mètodes

1) S'uneixen els anticossos procedents dels sobrenedants de cultiu dels híbrids (unió no covalent) als pous d'una placa microtiter de 96 pous de Polyvinylchloride (ELISA, capacitat d'unió 300 ngr/cm², Bioreba), afegint 100 µl del sobrenedant a cada pou i incubant-los 2 hores a 37°C o 12 hores a 4°C.

2) S'espolsen les plaques per treure el sobrenedant i es saturen amb 200 µl/pou d'un excés de proteïnes (llet en pols desnatada, Molico, Nestlé, 5% en PBS) durant 2 hores a 37°C.

3) S'espolsen les plaques i es renten tres cops amb tampó de rentat (MTP; apartat 17).

4) S'incuben amb 100 µl/pou d'anticòs secundari comercial anti IgG de ratolí conjugat a HRP (cabra anti ratolí, GAM-PO, Nordic) diluït 1/5000 - 1/15000 (en funció de cada tanda) en MTP, durant 1-2 hores a 37°C.

5) S'espolsen les plaques i es renten tres cops amb MTP.

6) S'afegeixen 100 µl de solució de substrate (apartat 17) i es manté en la foscor fins que el contingut dels pous agafi una coloració adequada (20-30 minuts).

7) S'atura la reacció afegint 100 µl/pou de H₂SO₄ 4M, i es llegeix la densitat òptica en un espectrefotòmetre per a plaques microtiter (Multiskan) a 492 nm.

En alguns casos s'ha utilitzat la tècnica d'ELISA unint a la placa els antigens reconeguts pels anticossos monoclonals. En aquests casos, el protocol és el mateix però amb el pas previ d'unió de l'antigen a la placa (2 hores a 37°C o 12 hores a 4°C) i amb la saturació entre els passos d'unió de l'antigen i la incubació amb l'anticòs primari (1-2 hores a 37°C) (fig. 13b).

Fig. 13: Esquema de la detecció immunoquímica mitjançant la tècnica d'ELISA.
A) Detecció de la presència d'anticossos independentment de la seva especificitat. B) Detecció de l'especificitat dels anticossos o de la presència de l'antigen reconegut en una barreja antigènica.

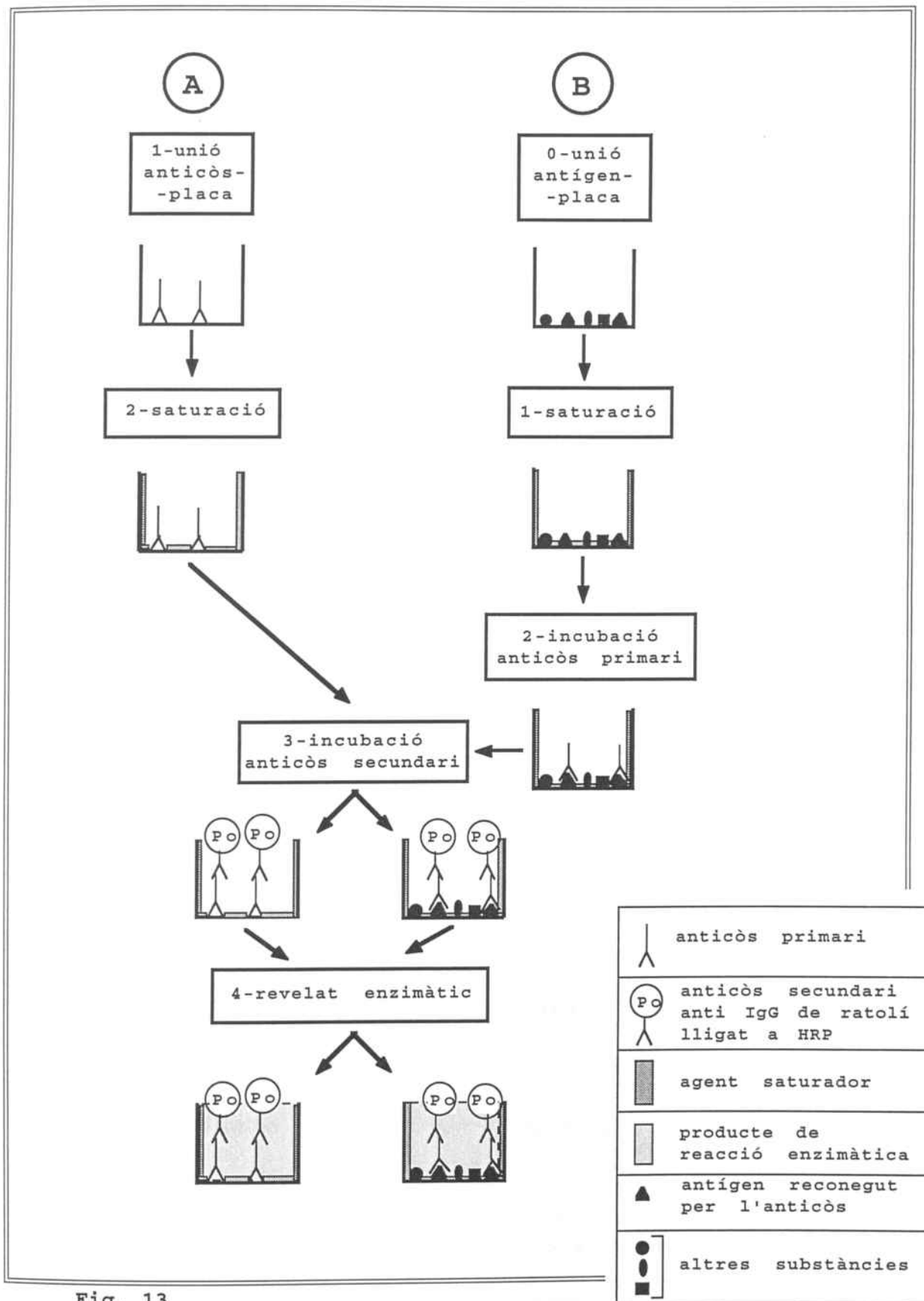


Fig. 13

11.2 - Tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques

Per determinar l'especificitat dels anticossos a nivell d'òrgans, teixits i cèl.lules s'han fet els següents crivellatges:

- mitjançant tècniques immunohistoquímiques en totes les fusions cel.lulars sobre seccions sagitals de planàries incloses en parafina (apartat 12)

- mitjançant tècniques immunocitoquímiques (apartat 13) sobre macerats cel.lulars a partir de la fusió n°38 (moment en que va quedar posada a punt aquesta tècnica) (fig. 11).

12 - TECNIQUES IMMUNOHISTOQUIMIQUES

12.1 - Mètodes de fixació

El fixador emprat en tots els crivellatges ha estat el paraformaldehid 4% en PBS (pH 7.2) ja que ha demostrat ser el més "universal" de tots els assajats. El mètode de fixació és el descrit per Romero i col. (1991) i Bueno i col. (1994). Planàries intactes o regenerants, prèviament tractades amb clorur de cisteïna 1% en PBS (pH 7.5) durant 1 minut a temperatura ambient per tal d'eliminar la mucositat, són anestesiades en fred posant-les sobre un portaobjectes en contacte amb gel. Es sacrifiquen amb el mateix fixador, es fixen durant 3-4 hores a 4°C i es renten amb PBS durant 24 hores a 4°C (mínim 3 canvis).

Aquells anticossos seleccionats per a realitzar treballs de descripció i/o regeneració han estat assajats amb altres fixadors, concrets per a cada relació antígen-anticòs, que milloressin la histologia i no fessin disminuir significativament el marcatge ni augmentar la inespecificitat. En aquest sentit s'han utilitzat fixadors tipus Karnowsky i Bouin. Els organismes fixats en Karnowsky i Bouin es mantenen en la solució fixadora durant 3 hores a 4°C i es renten durant 24 hores a 4°C en PBS els fixats en Karnowsky i en etanol 70% els fixats en Bouin (mínim 3 canvis).

12.2 - Organismes inclosos en parafina

12.2.1 - Inclusió en parafina i obtenció de seccions

Planàries fixades i rentades (apartat 12.1) es deshidraten en sèrie alcohòlica creixent (etanol 70%, 2 x 10 minuts; etanol 96%, 2 x 10 minuts; etanol absolut, 2x 10 minuts; i xilol, 2 x 15 minuts) i s'inclouen en dos banys de 30 minuts de parafina fosa (punt de fusió

51-53°C, Merck) mantinguda a 56°C. Els blocs es confeccionen submergint les mostres en parafina dins unes pinces de Leukart i deixant-la refredar. Els blocs es mantenen un mínim de 24 hores a 4°C abans de ser utilitzats.

Les seccions s'han fet de 10 µm de gruix tant sagitalment com transversal (fig. 14) amb un micròtom de sobretaula (Anglia) amb ganivetes rebutjables (Romero i col., 1991; Bueno i col., 1994), i s'han muntat sobre portaobjectes gelatinats (apartat 17).

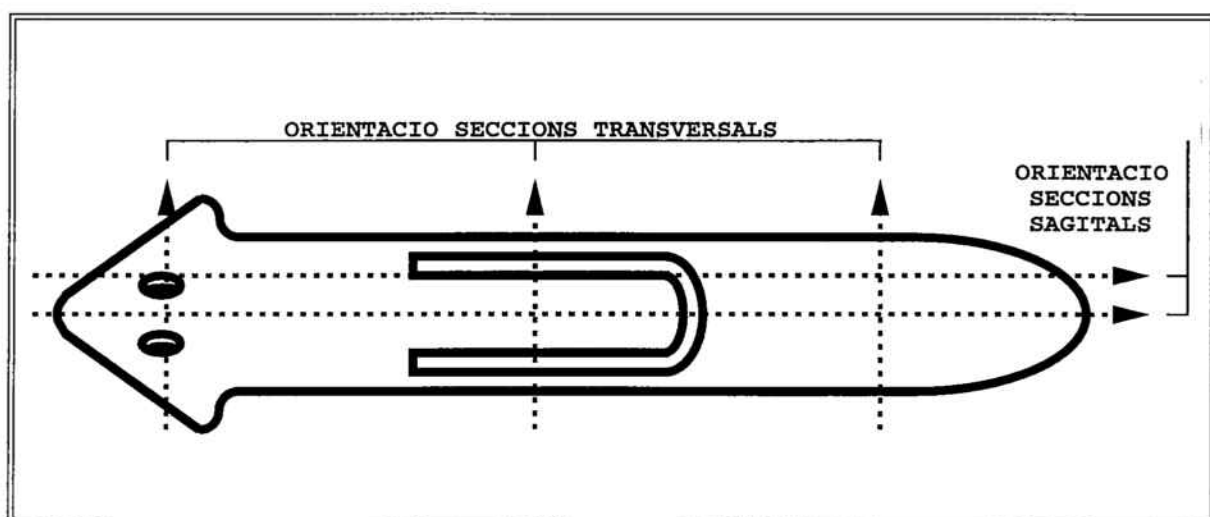


Fig. 14: Orientació de les seccions d'organismes inclosos en parafina respecte a l'eix antero-posterior.

12.2.2 - Immunotinció de seccions incloses en parafina

S'ha utilitzat el mètode de immunotinció indirecte (fig. 15) basat en la visualització de la unió antígen-anticòs mitjançant un anticòs secundari lligat a una molècula fluorescent o enzimàtica (Bullock i Petrusz, 1985; Johnstone i Thorpe, 1987). El procediment és el següent (Romero i col., 1991; Bueno i col., 1994):

1) Talls histològics obtinguts segons els apartats 12.1 i 12.2.1 es desparafinen i rehidraten en sèrie alcohòlica decreixent (xilol, 2 x 15 minuts; etanol absolut, 2 x 5 minuts, etanol 96%, 2 x 5 minuts; i etanol 70%, 2 x 5 minuts) i es renten 15 minuts en PBS.

2) Es permeabilitzen amb Pepsina (Sigma) 0.4% en HCl 0.1 N (pH 5) durant 15 minuts a 37°C, es renten 15 minuts en PBS i es saturen amb una solució 5% de llet desnatada en pols (Molico, Nestlé) en PBS durant 1 hora a temperatura ambient.

3) Un cop saturats, es passen breument per PBS per treure l'excés d'agent saturador i s'incuben amb l'anticòs monoclonal diluït en funció del seu títol durant 12 hores a 4°C en una càmera humida.

4) Després d'un nou rentat de 30-60 minuts en PBS (mínim 5 canvis) queden a punt per a la incubació amb l'anticòs secundari.

12.2.3 - Mètodes de detecció indirecta

S'han utilitzat dos sistemes per a detectar la unió antígen-anticòs: anticossos comercials lligats a molècules fluorescents (cabra anti ratolí lligat a isotiocianat de fluoresceïna, GAM-FITC, Nordic) i anticossos comercials lligats a biotina (Avidin Biotin Complex lligat a peroxidasa de rave (HRP), ABC-PO, Vector).

a) Detecció fluorescent (fig. 15).

S'incuben les seccions histològiques amb GAM-FITC diluït 1/50 en PBS 0.25% Tritó X-100 1-2 hores a temperatura ambient en la foscor. Passat aquest temps, es renten amb PBS durant 1 hora en la foscor (mínim 5 canvis) i es munten en glicerol 50% en H₂O_d.

b) Detecció pel sistema ABC-PO (fig. 15).

1) S'incuben les seccions histològiques amb l'anticòs anti IgG biotinilat diluït 1/200 en PBS durant 30 minuts a temperatura ambient.

2) Es renten en PBS 15 minuts i s'incuben amb una barreja d'avidina i biotina lligada a HRP (ABC Kit, Vector) diluïda 1/100 en PBS durant 30-60 minuts a temperatura ambient. La barreja d'avidina i biotina es prepara 30 minuts abans de la seva utilització

3) Es renten 1 hora en PBS (mínim 5 canvis) i es visualitza la presència d'enzim incubant els talls amb solució substrat de peroxidasa (DAB, virat amb sulfat amònic de níquel segons les modificacions de Hsu i Soban, 1982, apartat 17) durant 2-7 minuts.

4) Es renten novament en PBS durant 15 minuts i es munten en glicerol 50% en H₂O_d o bé es deshidraten en sèrie alcohòlica creixent (just l'invers del descrit per la desparafinació, apartat 12.2.2) i es munten en DPX.












 anticòs primari	 antígen reconegut per l'anticòs primari
 anticòs biotinitilat anti IgG de ratolí	 altres substàncies
 anticòs lligat a FITC anti IgG de ratolí	
 biotina	 parafina
 avidina	 no accessible als anticòssos
Po HRP	 agent saturador
	 precipitat de color

Fig. 15: Esquema de la detecció immunohistoquímica sobre seccions d'organismes inclosos en parafina.

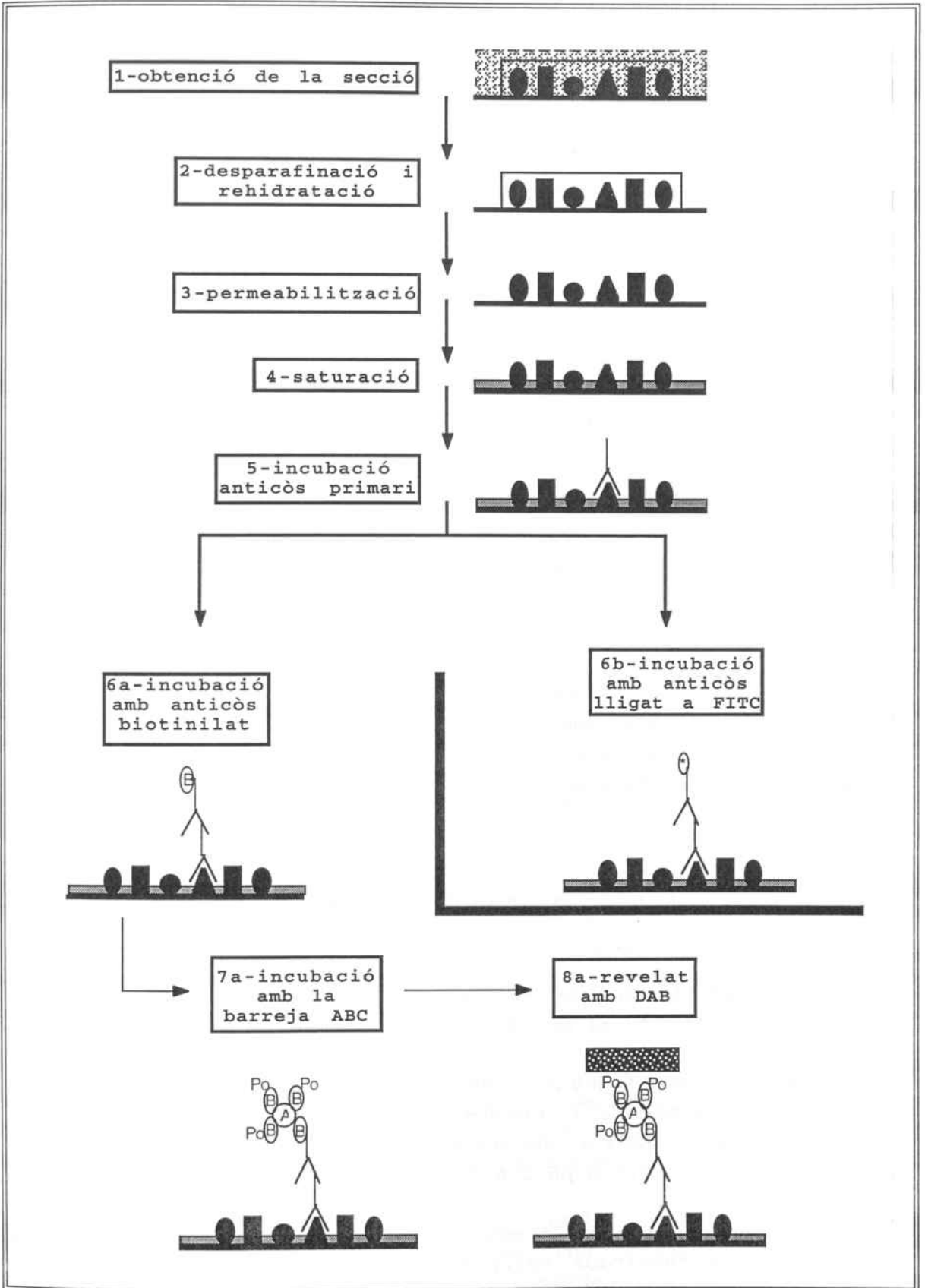


Fig. 15

12.3 - Seccions incloses en Lowicryl

12.3.1 - Inclusió en Lowicryl i obtenció de seccions semifines i ultrafines

Trossos de planària de 1.5 x 1.5 mm són fixats amb fixador tipus Carnowsky segons el procediment descrit a l'apartat 12.1. Es deshidraten a baixes temperatures en sèrie alcohòlica creixent (etanol 30%, 30 minuts, 0°C; etanol 50%, 60 minuts, -20°C; etanol 70%, 60 minuts, -35°C; etanol 96%, 60 minuts, -35°C; i etanol absolut, 60 minuts, -35°C) i s'inclouen en reïna Lowicryl 4B (LKB) (reïna-etanol absolut 1:1, 60 minuts, -35°C; 2:1, 60 minuts, -35°C; reïna pura, 60 minuts, -35°C; i reïna pura, 12 hores, -35°C).

Els blocs es fan omplint càpsules de gelatina amb reïna i transferint les mostres amb una pipeta Pasteur (tot a -35°C). 15-30 minuts després es connecta la làmpara ultravioleta i es deixa un mínim de 24 hores a -35°C, i 2-3 dies més a temperatura ambient.

Les seccions, obtingudes amb ganivetes de vidre, es fan d'un gruix d'1 µm (seccions semifines) i 50 nm (seccions ultrafines). Les primeres es munten sobre portaobjectes gelatinats i les segones sobre reixetes per microscòpia electrònica.

12.3.2 - Immunotinció de seccions semifines

Les immunotincions de seccions semifines s'han fet pel mètode de detecció indirecta. El procés és el següent:

1) Seccions semifines muntades sobre portaobjectes gelatinats es renten amb PBS 30 minuts (3 canvis), es tracten amb clorur amònic 50 mM en H₂O_d durant 1 hora a temperatura ambient i es permeabilitzen en Pepsina 0.4% en HCl 0.1 N pH 5 a 37°C durant 15 minuts.

2) Es renten amb PBS 15 minuts i es saturen amb una solució 5% de llet en pols desnatada (Molico, Nestlé) en PBS durant 1 hora a temperatura ambient, i s'incuben amb l'anticòs monoclonal diluït en PBS en funció del seu títol durant 12 hores a 4°C.

3) Després de la incubació, es renten amb PBS durant 1 hora (mínim 3 canvis) i s'incuben amb un anticòs secundari comercial lligat a or de 5 nm (British Biotechnology, Landerdiagnostico) diluït 1/20 en PBS durant 90 minuts.

4) Es renten en PBS per treure l'anticòs no lligat i en H₂O_d i H₂O_bd per treure les sals que aportava el PBS (PBS 10 minuts, x2; PBS 10mM 10 minuts; H₂O_d 10 minuts; H₂O_bd 10 minuts, x4), i s'incuben amb barreja de plata (Silver Enhancing Kit, British BioCell, Landerdiagnostico) de 10 a 15 minuts.

5) Quan el contrast és suficient, es renten un mínim de 2 minuts en aigua corrent, 5 minuts en H₂O_d i es tenyeixen amb Blau de Toluidina 0.1% durant 2-3 minuts a temperatura ambient.

6) Es renten amb H₂O_d, es deixen assecar i es munten amb oli d'immersió. La preparació es sella amb laca.

12.3.3 - Immunotinció de seccions ultrafines

La immunotinció de seccions ultrafines s'ha fet pel mètode de detecció indirecta. El procés és el següent:

1) Es reten les reixetes amb PBS durant 5-10 minuts, es tracten amb clorur amònic 50 mM durant 15 minuts a temperatura ambient i es tornen a rentar amb PBS 5 minuts més.

2) Es saturen amb llet desnatada en pols (Molico, Nestlé) durant 15 minuts a temperatura ambient, es renten 1 minut amb PBS i s'incuben amb l'anticòs monoclonal diluït en PBS segons el seu títol durant 12 hores a 4°C.

3) Es renten amb PBS durant 15 minuts (mínim 3 canvis) i s'incuben amb anticòs comercial lligat a or de 15 nm (cabra anti ratolí lligat a or, GAM-GOLD, British Biotechnology, Landerdiagnostico) diluït 1/50 en PBS, durant 90 minuts a temperatura ambient.

4) Es renten amb PBS per treure l'anticòs no lligat i amb H₂O_d per treure les sals (PBS 5 minuts, x2; PBS 10 mM 5 minuts; H₂O_d 5 minuts; H₂O_bd 5 minuts, x2). Un cop rentades, es deixen assecar a l'aire.

5) Es contrasten amb acetat d'uranil 2% hidròxid amònic 5% en 0.15 M d'àcid oxàlic durant 10 minuts i en 1.5% metilcelulosa en H₂O_d durant 30 segons.

12.4 - Immunotinció d'organismes processats "in toto"

La immunotinció d'organismes processats "in toto" s'ha fet seguint els protocols descrits per Wikgren i Reuter (1985) i adaptat per Burgaya i Baguñà (1992). El procés és el següent:

1) Planàries de 4-5 mm de llargada es tracten amb clorur de cisteïna 1% en PBS a pH 7.0 durant 1 minut, es renten en PBS i es permeabilitzen en 0.5 % de pronasa E durant 15 minuts a temperatura ambient.

2) Es renten en PBS sobre el suport on s'han de permeabilitzar, es fixen amb paraformaldehid 4 % en PBS durant 4 hores a 4°C i es renten amb PBS durant 12 hores (mínim 3 canvis).

3) S'incuben amb l'anticòs monoclonal diluït en tampó TIT (apartat 17) en funció del seu títol durant 3-4 dies en agitació suau a 4°C.

4) Es renten en TIT durant 24 hores i s'incuben amb un anticòs secundari comercial conjugat a isotiocianat de fluoresceïna (cabra anti ratolí, GAM-FITC, Nordic) diluït 1/50 en TIT.

5) Es renten en TIT durant 24 hores, es munten en glicerol 50% en PBS i es fa un lleuger "squash".

13 - TECNIQUES IMMUNOCITOQUIMIQUES

13.1 - Obtenció de macerats cel.lulars

Els macerats cel.lulars utilitzats en tècniques immunocitoquímiques s'han obtingut tractant planàries amb clorur de cisteïna 1% en PBS a pH 7.0 durant 1 minut per eliminar la mucositat, tallant-les en petits trocets amb una fulla de bisturí i posant-les a macerar a temperatura ambient en solució maceradora salina (apartat 17; Bueno i col, 1992; Espinosa, 1993). A les 12 hores s'agita molt suaument el flascó per separar les cèl.lules ja macerades sense que es trenquin i es deixa reposar uns minuts per que precipitin els agregats, quedant així les cèl.lules macerades en el sobrenedant.

13.2 - Immunotinció de macerats cel.lulars

Macerats cel.lulars obtinguts amb solució maceradora salina (apartat 13.1) són dipositats sobre portaobjectes sense gelatinar i es deixen sedimentar durant 1 hora a temperatura ambient. Es retira la solució maceradora xuclant amb una pipeta o similar i es fixen amb paraformaldehid 4% en PBS durant 1 hora a temperatura ambient. Un cop fixades, es renten amb PBS un mínim de mitja hora i es permeabilitzen amb Pepsina (Sigma) 0.1% en HCl 0.1 N a pH 5.0 durant 15-30 minuts a 37°C. La resta del processat és idèntic al descrit per a la immunotinció sobre seccions de planàries incloses en parafina (apartats 12.2.2 i 12.2.3) si es visualitza la immunodetecció amb el sistema ABC-PO (Avidin Biotin Complex conjugat a HRP, Vector) o mitjançant fluorescència; i idèntic al descrit per a la immunotinció de seccions semifines (apartat 12.3.2) si es visualitza la immunodetecció amb anticossos conjugats a or i amplificats amb plata.

13.3 - Obtenció de dissociats cel.lulars

L'obtenció de dissociats cel.lulars per ser immunodetectats es fa seguint el mateix procediment que el descrit en l'apartat 7.2.4.

13.4 - Immunotinció de dissociats cel.lulars

La immunotinció de dissociats cel.lulars es fa seguint el mateix procediment que el descrit per macerats cel.lulars en l'apartat 13.2.

14 - TECNIQUES ELECTROFORETIQUES

14.1 - Gels d'electroforesi (SDS-PAGE)

S'ha seguit bàsicament el mètode descrit per Laemli (1970) aplicat al sistema Mini-Protean II (BioRad), al sistema Hoefer, i al sistema Protean II (Biorad) depenent de les proteïnes a detectar. Els gels analítics s'han fet de 0.7 mm de gruix amb els dos primers i de 1.5 mm en el darrer. Els preparatius per a obtenir proteïna per a les immunitzacions s'han fet de 1-1.5 mm. En tots els casos els gels han estat discontinus d'acrilamida-bisacrilamida, amb un gel concentrador de 4% i un gel separador de 8%, 10%, 12% i 15% d'aquests compostos pel sistema Mini-Protean II. Pel sistema Hoefer i Protean II, utilitzats per detectar molècules de baix pes molecular, s'han seguit les instruccions donades per Sigma per marcadors de baix pes molecular (Sigma Technical Bulletin MWM-100 (9-90)), amb gel concentrador, espaiador i separador.

Es segueixen totes les instruccions de muntatge subministrades amb l'aparell, s'apliquen les mostres i es fan avançar amb un voltatge constant de 200V dins una cubeta amb tampó d'electroforesi (apartat 17) durant 45 minuts (Mini-Protean II) o a 30 mA durant 4-30 hores (Hoefer i Protean II respectivament). En ambdós casos s'ha mirat que el front estigués a punt d'arribar a la base del gel. Un cop finalitzada l'electroforesi es processa el gel per a fer una transferència (Western-blott, apartat 14.4) o una tinció proteica total (apartats 14.2 i 14.3).

Les mostres que s'apliquen al gel s'obtenen per homogeneització en tampó PBS, PBS - 0.5% Tritó X-100 o TITX (apartat 17) depenent dels casos, segons el protocol descrit a l'apartat 7.2.7 (Collet, 1990), en presència d'inhibidors de proteases. Just abans de ser aplicades al gel, es barregen amb el tampó de càrrega (apartat 17).

14.2 - Tinció proteica total amb Coomassie Brilliant Blue R-250

La tinció de proteïna total en gels SDS-PAGE amb Coomassie Brilliant Blue R-250 s'ha realitzat segons el procediment descrit per Harlow i Lane (1988). Es posa el gel en una cubeta amb solució de tinció Coomassie Brilliant Blue R-250 (apartat 17), en agitació suau de 2 a 4 hores a temperatura ambient o 12 hores a 4°C. Passat aquest temps, es destenyeix en solució destenyidora, sent renovada varies vegades fins que el fons del gel quedi clar i tant sols s'observin tenyides les bandes. Un cop ben destenyit, es pot guardar en àcid acètic 10% en H₂O_d o bé secar amb un secador de gels.

14.3 - Tinció proteica total amb nitrat de plata

La tinció de proteïna total amb nitrat de plata en gels SDS-PAGE s'ha realitzat segons el protocol descrit per Wray i col. (1981).

1) Es fixen els gels amb solució fixadora per tincions de plata durant 1-2 hores, i es renta durant 60 minuts (3 canvis) en etanol 30%.

2) Es fa un pretractament amb tiosulfat sòdic (Na₂S₂O₃·5H₂O) 0.2 mgr/ml 1 minut, es renta amb H₂O_d 1 minut (3 canvis) i s'impregna amb solució de nitrat de plata durant 20 minuts en la foscor.

3) Es renta amb H₂O_d durant 1 minut (3 canvis) i es revela amb solució reveladora (apartat 17) de 1 a 3 minuts fins a veure bandes.

4) Quan s'observen bandes, es renta amb H₂O_d durant 40 segons (2 canvis), s'atura amb solució d'aturada i es renta amb metanol 30%.

Tot el protocol es fa a temperatura ambient. Es poden guardar els gels amb metanol 30% a 4°C o bé assecar-los en un secador de gels.

14.4 - Transferència de proteïnes a filtre de nitrocel.lulosa: Western-blot

La transferència electroforètica de proteïnes entre gels de poliacrilamida (SDS-PAGE) a membranes de nitrocel.lulosa s'ha fet seguint el procediment descrit per Towkin i col. (1978) i Dunn (1986), utilitzant el sistema Mini-Transblot (BioRad) i seguint les condicions especificades pel fabricant.

a) Procediment desnaturalitzant (Towkin i col., 1978):

1) S'incuba el gel en una cubeta amb tampó de transferència (apartat 17) en agitació suau durant 30 minuts.

2) Es munta el "sandwich" de transferència amb el gel, la membrana de nitrocel.lulosa (s'ha provat també el niló, amb el mateix protocol) i paper Whatman.

3) Es col.loca el "sandwich" dins la cubeta de transferència amb tampó de transferència i refrigerant, i es connecta la font a 100V durant 60 minuts.

4) Es desmunta el "sanwich" i es deixa assecar la membrana.

b) Procediment renaturalitzant (Dunn, 1986):

1) S'incuba el gel en una cubeta amb tampó de renaturalització (apartat 17) durant 1 hora, amb un mínim de 4 canvis de 200 ml cada un.

2) S'incuba el gel en una cubeta amb tampó de transferència renaturalitzant (apartat 17) en agitació suau durant 30 minuts.

3) La resta del protocol és igual al descrit per electrotransferències desnaturalitzants però emprant tampó de transferència renaturalitzant.

14.5 - Immunodetecció d'antígens sobre filtres de nitrocel.lulosa

La immunodetecció d'antígens sobre filtres de nitrocel.lulosa (o niló) s'ha relitzat tant sobre antígens transferits al filtre a partir de gels de poliacrilamida (Western blott) com sobre antígens dipositats directament sobre el filtre (Dot blot).

La immunodetecció "Dot blot" s'ha fet seguint el procediment descrit per Sharon i col (1979).

1) S'hidrata la membrana de nitrocel.lulosa (o niló) amb PBS, de 1 a 12 hores, i sense deixar que s'assequi es dipositen gotes de lasolució d'antigen (obtingudes segons el procediment de l'apartat 7.2.7), separades un mínim de 5 mm.

A partir d'aquest moment, el processat és idèntic que per a immunodetecció "Western blott".

2) Es fixa l'antigen deixant assecar la membrana o bé incubant-la en isopropanol 25% àcid acètic - 10% durant 15 minuts.

3) Es rehidrata o renta la membrana en PBS (depenent del mètode de fixació emprat) i es satura amb una solució de 5% llet en pols desnatada (Molico, Nestlé) en PBS durant 1-2 hores a temperatura ambient en agitació suau. En el cas de què la membrana provingui d'una electrotransferència renaturalitzant, convé fer la saturació amb 5% llet en pols desnatada i 0.1% Tween 20 en 10 mM Tris-HCl pH 7.4 durant 12 hores a 4°C en agitació suau.

4) Es renten breument amb PBS i s'incuben amb l'anticòs monoclonal diluït en PBS en funció del seu títol durant 1-4 hores a temperatura ambient o 12 hores a 4°C, en agitació suau.

5) Es renten amb MTP durant 30 minuts (mínim 3 canvis) amb agitació suau, i s'incuben amb l'anticòs secundari lligat a peroxidasa de rave (HRP) (cabra anti ratolí, GAM-PO, Nordic) diluït 1/100 - 1/5000 en MTP, durant 1-2 hores en agitació suau i a temperatura ambient.

6) Es renten amb MTP durant 60 minuts (mínim 5 canvis) i es revela amb solució reveladora (DAB virat amb clorur de cobalt, segons les modificacions de Hsu i Soban, 1982; apartat 17) fins que es vegin les bandes o taques amb la coloració adequada.

7) Es renta la membrana amb H₂O d i es deixa assecar entre papers de filtre.

14.6 - Extracció acètica d'antígens separats mitjançant gels de poliacrilamida (SDS-PAGE)

S'ha seguit una modificació del protocol descrit per Bernabeu i col (1977). Es talla el gel de poliacrilamida per les zones de les bandes proteiques que es volen extreure i s'homogenitzen amb una vareta de vidre amb àcid acètic 66% en PBS dins un tub Ependorf. Un cop homogeneitzades, es deixen 12 hores a 4°C en agitació i es centrifuguen durant 15 minuts a 20000g. Es recull el sobrenedant i es tampona per adició (1:5) de tampó fosfat 0.5 M a pH 7.7. Si cal, es pot dialitzar front el tampó escaient.

15 - CARACTERITZACIO BASICA D'ANTIGENS

15.1 - Purificació d'antígens per cromatografia d'immunoafinitat

El sistema de cromatografia d'immunoafinitat utilitzat per purificar antígens és el sistema "Immuno Pure IgG Orientation Kit" (Pierce), que es basa en unir fortament l'anticòs a proteïna A. S'han seguit bàsicament les instruccions facilitades pel fabricant. Durant tot el procés es van fent els controls següents mitjançant la tècnica d'ELISA (apartat 11.1):

- unió de l'anticòs a la proteïna A
- unió antigen-anticòs
- elució de l'antigen.

15.1.1 - Obtenció d'antígens

Els antígens s'han obtingut per homogenització de la zona central de planàries tallades entre els nivells de tall D-E i A-C (Saló, 1984; veure fig. 7). Es tractaten amb clorur de cisteïna 1% durant 1 minut per treure la mucositat i s'homogenitzen amb tampó Tris-HCl 10 mM 0.5% Tritó X-100, a pH 7.5, amb inhibidors de proteases (apartat 17) seguint el procediment descrit a l'apartat 7.2.7 (Collet, 1990).

15.1.2 - Purificacions prèvies amb columnes de Sephadex G-50

Un cop obtingut un extracte total d'antígens de planària es passa per una columna de Sephadex G-50 (Pharmacia) de 25 cm³ de capacitat per tal de treure el màxim nombre de substàncies que no siguin les reconegudes per l'anticòs monoclonal. Es diposita 1 ml de la solució

Material i Mètodes

total d'antígens sobre el gel i, quan ha entrat tot dins el gel, en fan entrar 100 µl de Bromophenol Blue 0.1%. S'elueix amb tampó Tris-HCl 10 mM i es van recollint fraccions de 2 ml fins que surt el Bromophenol Blue. La densitat òptica d'aquestes fraccions es llegida amb un espectrofotòmetre (Ultrospec 4050, LKB) a 280, 230 i 210 nm. A més a més, 100 µl de cadascuna de les fraccions són fixats en una placa d'ELISA per detectar amb l'anticòs monoclonal corresponent (apartat 11.1) la fracció que conté l'antigen que volem purificar.

15.1.3 - Unió dels anticossos i antígens a la columna d'immunoafinitat

L'anticòs monoclonal que ha de ser unit a la columna d'immunoafinitat s'ha obtingut a partir d'un volum suficient de sobrenedant de cultiu (400-500 ml) en medi HT FCS(-) per tenir uns 8-10 mgr d'anticòs, quantitat que donarà la màxima eficiència. Per concentrar l'anticòs en el volum requerit per la columna d'immunoafinitat (1-5 ml) el procediment és el següent:

1) Es fa precipitar l'anticòs monoclonal del medi (HT FCS-) amb sulfat amònic 50%, afegint-lo molt poc a poc al mateix temps que es va agitant amb un agitador magnètic a 4°C.

2) Es deixa agitant-se durant 12 hores a 4°C.

3) Es centrifuga a 3000g durant 30 minuts, es resuspen el precipitat en 1-5 ml de tampó Tris-HCl 10 mM i es dialitza 12 hores a 4°C front el mateix tampó.

Un cop es tenen els 8-10 mgr d'anticòs en el volum escaient (1-5 ml) es munta la columna (fig. 16) segons el següent procediment:

1) S'equilibra la columna passant 5 ml de tampó de rentat (Wash Buffer, Immuno Pure IgG Orientation Kit (IgG OK) Pierce).

2) Es dilueix la solució d'anticòs 1:1 amb tampó d'unió (Binding Buffer, IgG OK) i es fa passar a través de la columna.

3) Quan ha passat tot, es renta la columna amb 10 ml de tampó de rentat (Wash Buffer, IgG OK) i es posen 2 ml de tampó de lligació (Crosslinking Buffer, IgG OK) on hi ha dissolt Dimethyl pimelimidat

(6.6 mgr/ml) per unir fortament l'anticòs a la proteïna A. Es tapa la columna i es manté 1 hora a temperatura ambient agitant-se en un agitador orbital.

4) Es renta amb 5 ml de tampó de lligació (Crosslinking Buffer, IgG OK) i s'afegeixen 2 ml de tampó de saturació (Blocking Buffer, IgG OK). Es tapa la columna i es deixa agitant-se durant 10 minuts a temperatura ambient en un agitador orbital.

5) Es renta la columna amb 5 ml de tampó d'elució (Elution Buffer, IgG OK) a pH 2.8 sempre i quan el pH àcid no afecti a l'estabilitat de l'anticòs (s'ha de comprovar per a cada anticòs).

6) Es renta la columna amb 10 ml de tampó de rentat (Wash Buffer, IgG OK) i s'equilibra amb tampó Tris-HCl 10 mM pH 7.5.

7) Es fa passar la solució d'antígens per la columna (prèviament purificada segons l'apartat 15.1.2) i, quan ja ha passat tota, es renta la columna amb tampó Tris-HCl 10 mM pH 7.5 fins que no es detecti cap lectura amb l'espectrefotòmetre a 280, 230 i 210 nm.

15.1.4 - Elució dels antígens de la columna d'immunoafinitat

Primer s'elueix l'antigen amb tampó Mg Cl₂ de molaritat creixent (fraccions de 1 ml de: 0.5 M; 1 M; 1.5 M; 2 M; 2.5 M; 3 M; i 3.5 M) i després amb tampó Glicina HCl 0.1 M pH 2.8. Es recullen fraccions de 1 ml. Si les fraccions provenen d'una elució amb tampó Glicina HCl 0.1 M pH 2.8 es tamponen immediatament amb tampó fosfat 0.5 M pH 7.7, i si provenen d'una elució amb Mn Cl₂ es dialitzen front tampó Tris-HCl 10 mM pH 7.5. Les fraccions així obtingudes són testades mitjançant la tècnica d'ELISA (apartat 11.1).

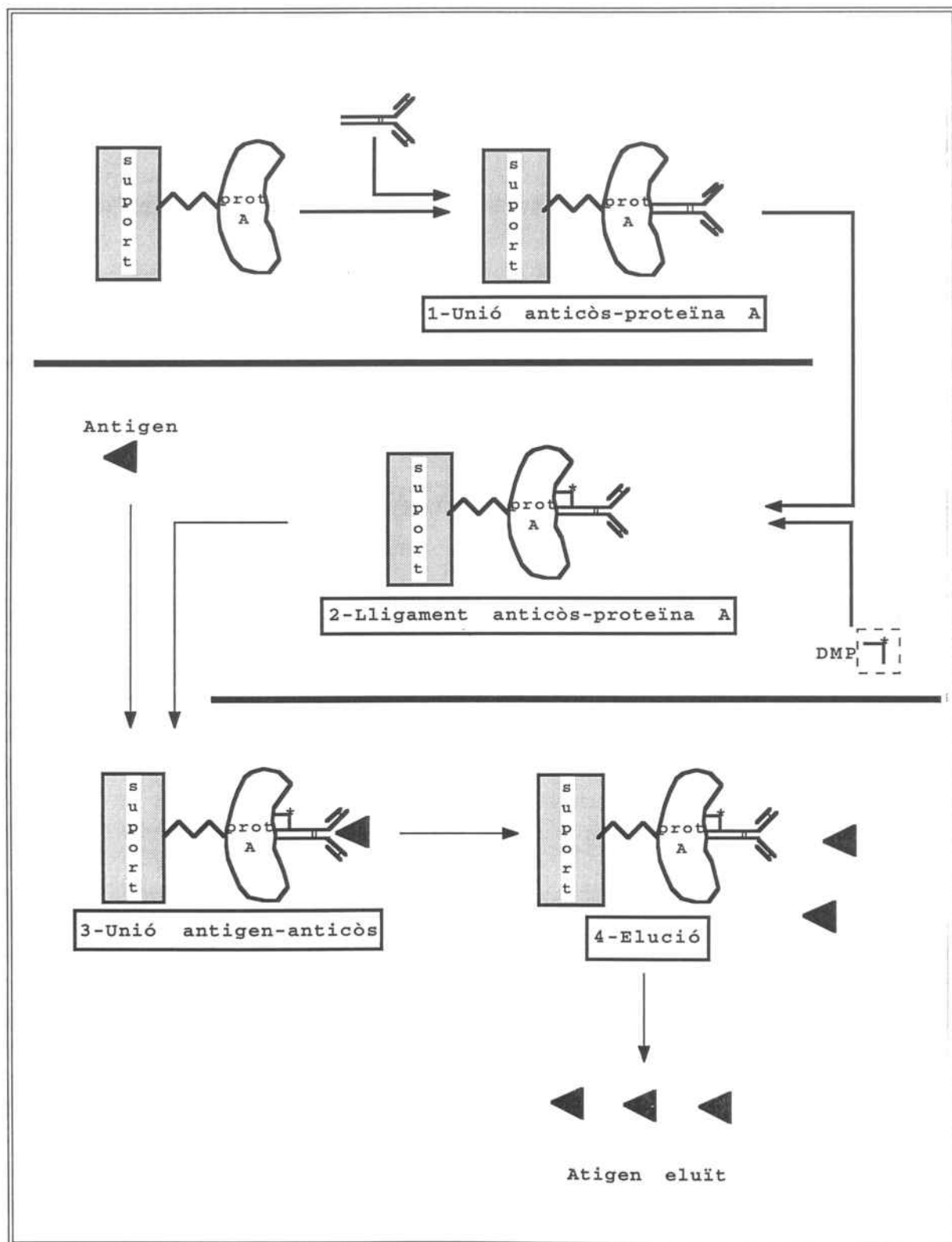


Fig. 16: Esquema de la purificació de substàncies mitjançant columna d'immunoafinitat segons el protocol del sistema "Immuno Pure IgG Orientation Kit" (Pierce).

15.1.5 - Purificacions posteriors mitjançant HPLC

Totes les fraccions que contenen l'antigen (detectat mitjançant la tècnica d'ELISA, apartat 11.1) són purificades mitjançant columnes de separació atenent a la mida amb un aparell HPLC (HPLC 2150 PUMP, LKB). Les fraccions que s'obtenen d'aquestes columnes són novament testades amb la tècnica d'ELISA, i totes aquelles en que es detecta presència d'antigen són corregudes en un gel d'electroforesi (SDS-PAGE, apartat 14.1). Aquest gel es tenyeix amb nitrat de plata (apartat 14.3) per comprovar la puresa de l'antigen aïllat.

15.2 - Detecció de glucoproteïnes sobre filtres

La detecció de glucoproteïnes sobre filtres s'ha fet pel sistema Glican Detection Kit (Boehringer Mannheim) seguint exactament les instruccions donades pel fabricant. S'ha utilitzat antigen purificat mitjançant columnes d'immunoafinitat segons els procediments de l'apartat 15.1. El protocol és el següent (fig. 17):

1) S'apliquen uns 5-20 μ g l de solució d'antigen sobre una membrana de nitrocel.lulosa, prèviament hidratada amb PBS, i es deixa assecar.

2) Es renta la membrana amb PBS pH 6.5 i s'oxida amb metaperiodat sòdic 10 mM en tampó acetat pH 5.5 durant 20 minuts a temperatura ambient.

3) Es renta la mebrana amb PBS pH 6.5 durant 30 minuts (3 canvis) i s'incuba amb 0.0002-0.001% de DIG-succinil-E-amidocaproic àcid hidrazida en tampó acetat pH 5.5 (marcatge de polisacarids) durant 1 hora a temperatura ambient.

4) Es renta la membrana amb tampó TBS durant 30 minuts (3 canvis) i es tenyeix amb Ponceau S durant 5 minuts (tinció protèica).

5) Es renta la membrana amb H_2O bd fins que el filtre queda blanc i sols resten tenyides les aplicacions proteiques.

Material i Mètodes

6) Es fotografia abans que marxi la tinció i s'incuba durant 30 minuts a temperatura ambient en solució blocadora (apartat 17).

7) Es renta la membrana en TBS durant 30 minuts (3 canvis) i s'incuba amb l'anticòs anti digoxigenina lligat a fosfatasa alcalina (be anti digoxigenina, SaDIG) durant 1 hora a temperatura ambient.

8) Es renta la membrana amb TBS durant 30 minuts (3 canvis) i es revela amb solució reveladora (apartat 17).

9) Es renta la membrana amb H_2O_{bd} i es deixa assecar.

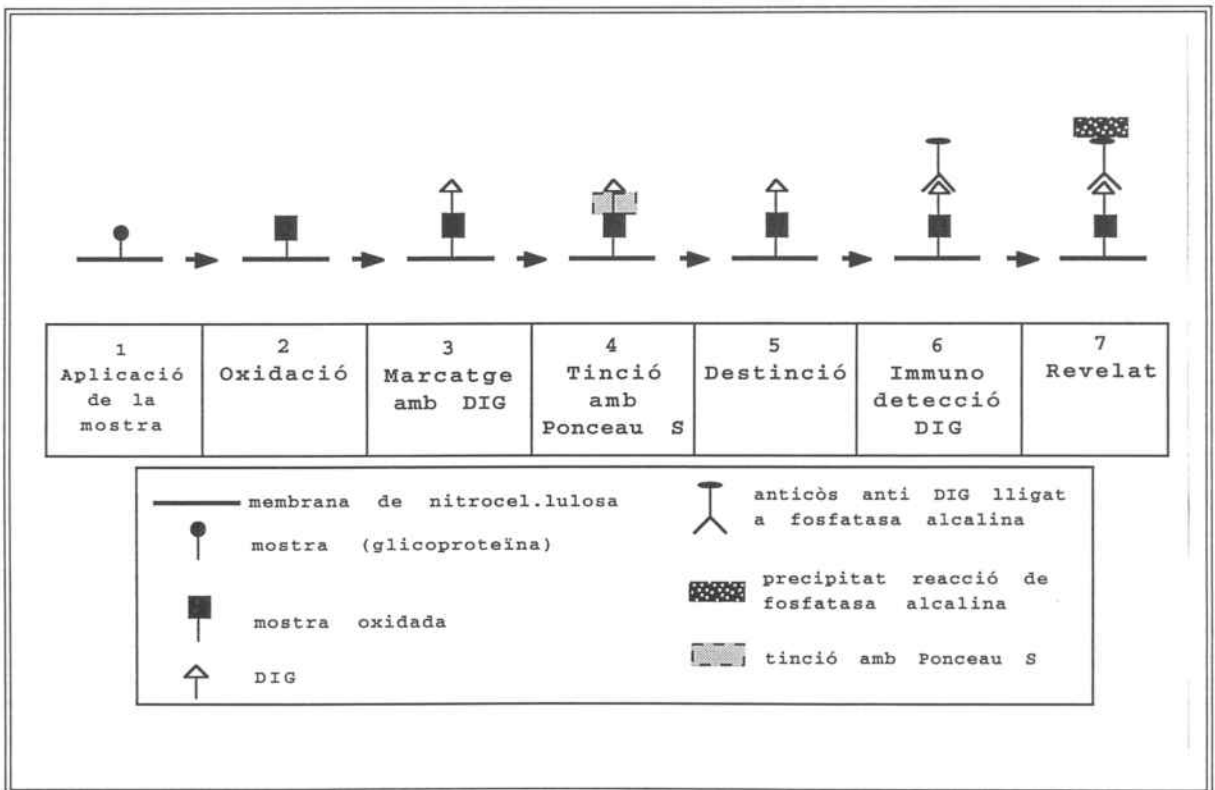


Fig. 17: Esquema de la detecció de glicoproteïnes sobre filtres ("Dot blot") segons el protocol del sistema Glican Detection Kit (Boehringer Mannheim).

15.3 - Anàlisi de C i N i confecció d'aminogrames

L'anàlisi de C i N s'ha fet amb un analitzador Eager 200 (per comprovar la presència d'aminoàcids abans de confeccionar els

aminogrames) sobre mostres procedents d'una columna d'immunoafinitat i una separació per HPLC (apartats 15.1).

Un cop comprovada la presència de N, els aminogrames s'han confeccionat amb proteïnes purificades de la mateixa manera mitjançant un analitzador d'aminoàcids Alpha Plus (Pharmacia). S'hidrolitza la mostra amb HCl 6N amb un 1% de fenol al buit (condicions antioxidants), durant 24 hores a 105 °C (Allen, 1989). L'anàlisi d'aminoàcids es realitza seguint els principis del mètode desenvolupat per Moore i Stein (Spackman, 1958), en el qual els aminoàcids de la mostra són separats en una cromatografia de bescanvi iònic amb una reïna de bescanvi catiónic sulfonada. Els diferents aminoàcids s'elueixen per increment de pH del tampó i per increment de la força iònica amb sals de liti, i es detecten per reacció colorimètrica amb ninidrina (per a una revisió general veure Allen, 1989)

15.4 - Deglicosilació d'antígens

Antígens totals de planària s'han tractat amb glicosidases per veure si en determinats antígens glicoprotèics l'epítot reconegut per l'anticòs monoclonal que han generat resideix en la fracció glucídica o en la protèica. Un cop incubats amb l'enzim corresponent, s'han fixat en membranes de nitrocel.lulosa per ser detectats amb els anticossos corresponents (Immunodot, apartat 14.5), comprovant si s'ha perdut la immunoractivitat.

Les glicosidases emprades han estat l'endoglicosidasa F, l'endoglicosidasa H i la sialidasa (totes de Boehringer Mannheim). En tots els casos, antígens totals de planària obtinguts segons els protocols standard (apartats 7.2.1 i 7.2.7) s'incuben amb tots tres enzims, per separat i en els seus tampons respectius, durant 12 hores a 37°C (Kobata i col., 1979; Trimble i col., 1984; Steube i col., 1985; Tarentino i col., 1985), excluint dels tampons el β -mercaptoetanol ja que en els antígens utilitzats aquest producte impossibilita el reconeixement antigen-anticòs.

15.5 - Digestió d'antígens amb proteases

Antígens totals de planària obtinguts pels procediments standard (apartats 7.2.1 i 7.2.7) s'han tractat amb proteases per veure si en determinats antígens glicoproteics l'epítot reconegut per l'anticòs monoclonal que han generat resideix en la fracció proteica o en la glucídica. Un cop incubats amb l'enzim corresponent, s'han fixat en membranes de nitrocel.lulosa per ser detectats amb els anticossos monoclonals corresponents (Immunodot, apartat 14.5), comprovant si s'ha perdut la immunoreactivitat.

Les proteases emprades són la pronasa E (2mgr/ml) i la proteinasa K (100 µgr/ml) (totes dues de Boehringer Mannheim), utilitzant com a tampó un tampó per enzims de restricció (M, de la mateixa casa comercial). Les mostres tractades amb pronasa E es mantenen durant 12 hores a 37°C en presència d'aquest enzim, i les tractades amb proteinasa K es mantenen tanmateix a 56°C durant el mateix temps. Abans de fer l'aplicació sobre el filtre se les sotmet a un xoc tèrmic (100°C) per inactivar les proteases i evitar així la degradació dels anticossos durant les incubacions de l'Immunodot.

15.6 - Digestió d'antígens amb DNAasa

Antígens totals de planària obtinguts per procediments standard (apartats 7.2.1 i 7.2.7) s'han incubat amb DNAasa en tampó d'enzims de restricció (M) seguint els procediments descrits en Sanbook i col. (1989) per veure si determinats anticossos monoclonals tenen com a epítot molècules de DNA. Acabada la incubació, s'apliquen sobre membranes de nitrocel.lulosa i es detecten amb els anticossos monoclonals corresponents (Immunodot, apartat 14.5), per comprovar si s'ha perdut la immunoreactivitat.

16 - NOMENCLATURA RELATIVA A FUSIONS, ANTICOSSOS I ANTIGENS

La nomenclatura emprada relativa a fusions, anticossos monoclonals i antigens en aquesta Tesi és la següent:

A) Les fusions cel.lulars s'han numerat per l'ordre en què s'han anat fent. Així, per exemple, la fusió 38^{ena} és la Fusió 38 o F-38.

B) Els anticossos monoclonals obtinguts s'han anomenat segons un codi de 4 lletres i 1 o 2 nombres:

B1) La primera lletra fa referència a l'espècie de planària amb que s'ha obtingut l'anticòs.

B2) Les altres tres lletres fan referència al tipus cel.lular, estructura, teixit o òrgan que reconeix l'anticòs.

B3) El primer nombre fa referència a la fusió a la qual va aparèixer l'anticòs.

B4) El segon nombre únicament s'utilitza si en la mateixa fusió s'han obtingut diferents anticossos contra el mateix tipus cel.lular, teixit, òrgan o estructura, per tal de distingir-los.

Així, per exemple, l'anticòs monoclonal TGOB-13.1 ha estat obtingut en l'espècie *D.tigrina*, reconeix específicament cèl.lules "goblet", va aparèixer a la Fusió **13** (o F-13) i dins d'aquesta fusió és en nombre **1** dels que van ser detectats.

C) Els antigens que són reconeguts pels anticossos monoclonals s'anomenen amb el mateix nom que l'anticòs però afegint Ag (**Antigen**) al darrera. Així, per exemple, l'antigen reconegut per l'anticòs monoclonal TCEN-49 és el TCEN-49Ag.



17 - TAMPONS I SOLUCIONS DIVERSES**17.1 - Tampons generals****PBS 100 mM pH 7.5**

NaCl.....136.00 mM

KCl.....2.68 mM

KH₂PO₄.....1.47 mMNa₂HPO₄.....81.00 mM**TAMPO FOSFAT 0.5 M pH 7.7**A) Na₂HPO₄·2H₂O.....0.5 Mb) NaH₂PO₄·H₂O.....0.5 M

afegir B) a A) fins a pH 7.7 (10% aprox.)

INHIBIDORS DE PROTEASES

EDTA.....2 mM

MnCl₂.....1 mM

Leupeptina.....0.5 µgr/ml

PMSF.....150 µgr/ml

MTP

Llet desnatada en pols (Molico, Nestlé).....0.5%

Tween-20.....0.05%

en PBS 100 mM

TAMPO 0.1 M GLICINA-HCl pH 2.8

Glicina.....0.1 M

NaCl.....0.15 M

HCl fins a pH 2.8

17.2 - Tampons i solucions per immunohistoquímica i immunocitoquímica

SOLUCIO MACERADORA SALINA

Acid acètic.....1 part
Glicerol.....1 part
PBS 100 mM.....13 parts

CMF (pH 7.2)

NaH₂PO₄·H₂O.....2.56 mM
NaCl.....14.28 mM
KCl.....10.21 mM
NaHCO₃.....9.42 mM
BSA.....1%

SOLUCIO FIXADORA KARNOWSKY

Paraformaldehyd.....3%
Glutaraldehyd.....0.025%
en PBS (pH 7.0)

SOLUCIO FIXADORA BOUIN

Acid pícric 1%.....79%
Formaldehyd 40%.....26%
Acid acètic glacial.....5%
ajustar el pH a 7.0

SOLUCIO DE GELATINA

Gelatina.....2.5%
Llum cròmica.....0.5%
en H₂O_d

SOLUCIO DE SUBSTRATE PER HRP (IMMUNOTINCIONS)

3-3'Diamonobenzidina tetrahidrocloridre.....0.3 mg/ml
Sulfat amònic de níquel 1%.....20%
H₂O₂ 30%.....0.4 µl/ml
en PBS 100 mM

TAMPO TIT

NaCl.....	125 mM
KCl.....	5 mM
BSA.....	0.1%
NaN ₃	0.2%
Tritó X-100	0.3%
en tampó fosfat 100 mM	

17.3 - Tampons i solucions d'electroforesi i ELISA**GEL ACRILAMIDA-BISACRILAMIDA (SDS-PAGE) SISTEMA MINI-PROTEAN II (per 5 ml finals)**

	Concentrador		Separador			
	4%	8%	10%	12%	15%	
H ₂ O	3.4 ml	2.3	2.0	1.7	1.2	ml
Aclilamida 29.2% + Bisacrilamida 0.8%	0.83 ml	1.3	1.7	2.0	2.5	ml
Tris-HCl pH 6.8 1.0M	0.63 ml					
Tris-HCl pH 8.8 1.5M		1.3	1.3	1.3	1.3	ml
SDS 10%	0.05 ml	0.05	0.05	0.05	0.05	ml
APS 10%	0.05 ml	0.05	0.05	0.05	0.05	ml
TEMED	0.005 ml	0.003	0.002	0.002	0.002	ml

GEL ACRILAMIDA BISACRILAMIDA (SDS-PAGE) SISTEMA HOEFER I PROTEAN II

	Concentrador	Espaiador	Separador
H ₂ O	4.20 ml	6.95 ml	3.40 ml
Acrilamida 48% + Bisacrilamida 1.5%	0.50 ml	3.05 ml	5.00 ml
Trizma-base pH 8.45			
3.0M SDS 0.3%	1.55 ml	5.00 ml	5.00 ml
Glicerol			1.60 ml
APS 10%	0.05 ml	0.05 ml	0.05 ml
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl

Material i Mètodes

TAMPO DE CARREGA (x2)

Tris-HCl pH 6.8.....1.0 ml
Glicerol.....0.8 ml
SDS 10%.....1.6 ml
Blau de bromofenol 2% 5 µl
H₂O.....3.8 ml
β-mercaptoetanol*.....5% final
*no en tots els casos

TAMPO D'ELECTROFORESI (MINI-PROTEAN II)

Glicina.....192 mM
Trizma base.....25 mM
SDS.....0.1%

TAMPO D'ELECTROFORESI - CATODE (HOEFER I PROTEAN II)

Trizma base.....100mM
Tricina.....100mM
SDS.....0.1%
ajustar a pH 8.2

TAMPO D'ELECTROFORESI - ANODE (HOEFER I PROTEAN II)

Trizma base.....200mM
ajustar a pH 8.9

SOLUCIO FIXADORA PER TINCIONS DE PROTEINA TOTAL (PLATA)

Metanol.....50%
Acid acètic.....12%
Formaldehid 37%.....0.5%

SOLUCIO DE PLATA

Nitrat de plata.....2 mgr/ml
Formaldehid 37%.....0.075%

SOLUCIO D'ATURADA (PLATA)

Metanol.....50%
Acid acètic.....12%

SOLUCIO REVELADORA PER TINCIONS DE PROTEINA TOTAL (PLATA)

Na₂CO₃.....60 mgr/ml
 Formaldehid 37%.....0.05%
 Na₂S₂O₃.5H₂O.....0.004 mgr/ml

COMASSIE BRILLIANT BLUE R-250 (Acid Blue 83)

Metanol.....25%
 Acid acètic.....20%
 CBB R-250.....0.1%

SOLUCIO DESTENYIDORA PER GELS TENYITS AMB COOMASIE BRILLIANT BLUE R-250

Metanol.....30%
 Acid acètic.....10%

TAMPO DE TRANSFERENCIA DESNATURALITZANT

Trizma base.....25 mM
 Glicina.....150 mM
 SDS.....0.01%
 Metanol.....20%

SOLUCIO DE SUBSTRATE PER HPRT (WESTERNS I DOT-BLOT)

Diaminobenzidina tetrahydrochloride (DAB).....0.5 mgr/ml
 CoCl₂.....0.1 %
 H₂O₂ 30%.....0.1 µl/ml
 en PBS 100 mM

SOLUCIO DE SUBSTRATE PER HRP (ELISA)

Orthophenildiamina (OPD).....2 mg/ml
 H₂O₂ 30%.....0.1 µl/ml
 en tampó citrat pH 5.5

TAMPO DE TRANSFERENCIA RENATURALITZANT

NaHCO₃.....10 mM
 Na₂CO₃..... 3 mM
 ajustar el pH a 9.9
 Metanol.....20%

Material i Mètodes

TAMPO DE RENATURALITZACIO

Tris-HCl 50.....50 mM
ajustar el pH a 7.4
Glicerol.....20%

17.4 - Tampons i solucions d'obtenció d'immunògens

CMF (pH 7.2)

NaH₂ PO₄.H₂O.....2.56 mM
NaCl.....14.28 mM
KCl.....10.21 mM
NaCO₃.....9.42 mM
BSA.....1%

SOLUCIO MACERADORA AQUOSA

Acid Acètic.....1 part
Glicerol.....1 part
H₂O.....13 parts

TITX - TAMPO DE SOLUBILITZACIO

Tris-HCl pH 8.....50 mM
EDTA.....5 mM
NaCl.....150 mM
Azida sòdica.....0.02%
Tritó X-100.....0.05%
DTT.....100 mM

TAMPO BORAT pH 11

Acid bòric.....200mM
NaOH 1N.....10%
ajustar el pH a 11

17.5 - Tampons i solucions de detecció de glicoconjugats

<p>TBS pH 7.5</p> <p>Tris-HCl.....50 mM NaCl.....150 mM ajustar el pH</p>
<p>TAMPO ACETAT SODIC pH 5.5</p> <p>Acetat sòdic.....100 mM ajustar el pH</p>
<p>PBS pH 6.5</p> <p>Fosfat sòdic.....50 mM NaCl.....150 mM ajustar el pH</p>
<p>SOLUCIO REVELADORA PER FOSFATASA ALCALINA</p> <p>NBT (4-nitroblue tetrazolium chloride).....0.385 mgr/ml X-fosfat.....0.1875 mgr/ml en tampó Tris-HCl pH 9.5</p>
<p>TAMPO TRIS-HCl pH 9.5</p> <p>Tris-HCl.....100 mM MgCl₂.....50 mM NaCl.... 100 mM ajustar el pH</p>

17.6 - Tampons de deglicosilació

TAMPO PER ENDOGLICOSIDASA H

EDTA.....10-50 mM
Tritó X-100.....0.5-2%
SDS.....0.2%
β-mercaptoetanol.....1%
en tampó acetat sòdic pH 4.5-6 100 mM

TAMPO PER ENDOGLICOSIDASA F

PMSF.....150 µgr/ml
SDS.....0.02%
βmercaptoetanol.....1%
en tampó acetat sòdic pH 4.5-6 100 mM

TAMPO PER SIALIDASA

EDTA.....10 mM
en tampó acetat sòdic pH 4.5-6 100 mM

RESULTATS

18 - FUSIONS REALITZADES

Per tal d'aconseguir una bateria d'anticossos monoclonals (MAbs) que permetessin realitzar els propòsits especificats a la Introducció i, més concretament, als Objectius, s'han realitzat 58 fusions que han generat 277 hibridomes productors d'anticossos específics de teixits, tipus i subtipus cel.lulars, regions i estructures en la planària *Dugesia(G)tigrina*. No tots ells han estat clonats fins a la monoclonalitat (apartat 9.7), ja que això hagués suposat una despesa de temps i diners insostenible en aquells moments. La majoria dels hibridomes productors d'anticossos específics han estat congelats postfusió un cop realitzat el crivellatge específic (apartat 11), prèvia amplificació en placa de 12 pous. En aquells casos en que s'ha considerat l'anticòs produït per un determinat hibridoma especialment interessant degut al tipus d'especificitat i/o els treballs a realitzar en un moment donat, aquest ha estat clonat segons els procediments descrits a Material i Mètodes fins assolir la monoclonalitat (apartat 9.7). D'aquests anticossos se'n parlarà als apartats 19, 20 i 21. Tots els hibridomes productors d'anticossos específics que no han estat clonats, resten congelats en nitrogen líquid constituint una "Mabsteca" (col.lecció d'hibridomes productors d'anticossos específics) a l'espera de ser clonats, de manera que puguin ser utilitzats quan les exigències de recerca per part del Grup ho requereixin. De tots ells es parlarà en aquest mateix apartat i a l'apartat 19.

18.1 - Característiques, resultats i rendiments de les fusions

Les característiques de cada fusió, entenent com a tals tots aquells paràmetres variables que intervenen, així com els rendiments i resultats obtinguts estan especificats a la figura 18. Aquests paràmetres variables són:

- el tipus d'immunogen emprat
- el protocol d'immunització
- la soca mielòmica emprada
- els mètodes de crivellatge

Resultats

Tots ells estan comentats dins aquest apartat. Els **rendiments** considerats a la figura 18 fan referència al nombre de pous amb clons respecte al nombre total de pous (%) (utilitzant en totes les fusions plaques de 96 pous), i al nombre de clons productors d'anticossos específics respecte els clons totals (%). Els **resultats** estan indicats fent referència únicament a l'especificitat dels anticossos produïts pels hibridomes generats. La llista exhaustiva d'hibridomes productors i la seva especificitat es pot veure a la figura 26 de l'aparatat 19. S'ha deixat l'espai corresponent en blanc en aquelles fusions on no ha hagut resultats o altres característiques a esmentar.

TAULA DE LES CARACTERISTIQUES, RENDIMENTS I RESULTATS DE LES FUSIONS
REALITZADES

Figura 18

ABREVIACIONS fig. 18 (s'han utilitzat algunes abreviacions de Baguñà i Romero, 1981, i Romero, 1987)

ACF - Adjuvant Complert de Freund
AIF - Adjuvant Incomplert de Freund
lent - 20 dies entre recordatoris
ràpid - 10 dies entre recordatoris
96p - 96 pous
banda 1, 2 i 3 - banda de SDS-PAGE (veure apartat 18.2.1)
nerv - cèl.lules nervioses
mus - cèl.lules musculars
nb - neoblasts
reg - regenerants

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
1	Neoblast enriquit	ACF,AIF(x2), PBS(x3) lent	NP3	20
2	Blastemes de 1, 2 i 3 dies	ACF,AIF(x2), PBS(x3) lent	NP3	0
3	Homogenat total	ACF,AIF(x2), PBS(x3) lent	NP3	10
4	Blastemes de 1, 2 i 3 dies	ACF,AIF(x2), PBS(x3) lent		
5	Homogenat total	ACF,AIF(x2), PBS(x3) ràpid	NS1	80
6	Blastemes de 1, 2 i 3 dies	ACF,AIF(x2), PBS(x3) ràpid	NS1	85
7	Neoblast enriquit	ACF,AIF(x2), PBS(x3) ràpid	NS1	60
8	Macerats	PBS(x6) lent	NS1	0
9	Homogenat caps fixats	PBS(x6) lent	NS1	100

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA	?		
ELISA Macerats de blastemes	0		
ELISA Macerats	0		
			Anulada
ELISA Dissociats	0		
ELISA Macerats i Seccions de blastemes	0.7		
ELISA Dissociats Seccions	5.5	Flamígeres, aci- dòfiles, cianòfi- les, musculars, general excepte gastrodermis, làmina basal	
ELISA Seccions	1.25	Cianòfiles, flamígeres	

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
10	Homogenat caps	PBS (x6) lent	NS1	10
11	Macerats	PBS (x7) lent	NS1	22
12	Macerats	PBS (x8) lent	NS1	0
13	Macerats	PBS (x9) lent	NS1	99
14	Macerats	In vitro	NS1	10
15	Membrana neoblasts enriquit	ACF, PBS (x5) lent	NS1	100
16	Nuclis neoblast enriquit	ACF, PBS (x5) lent	NS1	17
17	Neoblast enriquit	ACF, PBS (x5) lent	NS1	30
18	Membrana neoblast enriquit	ACF, AIF (x3), PBS (x3) lent	NS1	15

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions	0		
ELISA Seccions	0		
ELISA Seccions	9	Musculars, epi- dèrmiques, cianò- files, goblet, flamígeres, pa- renquimàtiques, gastrodèrmiques, làmina basal	
ELISA Seccions	1	Secretores	Una placa 96p postfusió
ELISA Seccions	4.1	Epidèrmiques, go- blet, cianòfiles, acidòfiles, gas- trodèrmiques, làmina basal	
ELISA Seccions	1.2	Cianòfiles	
ELISA Seccions	9	Gastrodèrmiques, cianòfiles, epi- dèrmiques	
ELISA Seccions	1.4	Goblet	

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
19	Nuclis neoblast enriquit	ACF, AIF (x3) PBS (x3) lent	NS1	0
20	Macerat de caps	ACF, AIF (x4) PBS (x2) lent	NS1	90
21	Dissociats			
22	Homogenat total absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	64
23	Homogenat total absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	50
24	Neoblast enriquit absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	65
25	Neoblast enriquit absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	52

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions	0		
			Mort ratolí
ELISA Seccions	4.5	Acidòfiles, cianòfiles, goblet, gastrodèrmiques, parenquimàtiques, general excepte gastrodermis	
ELISA Seccions	2.9	Goblet, cianòfiles, epidèrmiques, parenquimàtiques, làmina basal	
ELISA Seccions	4.5	Acidòfiles, secretores, goblet, cianòfiles, general excepte gastrodermis	
ELISA Seccions	4.8	Goblet, secretores, cianòfiles, general excepte gastrodermis	

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
26	Neoblast enriquit absorbit	ACF,AIF(x2) PBS(x3) lent	NS1	78
27	Banda 1 SDS- PAGE nb	Acrilamida (x6) lent	NS1	100
28	Banda 2 SDS- PAGE nb	Acrilamida (x6) lent	NS1	75
29			NS1	100
30			NS1	100
31	Banda 3 SDS- PAGE nb	Acrilamida (x6) lent	NS1	80
32	Banda 1 SDS- PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	60
33	Banda 2 SDS- PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	85
34	Banda 2 SDS- PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	90
35	Banda 1 SDS- PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	82
36	Banda 1 SDS- PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	93

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions	2.9	Cianòfiles, gastrodèrmiques, secretores, general excepte gastroder.	
ELISA Seccions	2.5	Muscular, epidèrmiques, acidòfiles, cianòfiles, làmina basal	
ELISA Seccions	1.6	Cianòfiles	
ELISA Seccions	0.2	DNA	Ratolí no immunitzat
ELISA Seccions	1.25	Musculars, epidèrmiques	Ratolí no immunitzat
ELISA Seccions	0		
ELISA Seccions	0		
ELISA Seccions	3.2	Musculars, cianòfiles, nuclis, làmina basal	
ELISA Seccions	0.5	Nerviós, cianòfiles	
ELISA Seccions	0.5	Nerviós, musculars	
ELISA Seccions	0.7	Musculars, cianòfiles	

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
37	Banda 2 SDS-PAGE nerv	Acrilamida (x6) lent	NS1	85
38	Macerats	PBS (x6) ràpid	NS1	50
			NP3	38
39	Homogenat de faringe	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	30
40	Macerats	PBS (x6) lent	NS1	90
			NP3	85
41	Homogenat de faringe	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	60
42	Macerats	PBS (x6) lent	NS1	100
43	Macerats	PBS (x6) lent	NS1	100
44	Neoblast enriquit absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	95
45	Neoblast enriquit absorbit haptè	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	87

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions	0		
ELISA Seccions	0		1/2 melsa
Macerats			1/2 melsa
ELISA Seccions Macerats	0		
ELISA Seccions	0		1/2 melsa
Macerats			1/2 melsa
ELISA Seccions Macerats	1	Epidèrmiques	
ELISA Seccions Macerats	1.25	Musculars, acidò- files, gastrodèr- miques, nervioses	
ELISA Seccions Macerats	0.8	Acidòfiles, se- cretors, cianò- files, nuclis	
ELISA Seccions Macerats	0		
ELISA Seccions Macerats	0.5	Epidèrmiques, cianòfiles	

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
46	Macerats filtrats (nb, musc, nerv)	PBS (x6) lent	NS1	89
47	Macerats filtrats (nb, musc i nerv)	PBS (x6) lent	NS1	97
48	Neoblasts enriquits absorbits	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	99
49	Neoblasts enriquits absorbits	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	98
50	Neoblast enriquit absorbit haptè	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	100
51	Neoblast enriquit absorbit haptè	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	97
52	Homogenat <i>D. mediterranea</i>	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	
53	Blastema cefàlic 1/2 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	94
54	Blastema caudal 1/2 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	71

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions Macerats	1.2	Musculars, epidèr miques, cianòfiles, nervioses	
ELISA Seccions Macerats	0.4	Musculars, epidèr miques	
ELISA Seccions Macerats	1	Musculars, epidèr miques, cianòfiles	
ELISA Seccions Macerats	0.4	Regió central, gastrodèrmiques, epidèrmiques	
ELISA Seccions Macerats	0		
ELISA Seccions Macerats	0		
			Contaminació
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	2	Gastrodèrmiques, epidèrmiques, nuclis	
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	0		

Resultats

FUSIO	IMMUNOGEN	IMMUNITZACIO	PARENTAL	% CLONS
55	Blastema cefàlic 1 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	100
56	Blastema caudal 1 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	100
57	Blastema cefàlic 3 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	99
58	Blastema caudal 3 h absorbit	ACF, AIF (x2) PBS (x3) lent	NS1	98

Fig. 18: Característiques, rendiments i resultats de les fusions realitzades

CRIVELLATGE	% PRODUCTORS	RESULTATS	ALTRES
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	0.6	Musculars, cianòfiles	
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	0.8	Cianòfiles, general excepte gastroder- mis, làmina basal	
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	0.8	Muscular, cianòfiles	
ELISA Seccions reg. Macerats reg.	0.6	Epidèrmiques, cianòfiles	

18.2 - Resultats i rendiments de les fusions en funció dels paràmetres variables

18.2.1 - Immunògens

Els immunògens utilitzats per activar la proliferació de limfòcits B s'han obtingut seguint els procediments descrits a l'apartat 7 de Material i Mètodes, havent-se injectat sempre en les quantitats i pureses especificades. En relacionar els immunògens emprats amb els resultats obtinguts en cada fusió, tenint en compte que en les últimes fusions s'han seguit criteris més restrictius que en les primeres a l'hora de clonar i/o congelar hibridomes productors (apartat 18.1), es poden observar correspondències entre ambdós paràmetres.

Les consideracions que cal fer al respecte són les següents:

1) Immunització amb antígens absorbits sobre anticossos ja generats

En les fusions F-22 i 23, en les que s'absorbeixen antígens provinents d'homogenats totals de planària, i en les fusions F-24, 25, 26, 44, 45, 48, 49, 50 i 51, en les que s'absorbeixen antígens provinents d'homogenats de neoplasts enriquits (apartats 7.2.1, 7.2.2, 7.2.5, 7.2.8), la finalitat és eliminar o reduir al màxim aquells antígens que tenen un alt poder immunogènic i que generen anticossos que van apareixent succesivament en les fusions realitzades. Aquesta absorció s'ha fet sobre una barreja de 15 MAb's que presenten patrons de marcatge en cèl.lules secretores, majoritàriament de tipus cianòfil, i que anaven apareixent de forma sistemàtica en gran nombre de fusions. Això ens va fer pensar que els antígens que els generaven podrien estar desviant la resposta immune cap a ells, "emascarant" altres antígens potencialment interessants. La majoria d'aquests antígens poden tenir un caràcter glucídic o glucoderivat, ja que és aquest el tipus de secreció que presenten aquestes cèl.lules (mucus lliscant i adherent, Baguñà, 1973).

Per comprovar aquest extrem, antígens totals (homogenat total) de planària van ser tractats amb pronasa E i proteinasa K, fixats sobre una membrana de nitrocel.lulosa i immunodetectats amb tots 15 MAb's

(fig. 19). Amb aquest immuno-dot, s'espera que si l'epítop resideix en una fracció proteica, l'antigen no serà detectat després del tractament amb aquets enzims proteolítics. Tal i com es desprèn del resultat obtingut, en la majoria dels antigens l'epítop reconegut pel MAb sembla residir en una fracció no proteica.

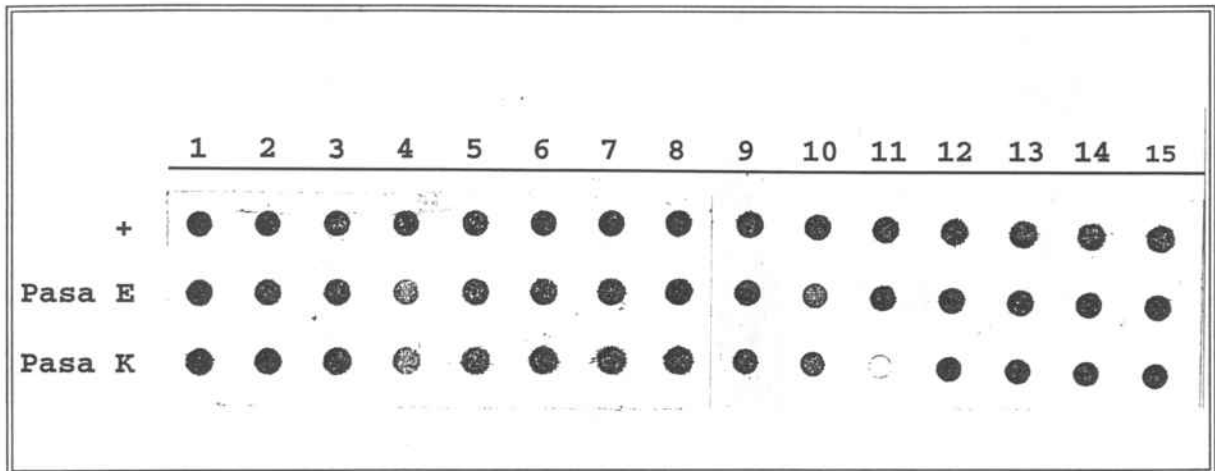


Fig. 19: Immunodot dels 15 MABs utilitzats en les absorcions antigèniques. +, fixació al filtre d'homogenat total de planària incubat amb tampó d'actuació de proteases; Pasa E, homogenat total de planària incubat amb pronasa E; Pasa K, homogenat total de planària incubat amb proteinasa K; 1-15, diferents MABs utilitzats.

Al mateix temps, s'observa una forta disminució en la llapissada de fons quan es fa córrer antigen absorbit (tant si prové d'homogenats totals de planària com de neoblasts enriquits) en un gel d'electroforesi SDS-PAGE tenyit amb Coomassie Brilliant Blue R-250 (fig. 20) (prenent com a control antigen no absorbit). Les bandes que es veuen nítides no pateixen, en canvi, cap disminució significativa. Això pot indicar que la llapissada està formada per glúcids o els seus derivats (p.e., com descriu Trimble i Maley, 1984, pel cas concret de l'invertasa; per revisions generals, veure Beeley, 1985; i Chaplin i Kennedy, 1986), molècules que de fet no avancen correctament en una electroforesi (Beeley, 1985). Algunes d'aquestes molècules podrien formar part o ser precursors del moc que presenten en gran quantitat aquests organismes, o que si més no formen part de les secrecions més abundants dels tipus cel·lulars secretors. A més a més, indica que són molècules amb un alt poder immunogènic, en concordança amb els resultats obtinguts durant la producció d'anticossos monoclonals en l'espècie *Dugesia japonica* per K. Agata (1992, comunicació personal).

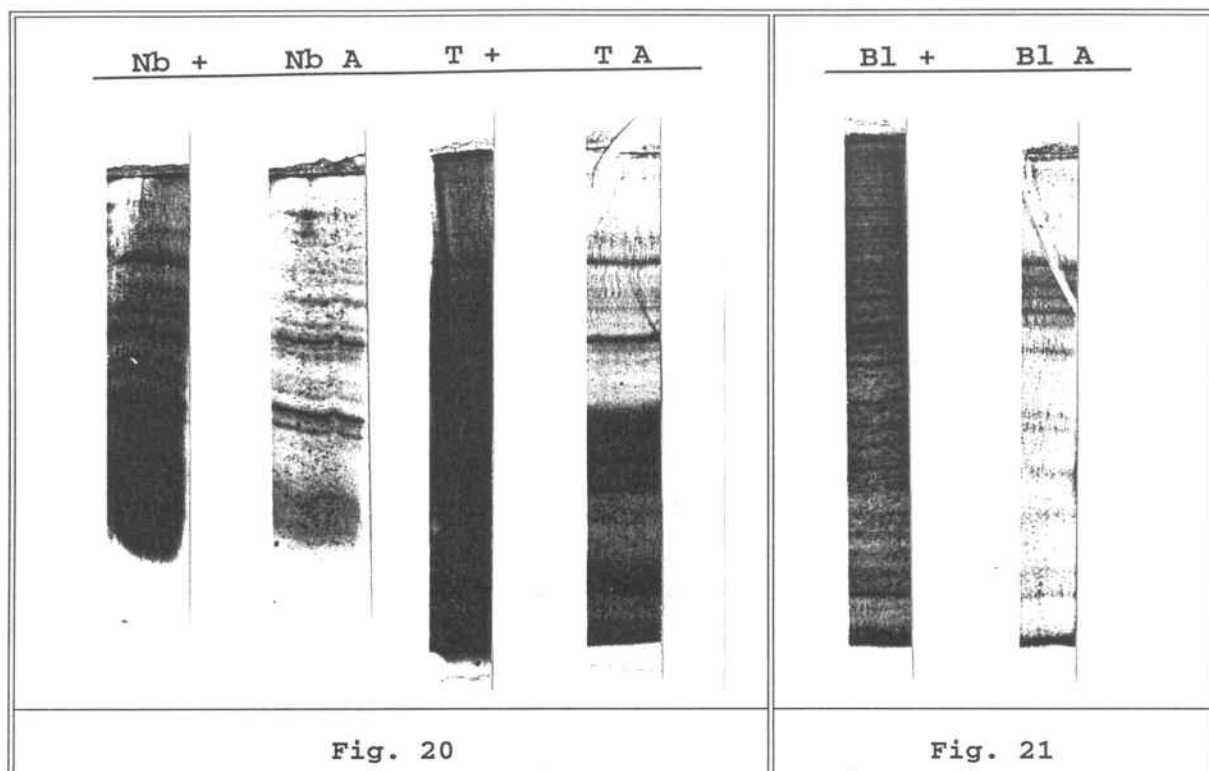


Fig. 20: SDS-PAGE (12.5 % acrilamida-bisacrilamida) d'homogenat absorbit amb la combinació de 15 MAb's específics de cèl.lules secretores. *Nb +*, antígens de neoblasts enriquits per filtració pre-absorció; *Nb A*, antígens de neoblasts enriquits per filtració post-absorció; *T +*, antígens totals de planària pre-absorció; *T A*, antígens totals de planària post-absorció.

Fig.21: SDS-PAGE (12.5 % acrilamida-bisacrilamida) d'homogenat de blastemes de regeneració absorbits amb anticossos policlonals obtinguts per immunització amb organismes adults intactes. *Bl +*, antígens de blastemes de regeneració pre-absorció; *Bl A*, antígens de blastemes de regeneració post-absorció.

En les fusions de F-53 a F-58, ambdues incloses, s'absorbeixen antígens provinents de blastemes de diferents estadis de regeneració amb la finalitat d'eliminar o reduir al màxim aquells antígens que no siguin exclusius dels respectius estadis de regeneració. Aquesta absorció s'ha fet sobre anticossos policlonals obtinguts immunitzant ratolins amb planàries intactes segons els procediments descrits. En testar l'absorció fent córrer en un gel d'electroforesi (SDS-PAGE) antígens absorbits i no absorbits i tenyir-lo amb Coomassie Brilliant Blue, s'observa la quasi total desaparició de tinció en els que han estat absorbits (fig. 21).

Quan es quantifica la proteïna absorbida mitjançant reactiu de Bradford, aquesta suposa d'un 20% a un 40% del total.

Efectivament, en les fusions en les que s'han absorbit els antigens amb la barreja dels 15 MABs, s'observa una disminució important en el nombre d'anticossos específics de cèl.lules de tipus secretor (fig. 18 i fig. 26). En les fusions on no s'ha absorbit l'immunogen a injectar, un 60 % dels hibridomes generats són específics de cèl.lules secretores, i en les que s'han absorbit, aquesta especificitat es presenta en un 45 % dels hibridomes.

Les fusions en que la font d'immunògens són poblacions enriquides de neoblasts s'han fet per obtenir anticossos específics de cèl.lula soca. En elles no s'ha obtingut cap hibridoma productor d'anticossos específics de neoblast. El mateix ha succeït amb les que la font d'antigen són blastemes de regeneració, en les que no s'ha obtingut cap anticòs específic d'aquests estadis.

2) Immunització amb fraccions proteiques diferencials de neoblasts i cèl.lules nervioses

L'obtenció de fraccions proteiques diferencials específiques o majoritàries de neoblasts i cèl.lules nervioses (Collet, 1990) obtingudes mitjançant gels d'electroforesi SDS-PAGE, s'ha fet amb la finalitat d'obtenir anticossos específics d'aquests dos tipus cel.lulars, ja que en les fusions realitzades amb anterioritat s'havien obtingut anticossos específics de pràcticament tots els tipus cel.lulars menys aquests dos. Aquestes fraccions s'han obtingut segons els procediments descrits a l'apartat 7.2.7.

En comparar el patró de bandes obtingut entre homogenat d'una població enriquida de neoblasts i homogenat total (fig. 22), s'observen 3 bandes diferencials, no exclusives però sí majoritàries, amb un pes molecular aparent de 25 kDa (fracció 1), 40 kDa (fracció 2) i 60 kDa (fracció 3). En les fusions realitzades amb aquests immunògens (fraccions o bandes 1, 2 i 3 de neoblast) s'han obtingut anticossos específics de tipus i subtipus cel.lulars que deuen tenir l'antigen reconegut dins aquestes fraccions. Malauradament, en cap d'aquestes fusions no s'ha obtingut tampoc cap anticòs específic de cèl.lula soca.

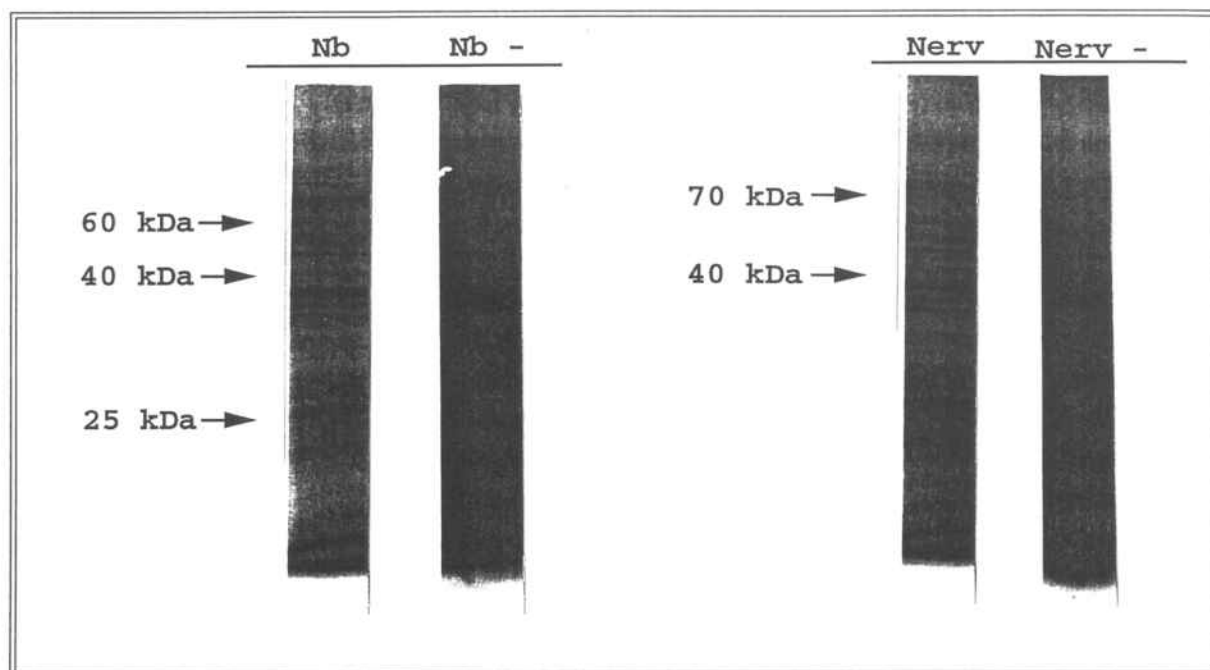


Fig. 22: Bandes proteiques diferencials d'homogenat de ganglis cefàlics i de neoblasts en SDS-PAGE (12 % acrilamida-bisacrilamida). Nerv, homogenat de ganglis cefàlics (teixit nerviós); Nerv -, homogenat de cues de planària (amb un percentatge molt baix de teixit nerviós); Nb, homogenat de neoblasts enriquits per filtració; Nb -, homogenat de cèl.lules diferenciades.

En comparar el patró de bandes obtingut entre homogenat de ganglis cefàlics (cèl.lula nerviosa) i homogenat de cues (pel seu baix nombre de cèl.lules nervioses, Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987; Romero i Baguñà, 1991), s'observen 2 bandes diferencials, no exclusives però sí majoritàries, amb un pes molecular aparent de 40 kDa (fracció 1) i 70 kDa (fracció 2). En les fusions realitzades amb aquests immunògens (fracció o banda 1 i 2 de nerviós) s'han obtingut dos dels cinc anticossos específics d'aquest tipus cel.lular (fig. 26), un amb cada una d'aquestes fraccions. A més a més, en dos de les fusions provinents de la immunització amb la fracció 1 s'han obtingut anticossos específics de cèl.lules musculars. L'antigen de cèl.lula muscular reconegut per aquests anticossos deu estar també dins aquesta fracció.

3) Immunització amb membranes cel.lulars

En aquelles fusions en què s'ha immunitzat el ratolí amb membranes cel.lulars (F-15 i F-18), l'especificitat dels anticossos generats s'esbiaixa cap a aquesta estructura. El 66% d'ells reconeix antigens de membrana, mentres que el 34% restant mostra especificitat

per vesícules secretores de diversos tipus cel.lulars secretors. Aquest 34% d'anticossos són fruit de la presència de vesícules contaminants en la mostra i de l'alt poder immunogènic d'aquestes. En les fusions en les que els limfòcits B no s'havien activat solament amb membranes aïllades, el nombre d'anticossos específics d'antígens de membrana és inferior al 10%.

4) Immunització amb poblacions de neoblasts enriquits

En aquelles fusions en que s'ha immunitzat els ratolins amb poblacions cel.lulars enriquides en neoblasts (cèl.lules senceres), l'especificitat dels anticossos generats depèn de si les cèl.lules s'han obtingut per dissociació (F-7) o per maceració (F-46 i F-47). Quan les cèl.lules s'obtenen per dissociació, la majoria dels anticossos generats (81%) són específics de cèl.lules secretores, gairebé el doble que en la població general d'anticossos (43%, fig. 26). Aquest alt percentatge és degut a que quan s'obté una població enriquida en neoblasts per dissociació, els principals contaminants són vesícules provinents de cèl.lules trencades.

Això no es produeix quan s'obtenen per maceració, ja que aquest procés no tant sols disgrega les cèl.lules sinó que simultàniament les fixa, de manera que són més resistents als tractaments i es trenquen amb una freqüència menor. En aquests casos, però, s'observen cèl.lules musculars i nervioses contaminants ja que algunes d'elles passen a través de les malles de 10 μm de diàmetre, amb les que s'enriqueix de la població de neoblasts (apartat 7.2.5), degut a la seva forma allargada. Efectivament, l'especificitat dels anticossos obtinguts en aquestes fusions mostra un clar biaix cap a aquests dos tipus cel.lulars: el 40% dels anticossos generats són específics de cèl.lules musculars i el 20% específics de nervioses. Aquests percentatges són molt més alts que els observats en la població general d'anticossos (13% per cèl.lules musculars i 1.4% per nervioses).

5) Immunització amb fraccions particulades

En aquelles fusions en què s'han immunitzat els ratolins amb una fracció particulada (cèl.lula sencera), s'han generat un 10% més de hibridomes productors per fusió (en mitjana) que en les què s'han immunitzat amb una fracció no particulada. Mentre en els primers la mitjana d'hibridomes productors per fusió és de 5, en els segons és de 4.5.

6) No immunitzats

Les fusions fetes amb ratolins no immunitzats han generat bàsicament anticossos específics de cèl.lules musculars (F-30) i de DNA (F-29, ampliat a l'apartat 19.5.2). Les possibles implicacions de la generació d'aquestes especificitats estan comentades a la Discussió.

18.2.2 - Immunitzacions

Prèviament a l'inici de l'obtenció d'hibridomes, es va optimitzar el procediment d'immunització per tal de provocar la màxima resposta immunitària amb el mínim esforç metodològic i de manipulació. Amb aquesta finalitat es varen provar tres rutes d'immunització i tres seqüències temporals diferents.

Les rutes d'immunització assajades van ser:

- subcutània
- intraperitoneal
- intravenosa

El títol d'anticòs generat (mesurat mitjançant la tècnica d'ELISA) en immunitzar ratolins per aquestes tres vies, amb la mateixa seqüència temporal i amb homogenat total de planària, està representat a la fig. 23.

Les immunitzacions subcutànies provoquen un títol d'anticòs clarament inferior a les fetes per les altres vies que, alhora, generen un títol molt semblant entre elles. Aquest fet, junt amb que la via intraperitoneal requereix molt menys esforç, ha fet que la majoria de les immunitzacions s'hagin fet per aquesta via. S'ha utilitzat la via intravenosa quan no s'ha disposat de suficient antigen, donat que aquesta via en requereix molt menys per produir el mateix efecte (títol d'anticòs, veure apartat 8.2).

Les seqüències temporals assajades afecten tant sols als primers recordatoris, sense que s'hagin modificat mai els tres recordatoris anteriors a les fusions, que sempre s'han fet amb intervals de 24-48 hores (apartat 8.3). Les seqüències temporals assajades han estat les següents: 7 dies entre recordatoris, 10 dies entre recordatoris i 20 dies entre recordatoris. Els resultats obtinguts en mesurar el títol

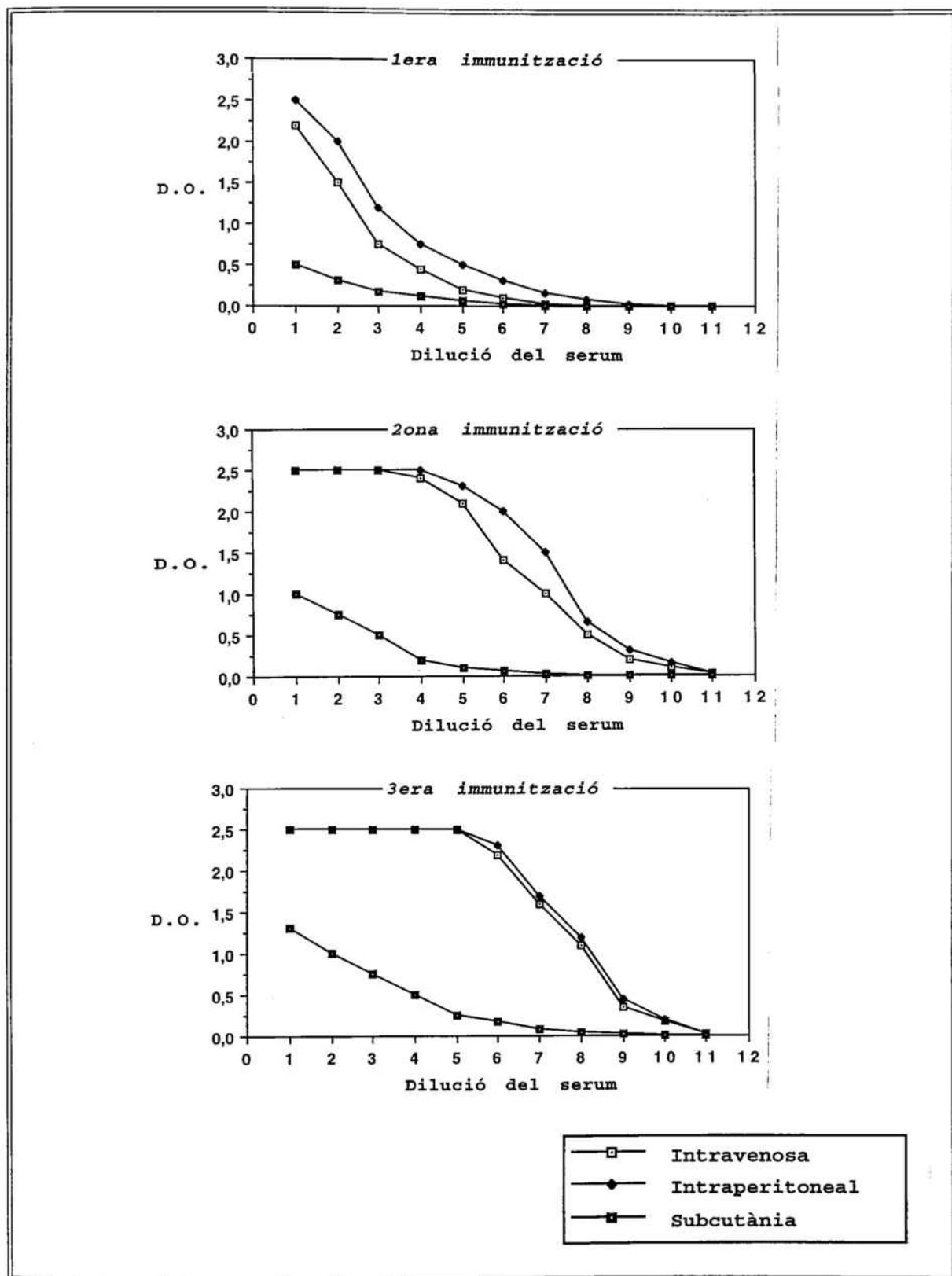


Fig. 23: Títol d'anticòs generat en tres immunitzacions consecutives i per tres vies diferents d'introducció de l'immunogen. Vies d'introducció d'immunogen: subcutània, intraperitoneal i intravenosa. Títol d'anticòs mesurat mitjançant la tècnica d'ELISA.

Resultats

d'anticòs generat (mitjançant la tècnica d'ELISA) immunitzant ratolins intraperitonealment amb homogenat total de planària mostren que els temps més idonis per provocar una màxima resposta immune són 10 i 20 dies entre recordatoris (fig. 24). Per tant s'han utilitzat aquestes dues seqüències temporals per immunitzar els ratolins (especificades a la fig. 18 com a ràpides o lentes depenent de si els intervals eren de 10 o 20 dies respectivament).

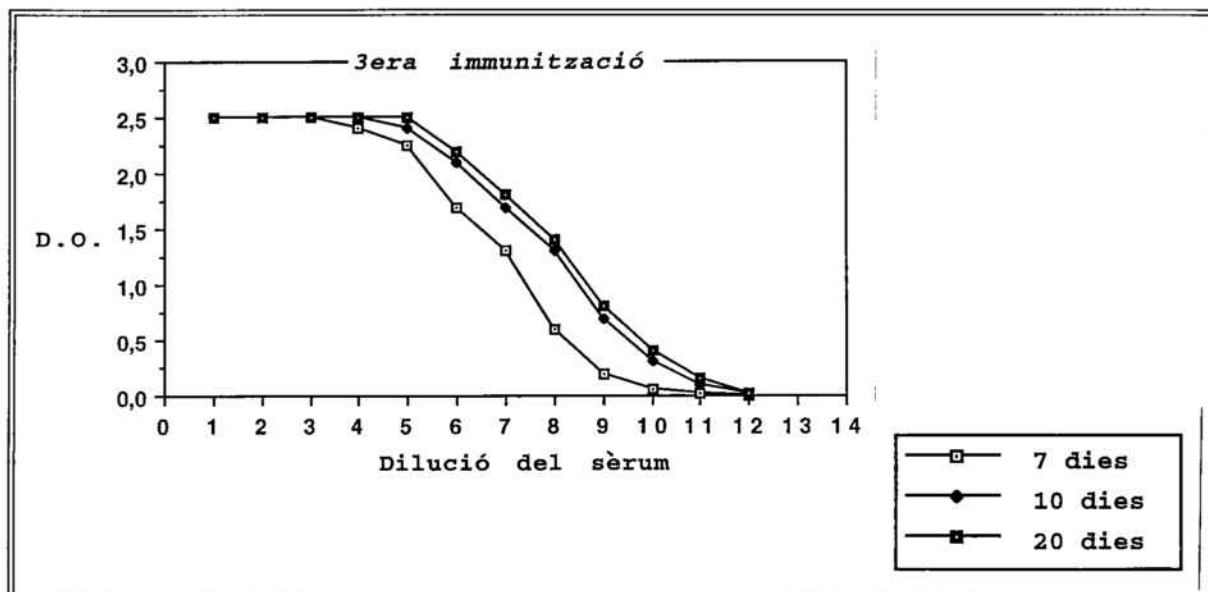


Fig. 24: Títol d'anticòs generat a la 3^{era} immunització amb tres seqüències temporals diferents d'introducció de l'immunogen. Seqüències temporals: 7, 10 i 20 dies entre recordatoris. Via d'introducció del immunogen: intraperitoneal. Títol d'anticòs mesurat mitjançant la tècnica d'ELISA.

18.2.3 - Soques mielòmiques emprades

En les primeres fusions realitzades (de F-1 a F-3) es disposava únicament de la soca mielòmica NP3 (cedida pel Dr. Enjuanes i utilitzada exitosament per Fibla (1991) per obtenir MAb's específics de Adh (alcohol deshidrogenasa) de diverses espècies de *Drosophila*). Degut a una contaminació de micoplasmes ocasionada per un sèrum fetal boví (FCS) contaminat el qual va ser subministrat l'any 1989 i en lè que es van veure afectades totes les aliquotes de la soca, es va haver d'obtenir un altre mieloma. El nou mieloma (cedit pel Dr. Vilella), pertanyent a la soca NS1 (apartat 9.2), es va utilitzar de la fusió F-5 a la F-37, moment en que es va rebre un mieloma de la soca NP3 (cedit novament pel Dr. Enjuanes). Per veure quina soca ens donava un millor

rendiment, es va realitzar una provatura en dues fusions, en la què la mitat dels limfòcits B es varen fusionar amb mieloma NS1 i l'altre mitat amb NP3. En la primera d'aquestes fusions (F-38) es va obtenir un rendiment del 50% de pous amb clons respecte pous totals amb la soca NS1 i del 25% amb la NP3. Pensant que potser la soca NP3 no estava en la fase de creixement òptim (exponencial), es va realitzar una segona provatura (F-40) en la què es va obtenir un rendiment del 90% de pous amb clons respecte pous totals amb la soca NS1 i del 85% amb la NP3 (fig. 25). Veient que els resultat eren molt semblants però sempre lleugerament superiors amb la soca NS1, i ja que s'havien realitzat 32 fusions amb ella i sols 3 amb la NP3, es va decidir fer totes les fusions següents amb mieloma de la soca NS1.

18.2.4 - Protocols de fusió

Inicialment, en les fusions F-1, F-2 i F-3, es va utilitzar el protocol de fusió descrit per Nowinsky i col. (1979) i modificat per Sanz i col. (1985). Aquest protocol és sensiblement més llarg que el descrit per Galfre i col. (1977) i revisat per Harlow i Lane (1988) (veure apartat 9.5). Inclou processos com una lisi freda d'eritròcits, un tractament amb DMEM 5% FCS amb un 0.5% d'heparina, i rentats amb DMEM 5% FCS. Utilitzant aquest protocol més llarg, s'obtenien uns rendiments de fusió (mesurats com % de pous amb clons respecte pous totals) molt baixos (fig. 18). Es per això que a la F-5 es va assajar el protocol de Galfre i col. (1977), amb el qual es va obtenir un rendiment més satisfactori. Aquest rendiment superior, aconseguit possiblement per la menor dificultat que suposa aquest mètode, junt amb l'estalvi de temps i medis, van fer que fos adoptat en totes les fusions posteriors a la F-5. Els baixos rendiments obtinguts en alguna de les primeres fusions fetes per aquest procediment són atribuïbles en la major part dels casos a errors humans i no de la tècnica.

18.2.5 - Mètodes de crivellatge

Els mètodes de detecció seleccionats pel crivellatge dels anticossos han estat:

- tècniques d'ELISA

Resultats

- tècniques immunohistoquímiques sobre seccions d'organismes inclosos en parafina
- tècniques immunocitoquímiques sobre dissociats i macerats cel.lulars

La primera s'ha utilitzat per detectar els hibridomes productors d'anticossos i les altres dues per establir l'especificitat dels anticossos detectats (apartat 11). Les tècniques d'ELISA, immunohistoquímiques i immunocitoquímiques sobre cèl.lules dissociades havien estat optimitzades abans de començar les fusions (en col.laboració amb L. Sumoy). En canvi, la tècnica immunocitoquímica sobre macerats cel.lulars no va quedar definitivament optimitzada fins a la fusió F-38, moment en què va ser incorporada com a mètode de crivellatge dels sobrenedants de cultius. La tècnica immunocitoquímica sobre dissociats cel.lulars presenta dos inconvenients que no la fan útil pel crivellatge postfusió:

1) la "delicadesa" amb què s'ha de dur a terme, degut a la extrema fragilitat de les cèl.lules aconseguides per aquest mètode, la fan difícilment compaginable amb un crivellatge a gran escala com el que s'ha de fer postfusió

2) pocs dels anticossos que immunoreaccionen amb seccions d'organismes inclosos en parafina presenten immunoreacció amb dissociats cel.lulars

Això ha fet que tant sols s'hagin utilitzat els dissociats cel.lulars com a mètode de crivellatge en algunes ocasions (fig. 18). Si considerem també que la tècnica immunocitoquímica sobre macerats cel.lulars no s'ha aplicat de manera regular fins a la F-38, fa que no hagi hagut una detecció a nivell "cel.lular" estable fins aquesta fusió. Això ha suposat problemes d'identificació en alguns dels tipus cel.lulars reconeguts pels anticossos i, pot ser, la pèrdua d'algun anticòs potencialment valuós.

El mètode d'immunodetecció sobre cèl.lules macerades ha resultat bastant versàtil quan a nombre d'anticossos immunoreactius, però no tant com l'immunohistoquímic sobre seccions d'organismes inclosos en parafina, que ha resultat ser la més versàtil de les metodologies assajades de detecció de l'especificitat dels anticossos.

Hi ha una coincidència bastant alta entre els resultats obtinguts en aquestes dues tècniques. El 50% dels anticossos generats que mostren especificitat en les immunotincions manifesten el mateix patró de

marcatge tant sobre seccions com sobre macerats; el 40% sols ho fan sobre seccions i no immunoreaccionen sobre macerats cel.lulars; el 10% sols mostren especificitat sobre macerats cel.lulars i no immunoreaccionen amb seccions; i menys de l'1% tenen especificitats aparentment diferents en aquestes dues tècniques (fig. 25). El fet que alguns anticossos sols immunoreaccionin amb una de les dues tècniques i les aparents discrepàncies d'especificitat amb alguns d'ells pot ser degut a que les diferències de processat entre aquestes tècniques alterin de manera diferent els diversos antigens a detectar. En alguns casos les discrepàncies podrien ser degudes a la dificultat que hi ha en distingir certs tipus cel.lulars amb aquests dos mètodes.

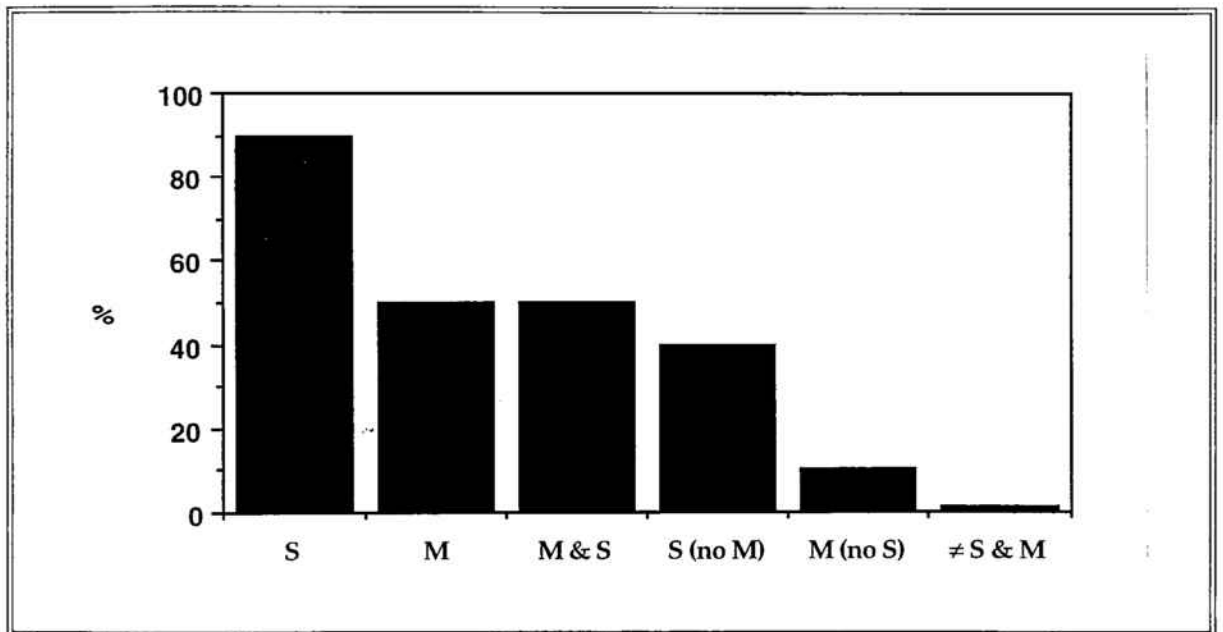


Fig. 25: Percentatge d'anticossos immunoreactius amb les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques emprades en els crivellatges de sobrenadants de cultiu postfusió. *S*, % d'anticossos immunoreactius en seccions d'organismes inclosos en parafina; *M*, % d'anticossos immunoreactius en macerats cel.lulars; *M & S*, % d'anticossos immunoreactius tant en seccions en parafina com en macerats cel.lulars i amb el mateix patró d'immunotinció; *S (no M)*, % d'anticossos immunoreactius solament amb seccions en parafina; *M (no S)*, % d'anticossos immunoreactius solament en macerats cel.lulars; *≠ S & M*, % d'anticossos immunoreactius tant en seccions en parafina com en macerats cel.lulars però amb patrons aparentment diferents d'immunotinció.

19 - DESCRIPCIÓ DE L'ESPECIFICITAT BÀSICA DELS ANTICOSSOS OBTINGUTS

Els 277 hibridomes productors d'anticossos obtinguts s'han classificat en funció d'uns tipus bàsics d'especificitat. Alguns d'ells han estat clonats fins a la monoclonalitat, i per tant són productors de MAb's. La majoria, però, han estat congelats postfusió o després d'un primer clonatge, a l'espera de ser clonats quan s'hagin d'utilitzar en funció de les necessitats de recerca. En aquests darrers, tota la caracterització de la seva especificitat s'ha fet amb el sobrenedant dels cultius d'amplificació previs a la criopreservació. Es per això que no s'ha fet amb MAb's, sinó amb anticossos, entenent la diferència entre ambdós com l'assoliment o no, respectivament, de la monoclonalitat. Això pot comportar alguns errors en la seva caracterització per la presència, per exemple, de més d'un cló productor en un pou de cultiu. Al mateix temps, també pot produir-se la pèrdua d'algun d'ells durant el procés de clonatge, fet no infreqüent i degut a la pèrdua de cromosomes durant el procés d'estabilització de l'hibridoma (apartats 5.3.2 i 9.7).

Tots els anticossos obtinguts pertanyen al grup de les IgG, ja que aquest ha estat un dels criteris de selecció en el crivellatge mitjançant ELISA (amb anticossos comercials específics de IgG, cabra anti ratolí lligat a peroxidasa, GAM-PO IgG específic, Nordic, apartat 11.1). Aquest criteri de selecció es va prendre després d'observar, en les primeres fusions, que els anticossos que no pertanyien a aquest grup (que de fet eren tots ells IgM) donaven una alta inespecificitat, al mateix temps que la freqüència amb que es perdien els hibridomes productors o amb que aquests deixaven de produir anticossos era molt més alta que per les IgG. D'aquesta manera es concentraven tots els esforços en aquells clons que tenien majors probabilitats de supervivència.

Quan es faci referència a anticossos produïts per hibridomes que han assolit la monoclonalitat es parlarà de MAb's. En canvi, s'utilitzarà el terme genèric d'anticossos quan aquests hagin estat produïts per hibridomes que no han assolit l'estat esmentat. Quan s'hagi de fer referència a un conjunt d'anticossos que inclogui tant MAb's com anticossos no monoclonals, se'ls anomenarà també anticossos.

Així mateix, i per abreviar, en moltes ocasions es parlarà d'anticossos quan en realitat s'hauria de parlar de clons (o

hibridomes) productors d'anticossos. Aquesta inexactitud troba la seva justificació en un intent de simplificació, sense pretendre fomentar errors ni confusions. Aquest intent de simplificació s'ha fet ja que en aquesta Tesi els anticossos (o els clons productors d'anticossos) han estat generats i utilitzats únicament com una eina de treball, i en cap cas com un fi en sí mateixos.

19.1 - Classificació dels anticossos en funció de la seva especificitat

Els tipus bàsics d'especificitat que s'han considerat per fer la classificació són:

1) Específics de tipus cel.lulars: Aquells que identifiquen un tipus cel.lular morfològicament diferenciable segons les descripcions morfològiques de Baguñà (1973) i Baguñà i Romero (1981).

2) Específics de subtipus cel.lulars: Aquells que identifiquen una població de cèl.lules immunològicament diferenciable d'altres morfològicament iguals (amb les condicions necessàries per utilitzar aquesta paraula quan es tracta de criteris morfològics) per la presència de determinants antigènics diferencials, ja sigui per qüestions de funció i/o posició, i pertanyents a un dels tipus cel.lulars morfològicament descrits per Baguñà (1973) i Baguñà i Romero (1981).

3) Específics de més d'un tipus cel.lular: Aquells que identifiquen més d'un tipus cel.lular morfològicament diferenciable segons les morfologies descrites per Baguñà (1973) i Baguñà i Romero (1981), però que comparteixen algun determinat antigènic ja sigui per qüestions de funció, origen o llinatge, detectable immunològicament.

4) Específics d'estructures subcel.lulars: Aquells que identifiquen estructures subcel.lulars com els nuclis, la làmina basal, el DNA o la matriu extracel.lular (MEC).

5) Específics regionals: Aquells que evidencien una regió de l'organisme, immunodetectant un determinat antigènic present a totes o gairebé totes les cèl.lules d'aquella regió, i per tant a tots o gairebé tots els tipus cel.lulars amb representació en aquella regió,

i que està absent en totes o gairebé totes les cèl.lules forànies a aquella regió.

La nomenclatura utilitzada és la descrita a l'apartat 16. En alguns casos es troben anticossos anomenats de manera diferent dins un mateix grup. Això es deu a que s'ha conservat el nom assignat a cadascun d'ells després de la primera caracterització de la seva especificitat, encara que en fer una caracterització més acurada se'ls hagi inclòs en algun altre grup. Hi ha 9 MABs que tenen un altre entre parèntesi al costat del nom assignat. El nom entre parèntesi fa referència al mateix MAB, però ha estat utilitzat en substitució del nom original en Espinosa i col. (1992), Bueno i col. (1992), Espinosa (1993) i Bueno i col. (1994b).

El llistat d'anticossos segons els criteris de classificació esmentats es pot veure a la fig. 26.

ESPECIFICITAT:	TIPUS CEL.LULARS
MUSCULARS	TMUS-13.1 ; TMUS-13.2 ; TMUS-13.3 ; TMUS-13.4 ; TMUS-13.5 ; TMUS-13.6 ; TMUS-13.7 TMUS-27.1 ; TMUS-27.2 TMUS-30.1 ; TMUS-30.2 TMUS-33.1 ; TMUS-33.2 ; TMUS-33.3 ; TMUS-33.4 ; TMUS-33.5 ; TMUS-33.6 ; TMUS-33.7 ; TMUS-33.8 ; TMUS-33.9 ; TMUS-33.10 TMUS-35 TMUS-36 TMUS-42.1 ; TMUS-42.2 TMUS-46 TMUS-47 TMUS-48.1 ; TMUS-48.2 ; TMUS-48.3 TMUS-55.1 ; TMUS-55.2 TMUS-57.1 ; TMUS-57.2 ; TMUS-57.3

Resultats

<p>EPIDERMiques</p>	<p>TEPI-13.3 ; TEPI-13.4 TEPI-15.6 TEPI-27 TEPI-30.1 ; TEPI-30.2 ; TEPI-30.3 ; TEPI-30.4 TEPI-41 TEPI-46 TEPI-47 TEPI-48.1 TEPI-53.1 ; TEPI-53.2</p>
<p>FLAMIGERES</p>	<p>TFLA-7 TFLA-9 TFLA-13.1 ; TFLA-13.2</p>
<p>ACIDOFILES (SECRETORES)</p>	<p>TACID-7.2 TACID-15.1 TACID-22 TACID-24 TACID-27 TACID-42.1 ; TACID-42.2 TACID-43</p>
<p>CIANOFILES (SECRETORES)</p>	<p>TCIAN-9 TCIAN-13.3 ; TCIAN-13.4 ; TCIAN-13.5 ; TCIAN-13.8 ; TCIAN-13.9 ; TCIAN-13.10 TCIAN-15.3 TCIAN-17.2 ; TCIAN-17.3 ; TCIAN-17.4 ; TCIAN-17.5 TCIAN-22.5 TCIAN-26.1 TCIAN-27.3 TCIAN-36.3 TCIAN-46.1 ; TCIAN-46.2 TCIAN-55 TCIAN-56 TCIAN-57.1 TCIAN-58</p>

GOBLET	TGOB-13 TGOB-15.1 ; TGOB-15.2 ; TGOB-15.3 TGOB-18 TGOB-22.1 ; TGOB-22.2 TGOB-23.1 ; TGOB-23.2 TGOB-24 TGOB-25
NERVIOSES	TNER-34 TNER-35 TNER-42 TNER-46
PIGMENTARIES	TPIG-27
GASTRODERMIQUES (GOBLET I COLUMNARS)	TG-17 TG-13.1 ; TG-13.2 TG-15.1 ; TG-15.4 ; TG-15.5 ; TG-15.6 TG-22 TG-26 TG-39 TG-42 TG-53.4 ; TG-53.5
PARENQUIMATIQUES	TP-13.1 TP-22

Resultats

ESPECIFICITAT:	SUBTIPUS CEL.LULARS
CIAFILES CEFALIQUES	TCIAN-7.1 ; TCIAN-7.2 ; TCIAN-7.3 TCIAN-13.6 TCIAN-17.1 ; TCIAN-17.6 TCIAN-22.2 ; TCIAN-22.3 ; TCIAN-22.4 TCIAN-25.1 TCIAN-26.2 TCIAN-27.1 ; TCIAN-27.2 ; TCIAN-27.4 TCIAN-34 TCIAN-36.2 TCIAN-43 TCIAN-57.2
CIAFILES CENTRALS	TCIAN-9.1 TCIAN-16 TCIAN-25.2 TCIAN-36.1 TCIAN-48.1
CIAFILES CEFA- LIQUES I CAUDALS	TCIAN-13.2 TCIAN-23
CIAFILES DORSALS	TCIAN-13.1 ; TCIAN-13.7 ; TCIAN-13.11
CIAFILES VENTRALS	TCIAN-7.4 TCIAN-17.1

CIAFILES DE LA FARINGE I PREFARINGE	TF-7.1 (TF-1) ; TF-7.2 (TF-2) TF-9.1 (TF-3) ; TF-9.2 (TF-4) ; TF-9.3 (TF-5) TF-13.1 ; TF-13.2 ; TF-13.3 ; TF-13.4 ; TF-13.5 (TF-6) TF-15 (TF-7) TF-22.1 TF-24 TF-25 TF-26.1 ; TF-26.2 TF-27.1 ; TF-27.2 TF-28.1 ; TF-28.2 ; TF-28.3 ; TF-28.4 ; TF-28.5 ; TF-28.6 TF-33 TF-34 TF-43 TF-56 TF-58.1
MUSCULARS LONGITUDINALS	TMUS-7 TMUS-46.2
PARENQUIMATIQUES CENTRALS	TP-13.2
EPIDERMiques DORSALS	TEPI-17.1
EPIDERMiques (DISCONTINU)	TEPI-15.4
EPIDERMiques DE LA FARINGE	TF-58.2
EPIDERMiques DE FARINGE (DISCONTINU)	TF-17.2 TF-53

Resultats

<p>DE DIFICIL CLASSIFICACIO (SECRETORES O PARENQUIMATIQUES)</p>	<p>TS-6.1 ; TS-6.2 ; TS-6.3 TS-7.1 ; TS-7.2 ; TS-7.3 TS-13.1 ; TS-13.2 ; TS-13.3 ; TS-13.4 ; TS-13.5 ; TS-13.6 TS-14 TS-15 TS-17.1 ; TS-17.2 TS-24.1 ; TS-24.2 ; TS-24.3 ; TS-24.4 ; TS-24.5 ; TS-24.6 TS-25 TS-26 TS-43</p>
<p>ESPECIFICITAT:</p>	<p>TIPUS CEL.LULARS DIFERENTS</p>
<p>GOBLET I CIANOFILES</p>	<p>TCIAN-15.1 ; TCIAN-15.2 ; TCIAN-15.4 TCIAN-22.6</p>
<p>GOBLET I EPIDERMiques DORSALS</p>	<p>TEPI-15.1 TGOB-23.3</p>
<p>EPIDERMiques I GASTRODERMIQUES</p>	<p>TG-15.2 TG-53.1 ; TG-53.2 ; TG-53.3</p>
<p>EPIDERMiques (DISCONTINU) I GASTRODERMIQUES</p>	<p>TEPI-15.5</p>
<p>GOBLET I PARENQUIMATIQUES</p>	<p>TP-23</p>
<p>GASTRODERMIQUES (GOBLET I COLUMNARS) I CIANOFILES</p>	<p>TCIAN-22.1</p>
<p>EPIDERMiques I SECRETORES</p>	<p>TEPI-13.4 TEPI-15.2 ; TEPI-15.3</p>

EPIDERMQUES DE LA FARINGE I GASTRODERMIQUES	TF-17.1 (TCAV-1) TF-41.1 ; TF-41.3 ; TF-41.4 TF-49
EPIDERMQUES DE LA FARINGE I CIANOFILES	TF-22.2 (TCAV-2) TF-41.2 ; TF-41.5 TF-45.1 ; TF-45.2
EPIDERMQUES I LAMINA BASAL	TEPI-13.1
NERVIOSSES I GASTRODERMIQUES	TNER-47
GENERAL	TT-22.1 TT-24.4 TT-25.3 ; TT-25.6 TT-26.1 ; TT-26.2 ; TT-26.3 ; TT-26.4
GENERAL (EXEPTA GASTRODERMIQUES)	TT-7.1 ; TT-7.2 TT-22.2 TT-24.1 ; TT-24.2 ; TT-24.3 TT-25.1 ; TT-25.2 ; TT-25.4 ; TT-25.5 ; TT- 25.7 TT-26.5 TT-56
ESPECIFICITAT:	ESTRUCTURES SUBCEL.LULARS
LAMINA BASAL	TMB-7 TMB-13.1 ; TMB-13.2 ; TMB-13.3 ; TMB-13.4 TMB-15 TMB-22 TMB-23 TMB-27.1 ; TMB-27.2 ; TMB-27.3 TMB-33.1 ; TMB-33.2 TMB-56

Resultats

NUCLIS	TNU-33.1 ; TNU-33.2 TNU-43 TNU-46 TNU-53.1 ; TNU-53.2
DNA	TNU-29
ESPECIFICITAT:	REGIONAL
REGIO CENTRAL	TCEN-49

Fig. 26: Especificitat d els anticossos obtinguts.

Les especificitats de tots aquests grups d'anticossos estan comentades i il.lustrades en aquest mateix apartat i en els apartats 20 i 21. Per motius de nombre no és possible comentar ni il.lustrar cada un dels anticossos concrets de la fig. 26. Es per això que s'han fet uns comentaris generals per a cada grup amb referències més profundes pels MAb's que han estat utilitzats amb algun propòsit concret, i s'han il.lustrat aquests darrers o els més significatius de cada grup.

A més a més de les fusions de la fig. 18 i dels anticossos de la fig. 26 s'han obtingut també 6 MAb's en dues fusions més, en col.laboració amb Jordi Garcia i Emili Saló (Departament de Genètica, Universitat de Barcelona) que reconeixen específicament les proteïnes de fusió E1 i E2, obtingudes per Jordi Garcia. La proteïna de fusió E1 conté la regió aminoterminal del gen amb homeobox Dth-1 i la E2 conté la regió carboxiterminal del gen amb homeobox Dth-2, ambdós de planària (Garcia-Fernandez i col., 1991; Garcia-Fernandez, 1992). Aquests sis MAb's (THB-1, THB-2, THB-3, THB-4, THB-6 i THB-8 o M1, M2, M3, M4, M6 i M8 a Garcia-Fernandez, 1992) reconeixen la proteïna de fusió en Western-blot però no la proteïna nadiua de planària amb la mateixa tècnica. El marcatge no era fàcilment interpretable amb mètodes immunohistoquímics i van ser substituïts per anticossos policlonals.

19.2 - Anticossos específics de tipus cel.lulars

19.2.1 - Anticossos específics de cèl.lules epidèrmiques

S'han obtingut 14 anticossos els quals immunoreaccionen amb totes les cèl.lules epitelials. Aquests anticossos podrien ser considerats com específics tissulars (teixit epidèrmic). A més a més, s'han obtingut altres específics solament d'algunes subpoblacions d'aquest tipus cel.lular (apartat 19.3.3) o específics d'aquest i altres tipus cel.lulars (apartat 19.4).

Les diferències entre els patrons de marcatge d'aquests 14 anticossos estan en la localització subcel.lular de l'antigen reconegut: mentre que alguns d'ells, com el MAb TEPI-15.6, immunodetecten un antigen present a la membrana cel.lular, altres, com el MAb TEPI-30.1, ho fan amb un antigen aparentment distribuït per tot el citoplasma (fig. 27). N'hi ha d'altres, com el TEPI-46 o el TEPI-53.1, que immunoreaccionen amb antigens situats a la placa basal i al cilis de les cèl.lules epidèrmiques ciliades i al pol apical de les no ciliades (fig. 27). Aquest mateix anticòs immunoreacciona també amb les cèl.lules rabdítiques subepidèrmiques (Fig. 27). Aquestes cèl.lules estan descrites com a precursoras de les cèl.lules epitelials, que contenen totes elles rabdits, i formarien part del compartiment de diferenciació (fig. 5) (Skaer, 1961; Baguñà, 1973). Per altra banda, Lentz (1967) ha demostrat l'origen de les cèl.lules rabdítiques a partir dels neoblasts. Tot això indicaria que l'antigen reconegut per TEPI-46 pot ser un antigen de diferenciació (entès com una molècula present en cèl.lules diferenciades i en cèl.lules en diversos estadis de diferenciació) ja que, encara que el seu marcatge no s'hagi observat de manera concloent en cèl.lules morfològicament indiferenciades (neoblasts determinats a cèl.lules epitelials), sí es troba present en el compartiment de diferenciació i en les cèl.lules diferenciades madures.

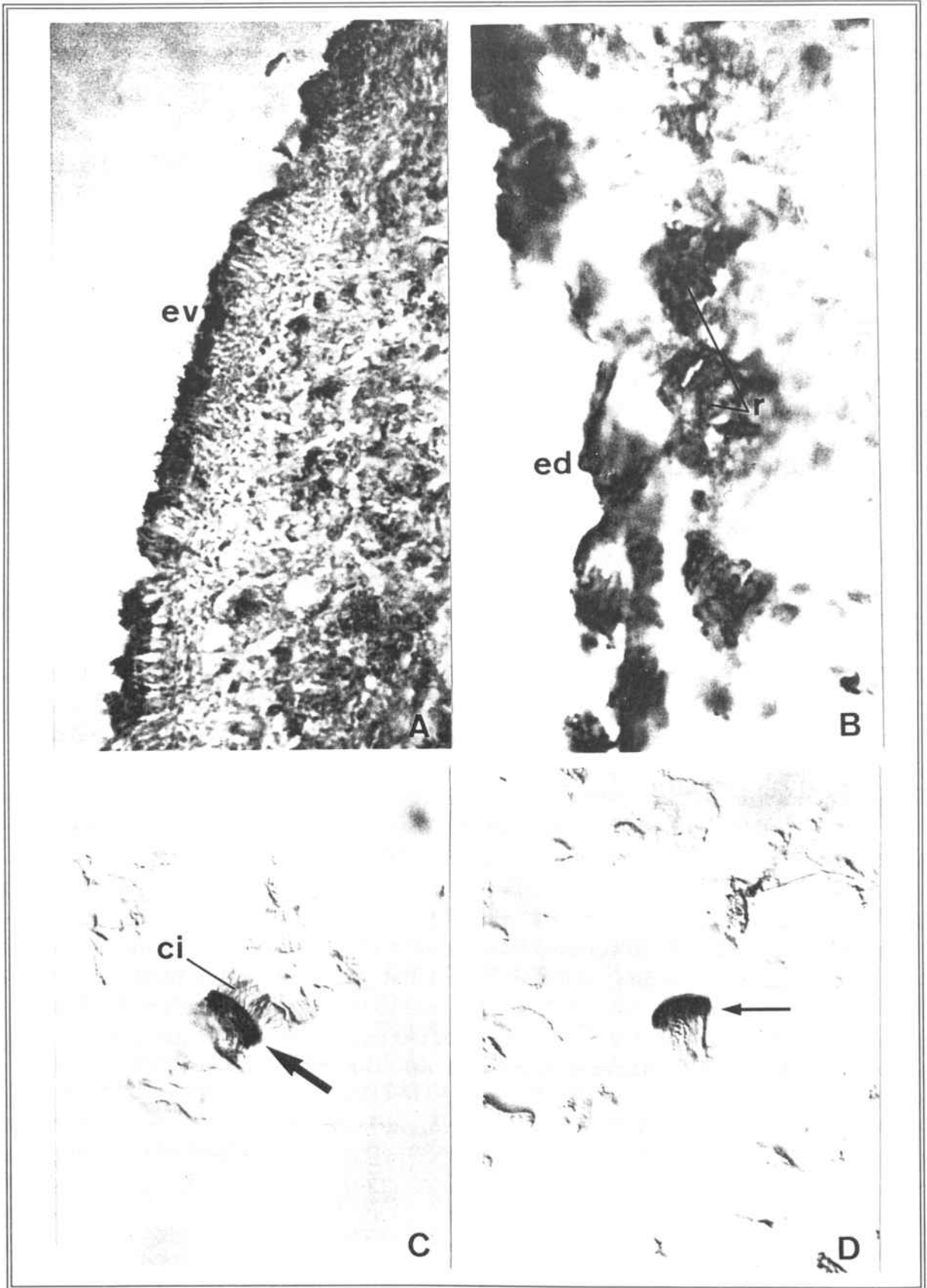


Fig. 27

Fig. 27: Immunotinció en cèl.lules epidèrmiques. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció sagital en parafina, MAb TEPI-30.1 (400x). B) Secció sagital en parafina, MAb TEPI-46 (1000x). C) Macerat cel.lular. Cèl.lula epitelial ciliada. MAb TEPI-46 (2000x, contrast interferencial). D) Macerat cel.lular. Cèl.lula epitelial no ciliada. MAb TEPI-46 (2000x, contrast interferencial). *ev*, epidermis ventral; *ed*, epidermis dorsal; *r*, cèl.lules rabdítiques; *ci*, cilis; *sageta gruixuda*, pol apical de cèl.lula epidèrmica ciliada; *sageta prima*, pol apical de cèl.lula epidèrmica no ciliada.

19.2.2 - Anticossos específics de cèl.lules goblet

S'han obtingut 11 anticossos específics de cèl.lules tipus goblet i d'altres que immunoreaccionen amb aquest tipus cel.lular, amb les cèl.lules columnars gastrodèrmiques (apartat 19.2.3) i amb altres tipus cel.lulars (apartat 19.4).

Els anticossos que són específics tant sols de les cèl.lules tipus goblet (veure Specian i Oliver, 1991, per a una revisió general sobre aquest tipus cel.lular; i Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987, sobre aquest tipus cel.lular en planàries) mostren un patró de marcatge molt semblant entre ells (fig. 28) que no s'acostuma a donar en l'interior de les vesícules de secreció d'aquest tipus cel.lular. Aquest és un detall aparentment curiós si tenim en compte l'alt poder immunogènic que han demostrat tenir les substàncies contingudes en les vesícules de secreció de les cèl.lules secretores, si més no en cèl.lules secretores acidòfiles i, molt especialment, cianòfiles. De fet, potser indica una diferència qualitativa important entre els productes de secreció d'aquests tipus cel.lulars que podria estar en concordança amb la seva funció:

- secreció de productes relacionats amb la funció digestiva (mucus protector tipus mucines, Specian i Oliver, 1991) en les cèl.lules goblet, que els vessen als diverticles intestinals;

- secreció externa (mucus lliscant i adherent) i interna en l'espai intercel.lular en les cèl.lules acidòfiles i cianòfiles (Baguñà, 1973) (veure apartat 19.2.4 per a més dades sobre aquests tipus cel.lulars, i apartat 21 per un cas concret de possible secreció interna).

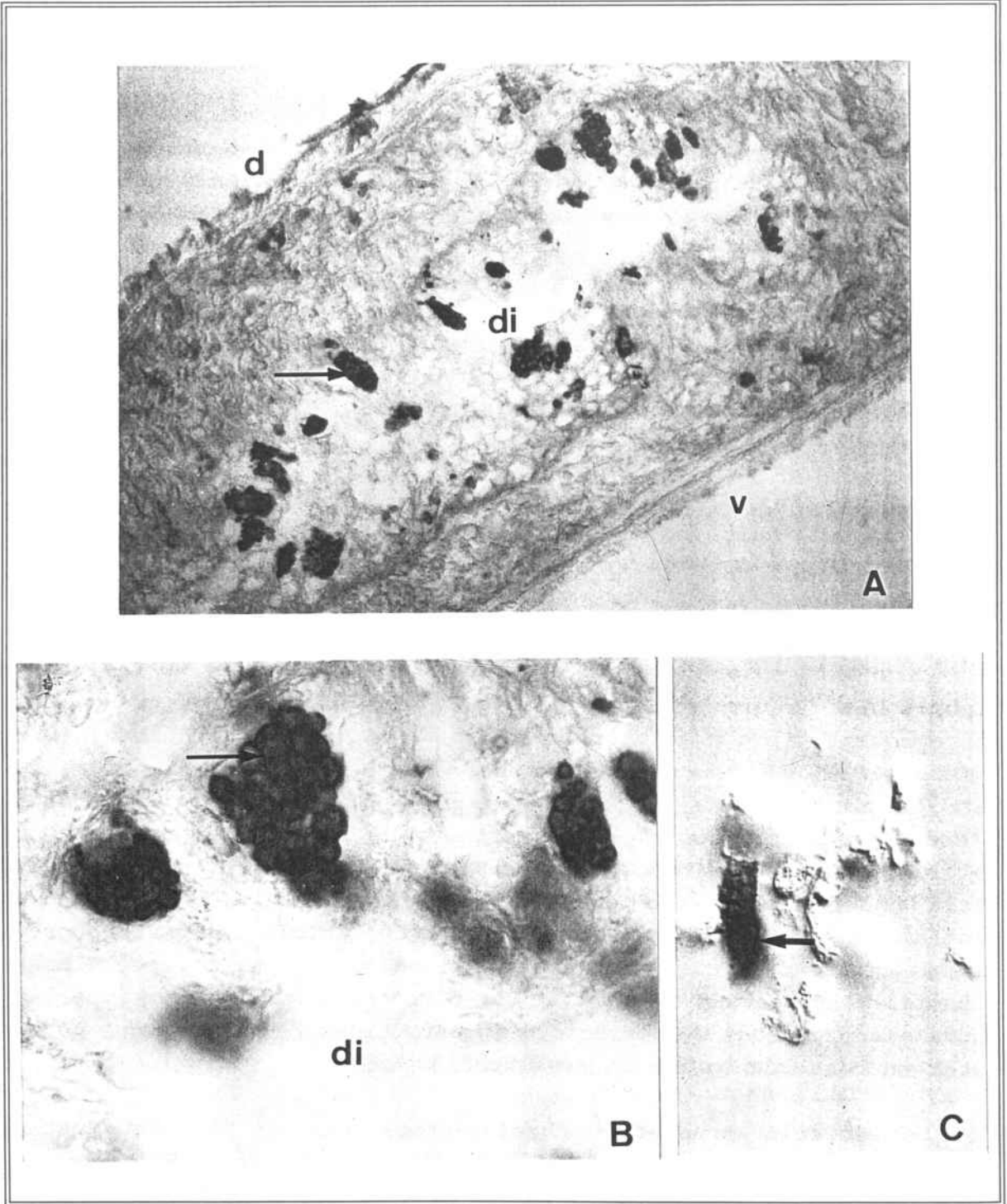


Fig. 28: Immunotinció en cèl.lules goblet amb el MAb TGLO-13. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció sagital en parafina (200x). B) Ampliació d'A (1000x). C) Macerat cel.lular (1000x, contrast interferencial). *d*, dorsal; *v*, ventral; *di*, diverticle intestinal; *sageta prima*, cèl.lules goblet amb l'estructura vesiculada característica formant part dels diverticles intestinals entre cèl.lules columnars gastrodèrmiques; *sageta gruixuda*, cèl.lula goblet.

19.2.3 - Anticossos específics de cèl.lules gastrodèrmiques

La gastrodermis de planària està formada per dos tipus cel.lulars diferents: les cèl.lules goblet (de les que es parla a l'apartat anterior i de les que s'han obtingut anticossos específics) i les cèl.lules columnars gastrodèrmiques (veure apartat 1.2 per la morfologia de planària). S'han obtingut 13 anticossos específics de cèl.lules gastrodèrmiques que reconeixen determinants antigènics presents en aquests dos tipus cel.lulars. No s'ha obtingut cap anticòs exclusiu de cèl.lules columnars gastrodèrmiques, de manera que tots els anticossos que reconeixen aquest tipus cel.lular també ho fan en les cèl.lules goblet (fig. 29, MAb TG-42). Per tant, aquests anticossos poden ser considerats també com específics tisulars (teixit gastrodèrmic).

Per explicar aquest fet hi ha dues hipòtesi possibles:

1.- Les cèl.lules goblet tenen, a més a més dels seus propis i exclusius determinants antigènics, tots els de les cèl.lules columnars gastrodèrmiques, sense que aquestes en tinguin cap d'exclusiu;

2.- Malgrat les cel.lules columnars gastrodèrmiques tinguin determinants antigènics exclusius no s'ha obtingut cap híbridoma productor d'anticossos específics d'elles per ser poc immunogènics, estar poc representats, no haver emprat el tipus d'immunogen més adequat o, simplement, per atzar, de manera que podria aparèixer fent més fusions amb els procediments ja utilitzats.

De les dues alternatives, la més versemblant és la segona, ja que es fa difícil pensar que les cèl.lules columnars gastrodèrmiques, que tenen una funció clarament diferent a la de les goblet (tenen la funció d'endocitar l'aliment, Baguñà, 1973), no tinguin cap determinant antigènic específic, ni tant sols relacionat amb la seva funció específica.

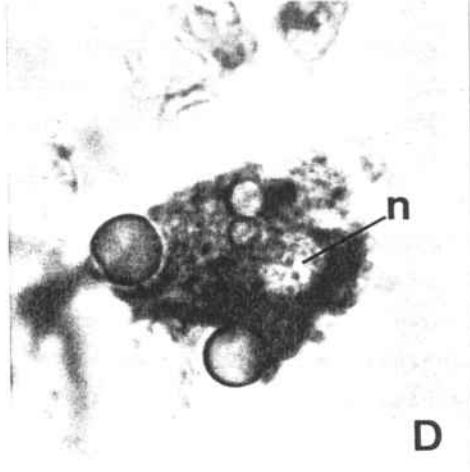
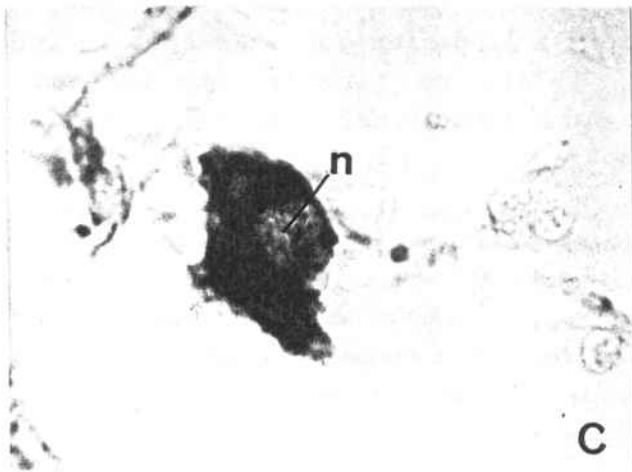
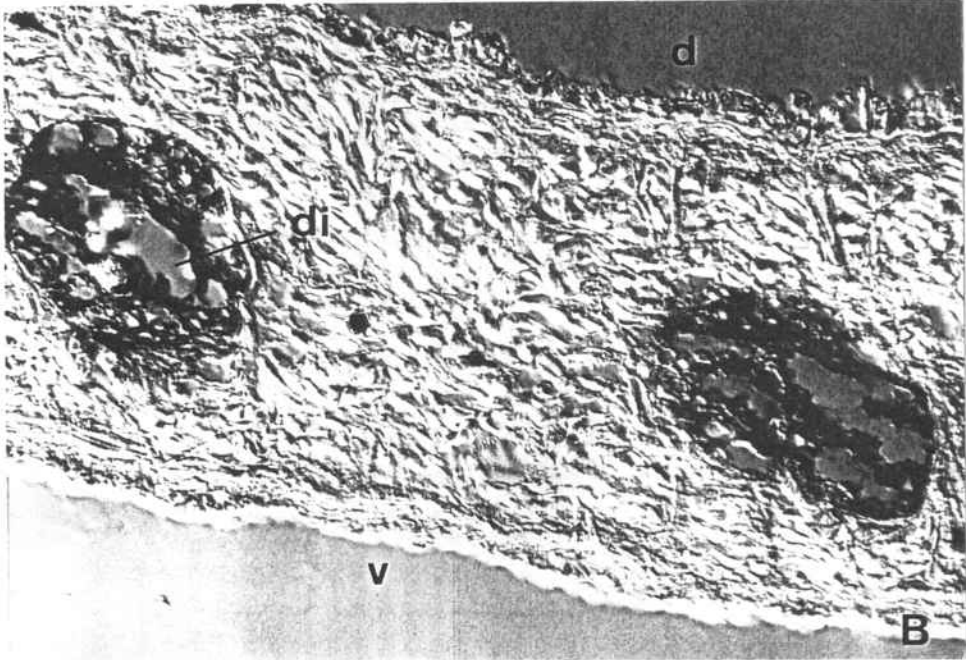
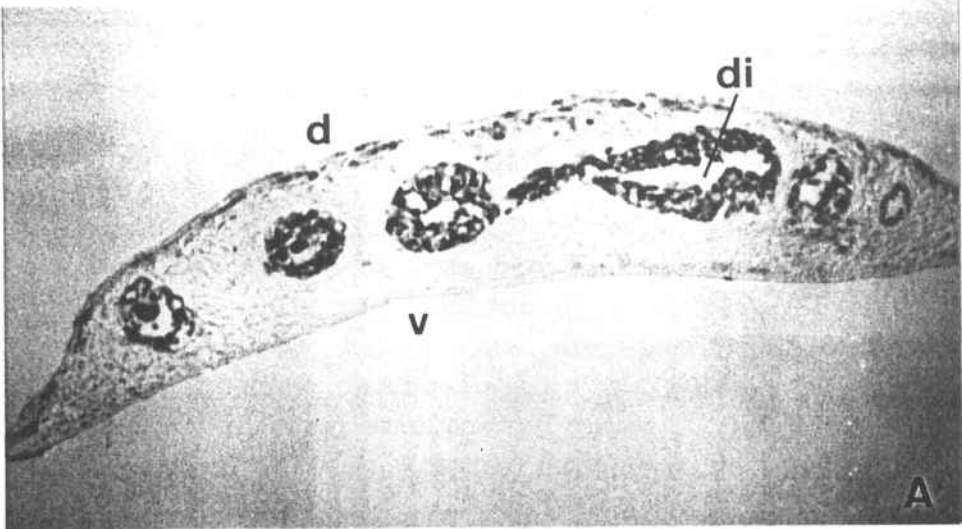


Fig. 29: Immunotinció en cèl.lules gastrodèrmiques amb el MAb TG-42. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció sagital en parafina (100x). B) Secció sagital en parafina (200x, contrast interferencial). C) i D) macerats cel.lulars (2000x). d, dorsal; v, ventral; di, diverticle intestinal; n, nucli.

19.2.4 - Anticossos específics de cèl.lules secretores

A planària, l'anomenat grup de cèl.lules secretores inclou dos tipus cel.lulars, les cèl.lules secretores acidòfiles i les cianòfiles (Baguñà, 1973). De fet, però, ambdós grups són molt heterogenis quan a la diversitat de grànuls de secreció observats per microscòpia electrònica (Ishii, 1963; Pascolini i col., 1971; Baguñà, 1973). Aquesta gran heterogeneïtat dels grànuls de secreció pot ser deguda al processat de les mostres i/o a la detecció de diferents estadis en la formació dels productes de secreció, inclús entre cèl.lules de secreció acidòfila i cianòfila (Baguñà, 1973). Això fa extremadament complexe i difícil la classificació d'aquests grups cel.lulars, i per tant l'assignació dels anticossos obtinguts en algun d'aquests grups. Així mateix, també es fa complexe decidir si un anticòs immunoreacciona amb totes les cèl.lules d'un d'aquests tipus (acidòfil o cianòfil), o si ho fa sols amb un subtipus d'elles.

S'han obtingut 8 anticossos específics de cèl.lules secretores acidòfiles, cap dels quals no ha estat clonat fins a la monoclonalitat. Aparentment immunoreaccionen amb totes les cèl.lules d'aquest tipus cel.lular, tant en les acidòfiles de tipus 1 com 2 (Pedersen, 1972; Baguñà, 1973), situades en una posició predominantment ventral. Tots els anticossos presenten un patró de marcatge citoplasmàtic molt similar (dada no mostrada), sense que s'hagi estudiat a fons si es dona a l'interior o a l'exterior de les vesícules de secreció. El més probable és que es doni dins les vesícules, ja que és allà on ha d'haver el major nombre de determinants antigènics específics i els més immunogènics.

S'han aïllat també 81 anticossos específics de cèl.lules secretores cianòfiles, dels quals 59 identifiquen clarament subpoblacions (subtipus) cel.lulars diferents (i dels que es parla a l'apartat 19.3.1), i 22 que aparentment identifiquen totes les

cèl.lules cianòfiles. Aquestes cèl.lules es troben distribuïdes per tot el parènquima, en posició subepidèrmica dorsal i ventral (fig. 30, Mab TCIAN-9) i en l'interior de la faringe (veure apartat 19.3.1), presentant moltes prolongacions que poden recórrer grans distàncies per l'interior de l'organisme. El marcatge d'aquest tipus cel.lular es dona, en tots 22 anticossos, a l'interior de les vesícules de secreció, les quals vessen el seu contingut a l'exterior (bàsicament mucus lliscantant i adherent) i a l'interior (Baguñà, 1973; veure apartat 21 per un cas concret de vessament de substàncies a l'espai intercel.lular). Aquestes substàncies secretades tenen un alt poder immunogènic, com ho demostra el fet que 81 dels 277 anticossos generats siguin específics de cèl.lules cianòfiles (incloent els específics de subpoblacions d'aquest tipus cel.lular, apartat 19.3.1), representant el 29% del total. Aquest fet justifica que moltes de les immunitzacions es fessin amb antigens prèviament absorbits amb 15 MAbs específics d'aquest tipus cel.lular (apartat 7.2.8), obtenint els resultats exposats a l'apartat 18.2.1.

L'alt contingut glucídic dels productes de secreció (mucus) i els resultats obtinguts per K. Agata (1992, comunicació personal) en la planària *Dugesia japonica*, en la que la majoria dels MAbs que obté (aproximadament un 94%) reconeixen epítops glucídics, fan pensar que la major part d'aquests anticossos siguin específics d'aquests tipus de substàncies. Aquesta dada ha estat comprovada amb els 15 MAbs amb què s'ha preparat la barreja d'absorció (apartat 18.2.1, fig. 19), els quals semblen reconèixer majoritàriament un epítop no proteic. No es disposa de dades respecte als altres.

Fig. 30: Immunotinció en cèl.lules secretores cianòfiles amb el Mab TCIAN-9. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. Contrast interferencial. A) Secció sagital en parafina (400x). B) i C) Macerats cel.lulars (1000x). d, dorsal; v, ventral; sageta, prolongacions característiques de les cèl.lules secretores cianòfiles.

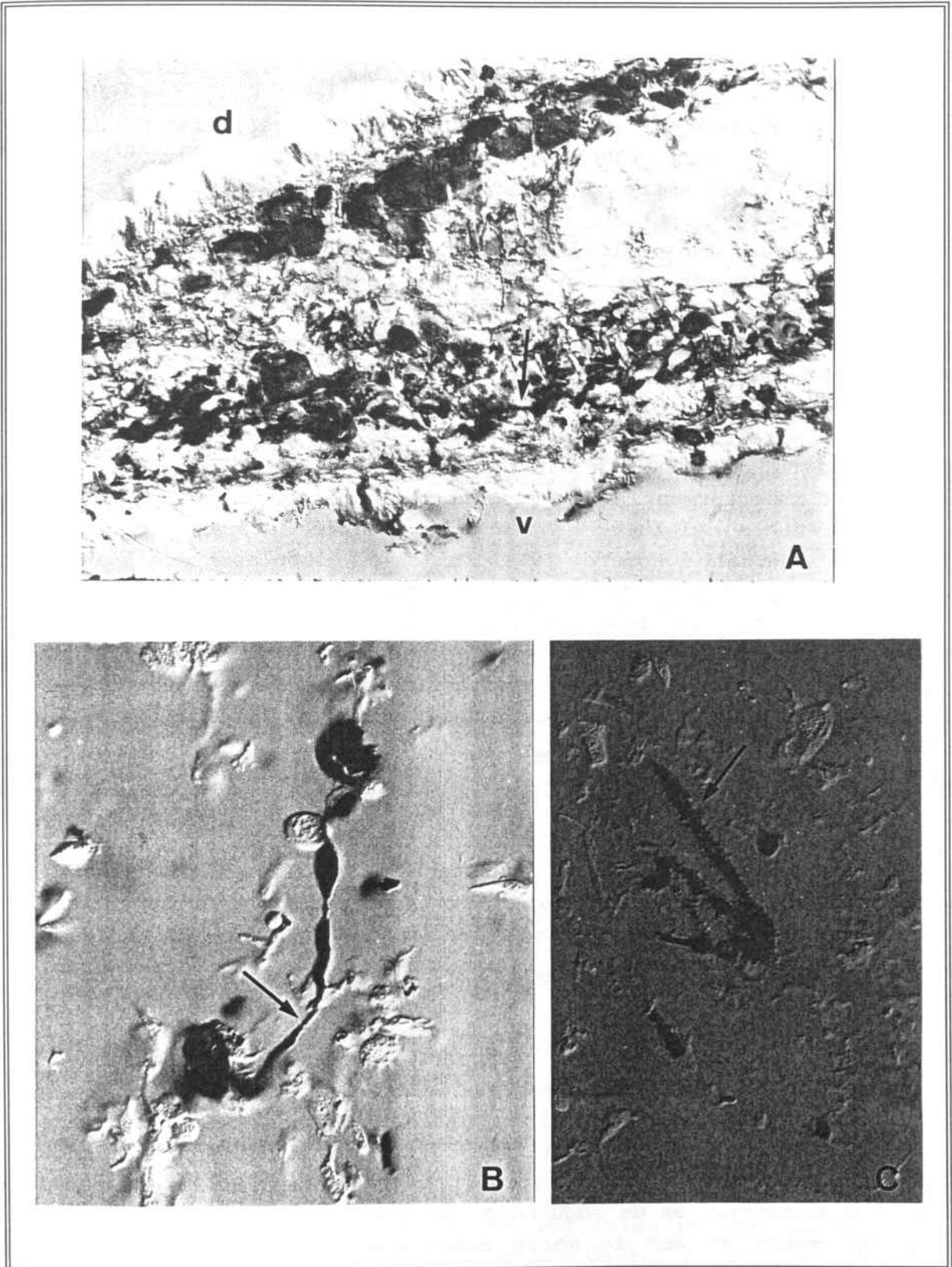


Fig. 30

19.2.5 Anticossos específics de cèl.lules musculars

S'han obtingut 37 anticossos específics de cèl.lules musculars, 35 dels quals immunoreaccionen amb totes les fibres musculars de l'organisme, i els altres 2 ho fan amb una subpoblació d'aquest tipus cel.lular (apartat 19.3.2). L'alt nombre d'anticossos obtingut (13% del total) fa que les cèl.lules musculars siguin, després de les secretores, les que més han induït la generació d'anticossos. Els patrons de marcatge de tots ells són molt similars i es restringeixen a la fibra muscular, deixant el nucli i el citoplasma que l'envolta sense immunoreacció.

Un d'aquests anticossos, el MAb TMUS-13, ha estat portat a la monoclonalitat. Presenta un patró de marcatge en la fibra muscular com el descrit anteriorment, sense mostrar immunoreacció ni en el nucli, que en aquest tipus cel.lular es troba en posició lateral lleugerament pedunculat (Baguñà i Romero, 1981), ni en el citoplasma que l'envolta (fig. 32). Aquest marcatge no és uniforme en tota la fibra muscular. Emprant tècniques de detecció immunocitoquímica més sensibles sobre cèl.lules macerades amb anticossos secundaris lligats a or de 5 nm i amplificant el marcatge amb precipitats de plata (veure apartat 13.2), s'observa que el marcatge es restringeix a les vores de la fibra (fig. 32), en el citoplasma més proper a la membrana cel.lular i/o en ella mateixa.

El determinant antigènic reconegut per aquest MAb és proteic, tal i com es desprèn del tractament fet amb proteases (Pronasa E i Proteinasa K) d'un homogenat total, immunodetectat posteriorment sobre una membrana de nitrocel.lulosa (immunodot, fig. 31). En ell es pot veure la total desaparició de la immunoracció de l'homogenat tractat amb aquests enzims.

Quan s'immunodetecta mitjançant la tècnica de Western-blot homogenat total de planària separat electroforèticament amb un gel d'acrilamida (SDS-PAGE), l'antigen presenta una massa molecular aparent de 125 kDa (fig. 31), tant si s'utilitzen mètodes desnaturalitzants (Towkin i col., 1978) com renaturalitzants (Dunn, 1986), indicant que l'epítocp reconegut és de seqüència. De fet presenta dues bandes molt properes entre sí amb la massa esmentada, i dues bandes de menor immunoreacció a 180 kDa i 50 kDa. Aquestes bandes no s'observen si es disminueix la quantitat de proteïna carregada al gel.

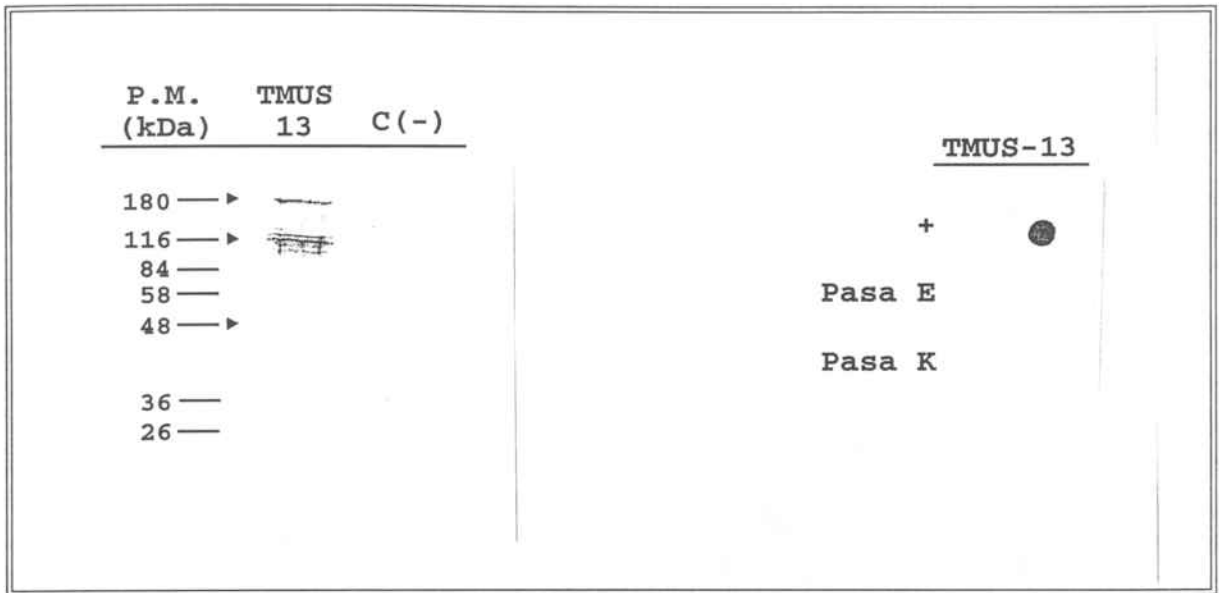


Fig. 31: Immunodetecció de l'antigen reconegut per TMUS-13. A) Western-blot (SDS-PAGE 12 % acrilamida-bisacrilamida) d'homogenat total de planària. B) Dot-blot d'homogenat total de planària incubat amb proteases. TMUS-13, immunodetecció amb aquest mateix MAb; C(-), incubació 1^{ra} amb medi de cultiu sense anticossos (control negatiu); +, fixació a filtre d'homogenat total de planària incubat amb tampó d'actuació de proteases; Pasa E, homogenat total de planària incubat amb pronasa E; Pasa K, homogenat total de planària incubat amb proteinasa K.

Sobre seccions d'organismes inclosos en parafina aquest MAb immunoreacciona amb totes les fibres musculars de l'organisme (per a una descripció de la musculatura de planària, veure els treballs de Pedersen, 1961, 1972; Baguñà, 1973; Sarnat, 1984; apartat 1.2), permetent una visualització fàcil de les fibres circulars, longitudinals i transversals tant del parènquima com de la faringe (fig. 32). Cal destacar el marcatge que s'obté a les fibres musculars que envolten els diverticles intestinals, ja que és el primer cop en què es demostra la presència d'aquestes fibres en una espècie del gènere *Dugesia* (fig. 32) (Romero i col., 1991; Bueno i col., 1991), i que ja havia estat demostrada en altres turbellaris i trícilads per Rieger i col. (1990).

En algunes immunotincions fetes sobre cèl.lules macerades sembla intuir-se un cert marcatge en algunes cèl.lules amb morfologia de neoblast (dada no mostrada ja que la baixa immunoreactivitat observada és difícilment diferenciable de les cèl.lules no immunoreactives). Aquest marcatge és molt lleu i el nombre de cèl.lules afectades molt baix. Aquest marcatge que solament s'intueix en immunotincions sobre cèl.lules macerades queda plenament confirmat en fer estudis de

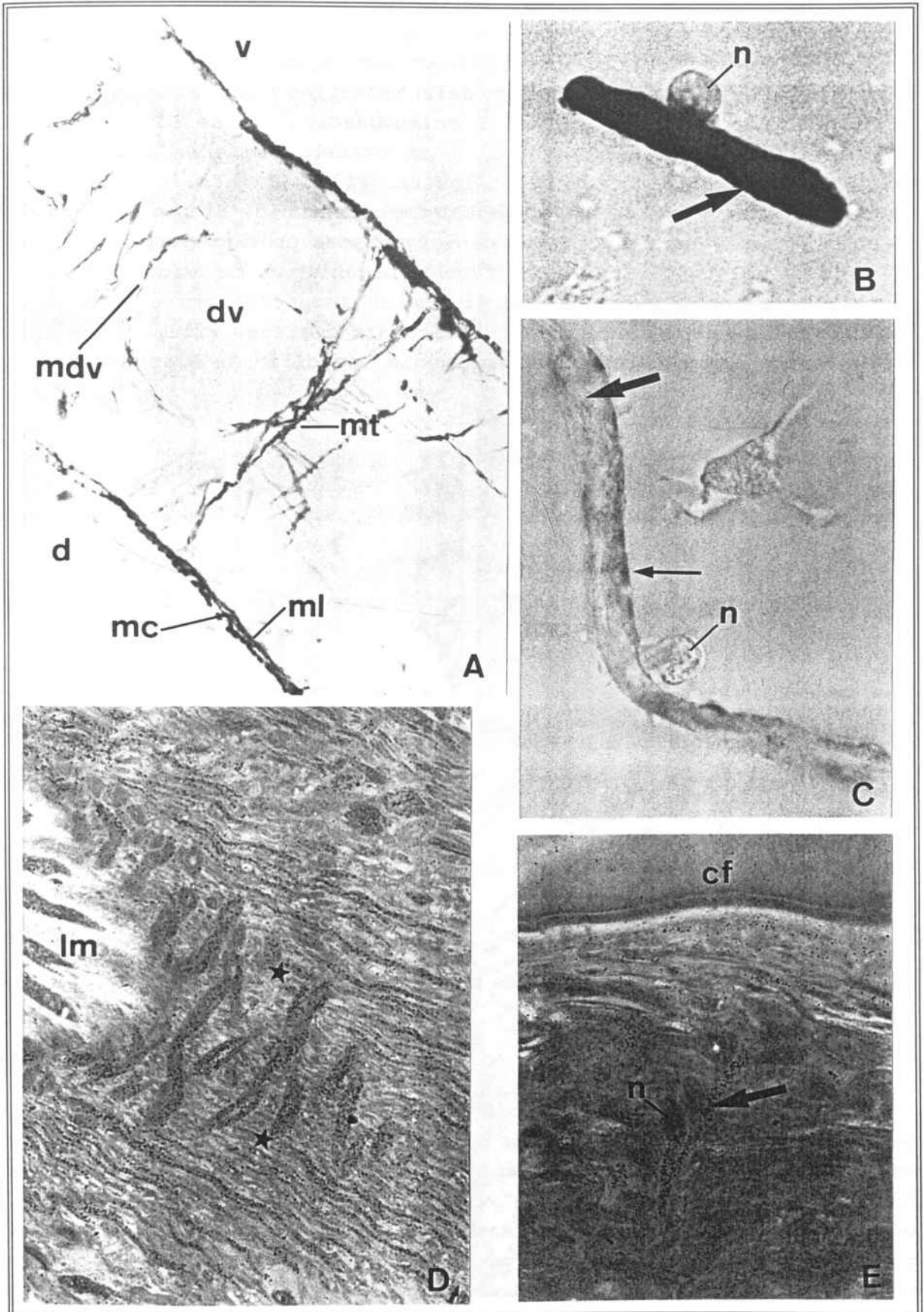
regeneració (Espinosa, 1993; apartat 20.1). Com que la diferenciació dels mioblasts a partir dels neoblasts ha estat demostrada per Le Moigne (1967) i Pedersen (1972), pot tractar-se d'un antigen de diferenciació present en neoblasts probablement determinats a cèl.lula muscular en els seus primers estadis de diferenciació, abans de perdre la seva morfologia típica, i que es troba també present en les cèl.lules diferenciades madures.

En seccions semifines es pot veure la forma que pren l'entremat de fibres musculars en determinades estructures de l'organisme com la faringe. En ella es pot observar la trama que formen les fibres musculars amb disposicions perpendiculars entre sí prop de la llum de la faringe, així com la disposició lateral del nucli en una prolongació lleugerament pedunculada del citoplasma dins el teixit que l'envolta (fig. 32).

L'antigen reconegut pel MAb TMUS-13 és totalment interespecífic dins la classe Turbellaria, on s'ha assajat amb els organismes de l'ordre Seriata, de l'ordre Polycladida i de l'ordre Rhabdocoela anomenats a l'apartat 6.1 (fig. 33), pertanyents tots ells al Filum dels Plathelminthes. Així mateix, també immunoreacciona amb organismes de la Classe Trematode i Ordre Digenia (Plathelminths paràsits), on s'ha assajat sobre organismes de l'espècie *Fasciola hepatica* (fig. 33) (cedida pe Servei de Zoonosi de l'Escorxador de Barcelona).

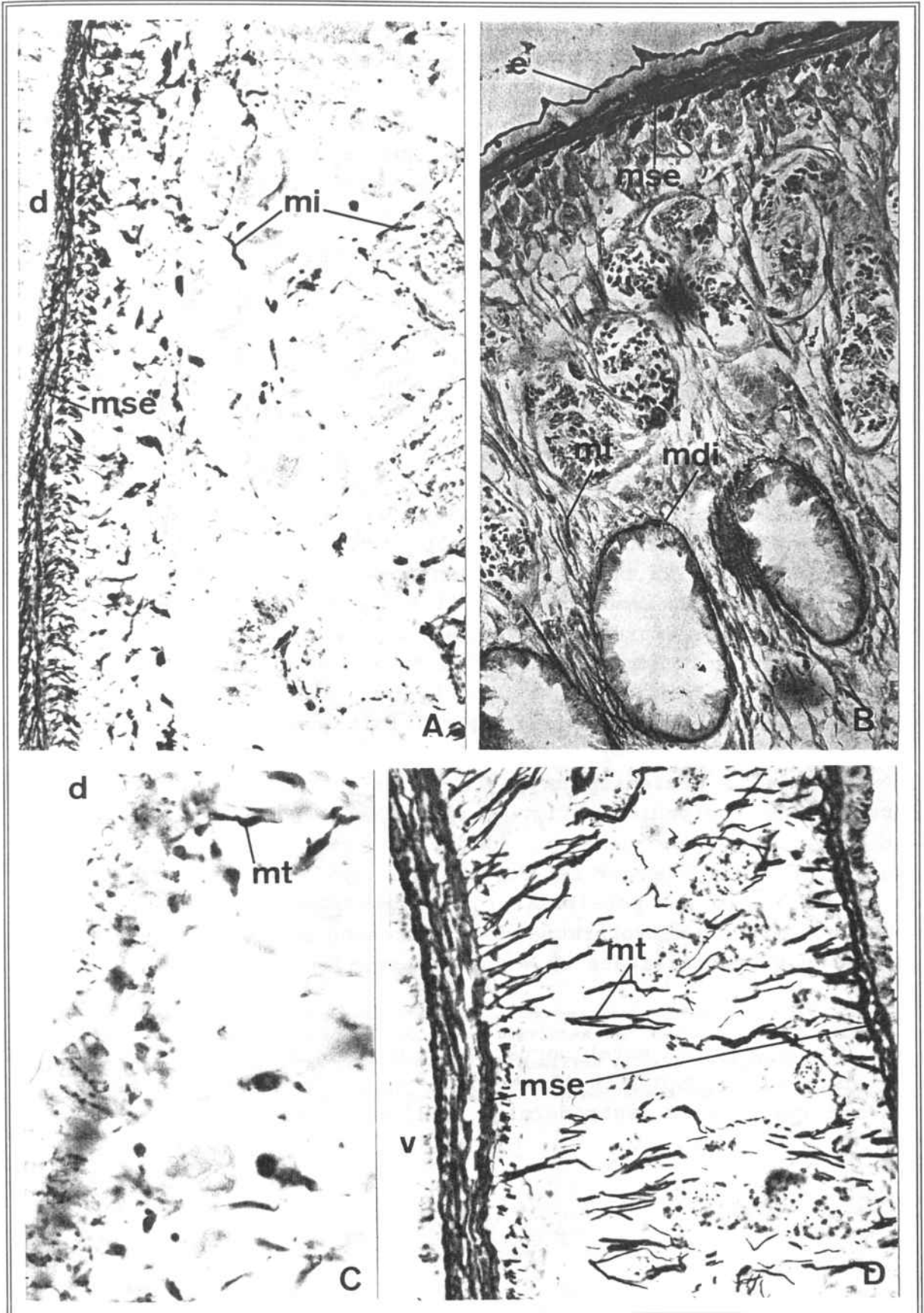
Aquesta interespecificitat permet emprar aquest marcador per visualitzar, de manera directa i molt específica, les diverses disposicions de les fibres musculars que presenten les diferents espècies (fig. 33), així com per ajudar i facilitar la classificació d'aquelles en què s'empra la musculatura com a criteri taxonòmic.

Fig. 32: Immunotinció en cèl.lules musculars amb el MAb TMUS-13. Mètode de detecció: A i B, ABC lligat a HRP; C, D i E, anticòs secundari lligat a or coloidal, amb amplificació de senyal amb nitrat de plata. A) Secció sagital en parafina (400x). B) Dissociat cel.lular (2000x). C) Macerat cel.lular (2000x). D) Secció semifina de faringe (1000x). E) Secció semifina de faringe (2000x). *d*, dorsal; *v*, ventral; *mdv*, musculatura del diverticle intestinal; *ml*, musculatura longitudinal; *mc*, musculatura circular; *mt*, musculatura transversal; *dv*, diverticle intestinal; *n*, nucli; *lm*, lumen faringi; *cf*, cavitat de la faringe; *sageta gruixuda*, fibra muscular; *sageta prima*, marcatge en sarcoplasma; *estrelles*, entremat de fibres musculars.



S'han relitzat immunodeteccions amb aquest mateix MAb sobre organismes pertanyents al Filum dels Nemertins (*Prostoma s.p.*), al Filum dels artròpodes (*Drosophila melanogaster*, Classe Insectes), en el dels Moluscs (*Mytilus edulis*) i en vertebrats sobre musculatura llisa, estriada i cardíaca de pollastre (Filum Cordats, Classe Aus). En cap d'aquests casos s'ha detectat immunoreacció. El fet que s'hagi detectat immunoreacció amb tots els organismes provats pertanyents al Filum dels Platihelmins, comprenent organismes de vida lliure i paràsits, però en canvi no s'hagi trobat immunoreacció en cap dels organismes ni tipus de musculatura assajats d'altres Filums fa pensar que es tracta d'un determinant antigènic específic de Platihelmins.

Fig. 33: Immunotinció amb el MAb TMUS-13 en diverses espècies de platelmints. Seccions sagitals d'organismes inclosos en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) *Discocelis tigrina*, Ordre Polycladida (200x). B) *Fasciola hepatica*, Classe Trematode, Ordre Digenia (1000x). C) Organisme de l'Ordre Rhabdocoela (200x). D) *Dendrocoelum Lacteum*, Ordre Seriata (200x). *d*, dorsal; *v*, ventral; *mse*, fibres musculars subepidèrmiques; *mi*, fibres musculars internes; *mt*, fibres musculars dorso-ventrals; *mdi*, fibres musculars dels diverticles intestinals; *e*, epidermis.



19.2.6 - Anticossos específics de cèl.lules nervioses

S'han obtingut 5 anticossos que reconeixen específicament cèl.lules nervioses. Dos d'ells han estat generats a partir d'immunitzacions fetes amb fraccions proteiques exclusives o majoritàries de cèl.lules nervioses obtingudes mitjançant gels d'electroforesi SDS-PAGE (apartats 7.2.7 i 18.2.1); dos més s'han obtingut a partir d'immunitzacions fetes amb poblacions cel.lulars macerades enriquides en neoblasts (per filtració, apartats 7.2.5 i 18.2.1) que portaven com a contaminants cèl.lules musculars i nervioses; i el darrer a partir d'immunitzacions fetes amb cèl.lules macerades totals.

El fet que sigui un dels tipus cel.lulars dels quals s'ha obtingut un nombre més baix d'anticossos fa pensar que potser els determinants antigènics d'aquests tipus cel.lulars es troben en una proporció molt baixa respecte els antigens totals de planària, o bé tenen una capacitat immunogènica molt baixa (haptens) i són fàcilment "emascarats" per altres antigens que desvien la resposta immune cap a ells, o potser totes dues coses alhora. Si més no aquests anticossos no permeten fer seguiments ni descripcions com les fetes per Fujita (1987) amb anticossos específics de cèl.lules nervioses de *Drosophila*.

Tots ells presenten un patró de marcatge en totes les fibres nervioses de l'organisme (fig. 34, Mab TNER-46) i són també uns dels anticossos que donen un major soroll de fons en les immunotincions. Aquest soroll de fons pot ser degut a inespecificitats dels anticossos o, potser, i com una possibilitat molt aventurada, a la detecció d'un neurotransmissor o neurohormona que fos present en diversos teixits. Cap de les dues possibilitats ha estat comprovada.

Dos d'ells han estat portats a la monoclonalitat: els MAb TNER-46 i TNER-47. El MAb TNER-47 reacciona també de manera específica amb les cèl.lules de la gastrodermis. D'ell es parla a l'apartat 19.4.

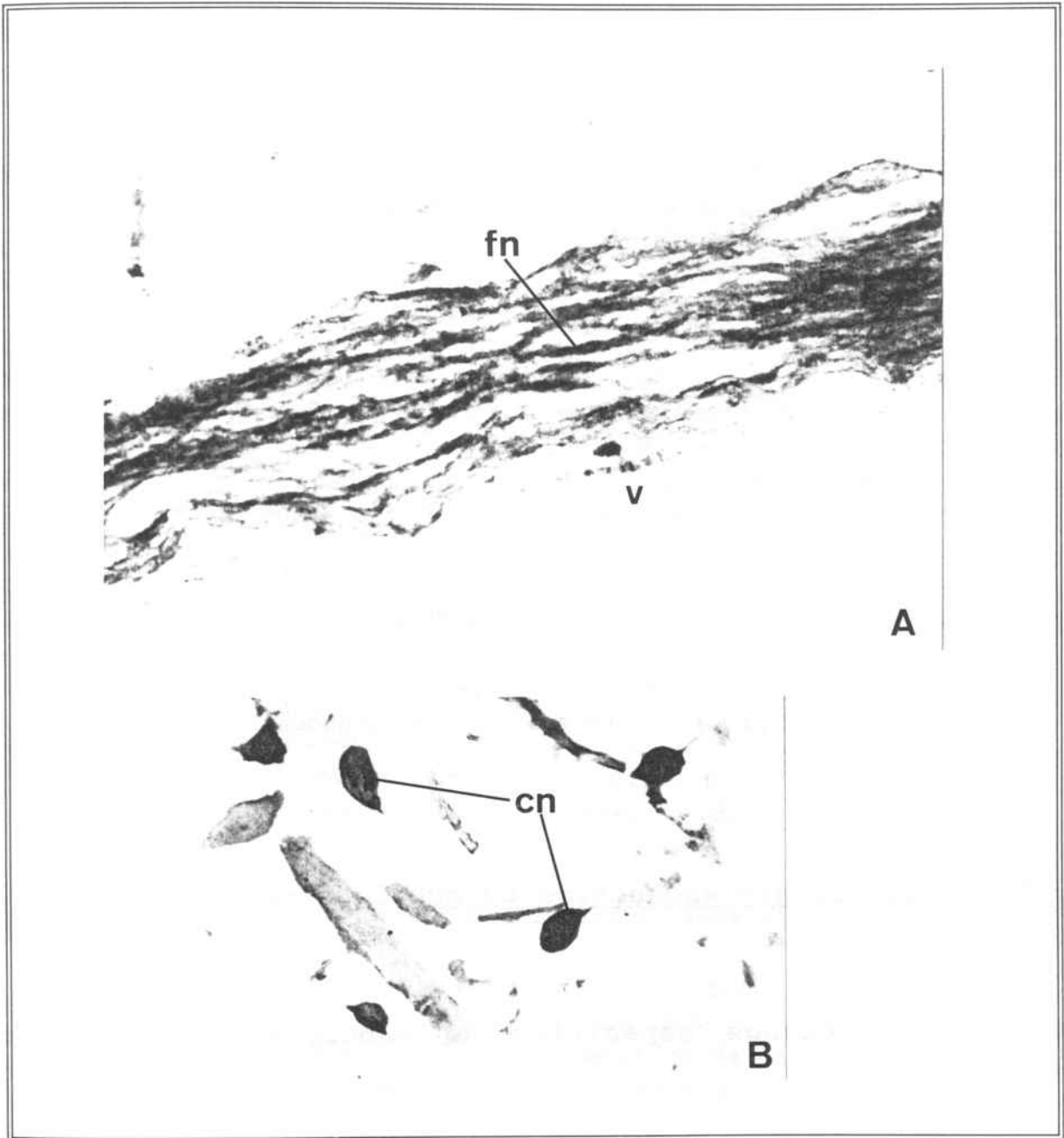


Fig. 34: Immunotinció en cèl.lules nervioses amb el MAb TNER-46. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció sagital en parafina (400x). B) Macerats cel.lulars (1000x). v, ventral; fn, fibres nervioses dels cordons nerviosos ventrals; cn, neurones.

19.2.7 - Anticossos específics d'altres tipus cel.lulars

S'han obtingut també anticossos específics de cèl.lules pigmentàries (1), cèl.lules flamígeres (4) i cèl.lules parenquimàtiques (2), però cap d'ells ha estat portat a la monoclonalitat. Es tracta, de fet, de tipus d'especificitats que han estat molt poc representats en el total d'anticossos obtinguts (tots ells junts representen solament el 2.5% del total), i que a més a més han presentat certes dificultats per la seva caracterització (excepte els específics de flamígeres). En el cas de les parenquimàtiques, aquesta dificultat resideix en ser diferenciades morfològicament de cèl.lules de tipus secretor en seccions d'organismes i de cèl.lules columnars gastrodèrmiques en macerats cel.lulars, ja que les tècniques utilitzades en la caracterització no preserven suficientment bé l'estructura (apartats 12, 13 i 22.2.2).

En el cas de les cèl.lules pigmentàries, la dificultat ha residit en discernir correctament entre el propi pigment de la cèl.lula, que ha mostrat sempre una tendència a "segrestar" el precipitat de la immunotinció i els propis anticossos, i una immunodetecció específica.

19.3 - Anticossos específics de subtipus cel.lulars

19.3.1 Anticossos específics de subtipus de cèl.lules cianòfiles

Les cèl.lules cianòfiles són les que han presentat un major nombre de determinants antigènics, immunològicament diferenciables, específics de grups diferents de cèl.lules incloses totes elles dins el grup de les cianòfiles (segons els criteris morfològics establerts per Baguñà (1973) i Baguñà i Romero (1981)). En concret, s'han reconegut 6 subtipus diferents de cèl.lules cianòfiles en base a criteris immunològics (per reconeixement de determinants antigènics específics).

Aquests subtipus reconeguts són:

1) Cèl.lules cianòfiles cefàliques

S'han detectat 18 anticossos que reconeixen específicament aquesta població cel.lular restringida a una regió de l'organisme. Presenten un patró de marcatge molt similar que inclou totes o la majoria de cèl.lules secretores d'aquesta zona de l'organisme (fig. 35, MAb TCIAN-34). Aquestes cèl.lules corresponen a una subpoblació de les cèl.lules cianòfiles de tipus 1 que emeten abundants prolongacions al voltant dels ganglis cefàlics (Baguñà, 1973). Podrien ser les encarregades de secretar la mucosa en la cara ventral més anterior de l'organisme ja que s'observen prolongacions a través de l'epidermis ventral més anterior.

2) Cèl.lules cianòfiles centrals

S'han obtingut 5 anticossos que reconeixen específicament aquest subtipus cel.lular present sobretot a la zona de la prefaringe i en el parènquima, tant dorsal com ventral, que envolta la cavitat de la faringe. Aquestes cèl.lules podrien correspondre a cèl.lules cianòfiles de tipus 2, ja que estan situades precisament en aquesta zona, però sense que els anticossos immunoreaccionin amb les prolongacions que aquestes cèl.lules emeten cap a l'interior de la faringe (Baguñà, 1973).

3) Cèl.lules cianòfiles cefàliques i caudals

S'han aïllat 2 anticossos específics d'aquest subtipus cel.lular el qual inclou una població de cèl.lules a la zona cefàlica, la mateixa que la reconeguda pels anticossos específics de cèl.lules cianòfiles cefàliques, però que a més a més inclou una altra població idèntica a la zona caudal.

4) Cèl.lules cianòfiles dorsals

S'han obtingut 3 anticossos, tots ells a la fusió F-13, específics d'aquest subtipus de cèl.lules cianòfiles, que presenten un patró de distribució a la zona subepidèrmica dorsal i al llarg de tot l'organisme, desde la zona cefàlica a la caudal (fig. 35, MAb TCIAN-13.7).

5) Cèl.lules cianòfiles ventrals

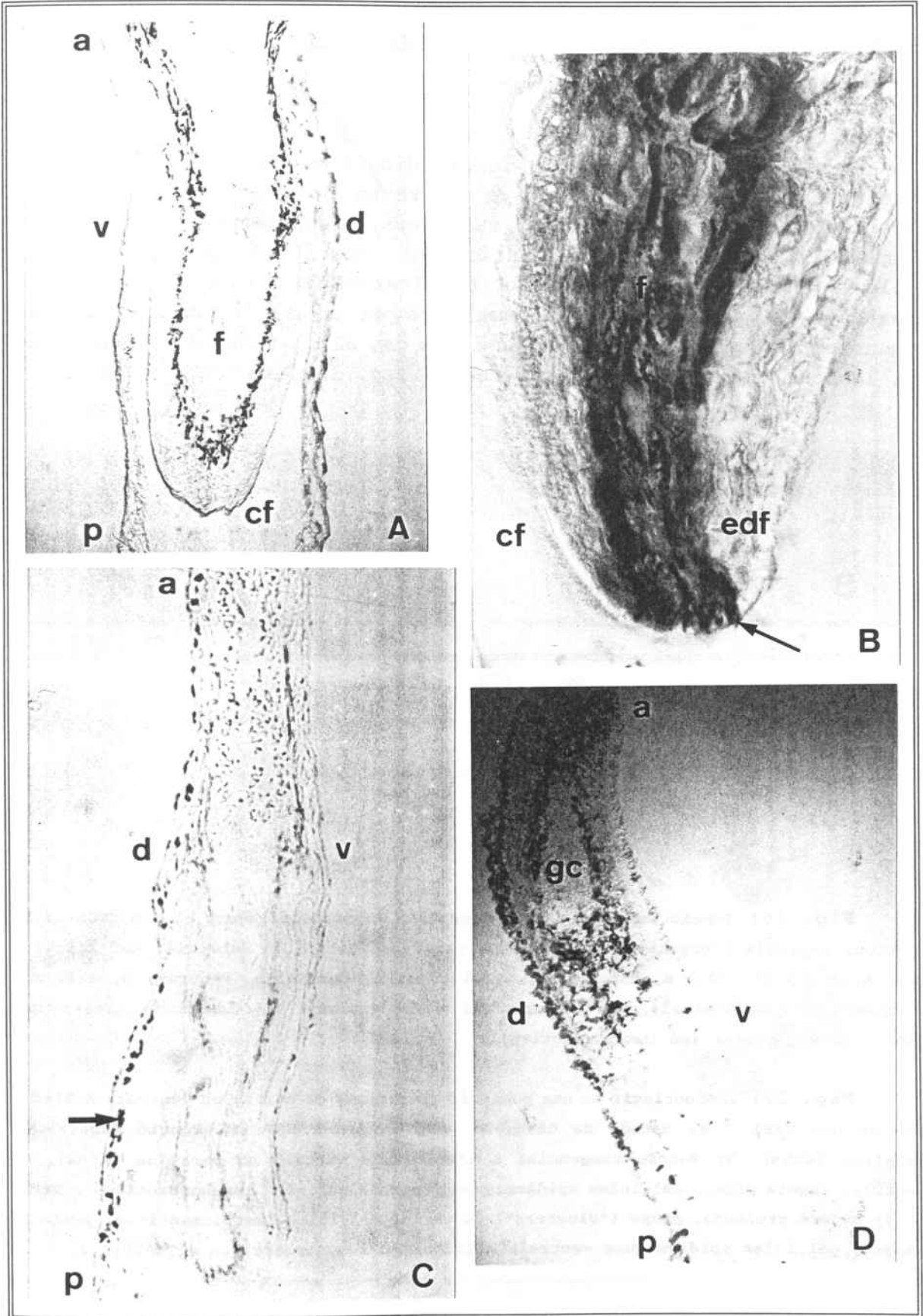
S'han generat 2 anticossos específics d'aquest subtipus de cèl.lules cianòfiles, que presenten un patró de distribució idèntic a l'anterior però a la zona subepidèrmica ventral.

6) Cèl.lules cianòfiles de la faringe i prefaringe

S'han obtingut 29 anticossos específics d'aquest subtipus de cèl.lules cianòfiles, sent el subtipus que més anticossos ha generat. Presenten tots ells un patró de distribució que comprèn la zona prefaringia i la faringia en tota la seva longitud i amb una posició central, amb prolongacions que travessen l'epidermis en l'extrem distal de la faringe (fig. 35, MAb TF- 9.1). Aquest subtipus cel.lular pot correspondre al descrit per Baguñà (1973) com a cèl.lules cianòfiles de tipus 2 per la seva situació en la zona prefaringia emetent prolongacions cap a l'interior de la faringe, encara que probablement també immunoreaccioni amb les cèl.lules cianòfiles de la faringe descrites per aquest mateix autor amb el nom de G1 i G2. Aquestes cèl.lules tindrien la funció hipotètica de lubricar l'aliment i, sobre tot, secretar enzims proteolítics, lipolítics i amilolítics (Pascolini, 1967; Jennings, 1975).

De fet, tots els autors que han fet classificacions d'aquest tipus cel.lular (veure Pascolini i col., 1971; Baguñà, 1973) coincideixen a assenyalar la gran heterogeneïtat que presenten aquestes cèl.lules respecte la morfologia dels seus grànuls de secreció. De totes maneres, però, les distribucions que donen aquests autors segons criteris morfològics no coincideixen sempre amb la distribució dels subtipus cel.lulars establerts segons determinants antigènics.

Fig. 35: Immunotinció amb anticossos específics de poblacions (subtipus) de cèl.lules cianòfiles. Seccions sagitals d'organismes inclosos en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Immunoreacció en cèl.lules cianòfiles de la faringe. MAb TF-9.1 (200x). B) Immunoreacció en cèl.lules cianòfiles de la faringe amb prolongacions que atravesen l'epidermis en l'extrem distal de la faringe. MAb TF-9.1 (400x). C) Immunoreacció en cèl.lules cianòfiles subepidèrmiques dorsals. MAb TCIAN-13.7 (100x). D) Immunoreacció en cèl.lules cianòfiles cefàliques. MAb TCIAN-34 (100x). *a*, anterior; *p*, posterior; *d*, dorsal; *v*, ventral; *f*, faringe; *cf*, cavitat de la faringe; *edf*, extrem distal de la faringe; *gc*, gangli cefàlic; *sageta prima*, prolongacions de cèl.lules cianòfiles faríngies atravesant l'epidermis de l'extrem distal de la faringe; *sageta gruixuda*, cèl.lules cianòfiles subepidèrmiques dorsals.



19.3.2 - Anticossos específics de subtipus de cèl.lules musculars

Les cèl.lules musculars longitudinals presenten al menys un determinant antigènic diferent a la resta de cèl.lules musculars. Aquest subtipus de cèl.lules musculars, les cèl.lules musculars longitudinals, han generat 2 anticossos específics d'elles, un dels quals ha estat portat a la monoclonalitat (Mab TMUS-46.2). Tots dos presenten el mateix patró de marcatge en aquest tipus de fibres, immunoreaccionant només amb elles i amb cap altra fibra de l'organisme (ni les circulars ni les transversals, fig. 36, Mab TMUS-46.2).

Fig. 36: Immunotinció en fibres musculars longitudinals amb el Mab TMUS-46.2. Seccions sagitals d'organismes inclosos en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 200x. B) 400x. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; u, ull; ml, musculatura longitudinal; mt, musculatura dorso-ventral (no immunoreactiva); mc, musculatura circular (no immunoreactiva).

Fig. 37: Immunotinció en una població (subtipus) de cèl.lules ventrals ciliades amb el Mab TEPI-15.4. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció sagital en parafina (400x). B) Secció tangencial a l'epidermis ventral en parafina (400x). v, ventral; *sageta prima*, cèl.lules epidèrmiques ventrals ciliades immunoreactives a TEPI-15.4; *sageta gruixuda*, grups ("clusters") de vèries cèl.lules immunoreactives; punta de *sageta*, cèl.lules epidèrmiques ventrals ciliades no immunoreactives a TEPI-15.4.

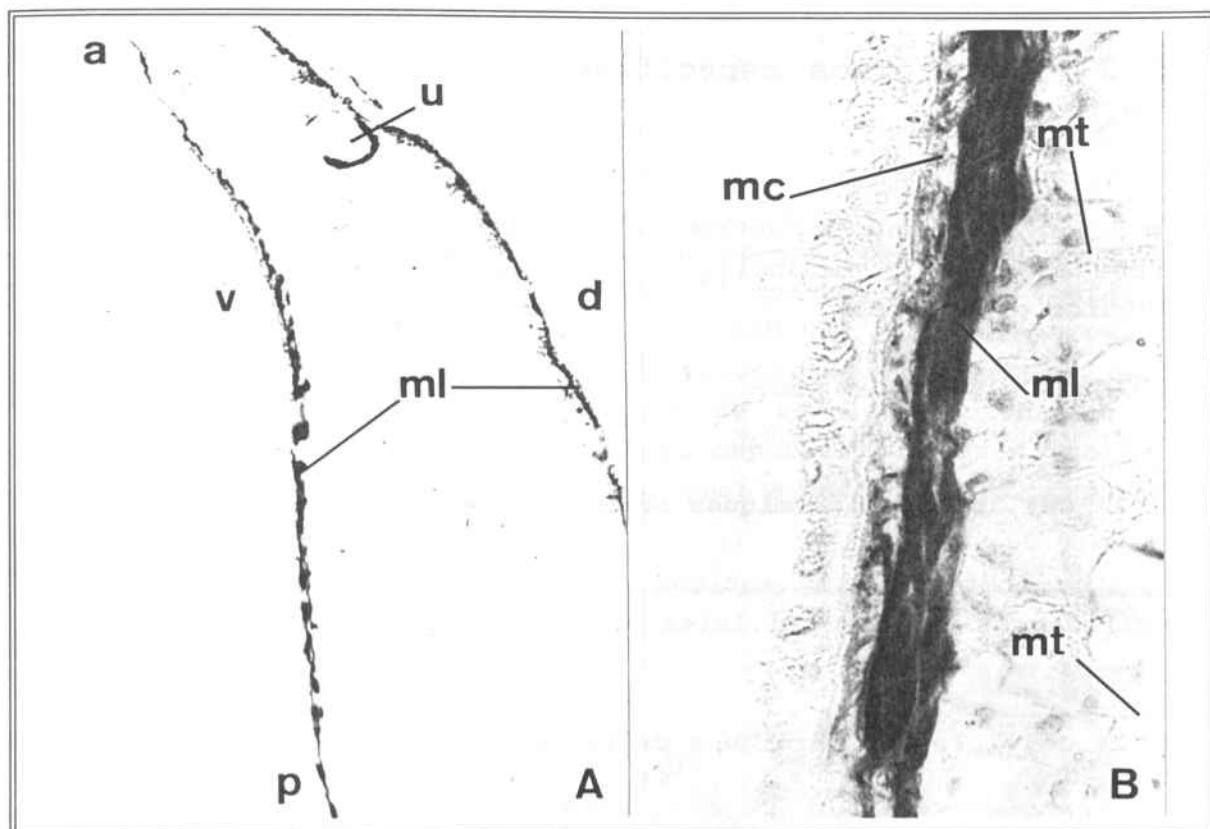


Fig. 36

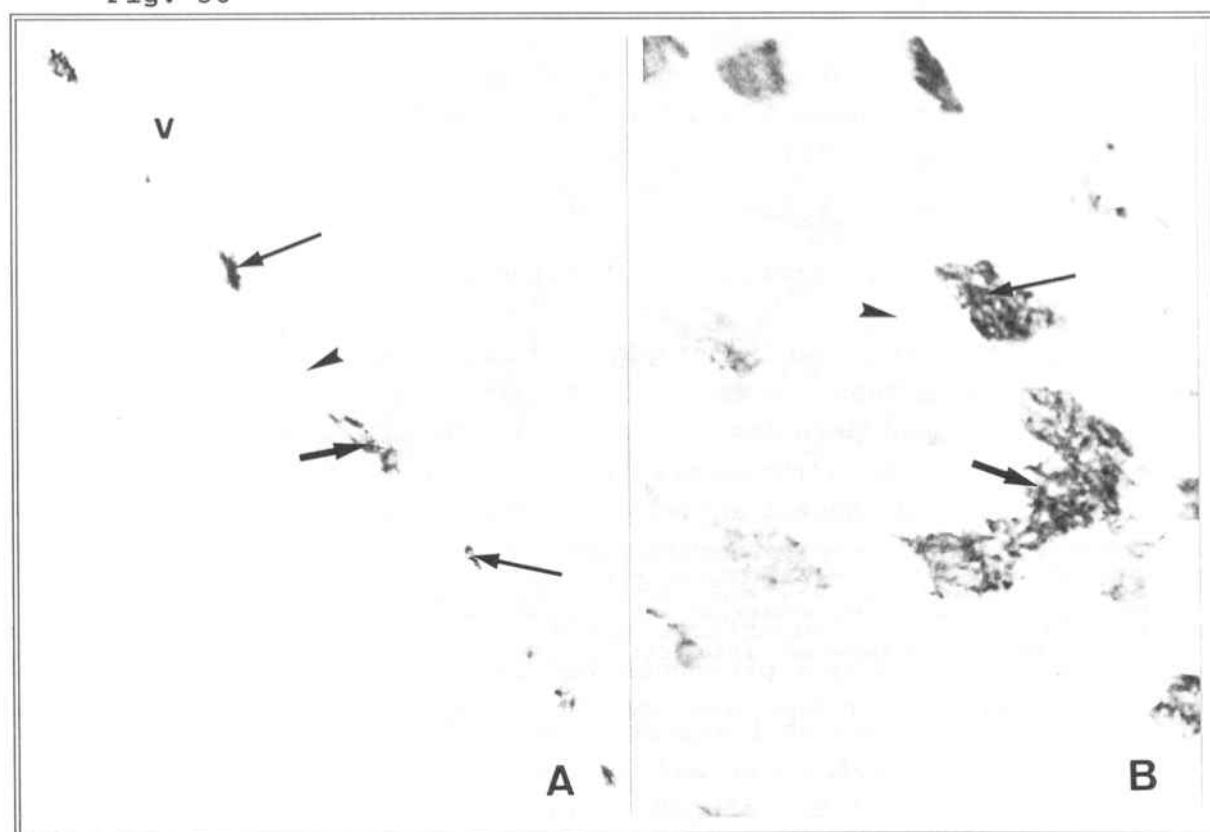


Fig. 37

19.3.3 - Anticossos específics de subtipus de cèl.lules epidèrmiques

S'han reconegut 3 subtipus diferents de cèl.lules epidèrmiques en base a criteris immunològics pel reconeixement de determinants antigènics específics.

Aquests subtipus són:

1) Cèl.lules epidèrmiques dorsals

S'ha obtingut 1 anticòs (TEPI-17.1) que immunoreacciona específicament amb les cèl.lules epidèrmiques dorsals.

2) Cèl.lules epidèrmiques de la faringe

S'ha aïllat 1 (TF-58.2) anticòs que detecta específicament un determinant antigènic d'aquestes cèl.lules, i 2 anticossos que reconeixen solament algunes cèl.lules de l'epidermis de la faringe (TF-17.2 i TF-57). El seu patró de marcatge difereix de l'anterior per la presència d'un alt nombre de cèl.lules no immunoreactives (més del 50%) entre les immunoreactives.

3) Cèl.lules epidèrmiques de l'epidermis ventral

S'ha detectat 1 anticòs que reconeix específicament algunes cèl.lules epidèrmiques. De fet, el seu patró de tinció és similar al descrit anteriorment pels dos anticossos que reconeixen diferencialment certes cèl.lules de l'epidermis de la faringe, però restringit a l'epidermis ventral. Aquest anticòs (MAb TEPI-15.4) immunoreacciona amb cèl.lules aïllades de l'epidermis ventral o amb grups ("clusters") de 3 a 5 cèl.lules (Fig. 37, MAb TEPI-15.4). L'antigen reconegut sembla estar localitzat a la superfície apical de la cèl.lula. Aparentment, totes les cèl.lules que presenten aquest determinant antigènic són ciliades, però no totes les cèl.lules epidèrmiques ciliades el presenten.

19.3.4 - Anticossos específics de subtipus cel.lulars de difícil classificació

S'han obtingut 25 anticossos específics de subtipus cel.lulars en les cèl.lules secretores, tant acidòfiles com cianòfiles, i de cèl.lules parenquimàtiques que no presenten una regularitat en el seu patró de marcatge com els descrits a l'apartat 19.3.1 (cefàlics, dorsals, etc.). Aquests immunoreaccionen amb cèl.lules disperses pel parènquima amb patrons no fàcilment identificables. Per exemple, el MAb TS-15 presenta un patró de marcatge de cèl.lules disperses pel parènquima (fig. 38), sense que es vegi cap relació aparent respecte la seva situació (subepidèrmica, relacionat a gastrodermis, regional, etc.).

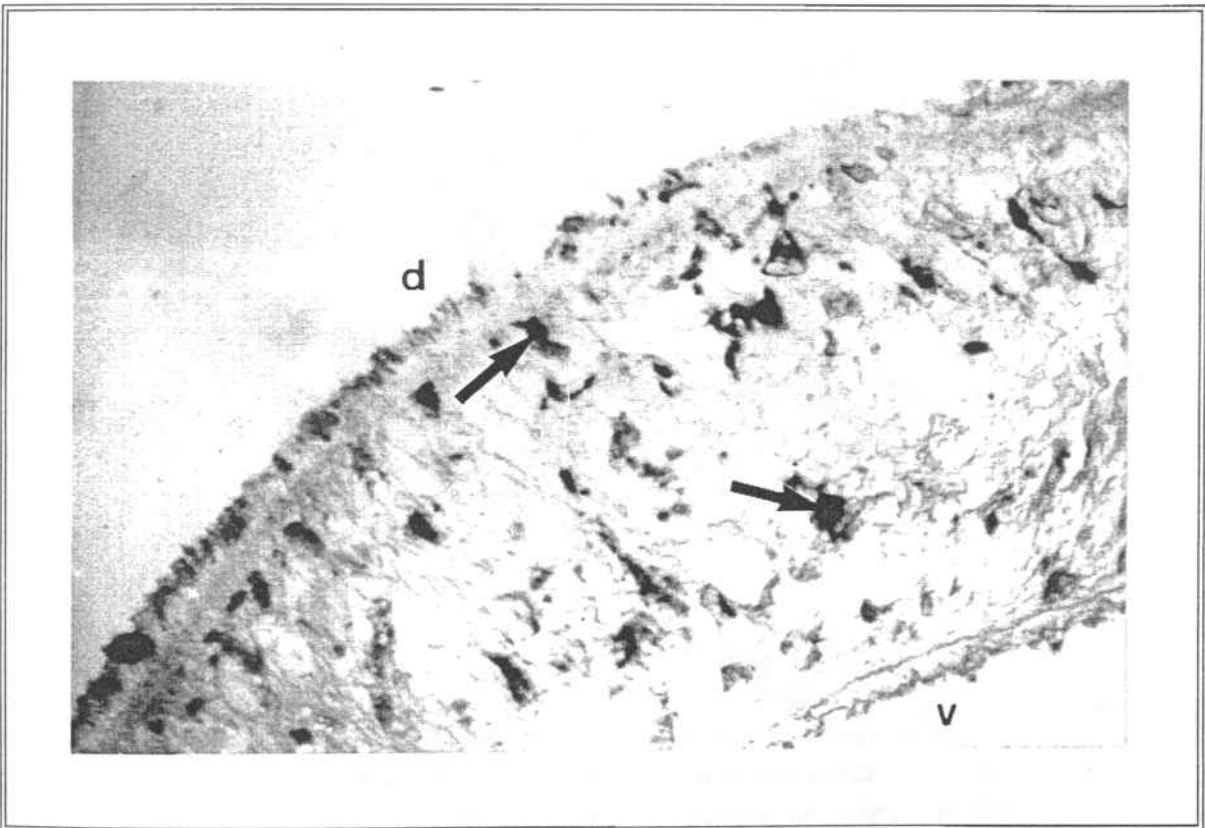


Fig. 38: Immunotinció en cèl.lules disperses pel parènquima de difícil classificació amb el MAb TS-15. Secció sagital d'organisme inclòs en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRT. 400x. Sageta, cèl.lules immunoreactives a TS-15.

Aquests patrons de marcatge diferents i de difícil classificació revelen una gran heterogeneïtat en les cèl.lules que componen el parènquima (Pascolini i col., 1971; Baguñà, 1974; Baguñà i Romero, 1981), d'altre banda molt lògic a aquest nivell d'observació. Aquesta

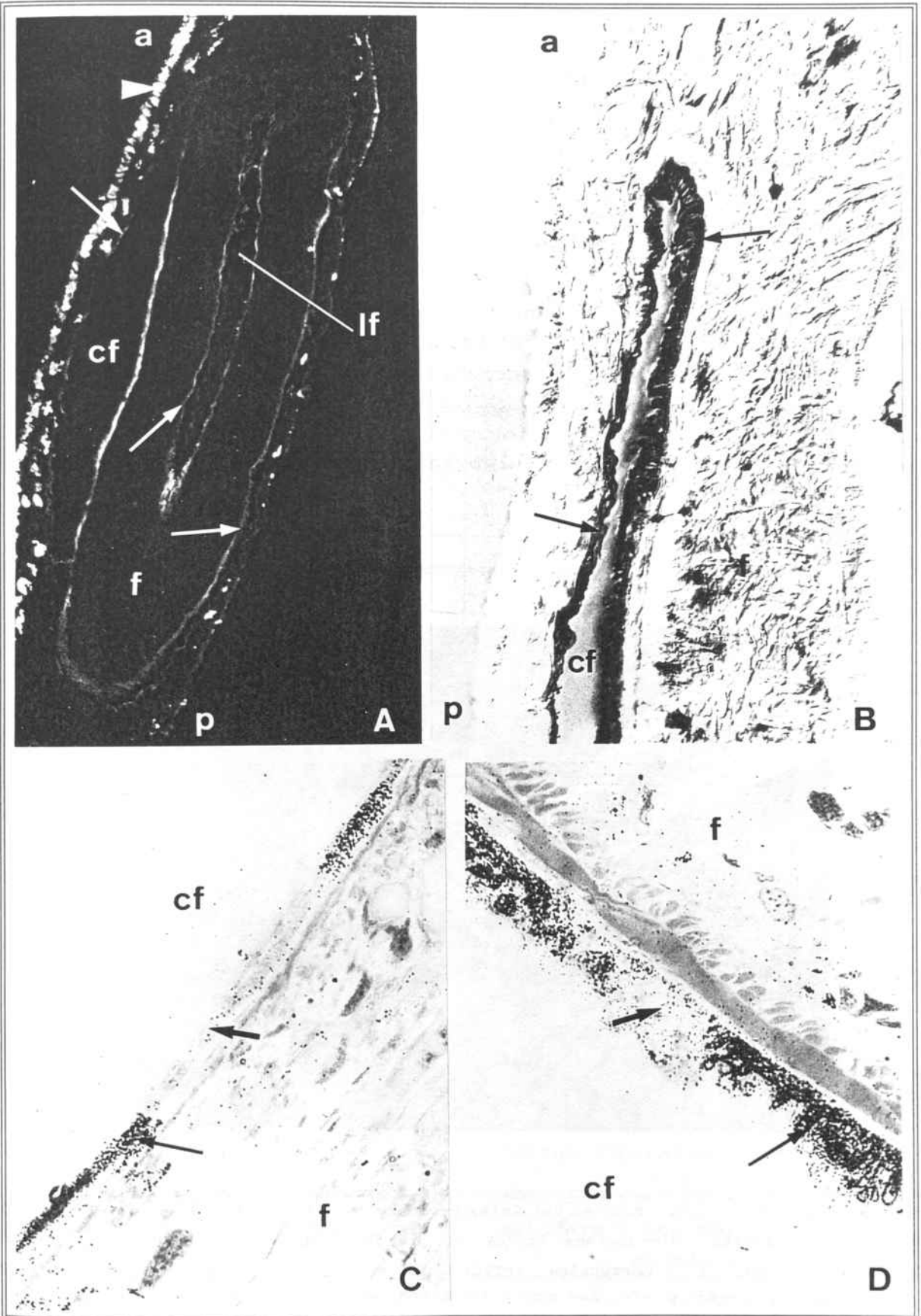
heterogeneïtat pot estar relacionada amb funcions, estadis o localitzacions cel·lulars diferents. Aquestes observacions concorden amb les observacions de polimorfismes en els grànuls i inclusions que presenten les cèl·lules del parènquima (Pascolini i col., 1971; Baguñà, 1973), i amb la presència de cèl·lules en diferents estadis de diferenciació des dels neoblasts fins a les cèl·lules diferenciades, degut al constant renovament cel·lular al que es troba sotmesa la planària (apartat 2 i 3).

19.4 - Anticossos específics comuns a diferents tipus cel·lulars

Alguns dels anticossos obtinguts no reconeixen un sol tipus o subtipus cel·lular, sinó que en reconeixen varis morfològicament diferents segons les descripcions de Baguñà (1973) i Baguñà i Romero (1981). Aquests anticossos posen de manifest l'existència d'antígens comuns o, si més no, de determinants antigènics comuns (epitops) en aquests tipus cel·lulars.

Per exemple, una d'aquestes relacions antigèniques la presenta el MAb TF-17.1 (o TCAV-1), descrit àmpliament per Espinosa (1993), del mateix grup de treball, que relaciona les cèl·lules epidèrmiques de la faringe i la gastrodermis (fig. 39). Segons les descripcions fetes per aquest autor, no totes les cèl·lules de l'epiteli faringi són immunoreactives amb aquest MAb (veure Espinosa, 1993, per a una descripció complerta). Estudis fets amb posterioritat als treballs de

Fig. 39: Immunotinció en cèl·lules de l'epiteli faringi amb el MAb TEPI-17.1 (TCAV-1). A) Secció sagital en parafina. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a flouresceïna (FITC). 100x. B) Secció sagital en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. 400x, contrast interferencial. C) Secció semifina de porció proximal de faringe. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a or coloidal; amplificació de senyal amb nitrat de plata. 1000x. D) Secció semifina de porció distal de faringe. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a or coloidal; amplificació de senyal amb nitrat de plata. 1000x. *a*, anterior; *p*, posterior; *f*, faringe; *cf*, cavitat de la faringe; *lf*, lumen faringi; *sageta prima*, cèl·lules de l'epiteli faringi immunoreactives a TEPI-17.1; *sageta gruixuda*, cèl·lules de l'epiteli faringi no immunoreactives a TEPI-17.1; *punta de sageta*, autofluorescència dels rabdits.



l'esmentat autor sobre seccions semifines, demostren novament l'existència de cèl.lules no immunoreactives i posen de manifest que aquestes tenen, a més a més, una morfologia en alguns casos diferent (fig. 39). Les cèl.lules no immunoreactives de la part apical de la faringe presenten un aspecte clarament més engruixit i amb més invaginacions que les immunoreactives. En canvi, en la part distal presenten la mateixa morfologia tant les immunoreactives com les que no ho són (si més no a aquest nivell d'observació).

Una altra relació antigènica que, en certs aspectes, representaria el pol oposat a la prèviament descrita, és la que presenta el MAb TT-7.1, que reacciona amb tots els tipus cel.lulars de l'organisme excepte amb les cèl.lules columnars gastrodèrmiques i les goblet, com si fos un negatiu fotogràfic dels marcatges obtinguts amb anticossos específics de cèl.lules gastrodèrmiques (fig. 40), com el MAb TG-42 (fig. 29).

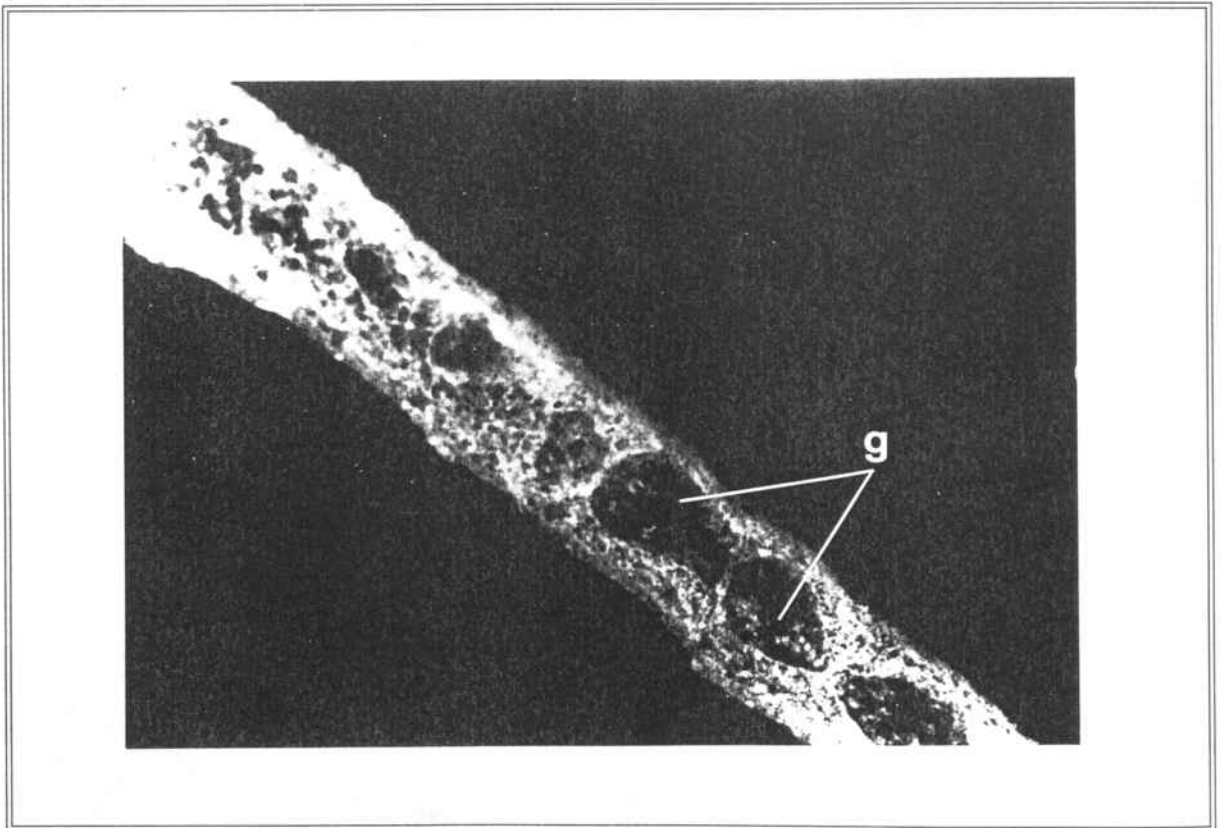


Fig. 40: Immunotinció en cèl.lules ectodèrmiques i mesodèrmiques amb el MAb TT-7.1. Secció sagital d'organisme inclòs en parafina. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a fluoresceïna (FITC). 100x. g, gastrodermis (mesoderm) no immunoreactiva a TT-7.1.

Cal aclarir que no tots els anticossos englobats dins aquest grup han estat portats a la monoclonalitat, i per tant pot ser que alguns d'ells siguin fruit de la presència de dos híbridomes productors en un mateix pou de cultiu. També cal remarcar que el fet de trobar dos tipus cel.lulars diferents amb marcatge immunològic produït per un mateix anticòs o MAb no garanteix que tots dos comparteixin la mateixa molècula, sino tant sols que tenen epítops que són reconeguts pel mateix anticòs o MAb.

A la figura 41 es resumeixen les relacions antigèniques entre tipus cel.lulars diferents, tenint present el dubte exposat al paràgraf anterior.

TIPUS CEL.LULARS ANTIGENICAMENT RELACIONATS	POSSIBLE RELACIO
goblet - cianòfiles	secreció de mucopolisacàrids
goblet - epidèrmiques dorsals	caràcter "epitelial" (endoderm - ectoderm)
gastrodèrmiques - epidèrmiques	caràcter "epitelial" (endoderm - ectoderm)
goblet - perenquimàtiques	vesícules i inclusions
cianòfiles - gastrodèrmiques	vesícules i inclusions
secretores - epidèrmiques	origen - destí de la secreció
epidèrmiques de la faringe - gastrodèrmiques	caràcter d'epiteli digestiu i continuitat de teixit
epidèrmiques de la faringe - cianòfiles	origen - destí de la secreció
epidèrmiques - làmina basal	situació
nervioses - gastrodèrmiques	caràcter "epitelial" (ectoderm - endoderm) i neuropèptids i neurohormones comuns (Gustafsson i Reuter, 1990)
totes exepete gastrodèrmiques	ectoderm i mesoderm, però no endoderm

Fig. 41: Relacions antigèniques entre tipus cel.lulars diferents.

19.5 - Anticossos amb especificitat subcel.lular

19.5.1 - Anticossos específics de làmina basal

S'han obtingut anticossos que no mostren especificitat per cap tipus ni subtipus cel.lular de planària, sinó que ho fan amb estructures subcel.lulars. Catorze d'ells immunoreaccionen amb la làmina basal (fig. 42, MAb TMB-13.1) i presenten el mateix patró de marcatge observat en seccions d'organismes inclosos en parafina.

19.5.2 - Anticossos específics de nucli i DNA

S'han detectat 6 anticossos que mostren especificitat pels nuclis de totes les cèl.lules, presentant tots ells el mateix patró de marcatge (fig. 43, MAb TNU-46).

Un d'ells, el TNU-46, ha estat portat a la monoclonalitat i s'ha determinat la naturalesa de l'antigen reconegut. En tractar homogenat total de planària amb proteases, fixar-lo en membranes de nitrocel.lulosa i immunodetectar-lo amb el MAb en qüestió, no s'observa cap disminució en la senyal obtinguda, sino que fins i tot i ha un lleuger increment de coloració. En canvi, en tractar l'homogenat amb DNAases, la senyal desapareix totalment (fig. 44). Així mateix, en fixar, a la mateixa concentració, DNA de diferents espècies a la membrana (*Dugesia (G)tigrina*, *Dugesia(S)mediterranea*, *Drosophila melanogaster*, DNA d'esperma de salmó, humà, i del fag lambda), s'observa que tots ells són detectats igualment per l'anticòs (fig. 44). D'aquests resultats es desprèn que el MAb TNU-46 és específic de DNA, i per això s'observa immunoreacció a tots els nuclis (fig. 43). No s'ha assajat la naturalesa de l'antigen reconegut pels altres anticossos amb especificitat histològica i cel.lular pels nuclis, i per tant no es sap si reconeixen també DNA o si immunoreaccionen amb altres mol.lècules nuclears.

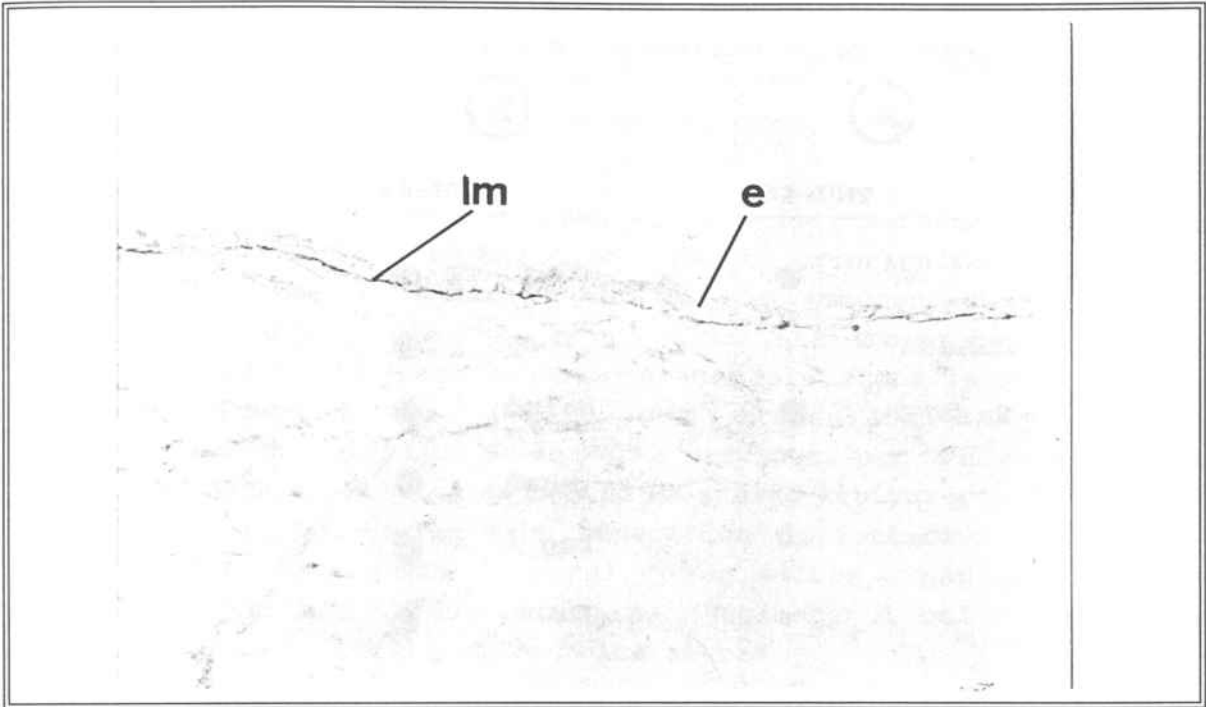


Fig. 42: Immunotinció en làmina basal amb el MAb TMB-13.1. Secció sagital d'organisme inclòs en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. 400x. e, epidermis; lm, làmina basal.

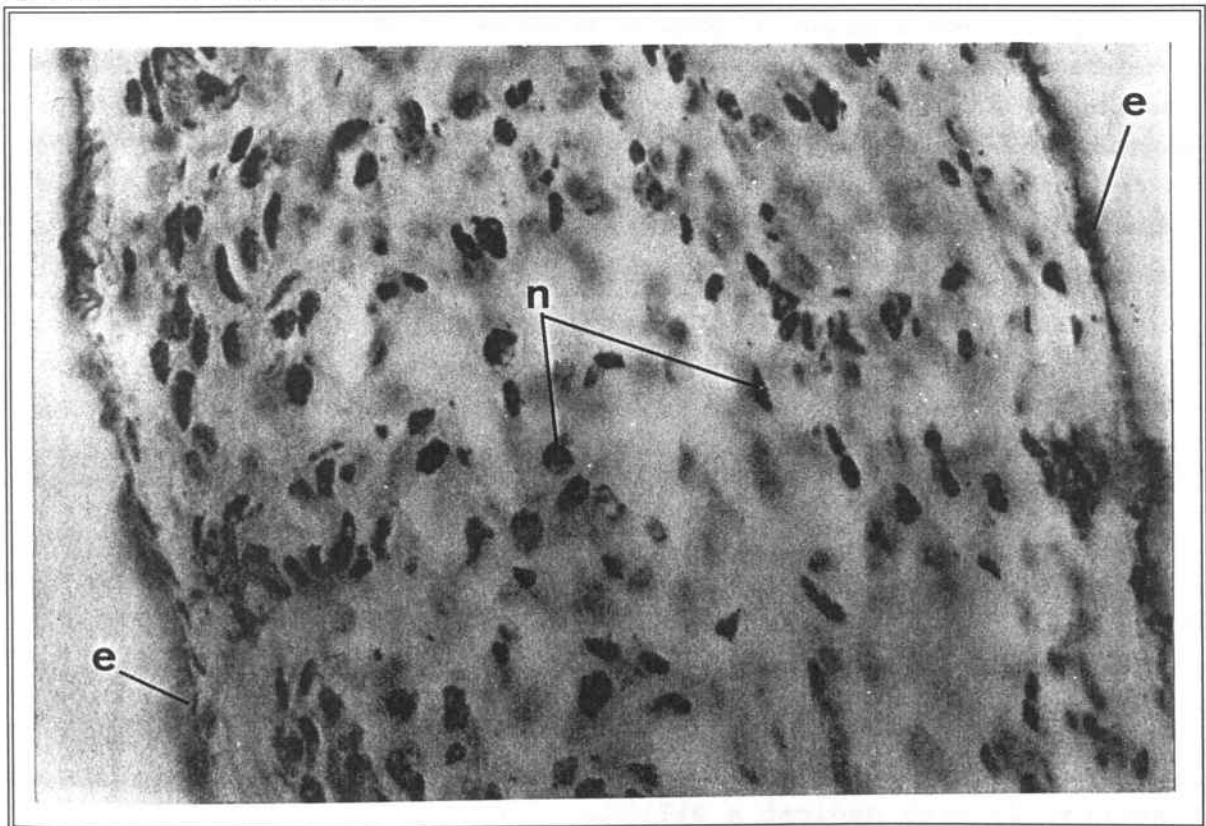


Fig. 43: Immunotinció en nuclis amb el MAb TNV-46. Secció sagital d'organisme inclòs en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. 1000x. e, epidermis; n, nucli.

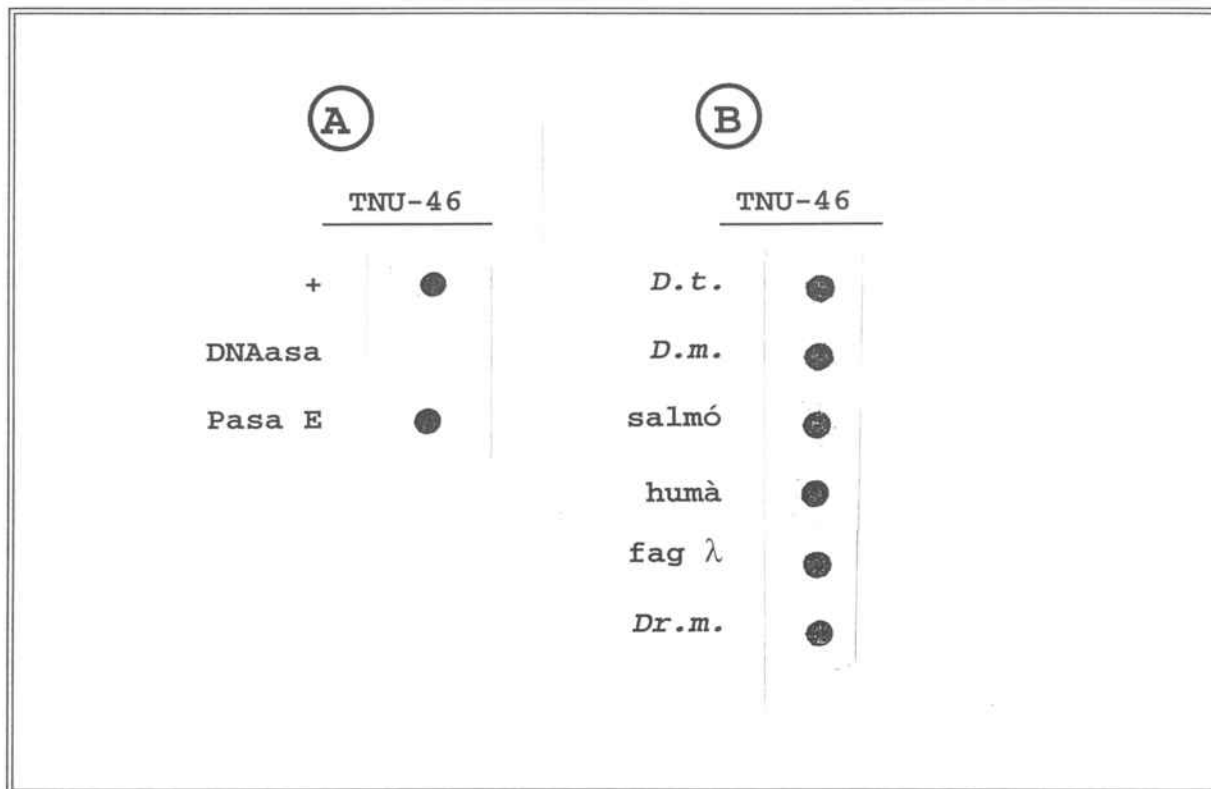


Fig. 44: Immunodot del MAb TNU-46. A) Dot-blot d'homogenat total de planària incubat amb proteasa i DNAasa. B) Dot-blot de DNA de diferents espècies d'organismes. +, fixació a filtre d'homogenat total de planària incubat amb tampó d'actuació de DNAasa i de pronasa E; DNAasa, homogenat total de planària incubat amb DNAasa; Pasa E, homogenat total de planària incubat amb pronasa E; *D.t.*, DNA de *Dugesia(G)tigrina*; *D.m.*, DNA de *Dugesia(G)mediterranea*; salmó, DNA d'esperma de salmó; humà, DNA humà; fag lambda, DNA del fag lambda; *Dr.m.*, DNA de *Drosophila melanogaster*.

19.6 - Anticossos amb especificitat regional

S'ha obtingut un anticòs, el MAb TCEN-49, que mostra especificitat regional. Immunoreacciona amb un antigen present a la regió central de l'organisme, compresa entre la zona prefaríngia i la postfaríngia, incloent-hi la faringe. Degut a la seva especificitat i als resultats obtinguts durant el creixement, decreixement i regeneració a planària ha estat el MAb més treballat, de manera que tot l'apartat 21 està dedicat a ell.

20 - APLICACIO DELS ANTICOSSOS GENERATS EN REGENERACIO

Els Mabs han esdevingut unes eines útils, versàtils i precises per l'estudi de la regeneració, degut principalment a l'alta especificitat per la molècula amb la que immunoreaccionen (veure l'apartat 5). Com a tals, han estat utilitzats amb èxit per diversos grups. A aquest efecte es poden destacar els treballs relitzats en hidra per Dunne i col. (1985), que obtenen MAb's específics de subpoblacions de cèl.lules de la xarxa nerviosa, per Schawaller i col. (1988) amb MAb's específics de pèptid HA ("head activator") o Heimfield i col. (1990) que empren MAb's específics de tentacles i cèl.lules epitelials de la columna corporal, o en altres organismes com els escarabats (Denburg, 1989), en carpa (Vielmeter i col., 1991) o en tritó (Goldhamer, 1989), entre molts altres.

Amb els anticossos que s'han obtingut, descrits a l'apartat 19, es disposa d'un nombre suficientment elevat d'anticossos com per abordar amb èxit diferents problemàtiques de la regeneració, encara que seria de gran utilitat disposar d'anticossos amb determinades especificitats poc o no representades (veure Discussió).

20.1 - Anticossos monoclonals específics de cèl.lules musculars

Durant el procés de la regeneració, el primer fenomen que esdevé és la cicatrització de la ferida, que s'inicia amb una forta contracció muscular i el cubriment d'aquella per l'estirament de l'antiga epidermis (Saló, 1984). En observacions fetes amb microscòpia òptica i electrònica, s'ha vist que la musculatura adjacent a la zona de la ferida es contrau fortament des del primer moment i aproximadament fins les 24 hores per tal de disminuir al màxim l'àrea no protegida per l'epidermis. L'augmentant de la proximitat entre l'epidermis ventral i dorsal permet un nou contacte entre elles responsable de la cicatrització de la ferida (per una descripció del procés, veure Saló, 1984; M. Ribes, comunicació personal).

Resultats

Els MAbs específics de cèl.lules musculars representen una nova eina de cara a aquests estudis, ja que suposen una manera directa de visualitzar aquest fenomen en permetre diferenciar les fibres musculars de la resta de teixits. En la fig. 45 es poden veure diversos estadis d'aquest procés, immunodetectats amb el MAb TMUS-13, on s'observa la forta contracció muscular a l'inici de la cicatrització, amb la formació d'un tupit entremat de fibres musculars a la zona de la ferida, seguida d'una posterior relaxació. A més a més, amb el MAb TMUS-46.2, específic de fibres musculars longitudinals, es podria fer una distinció entre aquestes fibres i la resta de fibres musculars de l'organisme per tal d'esbrinar fins a quin punt intervenen les diferents fibres en aquesta contracció.

Un cop format el blastema de regeneració, les noves fibres musculars poden provenir de la zona adjacent al blastema, per allargament de les fibres madures ja pre-existents en aquesta zona, o bé formar una nova estructura muscular dins el blastema a partir de la diferenciació de neoblasts que contactaria amb les fibres pre-existents de la zona adjacent al blastema. L'ús d'aquests MAbs pot contribuir a aportar dades sobre aquest tema, un dels aspectes clau de la formació del nou patró d'estructures.

Fig. 45: Immunotinció amb el MAb TMUS-13 en organismes regenerants. Seccions sagitals d'organismes inclosos en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. 200x. A) 12 hores de regeneració. Forta contracció muscular en la zona de la ferida per disminuir la superfície desprovista d'epidermis i permetre la formació de l'epiteli cicatricial. B) 24 hores de regeneració. Inici de la relaxació muscular un cop format l'epiteli cicatricial. C) 48 hores de regeneració. Musculatura pràcticament relaxada i progressiu engruiximent de l'epiteli cicatricial. *zf*, zona de la ferida; *e*, epiteli; *ec*, epiteli cicatricial; *m*, fibres musculars; *sageta prima*, contracció de la musculatura; *sageta gruixuda*, relaxació de la musculatura.

Fig. 46: Immunotinció en organismes regenerants de nivell E a 4 dies de regeneració. Secció sagital d'organisme inclòs en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. 400x. *a*, anterior; *p*, posterior; *f*, faringe; *cf*, cavitat de la faringe; *sageta*, immunoreacció en cèl.lules amb morfologia de neoblasts. Fotografia obtinguda per Ll. Espinosa.

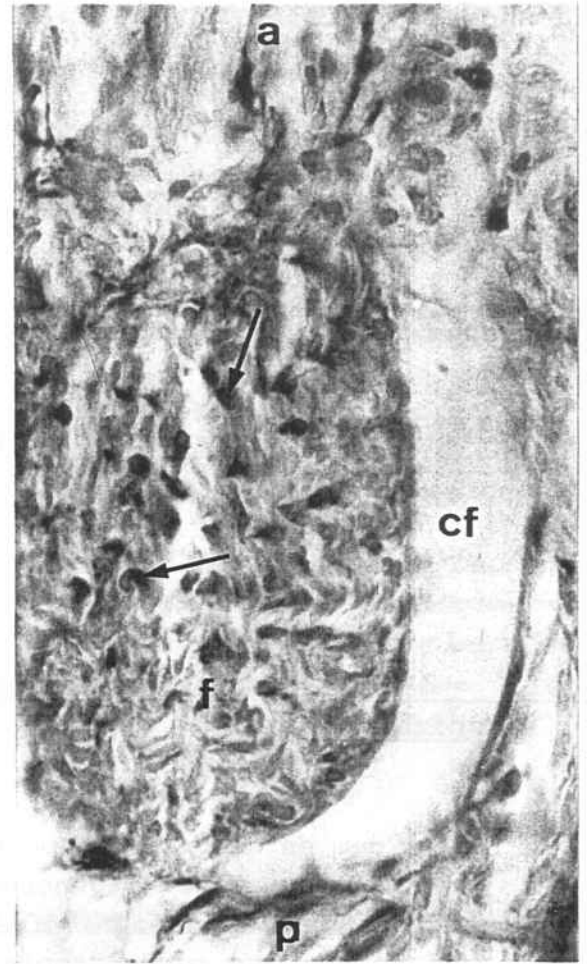


Fig. 46

Fig. 45

En aquest sentit, el MAb TMUS-13 ha estat emprat per Espinosa (1993) en la seva Tesina de Llicenciatura sobre la regeneració de la faringe. El motiu d'utilitzar aquest MAb resideix en el fet que la faringe és un òrgan amb una alta presència d'aquest tipus cel.lular (veure Espinosa, 1993, pels diferents aspectes del tema). En els resultats d'aquest treball s'observa, com un dels trets més significatius, la presència de cèl.lules amb morfologia de neoblast amb immunoreacció front TMUS-13 en el primordi de la faringe (blastema de regeneració intern que dona lloc a la faringe) (fig. 46), i no s'observa la presència de fibres musculars de la zona pre-existent penetrant a l'interior d'aquest primordi. Per tant es pot considerar que la musculatura de la faringe es forma "de novo" dins el primordi de la faringe (Espinosa, 1993). Aquests resultats clarifiquen les observacions fetes amb macerats cel.lulars immunotenyits amb aquest anticòs (apartat 19.2.5) en les que s'intuïa, de forma no massa clara, la presència de cèl.lules immunoreactives amb morfologia de neoblast.

Cap al cinquè-sisè dia de la regeneració faríngia es dona el pas de cèl.lules immunoreactives amb morfologia de neoblast a cèl.lules immunoreactives amb morfologia de cèl.lules musculars.

20.2 - Anticossos monoclonals específics de cèl.lules epidèrmiques

Tal i com es descriu breument a l'apartat 20.1, la cicatrització de la ferida prèvia a la regeneració i formació del blastema es dona per un recobriment de la zona afectada per part de l'epidermis de les zones adjacents, que queda completada als 30-45 minuts en forma d'un epiteli cicatricial de 1 μ m de gruix (Saló, 1984; Ribas i Baguñà, 1986). S'ha utilitzat un MAb específic de cèl.lules epidèrmiques, el TEPI-53.1, per tal de fer un seguiment de la cicatrització de la ferida per part de l'epidermis. De la mateixa manera que en el cas de cèl.lules musculars, suposa un mètode ràpid, directe i de fàcil visualització per aquests tipus d'estudis. Els resultats obtinguts confirmen plenament les descripcions fetes per Saló (1984) i Ribas i Baguñà, 1986), en el sentit de què la cicatrització es veu completada als 30 minuts després de la formació de la ferida.

L'anticòs TEPI-17.1, específic de cèl.lules epidèrmiques dorsals, pot ser utilitzat durant el procés de recobriment de la ferida per part

de l'epidermis per aportar noves dades sobre el model de formació del patró proposat per Chandebaise (1980), segons el qual el recobriment diferencial de la ferida per part de l'epidermis dorsal o ventral en regenerants cefàlics o caudals respectivament induiria la formació de les estructures cefàliques o caudals en cada cas (models d'interaccions cel.lulars entre regions frontera, apartat 2.2).

Dos MAb's específics de l'epidermis de la faringe (TF-17.1 i TF-22.2, o TCAV-1 i TCAV-2, respectivament) han estat emprats per Espinosa (1993) per fer un seguiment de la regeneració de la faringe, posar de manifest els estadis de diferenciació d'aquest tipus cel.lular i mostrar la seqüència de determinació/diferenciació. Aquesta seqüència ha resultat ser proximodistal (en sentit anteroposterior) en el cas de regeneració cefàlica (Espinosa, 1993; Bueno i col. 1994b).

20.3 - Anticossos específics regionals

El MAb específic regional obtingut, TCEN-49, ha resultat ser una eina molt útil per aportar dades noves respecte els mecanismes de regeneració, establiment i manteniment de la polaritat a planària; tanmateix ha permès conèixer una de les molècules implicades. Tots aquests resultats estan exposats a l'apartat 21.

20.4 - Anticossos monoclonals específics d'altres tipus cel.lulars

Set MAb's específics de cèl.lules cianòfiles de la faringe (TF7.1, TF-7.2, TF-9.1, TF-9.2, TF-9.3, TF-13.5 i TF-15, o TF-1, TF-2, TF-3, TF-4, TF-5, TF-6 i TF-7 respectivament) han estat utilitzats per Espinosa (1993) per fer un seguiment de la regeneració a faringe. No han estat uns marcadors útils pels primers estadis de regeneració donat que els antigens reconeguts són d'aparició molt tardana (cap el 6^a dia de regeneració). La diferenciació d'aquest tipus cel.lulars es produeix quan les estructures estan ja pràcticament formades (Baguñà, 1973; veure Espinosa, 1993, per a una descripció i discussió àmplia del marcatge d'aquests anticossos).

Resultats

Per tal d'establir la seqüència de determinació/ diferenciació de les cèl.lules i estructures durant la regeneració , tant dins com fora del blastema de regeneració, es poden utilitzar els anticossos ja esmentats en aquest apartat 20 o d'altres (específics de cèl.lules nervioses, gastrodèrmiques, goblet, etc...; fig, 26), seleccionant de els més útils en funció del patró de marcatge, temps, lloc d'aparició de l'antigen reconegut en la regeneració, versatilitat tècnica, i possibilitat de combinació amb altres anticossos o, fins i tot, amb altres marcadors (veure apartat 4). Es per això que tots els híbridomes productors d'anticossos específics obtinguts estan crioconservats en N₂ líquid, col.leccionats en una llibreria (MAbsteca) amb totes les dades i referències que es tenen.

21 - TCEN-49, L'ANTICOS MONOCLONAL QUE DETECTA REGIONS MOLECULARMENT RESTRINGIDES EN PLANARIA

21.1 - L'anticòs monoclonal TCEN-49

El Mab TCEN-49, al qual s'ha fet ja referència als apartats 19.6 i 20.3, ha estat obtingut en la fusió F-49, feta amb limfòcits B provinents d'una melsa de ratolí immunitzat amb homogenat d'una població cel.lular enriquida en neoblasts i absorbit sobre una combinació de 15 MAbs específics de cèl.lules secretores de freqüent aparició (apartats 7.2.4, 7.2.5, 7.2.8 i 7.2.1). El mètode utilitzat ha estat l'habitual (apartat 18.1).

En el crivellatge post-fusió sobre seccions d'organismes inclosos en parafina es va detectar marcatge restringit únicament a la zona central (respecte l'eix a/p) de planària. Es va considerar que podria tractar-se d'un anticòs interessant donat el seu aparent marcatge regional i va ser clonat. En els crivellatges posteriors es va confirmar el seu caràcter regional (apartat 21.2), i es va assolir la seva monoclonalitat (segons els mètodes de l'apartat 9.7) es van iniciar les immunodeteccions sobre seccions semifines, ultrafines i sobre altres espècies de planària (apartat 21.2). S'ha assajat també sobre seccions d'organismes de diversa llargada (apartat 21.3) i sobre organismes regenerants (apartat 21.4).

Finalment, s'han fet provatures d'alteració del patró d'expressió de TCEN-49Ag (segons la nomenclatura de l'apartat 16) (apartat 21.5) i s'ha procedit a la caracterització bàsica del mateix (apartat 21.6).

21.2 - Descripció del marcatge de TCEN-49 en organismes intactes

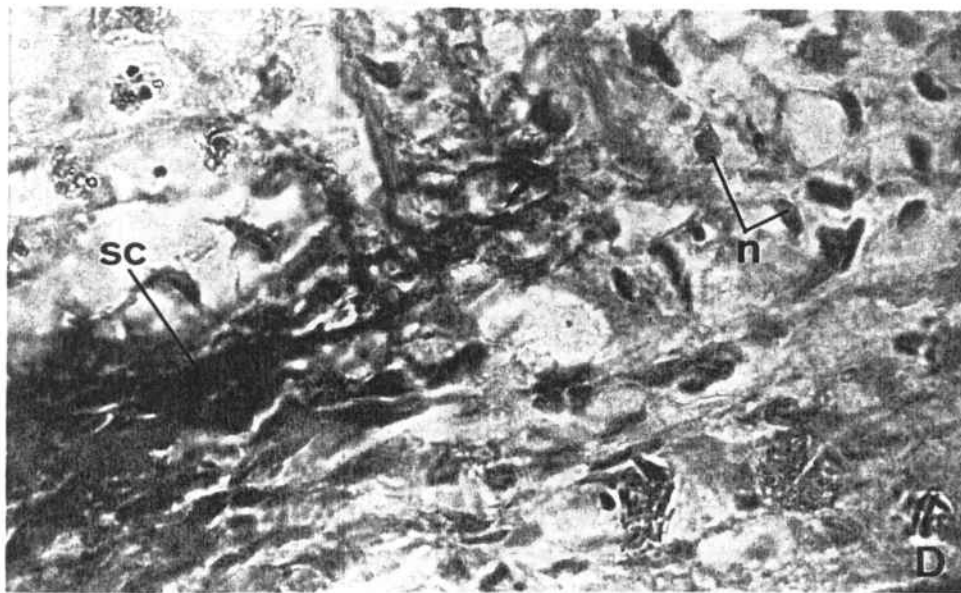
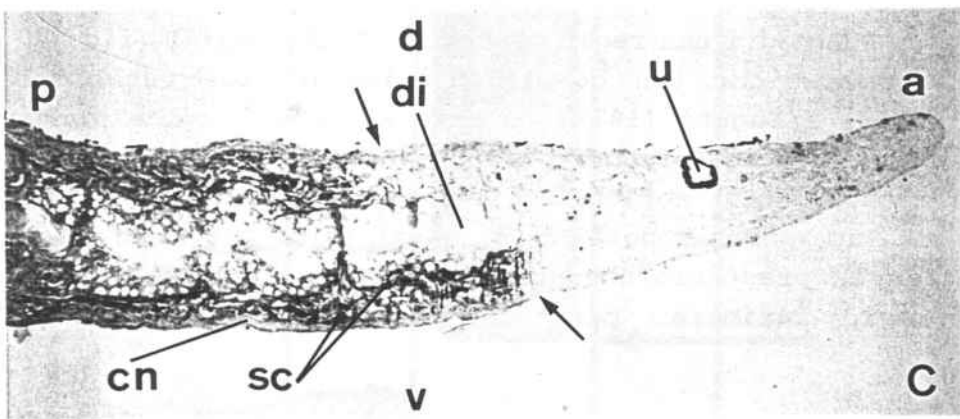
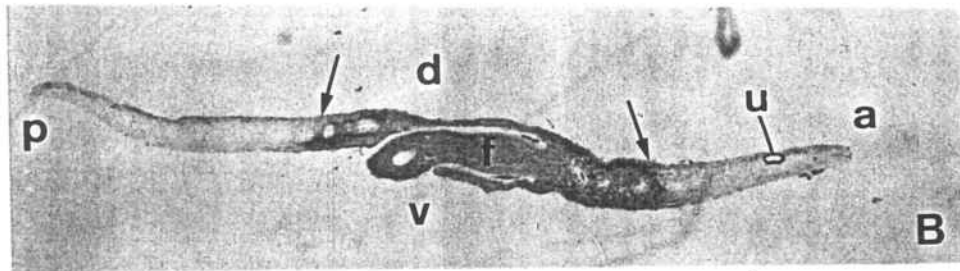
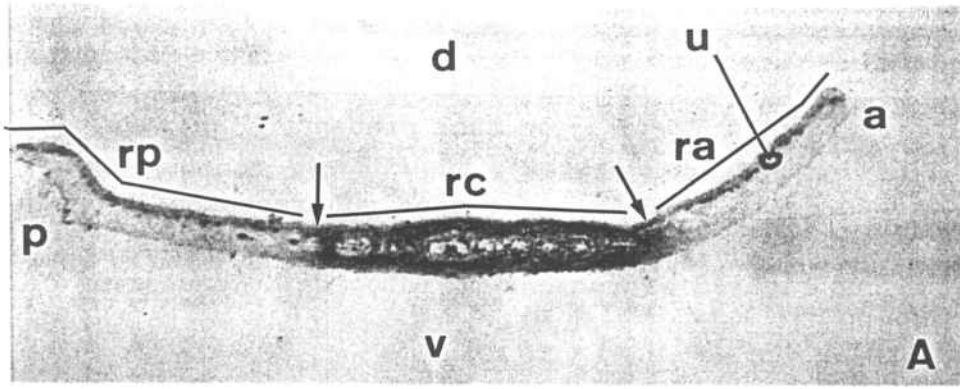
21.2.1 - Seccions d'organismes inclosos en parafina

Totes les seccions d'organismes inclosos en parafina emprades en el crivellatge provenen d'exemplars fixats amb paraformaldehid 4% en PBS. Aquest fixador, malgrat ser el més "universal" de tots els assajats en qüestions d'immunodetecció no preserva massa bé l'estructura histològica (apartats 12.1, 22.2.2). El primer que es va fer va ser buscar un fixador alternatiu que millorés la histologia sense que això impliqués una disminució acusada del marcatge immunològic (apartat 12.1). El fixador que millor resultat ha donat pel cas concret del MAb TCEN-49 és un fixador tipus Karnovsky, amb un 3% de paraformaldehid i un 0.025% de glutaraldehid en PBS a pH 7.0. Tots els resultats referents a seccions tant d'organismes inclosos en parafina com en Lowicryl (semifins i ultrafins) han estat obtinguts amb organismes fixats amb aquest fixador segons els protocols descrits a l'apartat 12.

A) Immunotinció de seccions sagitals

La immunotinció amb el MAb TCEN-49 de seccions sagitals mostra la restricció de l'antigen reconegut en una àrea situada en el centre de l'organisme, entre la zona prefaríngia i la postfaríngia, incloent tota la faringe i el parènquima corporal que l'envolta (fig. 47). Aparentment totes o gairebé totes les cèl.lules presents en l'àrea central presenten l'antigen, mentre que cap cèl.lula fora d'ella el presenta. Amb aquesta dada, i segons els criteris dels tipus d'especificitat bàsica establerts a l'apartat 19, se li ha assignat la classificació de MAb amb especificitat regional.

Fig. 47: Immunotinció amb el MAb TCEN-49 en organismes adults intactes. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció lateral de planària (respecte l'eix lateral) (40x). B) Secció central de planària (respecte l'eix lateral) (40x). C) Límit anterior de la immunoreacció (200x). D) Ampliació de la zona immunoreactiva (1000x). a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; u, ull; f, faringe; dv, diverticle intestinal; cn, cordó nerviós; sc, cèl.lula secretora cianòfila; n, nucli; ra, regió anterior; rc, regió central; rp, regió posterior; sageta, límit de marcatge. Observi's que el límit de marcatge no respecta els límits tissulars (fig. C, diverticle intestinal, cordons nerviosos)



Resultats

L'àrea que presenta immunoreacció és TCEN-49Ag(+) (es a dir, és immunoreactiva front TCEN-49 i per tant presenta l'antigen) i les dues àrees que no presenten immunoreacció són TCEN-49Ag(-) (es a dir, no són immunoreactives front TCEN-49 i per tant no presenten l'antigen). En els límits existents entre l'àrea TCEN-49Ag(+) i les àrees TCEN-49Ag(-) no s'observa cap tipus d'estructura morfològica, tissular ni cel.lular que els justifiqui. Tampoc s'observen diferències morfològiques entre les cèl.lules situades a ambdós costats del límit (TCEN-49Ag(+) i TCEN-49Ag(-)). Aquest és extraordinàriament rectilini i no respecta els límits imposats pels diferents tipus de teixits (nerviós, muscular, parenquimàtic i gastrodèrmic) (fig. 47 C).

En base a la frontera establerta entre les àrees no immunoreactives (la cefàlica o anterior i la caudal o posterior) i l'àrea immunoreactiva (la central) es poden establir tres regions en sentit a/p a planària: una regió anterior TCEN-49Ag(-), una regió central TCEN-49Ag(+) i una regió posterior TCEN-49Ag(-) (fig. 47 i 48). Aquestes tres regions són complementàries de les establertes per Bronsted (1969) i Baguñà (1973) en base a criteris morfològics més o menys laxes. Segons aquests criteris, les regions definides a planària en aquest mateix sentit serien 5: una regió cefàlica, una prefaríngia, una faríngia, una postfaríngia i una caudal (fig. 48). La regió central definida per la presència/absència de marcatge amb TCEN-49 ocuparia tota la regió faríngia, part de la prefaríngia i part de la postfaríngia.

La diferència entre unes i altres regions ve donada, en definitiva, pels criteris utilitzats en la seva definició:

- presència/absència de determinat antigen regional, amb uns límits ben definits, i que estableix regions restringides molecularment
- criteris morfològics, més laxes i amb uns límits de localització ambigua, però amb transfons detectable durant fenòmens de regeneració, creixement i decreixement (Baguñà, 1973; Saló, 1984).

En fer talls sagitals seriatos, s'observa que els més externs de la sèrie, els quals corresponen a les vores de l'organisme, no presenten marcatge. Aquests representen un 15%-25% del total de seccions de l'organisme (7.5%-12.5% a cada lateral). La zona de la regió central que no presenta marcatge està representada a la figura 48.

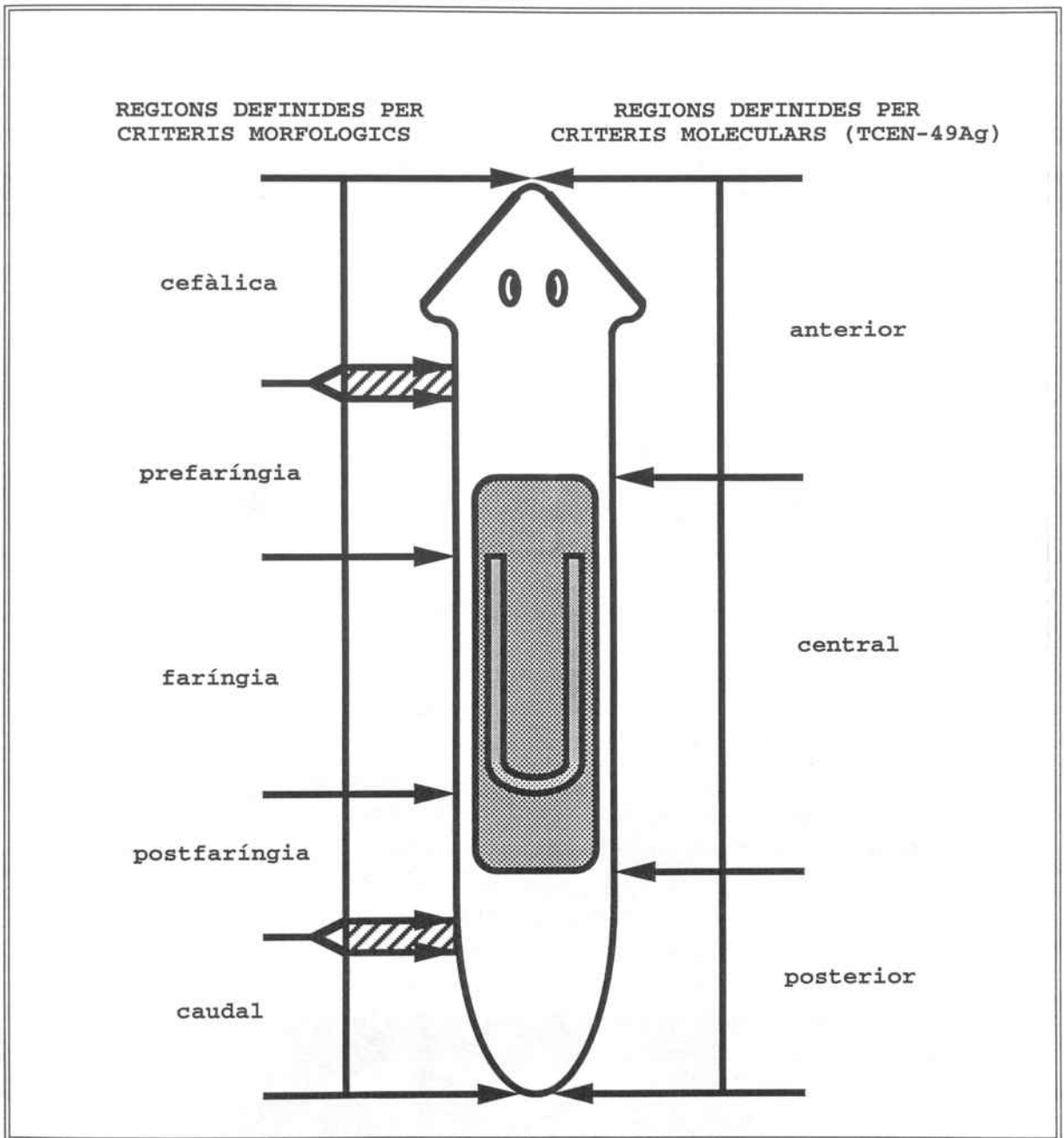


Fig. 48: Esquema de les regions definides a planària. *esquerra*, regions definides segons criteris morfològics; *dreta*, regions definides segons criteris moleculars; *sombreat*, zona immunoreactiva a TCEN-49; *ratllat*, límits entre regions difícils de definir.

El marcatge de TCEN-49 no és uniforme en tota la regió central. S'observen algunes cèl.lules amb morfologia de secretores amb un marcatge molt més intens que la resta de cèl.lules (fig. 47). Aquestes es troben disperses pel parènquima i la faringe amb una posició

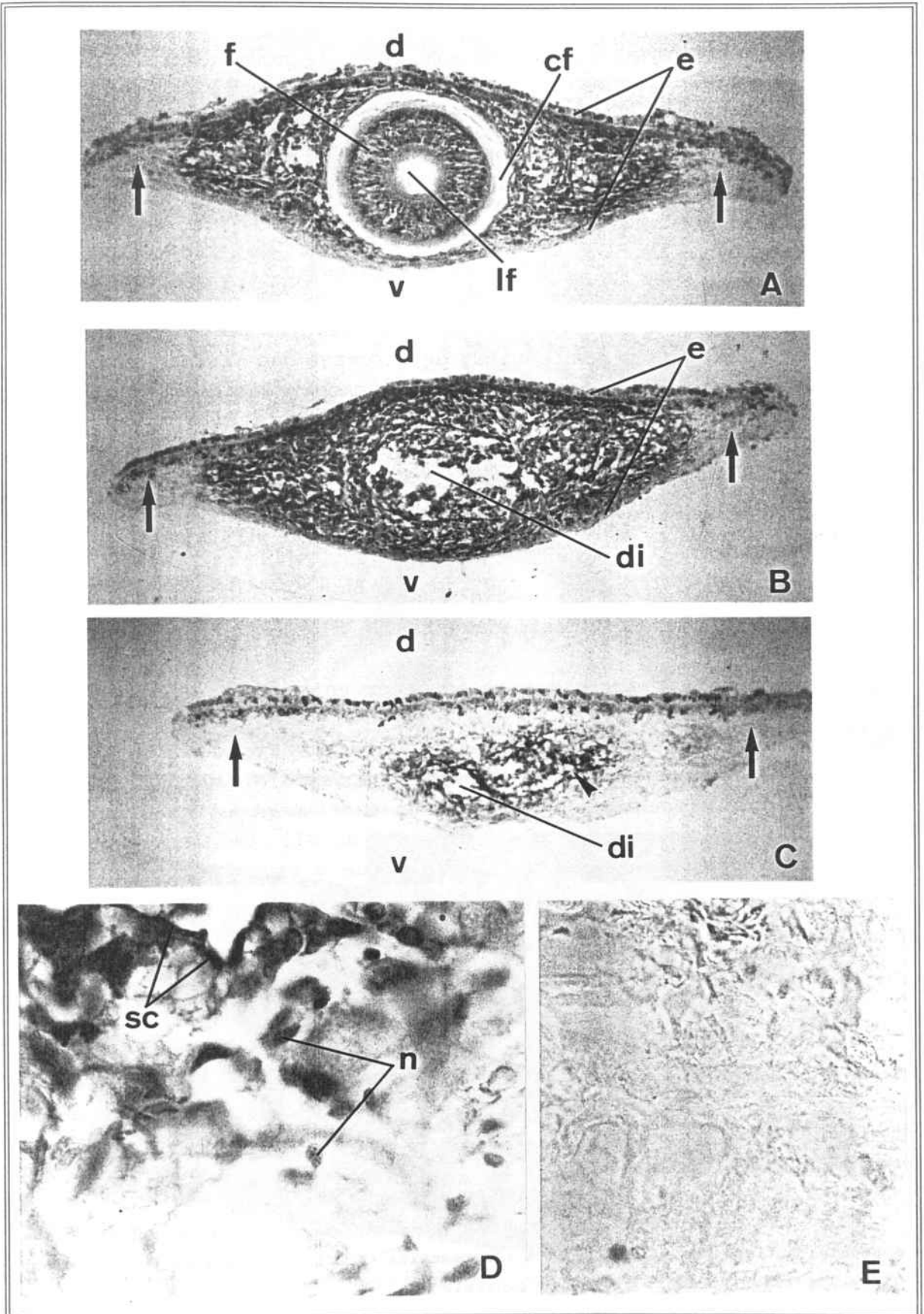
preferent subepidèrmica en el parènquima corporal, i central en la faringe (entre l'epiteli extern i el del lumen). En els límits de la regió central, on el marcatge és encara més suau, s'observa immunoreacció en nuclis (fig. 47). Si s'augmenta la dilució de l'anticòs per disminuir la intensitat del marcatge, s'observa immunoreacció en tots (o gairebé tots) els nuclis de la regió central.

B) Immunotinció de seccions transversals

La immunotinció de seccions seriades transversals (fig. 49) corrobora totes les observacions fetes amb seccions seriades sagitals. Totes o gairebé totes les cèl.lules de la regió central presenten l'antigen excepte en les vores laterals. Els límits de marcatge entre les vores laterals no immunoreactives (un 15%-25% de l'amplada total) i la zona central immunoreactiva (un 75%-85% de l'amplada total) són rectilinis. També s'observen les diferències d'intensitat de marcatge entre els diferents tipus cèl.lulars de la regió (sent més immunoreactives algunes cèl.lules amb morfologia de secretores) i el marcatge en nuclis (fig. 49) (sense que es detectin mai nuclis immunoreactius fora la regió central).

Els límits anterior i posterior de la regió central, malgrat ser rectilinis en cada secció sagital concreta (fig. 47), no ho són a nivell del volum de la planària. Aquests límits formen un casquet que s'extén lleugerament en direcció anterior en el límit entre la regió central i l'anterior, i en direcció posterior en el límit entre la regió central i la posterior (tal i com està esquematitzat a la figura 48), donant un volum que segueix la forma de l'organisme amb els límits esmentats.

Fig. 49: Immunotinció amb el Mab TCEN-49 d'organismes adults intactes. Seccions transversals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Secció a nivell de la faringe (200x). B) Secció a nivell de la prefaringe (200x). C) Secció a nivell del límit anterior de la regió central. D) Ampliació de la zona immunoreactiva (1000x). E) Ampliació de la regió anterior (no immunoreactiva) (1000x). *d*, dorsal; *v*, ventral; *f*, faringe; *lf*, lumen faringi; *cf*, cavitat de la faringe; *e*, epidermis (no immunoreactiva); *di*, diverticle intestinal (branca anterior); *sc*, cèl.lula secretora cianòfila; *n*, nucli; *sageta*, vores laterals de la regió central no immunoreactives; *punta de sageta*, límit anterior de la regió central.



C) Immunotinció de seccions d'altres races i espècies de planària

S'han fet immunotincions amb TCEN-49 en talls sagitals de totes les espècies de planària esmentades a l'apartat 6.1 per veure si el determinant antigènic reconegut per aquest MAb és comú a totes elles.

De totes elles sols *Dugesia(S)polychroa*, del mateix gènere que *Dugesia(G)tigrina* però del subgènere Schmidtea en lloc de Girardia, ha donat immunoreacció positiva envers aquest MAb. El patró de marcatge que s'obté en aquesta espècie és similar al descrit per *D.tigrina*, amb algunes cèl.lules amb més intensitat de marcatge que altres (sempre amb morfologia de cèl.lules secretores) i amb immunoreacció als nuclis. La immunoreactivitat es troba també restringida a la regió central de l'organisme, sent també TCEN-49Ag(+) (fig. 50).

Hi ha algunes diferències en el marcatge entre aquestes dues espècies:

- la grandària de la regió central és menor en *Dugesia(S)polychroa* (un 25% menor aproximadament)
- la intensitat del marcatge és menor en aquesta espècie.

Així mateix, també s'ha detectat la presència de TCEN-49Ag en organismes de la raça sexuada de l'espècie *Dugesia(G)tigrina*. El patró de marcatge que presenta aquesta raça és exactament el mateix que el descrit per la raça asexuada, tant a nivell de les cèl.lules immunoreactives com a nivell de la regió que s'estableix i les seves dimensions.

Fig. 50: Immunotinció de *Dugesia(S)polichroa* amb el MAb TCEN-49. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Regió central immunoreactiva (200x). B) Detall de la zona immunoreactiva (400x). a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; f, faringe; cf, cavitat de la faringe; sc, cèl.lula secretora cianòfila; n, nucli.

Fig. 51: Immunotinció amb el MAb TCEN-49. Organisme processat "in toto". Mètode de detecció: Anticòs secundari lligat a fluoresceïna (FITC). a, anterior; p, posterior; u, ulls; lf, lumen faringi; rc, regió central.

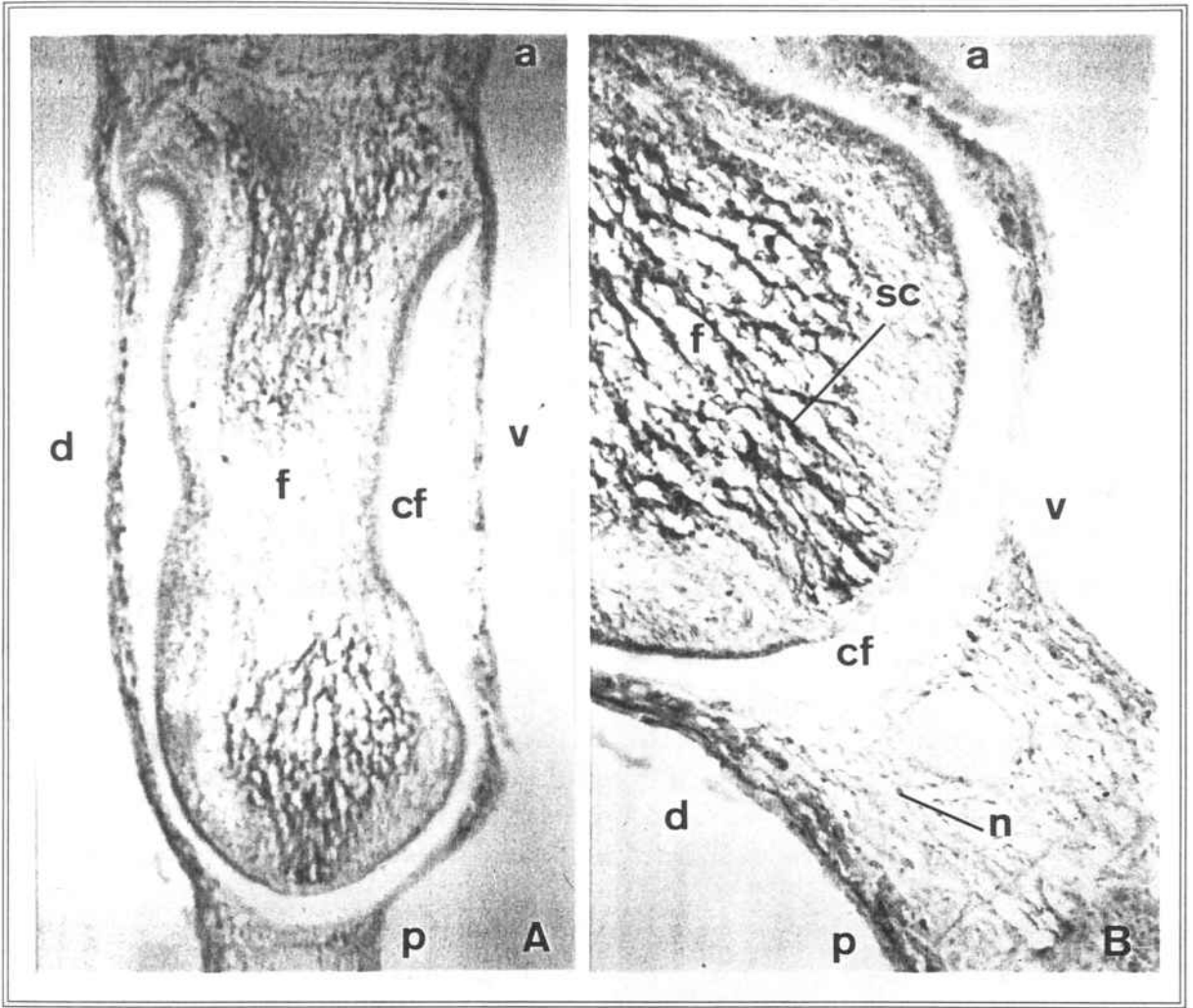


Fig. 50

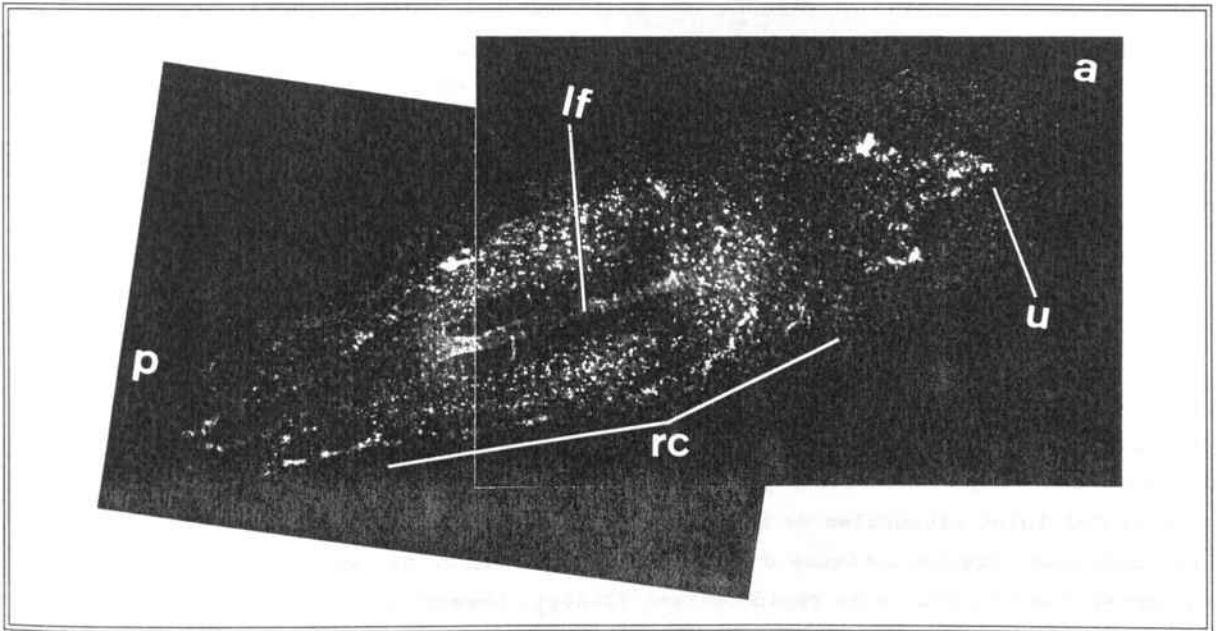


Fig. 51

21.2.2 - Planàries processades "in toto"

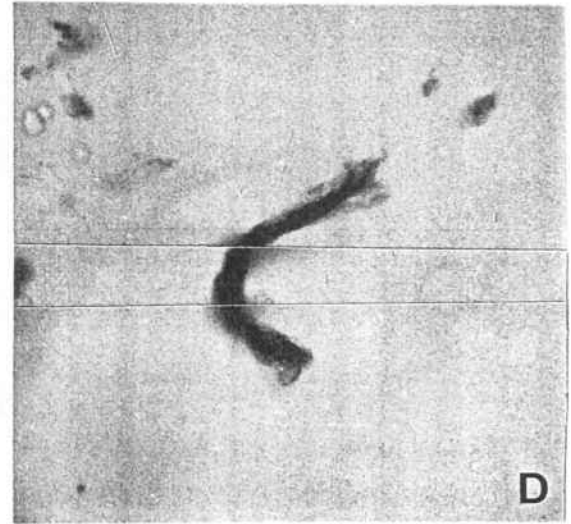
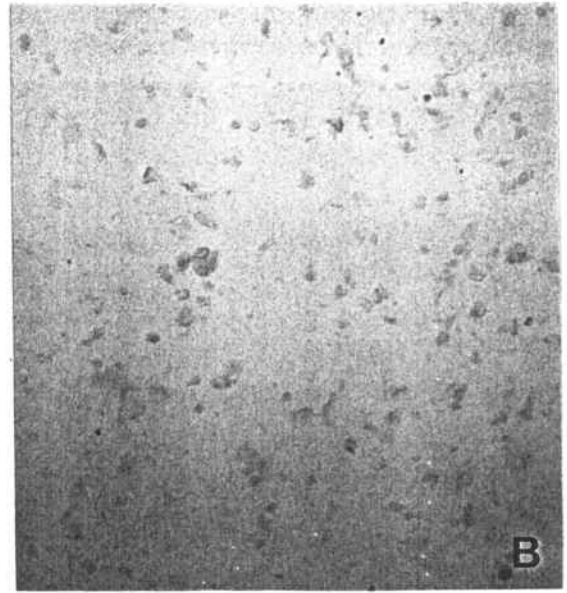
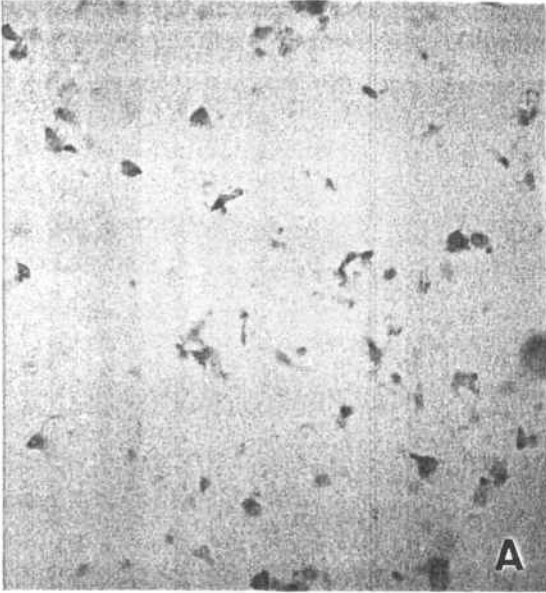
S'han realitzat immunodeteccions en planàries processades "in toto" per comprovar la forma general que pren la regió central. Aquestes immunotincions s'han fet segons els procediments descrits i referenciats en l'apartat 12.4. Mostren de forma globalitzadora les dimensions generals que té la zona d'expressió de TCEN-49Ag (fig. 51) sent igual a les descrites a l'apartat 21.2.1 mitjançant la reconstrucció de seccions seriades sagitals i transversals.

21.2.3 - Macerats cel.lulars

La immunotinció sobre cèl.lules macerades feta segons els procediments de l'apartat 13.2, visualitzada amb anticossos lligats a or i amplificant la senyal amb precipitats de plata, confirma les observacions fetes sobre seccions i aporta noves dades sobre els tipus cel.lulars que presenten l'antigen.

Quan es maceren regions centrals de planària i s'immunotenyeixen amb TCEN-49 s'observa que gairebé totes les cèl.lules presenten immunoreacció front aquest MAb (fig. 52). L'únic tipus cel.lular que no presenta marcatge són les cèl.lules del teixit epidèrmic. En la resta de tipus cel.lulars que són presents en aquesta regió s'observa immunoreacció positiva, excepte en aquelles cèl.lules que provenen de les vores laterals de la regió central (que són TCEN-49Ag(-)). Quan es maceren regions anteriors i posteriors de planària i s'immunotenyeixen amb TCEN-49 no s'observa marcatge en cap cèl.lula.

Fig. 52: Immunotinció de cèl.lules macerades amb el MAb TCEN-49. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a or coloidal amb amplificació de senyal amb nitrat de plata. A) Immunoreacció en macerats cel.lulars de regió central (200x). B) Macerats cel.lulars de regió anterior i posterior (no immunoreactius). Control negatiu (200x). C) i D) Cèl.lules cianòfiles de regió central fortament tenyides (1000x). Observi's les prolongacions característiques d'aquest tipus cel.lular. E) Immunoreacció en cèl.lules no secretores cianòfiles de regió central (1000x). Observi's el marcatge a nivell de la membrana nuclear (sageta). F) Ampliació de B (control negatiu) (1000x). n, nucli; sageta, marcatge nuclear.



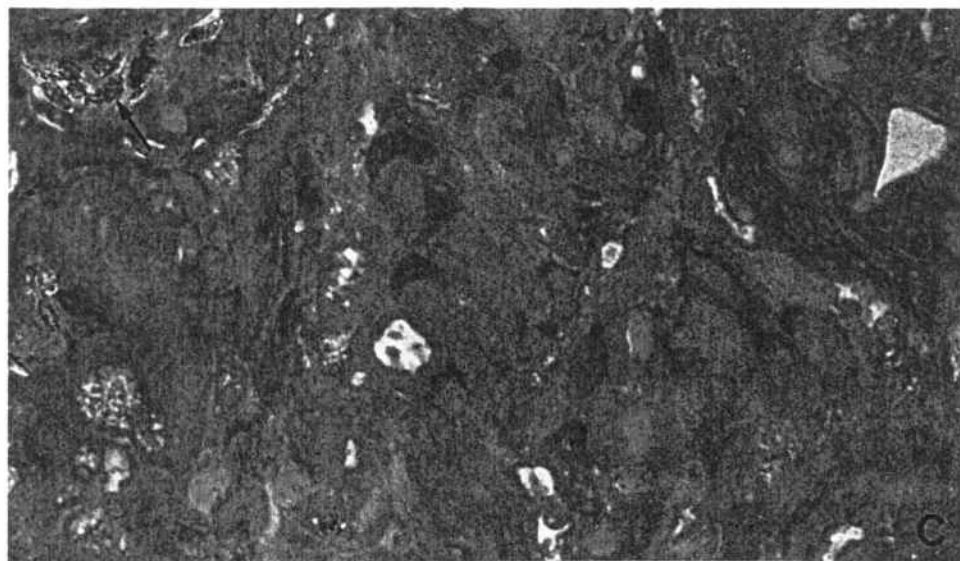
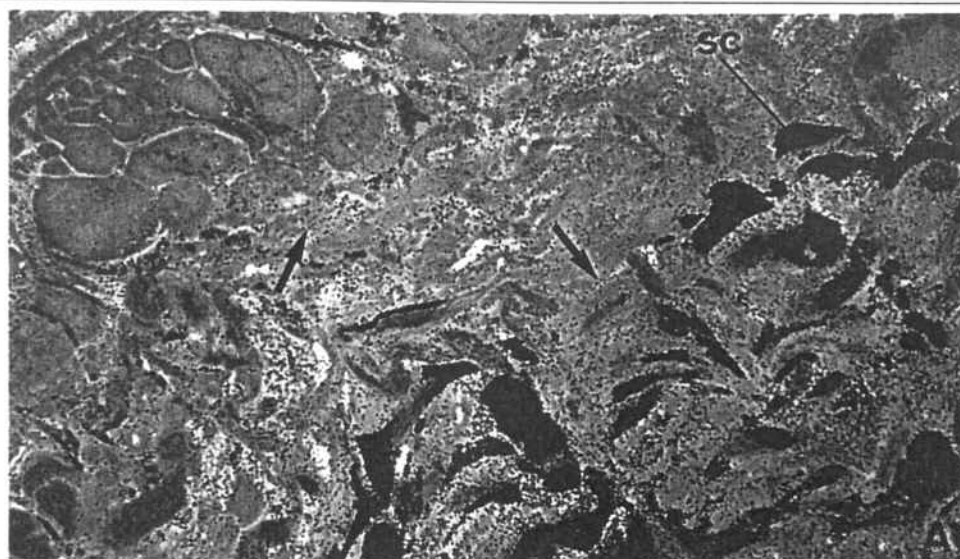
Amb aquesta metodologia s'observen diferències en el grau de marcatge entre els diferents tipus cèl.lulars. Les cèl.lules secretores cianòfiles, identificades segons la morfologia (Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987), presenten un nivell de marcatge clarament superior a la resta de cèl.lules (fig. 52). Es corresponen amb les cèl.lules amb més tinció observades en seccions d'organismes inclosos en parafina. Aquesta immunoreacció s'observa a nivell del citoplasma, sent difícil discriminar si és present també en nucli degut a la gran intensitat de marcatge.

La resta de cèl.lules presenta un nivell d'immunoreacció baix en citoplasma. No presenta cap marcatge en l'interior del nucli, però s'observa una alta immunoreactivitat a nivell de la perifèria del mateix, aparentment a nivell de la membrana nuclear o en zones properes a la mateixa (fig. 52). No és possible discriminar en immunotincions de cèl.lules macerades si aquest marcatge es dona a la part interna o externa de la membrana nuclear.

21.2.4 - Seccions semifines

La immunodetecció de TCEN-49Ag sobre seccions semifines s'ha fet seguint els protocols descrits a l'apartat 12.3.2, fixant trossos d'organismes provinents de la zona del parènquima corresponent a la regió central i de la faringe. Com a control negatiu s'han utilitzat trossos d'organismes provinents del parènquima de la cua, dins la regió posterior (TCEN-49Ag(-)).

Fig. 53: Immunotinció de seccions semifines amb el MAb TCEN-49. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a or coloidal; amplificació de senyal amb nitrat de plata. 1000x. A) Faringe. B) Parènquima corporal (regió central). C) Parènquima corporal no immunoreactiu (regió anterior). Observi's el marcatge inespecífic en els rabdits (sageta prima). *sc*, cèl.lula secretora cianòfila; *sageta gruixuda*, tendència del marcatge a seguir els límits cel.lulars i nuclears; *sageta prima*, marcatge inespecífic en rabdits.



En els controls negatius s'observa marcatge inespecífic (és a dir, immunoreacció no deguda a la presència de TCEN-49Ag) únicament en els rabs de les cèl.lules rabs (fig. 53), tant si les seccions s'han incubat amb anticòs 1^{ari} i 2^{ari} o solament amb 2^{ari}. Prescindint d'aquest marcatge, s'observa forta immunoreacció en cèl.lules amb abundants prolongacions, tant en el parènquima com en la faringe (fig. 53). Aquesta morfologia és característica de cèl.lules secretores cianòfiles, i es correspon amb les cèl.lules fortament tenyides observades en macerats cel.lulars i en seccions d'organismes inclosos en parafina.

La resta de teixit presenta un marcatge difós amb una tendència a seguir els límits cel.lulars i les membranes nuclears (fig. 53) en lloc d'estar distribuït uniformement. S'observen alguns punts de marcatge a l'interior de les cèl.lules, però amb una freqüència molt més baixa als ja descrits.

21.2.5 - Seccions ultrafines (microscòpia electrònica)

Les immunotincions amb el MAb TCEN-49 sobre seccions ultrafines s'han fet seguint el procediment descrit a l'apartat 12.3.3. Emprant aquests mètodes, la qualitat de la histologia obtinguda presenta deficiències degudes a la utilització de fixadors suaus (tipus Karnovsky, 3% paraformaldehid i 0.025% glutaraldehid en PBS) que dificulten la interpretació de les imatges obtingudes. Quan s'han utilitzat fixadors més forts per millorar la qualitat histològica, la immunoreactivitat s'ha vist fortament disminuïda dificultant encara més la interpretació dels resultats obtinguts. A concentracions superiors al 0.04% de glutaraldehid no es produïx immunoreacció.

S'han processat simultàniament reixetes amb seccions ultrafines provinents de:

- parènquima de regió central
- parènquima de regió posterior (cua)
- faringe.

Mostres d'aquests tres tipus de material s'han processat normalment, amb incubació d'anticòs 1^{ari} (TCEN-49) i 2^{ari} (GAM-gold), mentre que en altres s'ha substituït la incubació amb anticòs 1^{ari} per

medi de cultiu sense anticossos. D'aquesta manera s'han obtingut dos tipus de controls negatius:

- el provinent de seccions de regió central i posterior no incubades amb anticòs 1^{ari}, que ens informen de la possible inespecificitat deguda a l'anticòs 2^{ari}
- el provinent de seccions posteriors (TCEN-49Ag(-)) processades normalment (anticòs 1^{ari} i anticòs 2^{ari}), que ens informa de la inespecificitat deguda a tots dos anticossos.

En tots dos controls negatius el resultat ha estat pràcticament el mateix, sense que s'observi cap inespecificitat localitzada en cap estructura específica. Tant sols s'observen algunes (molt poques) partícules d'or aïllades. La diferència entre tots dos controls negatius, mesurada segons el nombre de partícules d'or visualitzades, és inferior al 10%, indicant que la major part de la inespecificitat ve donada per l'anticòs secundari o per partícules d'or no lligades. Quan es parli en aquest apartat dels controls negatius es farà referència a tots dos tipus de negatius alhora, considerats en el seu conjunt.

El marcatge amb TCEN-49 en seccions de parènquima de regió central presenta les mateixes característiques de marcatge que en les de faringe, i per tant són considerades també en el seu conjunt.

S'ha detectat la presència de marcatge en diversos tipus cel.lulars i en diverses estructures subcel.lulars:

- grànuls de secreció de cèl.lules secretores cianòfiles
- nuclis de diversos tipus cel.lulars
- matriu extracel.lular
- vesícules citoplasmàtiques no electrodenses en diversos tipus cel.lulars
- citoplasma
- fibres musculars

A la figura 54 hi ha una relació del marcatge detectat en cadascuna d'aquestes estructures, contabilitzat pel nombre de partícules d'or per cèl.lula o estructura (en el cas de matriu extracel.lular ve referit al nombre de partícules d'or per la matriu extracel.lular visible que envolta una cèl.lula), comparat amb el contatge de partícules d'or detectades en les mateixes estructures en els controls negatius (tamany de la mostra, 20 seccions de cada tipus).

Resultats

ESTRUCTURA	PARENQUIMA I FARINGE REGIO CENTRAL (partícules d'or/cèl.lula o estructura)	CONTROL NEGATIU (partícules d'or/cèl.lula o estructura)
Grànuls de cèl.lules cianòfiles	50/1	1/20
Nuclis (de diversos tipus cel.lulars)	1/2	1/20
Matriu extracel.lular	1/10	0
Vesícules citoplasmàtiques no electrodenses (en diversos tipus cel.lulars)	1/10	1/100
Citoplasma	1/5	1/10
Fibres musculars	1/5	1/10

Fig. 54: Relació del marcatge detectat per microscòpia electrònica en les diferents estructures. Tamany de la mostra, 20 seccions de cada tipus.

A part dels tipus i estructures cel.lulars esmentats a la figura 54, no s'ha detectat cap més presència d'or en cap de les seccions.

Segons la relació del marcatge de la figura 54, es pot considerar que el marcatge en citoplasma i en fibres musculars és inespecífic, ja que no hi ha diferències significatives entre els resultats del control negatiu i el de les seccions de marcatge específic (en ambdós casos la relació passa de 1/5 en seccions de marcatge específic a 1/10 en controls negatius).

En tots els altres casos la relació és molt més alta en les seccions de marcatge específic. De totes maneres, en algunes de les estructures que presenten immunoreacció positiva específica, el nombre de partícules d'or detectades és molt baix degut al gruix de les seccions (50 nm, és a dir 1/20 de les semifines i 1/200 de les provinents d'inclusions en parafina), i a que a més a més no s'han utilitzat agents permeabilitzadors quedant solament accessibles a l'anticòs els antigens que es troben a la superfície de la secció.

Sota aquesta perspectiva es pot considerar com a marcatge específic l'observat en l'interior dels grànuls de secreció de

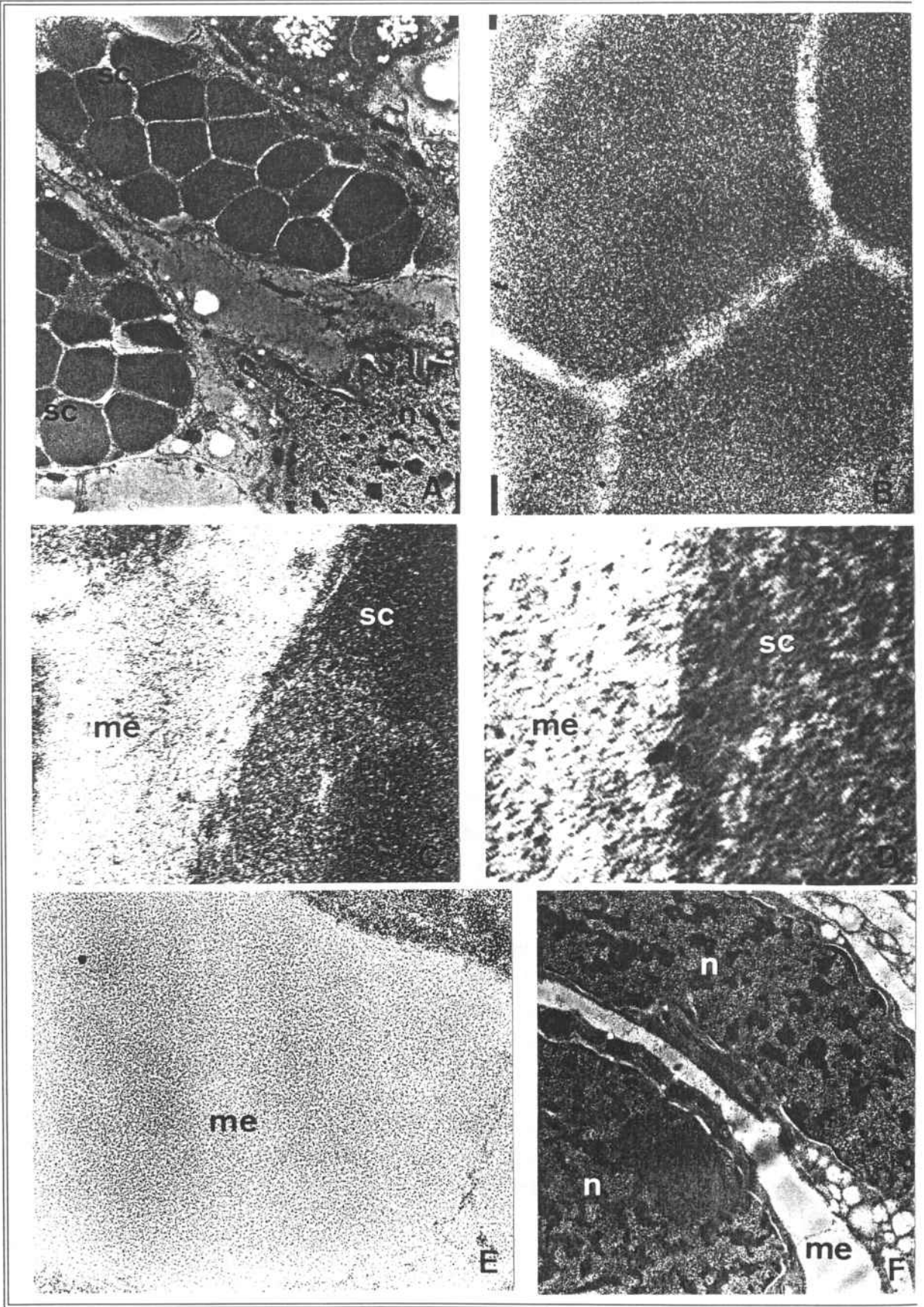
cèl.lules cianòfiles (fig. 55 A i B), corresponent a les cèl.lules amb més immunoreactivitat observades en seccions d'organismes inclosos en parafina, en seccions semifines i en macerats cel.lulars. Segons l'estructura dels seus grànuls de secreció, aquestes cèl.lules pertanyen a les cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2 descrites per Baguñà (1973). Aquests grànuls, que són les estructures que presenten una major immunoreactivitat, semblen ser de secreció interna tant per la seva situació dins el parènquima i la farínge com pel fet que s'observa algun grànul alliberant el seu contingut a l'espai intercel.lular (fig. 55 C i D).

En canvi, les cèl.lules cianòfiles amb altres tipus de grànuls de secreció (Baguñà, 1973) no presenten immunoreacció front aquest MAb en les seves vesícules, però sí que en presenten en el seu nucli.

També és específic el marcatge observat en els nuclis de totes les cèl.lules que componen el parènquima i la farínge. Aquest marcatge es veu sempre associat a la cara interna de la membrana nuclear o molt aprop d'ella, i coincidint sempre en regions riques en heterocromatina (fig. 55 K i L). No es pot afirmar que els nuclis de totes les cèl.lules presentin marcatge ja que en les seccions observades hi ha alguns que no en presenten. Els que no en presenten poden ser explicats com pertanyents a cèl.lules TCEN-49Ag(-) o bé com una conseqüència del baix nombre de partícules d'or detectades en aquesta estructura. Per tant tampoc es pot afirmar que hagi nuclis que no presentin marcatge.

Les partícules d'or observades en la matriu extracel.lular (fig. 55 E i F) també correspondrien a immunoreacció específica. El nombre de partícules d'or observades en aquest cas és més alt prop de les cèl.lules cianòfiles que ho presenten en els seus grànuls de secreció, i va disminuint en allunyar-se. També s'han visualitzat partícules d'or associades a la cara externa de la membrana plasmàtica (fig. 55 G i H) o molt aprop d'ella. Degut a la dificultat en discernir si estan molt aprop o associades a ella s'han comptabilitzat dins la matriu extracel.lular.

Finalment, les partícules d'or observades a l'interior de vesícules citoplasmàtiques no electrodenses també correspondrien a immunoreacció específica (fig. 55 I i J). Aquestes vesícules no electrodenses han estat observades en el citoplasma de la majoria de tipus cel.lulars que componen el parènquima en la regió central i la farínge. En elles, les partícules d'or acostumen a estar situades prop de la membrana que envolta les vesícules.



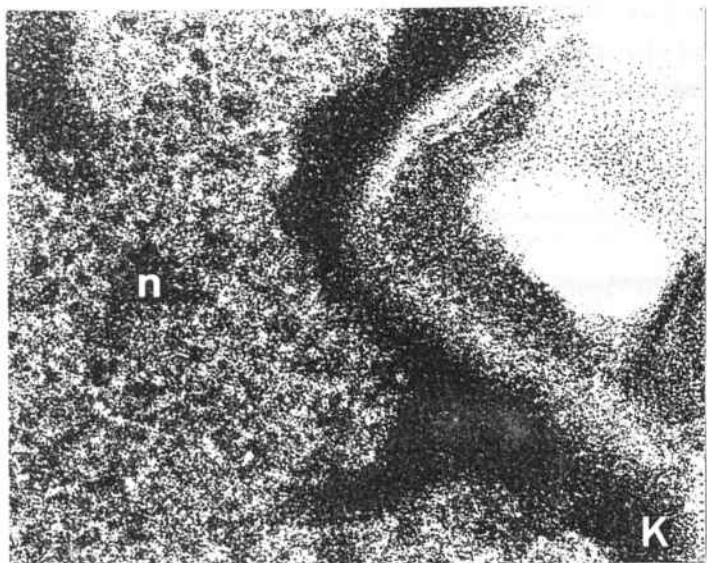
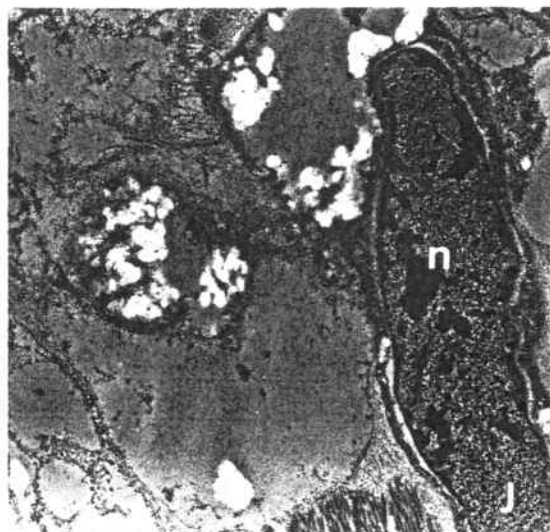
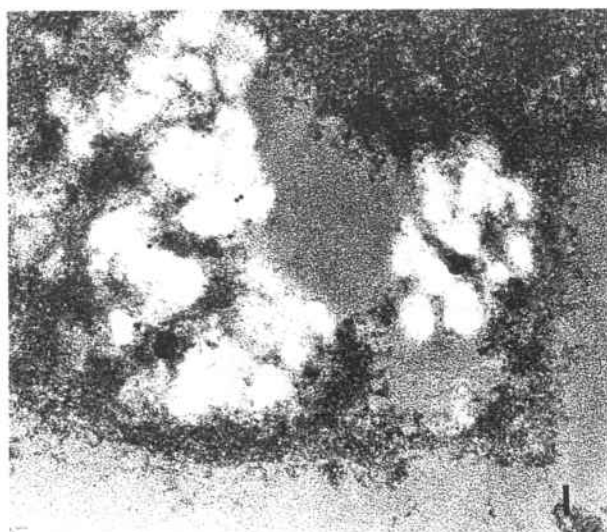
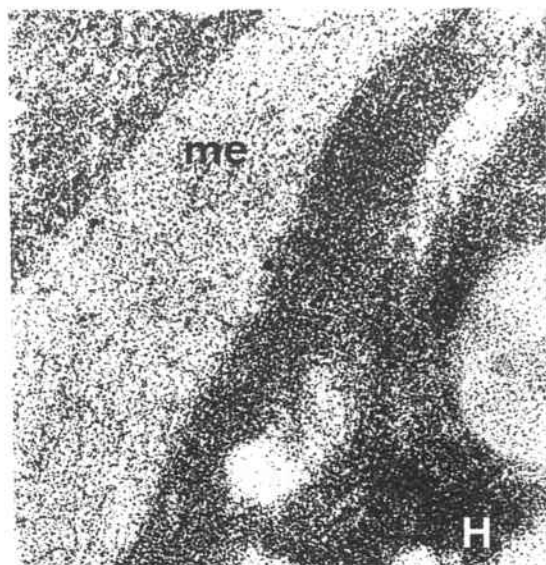
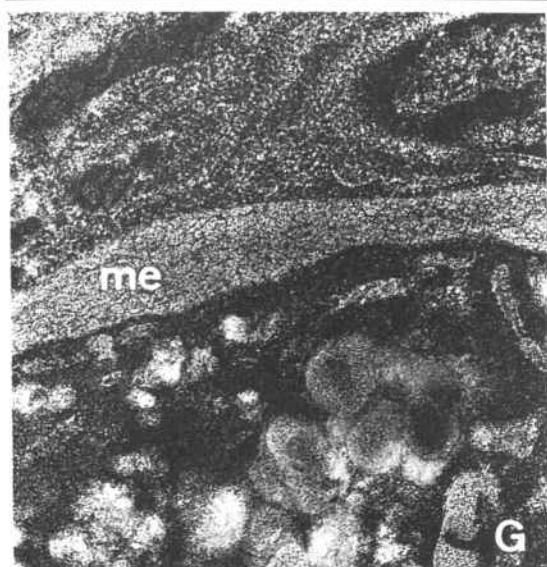


Fig. 55 (pàg. anterior): Immunotinció en seccions ultrafines de regió central amb el MAb TCEN-49. Mètode de detecció: anticòs secundari lligat a or coloidal. A) Marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2 (11000x). B) Immunoreacció en vesícules de secreció de cèl.lules secretores cianòfiles. Detall de A (71000x). C) Marcatge en possibles productes de secreció interna de cèl.lules secretores cianòfiles (71000x). D) Detall de la zona de secreció de C (210000x). E) Immunoreacció en matriu extracel.lular (71000x). F) Camp general del marcatge de E (11000x). G) Marcatge en matriu extracel.lular associat a la membrana cel.lular (2300x). H) Detall de la zona de la immunoreacció de G (71000x). I) Immunoreacció en vesícules poc electrodenses (34000x). J) Camp general del marcatge de I (11000x). K) Immunoreacció en la cara interna de la membrana nuclear, associada a heterocromatina (91000x). L) Camp general del marcatge de K (11000x). *n*, nucli; *sc*, cèl.lula secretora cianòfila; *me*, matriu extracel.lular.

El significat d'aquest patró de marcatge està comentat i discutit àmpliament a la Discussió, i se'l relaciona amb les dades obtingudes en organismes regenerants i amb les característiques de TCEN-49Ag.

21.3 - Canvis en la proporcionalitat de les regions molecularment definides durant el creixement i decreixement

Per calcular el volum total que representa la regió central, definida com la regió TCEN-49Ag(+), respecte el volum total de planària i quines modificacions experimenta durant el creixement/decreixement de l'organisme (veure apartat 2.1 per a una revisió d'aquests fenòmens), s'han fet seccions sagitals seriades d'organismes de diversa llargada (5, 7, 9 i 11mm).

Aquestes seccions seriades s'immunotenyeixen amb el MAb TCEN-49. Amb un integrador d'àrees (Kontron) es mesura l'àrea de cadascuna de les tres regions molecularment definides i l'àrea total de la secció. Aquestes mesures es fan a una de cada quatre seccions per tenir una mostra representativa de tot l'organisme. La integració de totes les àrees d'un organisme respecte l'àrea total ens dóna el volum de cada regió respecte el total (en %).

En comparar el volum relatiu de cadascuna d'aquestes tres regions en els organismes de diferent llargada s'observa que aquesta varia en funció de la longitud de l'organisme:

- en organismes de 5 mm de llargada, la regió central representa el 50% del volum corporal, l'anterior el 30% i la posterior el 20%.

- en organismes de 11 mm de llargada la regió central representa el 40% del volum total, l'anterior el 19% i la posterior el 41%.

- en organismes de llargada intermitja els volums relatius de cadascuna de les tres regions es troben entre aquests valors extrems (fig. 56).

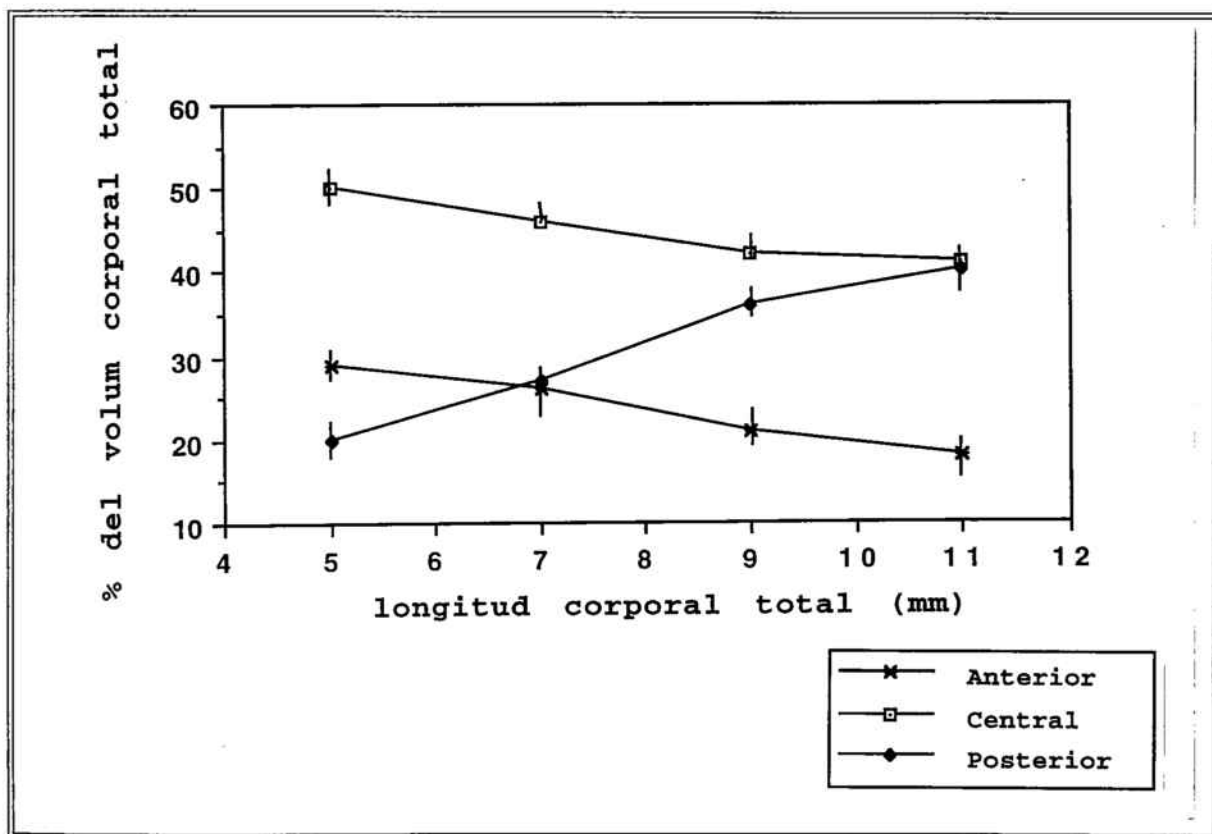


Fig. 56: Variacions del volum de les regions molecularment definides en funció de la longitud corporal. Mostra: 10 organismes/longitud corporal.

Si considerem aquests volums relatius durant el procés de creixement i decreixement, es veu que la regió central és la que presenta una variació menor, observant-se una lleugera disminució del volum relatiu d'aquesta regió durant el creixement (alometria negativa). La regió anterior presenta una variació molt semblant a la central i en la mateixa direcció (alometria negativa). En canvi, la

regió posterior presenta una variació més acusada i en sentit invers a les altres regions. Aquesta regió augmenta el seu volum relatiu durant el creixement (alometria positiva), sent duplicat en duplicar-se la longitud total de l'organisme (fig. 56). Per tant, la regió caudal és la que presenta major plasticitat incrementant o disminuint el seu volum quan l'organisme creix i decreix, respectivament (Baguñà, 1973).

Els canvis de proporcionalitat de les regions molecularment definides per TCEN-49Ag podrien ser un mecanisme d'establiment del patró (posicionament correcte de les estructures) o bé podrien ser una resposta de l'antigen front un mecanisme d'establiment del patró (reestabliment per ajustar-lo a les noves dimensions de l'organisme, veure Discussió).

21.4 - Aparició i modificació del marcatge de TCEN-49 durant la regeneració

El MAb TCEN-49 pot ser un bon marcador per detectar el reestabliment del patró d'estructures durant la regeneració principalment per:

- el caràcter regional de la immunoreactivitat de TCEN-49 i, per tant, de TCEN-49Ag (antigen) en organismes adults
- els canvis de posicionament observats durant el creixement i decreixement que podrien indicar una resposta de l'antigen front un mecanisme d'establiment del patró o ser, ell mateix, una font de posicionament (veure apartat 21.3 i Discussió).

Tanmateix podria indicar les possibles relacions existents entre TCEN-49Ag i els mecanismes d'establiment del patró.

Amb aquest propòsit es decidí obtenir organismes regenerants en diversos estadis de regeneració i en diversos nivells de tall, alguns dins la regió central i d'altres dins les regions anterior i posterior (veure apartat 6.3, fig. 7). En regenerants de nivell A, A', A" i E la regió central s'ha de regenerar totalment (fig. 57); en els de nivell C i F solament s'ha de regenerar una petita part (fig. 57); i en els de nivell C i D s'ha de regenerar la major part d'ella (fig. 57).

Alguns dels nivells de regeneració escollits (A, C, D i E) estan descrits per Saló (1984), i els altres (A', A" i F) han estat utilitzats per primer cop.

La temperatura de regeneració (22 °C en tots ells, i 17°C en alguns casos concrets) i el procediment d'obtenció i manteniment dels regenerants estan descrits a l'apartat 6.3.

1) Nivell E

Els regenerants cefàlics obtinguts a nivell E (cues que regeneren cap) estant constituïts solament per la regió posterior (fig. 57) i no conserven cap porció de la regió central en el moment del tall. Per tant, han de reconstruir totalment la regió central i l'anterior.

L'aparició de TCEN-49Ag en organismes a nivell E ha estat ja utilitzat per Espinosa (1993) en la seva Tesina de Llicenciatura sobre la regeneració de faringe. Aquest autor el va emprar junt amb altres MAbs per immunodetectar la localització de la nova faringe abans que aquesta es formés. Malgrat la descripció de l'evolució del marcatge amb TCEN-49 en aquest nivell de regeneració consti a l'esmentada referència, es tornarà a descriure extensament donada la importància que té la visió conjunta de la regeneració a diferents nivells i donat que s'han obtingut algunes noves dades al respecte.

Entre les 24 i 36 hores de regeneració apareix la primera immunoreacció de TCEN-49. Aquesta es dona en l'interior d'una única cèl.lula, situada al postblastema i en el lloc on es formarà (a les 24-48 hores) o s'està formant ja l'acúmul de cèl.lules indiferenciades que donarà lloc al primordi de la faringe (fig. 57 i 58). Aquesta primera cèl.lula immunoreactiva presenta una morfologia semblant a les cèl.lules secretores cianòfiles, però sense les prolongacions característiques d'aquest tipus cel.lular madur.

El nombre de cèl.lules immunoreactives va augmentant entre el 2^{on} i 5^e dia de regeneració, sense que es detecti cap marcatge fora d'elles. Dins aquest període i a mesura que va passant el temps, les cèl.lules immunoreactives comencen a emetre prolongacions. Durant la morfogènesi de la faringe (4^{art} dia), queden situades en el seu interior. Cap el 5^e dia de regeneració s'immunodetecten algunes d'aquestes cèl.lules fora de la nova faringe emetent prolongacions en sentit anteroposterior (i per tant proximodistal) (fig. 57 i 58).

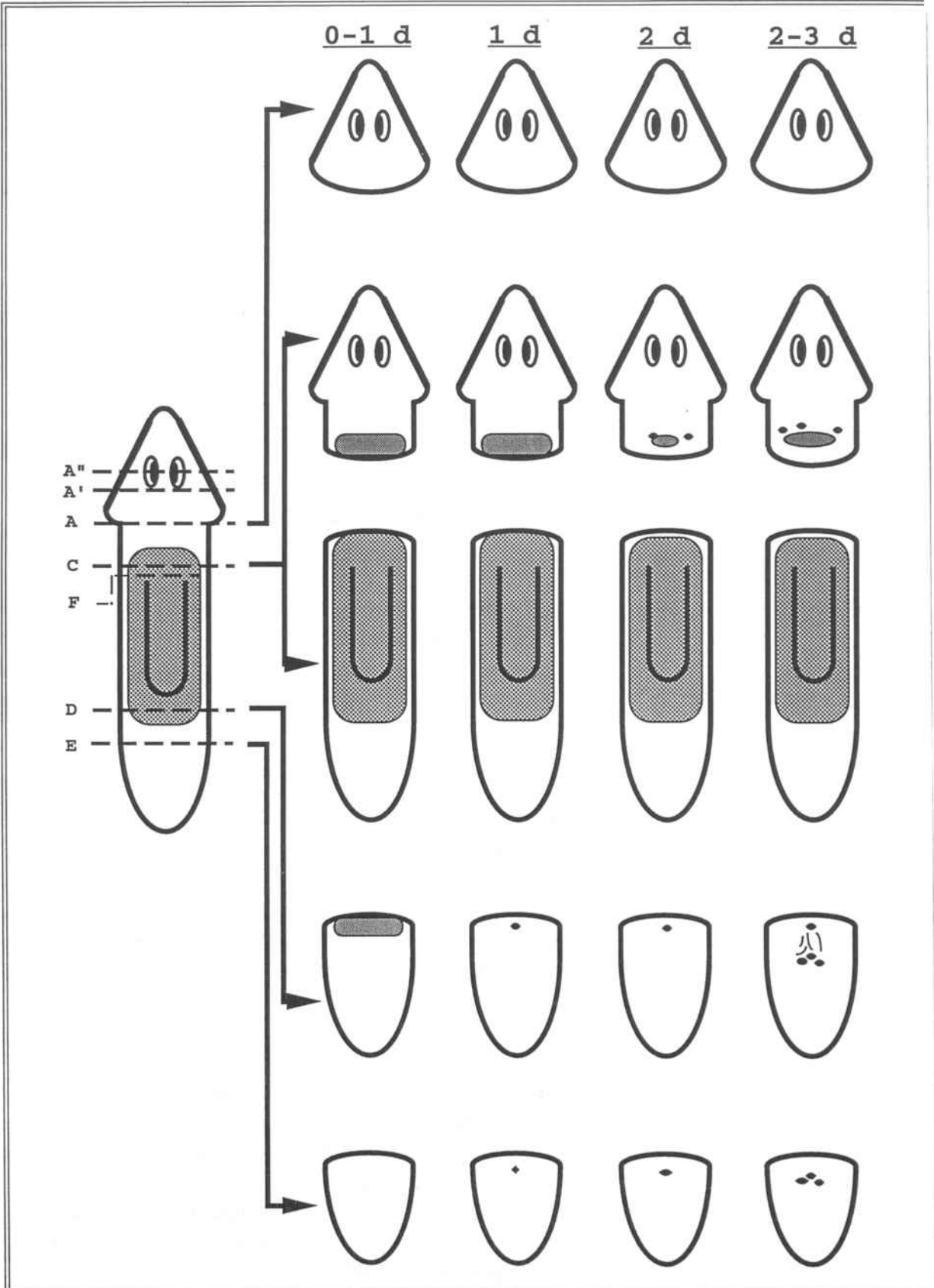
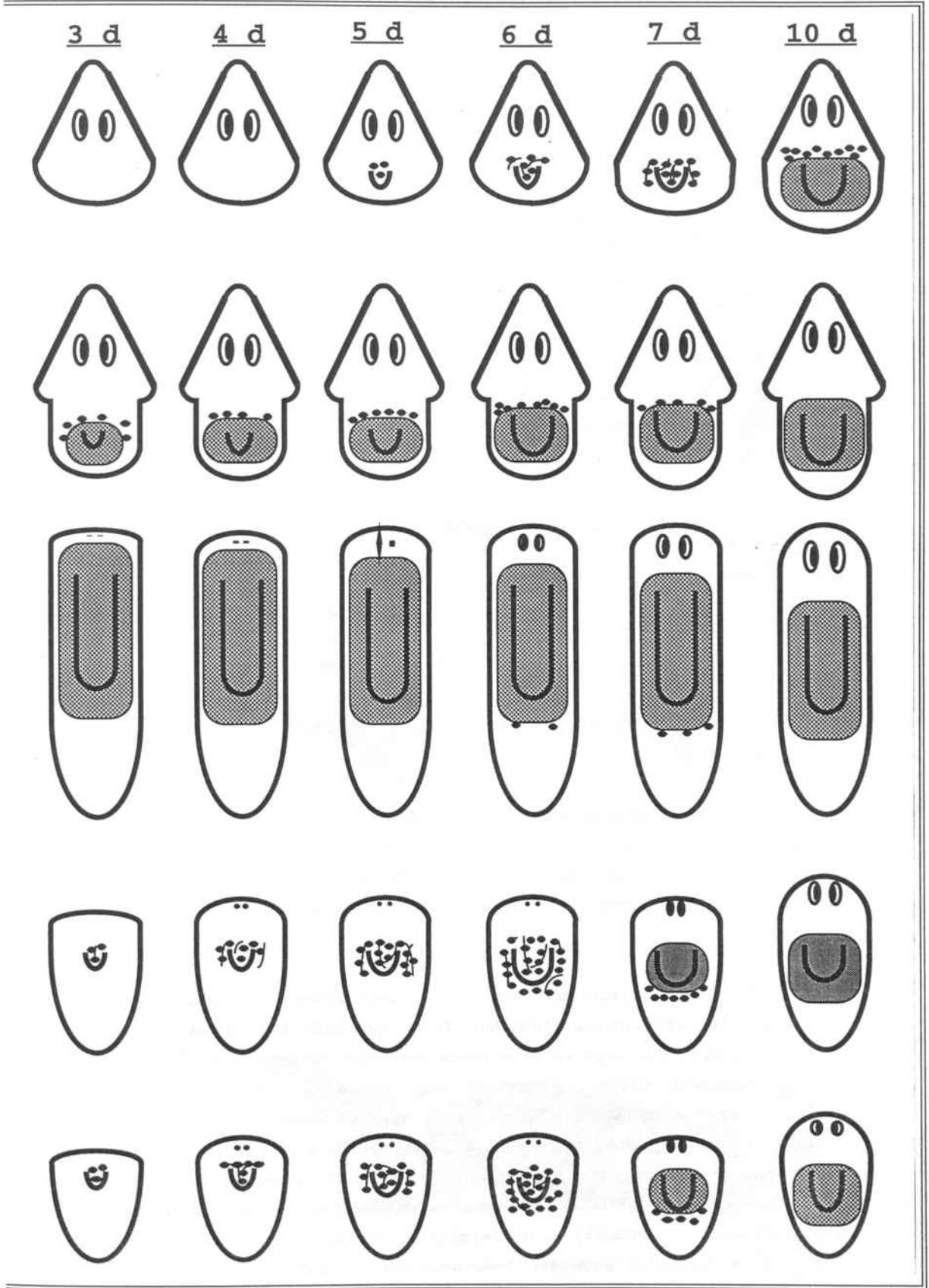


Fig. 57: Esquema de l'aparició i evolució del marcatge de TCEN-49 durant la
 ●●● Immunoreacció en tots els teixits de la regió central



regeneració de planària a 22°C i a diversos nivells de tall.

• Immunoreacció en cèl.lules secretores cianòfiles

Resultats

Cap els dies 6^è i 7^è de regeneració es comença a detectar per primer cop marcatge fora d'aquestes cèl.lules. A partir d'aquest moment, i en un interval de 24 a 48 hores, es va detectant progressivament immunoreacció en totes les cèl.lules que constituïran la nova regió central. Es comença per les situades a l'interior de la faringe i les que es troben en una posició més anterior dins el parènquima corporal, avançant progressivament cap el seu extrem posterior (fig. 57 i 58). Aquest avanç anteroposterior es veu iniciat sempre per prolongacions de cèl.lules cianòfiles i per noves cèl.lules cianòfiles TCEN-49Ag(+). La resta de teixits comencen a presentar immunoreacció amb posterioritat a l'expansió d'aquestes cèl.lules immunoreactives.

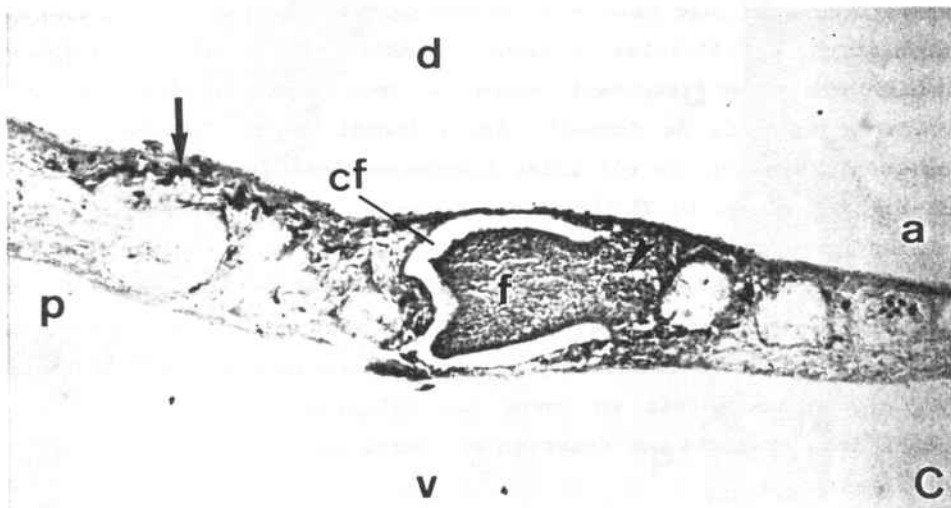
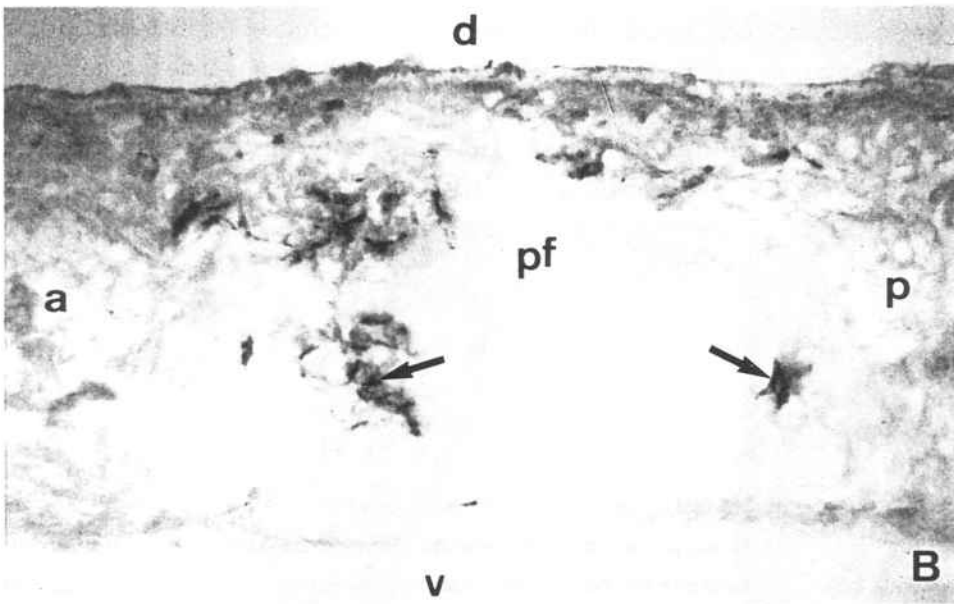
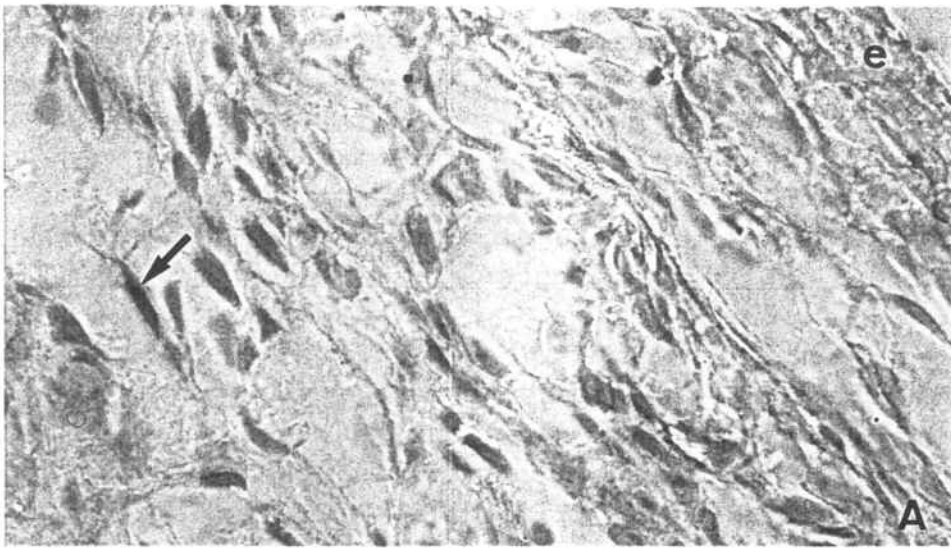
A partir del 10^è dia de regeneració s'assoleix novament una regió central complerta amb la proporcionalitat que li correspon segons la nova llargada de l'organisme (fig. 57).

2) Nivell D

Els regenerants cefàlics obtinguts a nivell D conserven tota la regió caudal i una petita part de la regió central (el 15%-20% de regió central més proper a la posterior) en el moment del tall. Per tant, han de reconstruir una nova regió anterior i ampliar la central, fent una nova faringe.

En aquests regenerants es manté sempre un cert nivell d'immunoreacció, però els canvis que experimenta l'àrea, la localització i el tipus de marcatge són molt extensos i ràpids (la seqüència d'aquests canvis està esquematitzada a la fig. 57).

Fig. 58: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell E. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 1^{er} dia de regeneració (1000x). Marcatge en la primera cèl.lula immunoreactiva (sageta). B) 3^{er}-4^{er} dia de regeneració (200x). Increment del nombre de cèl.lules immunoreactives (cèl.lules secretores cianòfiles, sagetes) a la zona de formació del primordi faringi. C) 7^è dia de regeneració (100x). Detecció de marcatge fora de les cèl.lules secretores cianòfiles (punta de sageta). Increment de l'extensió de la regió central iniciada per expansió del marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles (sageta). a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; e, epidermis; f, faringe; pf, primordi de la faringe; cf, cavitat de la faringe; sagetes, immunoreacció en cèl.lules discretes; punta de sageta, immunoreacció en totes les cèl.lules de la regió central. S'ha sobre-revelat la immunoreacció per detectar els marcatges febles.



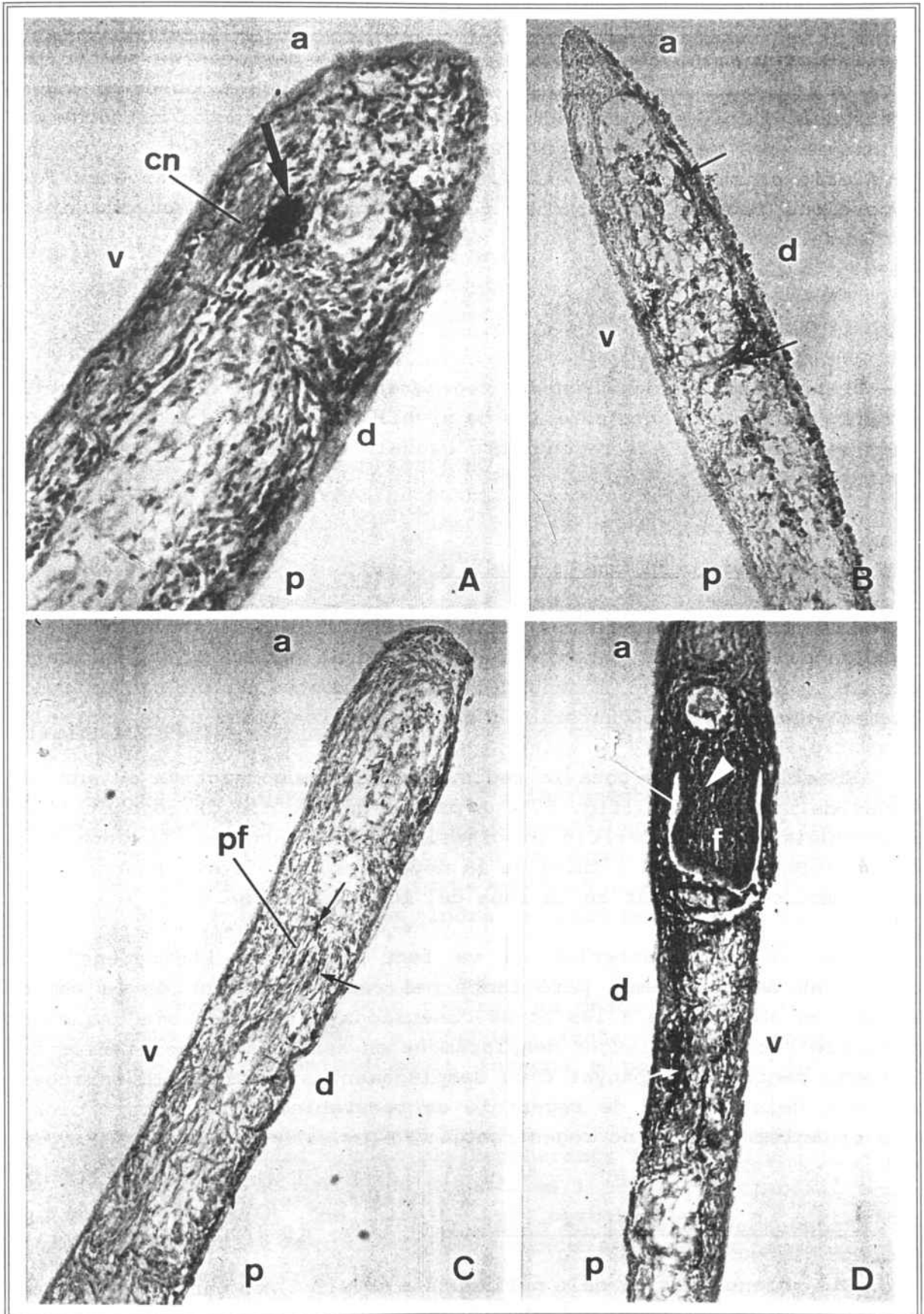
Resultats

Durant les 12 primeres hores de regeneració no s'observa cap canvi en el marcatge llevat d'una petita disminució en l'àrea ocupada per TCEN-49Ag. En el període de 12 hores comprès entre les 12 hores i el 1^{er} dia de regeneració desapareix totalment el marcatge excepte en un petit grup de 5-12 cèl.lules amb morfologia de secretores cianòfiles. Aquestes estan situades ventralment just sobre el sistema nerviós i en una posició molt anterior (fig. 59).

Aquest marcatge es manté fins el 2^{on} dia de regeneració. En aquest moment, i en el lapse de temps que separa el 2^{on} i el 2.5 dies de regeneració (12 hores), el grup de cèl.lules TCEN-49Ag(+) emet prolongacions en sentit anteroposterior desde la seva posició fins a la zona on s'està formant el primordi de la faringe (fig. 59).

En les 12 hores següents (del dia 2.5 al 3^{er} de regeneració) desapareix el marcatge en les cèl.lules situades en posició ventral-anterior, així com de les seves prolongacions i comença a ser immunoreactiu un grup de 8-12 cèl.lules situades en el primordi de la faringe (fig. 59). Aquest grup de cèl.lules és equivalent al visualitzat durant la regeneració de nivell E al 3^{er} dia del procés.

Fig. 59: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell D. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 1^{er} dia de regeneració (200x). Disminució de l'àrea immunoreactiva. Cèl.lules immunoreactives localitzades ventralment, just sobre els cordons nerviosos. B) 2^{on}-3^{er} dia de regeneració (100x). Prolongacions de cèl.lules secretores cianòfiles i noves cèl.lules secretores cianòfiles immunoreactives (sagetes) entre la zona immunoreactiva del 1^{er} dia de regeneració (A) i la zona de formació del primordi de la faringe. C) 3^{er} dia de regeneració (100x). Detecció de cèl.lules immunoreactives (sageta) solament a la zona del primordi de la faringe. D) 7^a dia de regeneració (100x). Detecció de marcatge fora de les cèl.lules secretores cianòfiles (punta de sageta). Increment de l'extensió de la regió central iniciada per expansió del marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles (sageta). a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; ef, faringe; pf, primordi de la faringe; cf, cavitat de la faringe; sagetes, immunoreacció en cèl.lules discretes; punta de sageta, immunoreacció en totes les cèl.lules de la regió central. S'ha sobre-revelat la immunoreacció per detectar els marcatges febles.



A partir d'aquest moment es desenvolupa com els regenerants de nivell E prèviament descrits i en els mateixos períodes de temps. El marcatge fora de les cèl.lules cianòfiles comença a observar-se a partir del 6^e dia de regeneració (fig. 59). L'expansió del marcatge es veu iniciat pel marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles, seguit de l'aparició d'immunoreacció en la resta de teixits fins recuperar les proporcions regionals correctes per la nova mida de l'organisme (a partir del 10^e dia).

3) Nivell C

S'han obtingut dos tipus de regenerants a partir d'aquest nivell de tall: els regenerants cefàlics de nivell C (que han de regenerar les zones cefàliques) i els regenerants caudals (que han de regenerar les zones caudals).

Regenerants cefàlics de nivell C

Els regenerants cefàlics obtinguts a nivell C conserven tota la regió caudal i la major part de la regió central (un 80%-85%), incloent tota la faringe, en el moment del tall. Aquests han de reconstruir solament una nova regió anterior i readaptar els límits de la central.

En ells es manté tota la regió central immunoreactiva durant el procés de regeneració (fig. 57). A partir del 2^{on} dia de regeneració, es produeix una desaparició progressiva de marcatge en la zona del postblastema que forma l'inici de la nova regió anterior juntament amb la no immunoreactivitat en la zona del blastema (fig. 60).

Aquesta regió anterior es va fent més gran, bàsicament pel creixement del blastema, però també pel reposicionament de la regió central en adaptar-se a les noves dimensions de l'organisme. Aquesta adaptació suposa un lleuger desplaçament en sentit anteroposterior de la regió central acompanyat d'un desplaçament similar de la faringe. A partir dels 10 dies de regeneració es reestableixen les proporcions d'un organisme adult (no regenerant).

Regenerants caudals de nivell C

Els regenerants caudals obtinguts a nivell C, en canvi, conserven en el moment del tall tota la regió anterior però solament una petita

part de la regió central, el 15%-20% més proper a l'anterior (fig. 57). En aquests regenerants s'ha de reconstruir una nova regió posterior i ampliar la central reconstruint totalment una nova faringe.

En aquests regenerants es manté sempre un cert nivell d'immunoreacció. L'evolució del marcatge en el decurs de la regeneració és diferent que en el cas de regenerants cefàlics de nivell C. Així mateix, també és diferent que en regenerants cefàlics obtinguts a nivell D. Aquests serien, en certa manera, els seus "simètrics" ja que tots dos conserven una regió TCEN-49Ag(-) intacte i el mateix % de regió central. La seqüència dels canvis d'immunoreacció està esquematitzada a la fig. 57.

Durant les primeres 24-36 hores de regeneració no s'observen canvis apreciables en la zona immunoreactiva per TCEN-49. Entre les 36 hores i el 2^{on} dia de regeneració es produeix una brusca reducció de l'àrea immunoreactiva, tant en sentit a/p, com d/v i lateral, quedant restringida la immunoreacció a una àrea que mesura aproximadament 1/4 de la que havia a les 24 hores de regeneració. Aquesta àrea immunoreactiva està situada just sobre la zona on es comença a produir l'acumulació de neoblasts que formaran el primordi de la faringe (fig. 60), i dins els límits de l'antiga regió central. El marcatge que s'observa es produeix tant en cèl.lules secretores cianòfiles, que veuen incrementat el seu nivell normal de reacció, com en la resta de teixits de l'àrea immunoreactiva.

Entre els dies 2.5 i 3^{er} incrementa fortament l'àrea immunoreactiva, expandint-se la regió central en sentit lateral i d/v fins ocupar els mateixos teixits que un organisme no regenerant. En aquest període es produeix una forta expansió en sentit p/a fins ocupar una zona del 60%-70% de la que tindrà la regió un cop totalment refeta (fig. 60).

Dins aquesta nova regió central es desenvolupa la faringe al mateix temps que la regió s'expandeix lentament fins assolir les proporcions d'un organisme adult intacte a partir del 10^e dia de regeneració.

Aquesta expansió, com en els regenerants E i D, es veu iniciada per prolongacions de cèl.lules cianòfiles i cèl.lules cianòfiles que expressen TCEN-49Ag "de novo". Amb posterioritat a l'aparició d'aquestes cèl.lules immunoreactives comencen a presentar immunoreacció la resta de teixits.

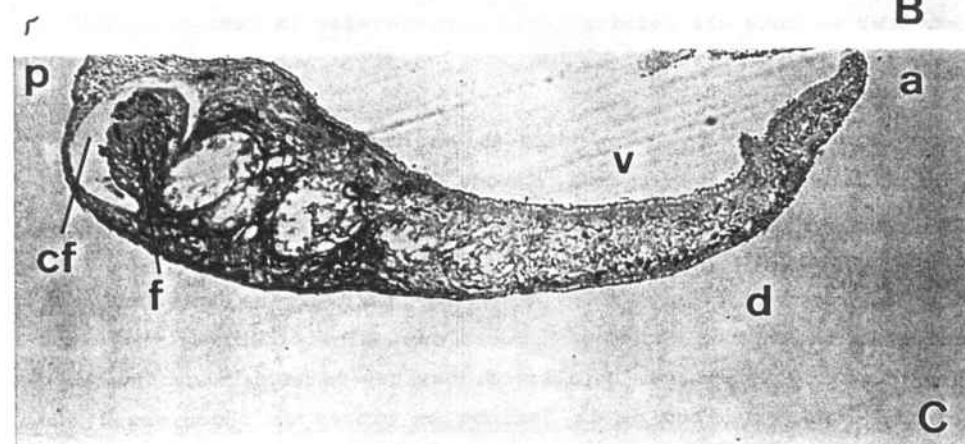
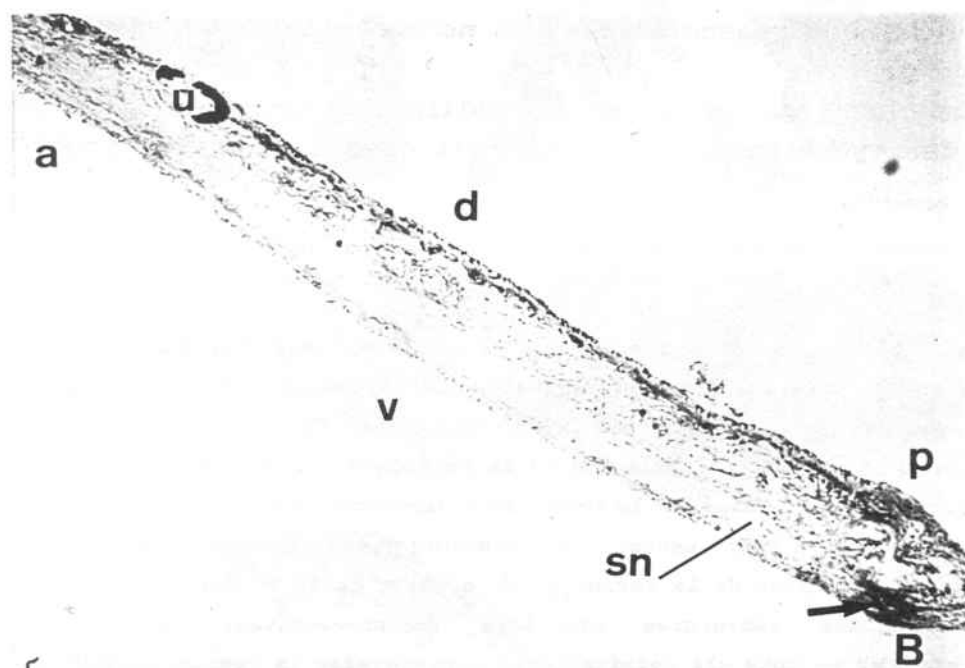
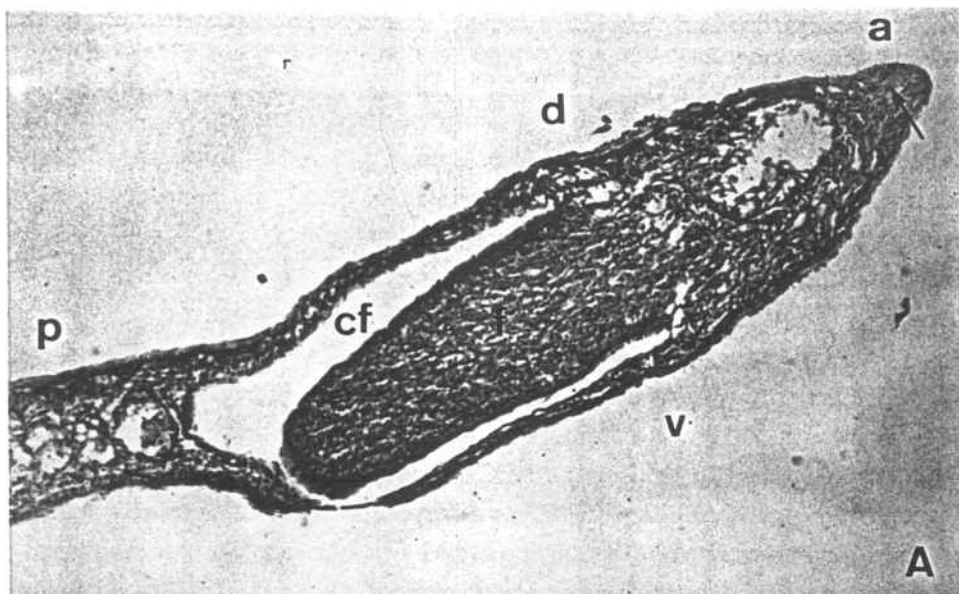
4) Nivell A, A' i A''

Els regenerants caudals obtinguts a nivell A estan constituïts solament per regió anterior i no conserven cap porció de la regió central en el moment del tall (fig. 57). Per tant, com en els regenerants cefàlics de nivell E, hauran de reconstruir totalment la regió central i, en aquest cas, la posterior.

La seqüència d'aparició, evolució i ampliació de les cèl.lules i l'àrea immunoreactiva és igual que en els regenerants cefàlics de nivell E, però presentant un retard considerable respecte aquests (fig. 57). Així, en lloc de ser detectades les primeres cèl.lules immunoreactives a les 24-36 hores de regeneració, aquestes no s'observen fins el 4^{art}-5^è dia (fig. 61), coincidint amb la formació del primordi de la faringe. Aquestes primeres cèl.lules immunoreactives presenten una clara morfologia de secretores cianòfiles, sense que s'hagi pogut detectar l'estadi previ visualitzat a nivell E (cèl.lules immunoreactives amb una morfologia poc clara de cianòfiles per manca de prolongacions).

El nombre de cèl.lules immunoreactives va augmentant fins al 8^è-9^è dia de regeneració, expandint-se, des de la seva localització inicial, primer en sentit anteroposterior (molt lleugerament i entre els dies 5^è i 7^è), i després en sentit posteroanterior (en un recorregut molt més llarg i entre els dies 6^è i 9^è). Durant aquest procés no es detecta immunoreacció en cap altre tipus cel.lular.

Fig. 60: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell C. A) regenerant cefàlic. B) i C), regenerants caudals. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 2^{on}-3^{er} dia de regeneració (100x). Detecció de zona no immunoreactiva (inici de la regió anterior, sageta prima) a l'extrem més anterior del regenerant. B) 2^{on} dia de regeneració (100x). Disminució de l'àrea ocupada per la regió central (sageta gruixuda). Detecció de la immunoreacció prop del sistema nerviós. C) 3^{er} dia de regeneració (100x). Expansió proximodistal (posteroanterior) de la regió central. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; u, ull; f, faringe; cf, cavitat de la faringe; sn, sistema nerviós; sageta prima, àrea no immunoreactiva; sageta gruixuda, àrea immunoreactiva. S'ha sobre-revelat la immunoreacció per detectar els marcatges febles.



No és fins el dia 9^è o 10^è de regeneració que es comença a detectar marcatge fora d'aquestes cèl.lules. A partir d'aquest moment, es va detectant progressivament immunoreacció en totes les cèl.lules que constituïran la nova regió central. L'expansió d'aquesta immunoreacció sobre tots els teixits es produeix en sentit posteroanterior, i va precedit sempre de l'expansió prèvia del marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles, com en els nivells E, D, i C (fig. 61).

Els regenerants caudals obtinguts a nivell A' conserven menys regió anterior que els de nivell A, i igualment gens de central. L'aparició, evolució i ampliació de les cèl.lules i àrea immunoreactiva és igual que en el nivell A, però presentant un retard sobre aquest de 3-4 dies. No es detecten les primeres cèl.lules immunoreactives (sempre sobre el primordi de la faringe i coincidint amb l'aparició d'aquest) fins el 8^è dia de regeneració (dada no mostrada).

Finalment, els regenerants caudals obtinguts a nivell A" no són capaços de regenerar i lisen entre els dies 1^{er} i 4^{art} de regeneració.

Fig. 61: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell A. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de marcatge: ABC lligat a HRP. A) 5^è dia de regeneració (100x). Detecció de les primeres cèl.lules immunoreactives (sageta) coincidint amb l'extrusió del primordi de la faringe en la cavitat faríngia. B) 10^è dia de regeneració (200x). Inici de la detecció d'immunoreacció (punta de sageta) en tots els teixits de la nova regió central. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; f, faringe; pf, primordi de la faringe; cf, cavitat de la faringe; lf, lumen faringi; sagetes, cèl.lules secretores cianòfiles immunoreactives; puntes de sageta, immunoreactivitat en tots els teixits. S'ha sobre-revelat la immunoreacció per detectar els marcatges febles.

Fig. 62: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell F. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 1^{er} dia de regeneració (40x). B) 3^{er} dia de regeneració (200x). Conversió de l'antiga cavitat faríngia en diverticle intestinal i formació d'un nou primordi de la faringe i d'una nova cavitat faríngia en posició posterior a l'antiga cavitat faríngia. La immunoreactivitat no experimenta modificacions significatives. a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; u, ull; cf, cavitat de la faringe; pf, primordi de la faringe; cf/di, antiga cavitat de la faringe en procés de reconversió en diverticle intestinal.

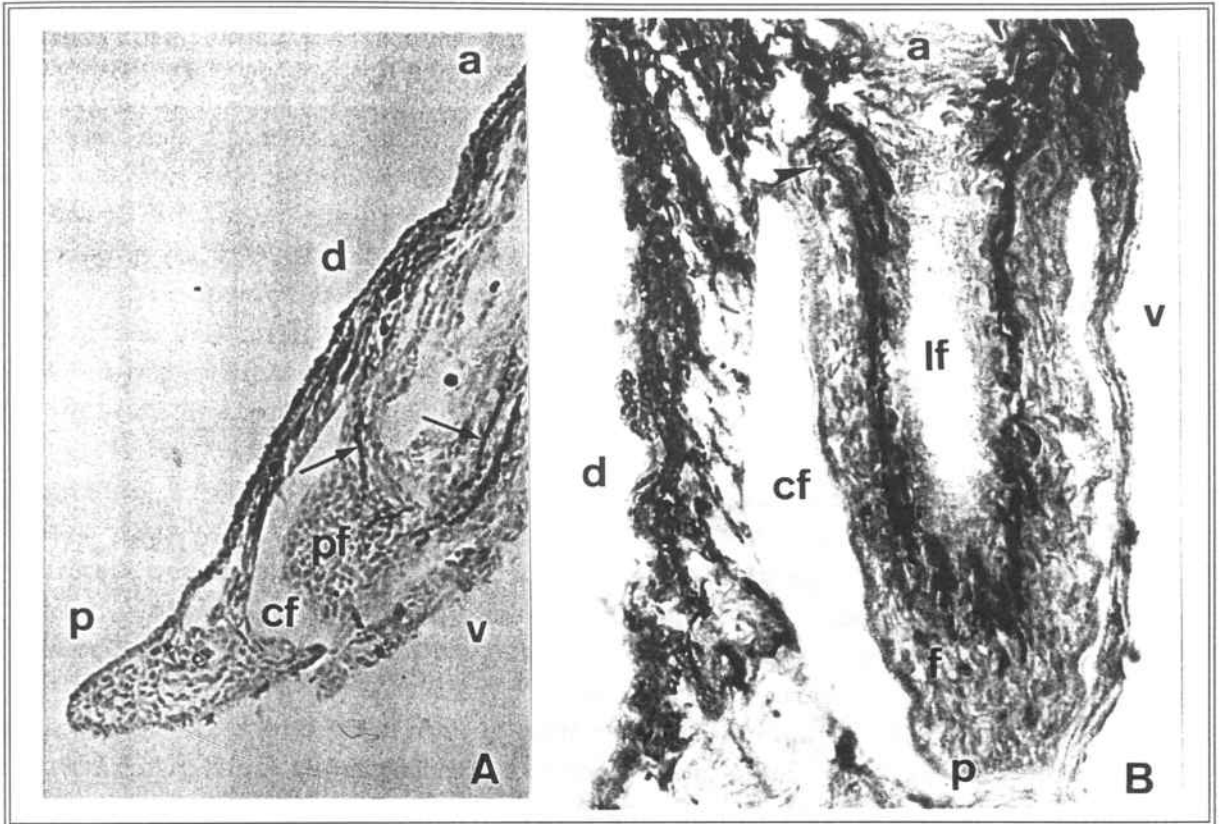


Fig. 61

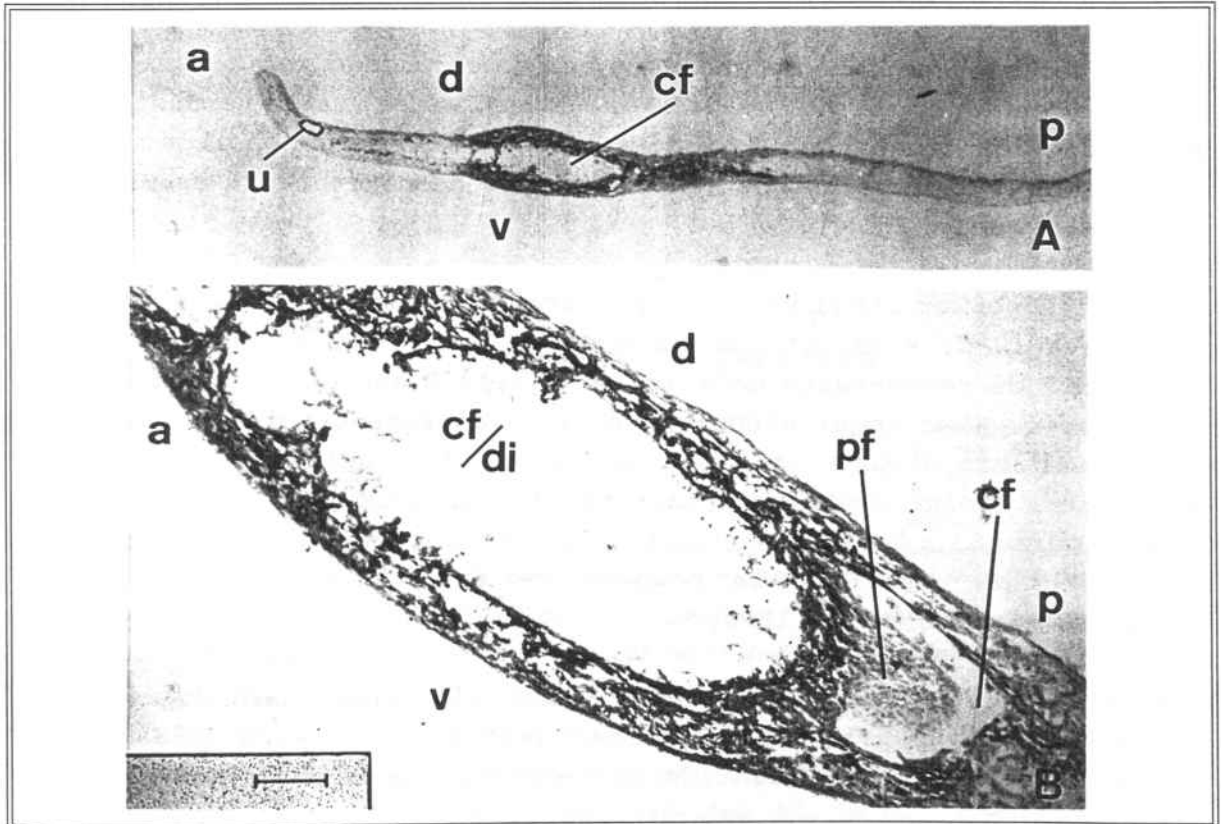


Fig. 62

5) Nivell F

En els regenerants obtinguts a nivell F, s'ha seccionat únicament la faringe i la zona prefaríngia adjacent a la faringe per evitar la presència de cèl.lules amb el cos cel.lular en aquesta zona que emetin prolongacions cap a l'interior de la faringe (Baguñà, 1973). En aquests regenerants, per tant, s'ha respectat totalment la regió anterior i la posterior, i no s'han alterat les dimensions totals ni els límits de la central. S'ha obtingut aquest tipus de regenerants per veure si la faringe induïa o modificava, d'alguna manera, l'expressió de TCEN-49Ag.

Els resultats obtinguts (fig. 62) mostren que la regió central no experimenta cap canvi quantitatiu (dimensions de la zona immunoreactiva) per l'amputació de la faringe. En alguns casos sembla observar-se un lleuger increment de marcatge en les cèl.lules secretores cianòfiles entre les primeres 24-48 hores de regeneració, com un lleuger i transitori canvi qualitatiu (patró de marcatge). A partir del 3^{er} dia de regeneració es forma la nova faringe dins la regió central, obrint-se també una nova cavitat faríngia en substitució de l'antiga que és absorbida per l'organisme.

Aquells estadis de regeneració en que es produeixen canvis ràpids i bruscs en l'expressió de TCEN-49Ag han estat també estudiats en regenerants mantinguts a 17°C a fi i efecte d'observar possibles canvis en el patró d'expressió donat que el procés de regeneració és més lent que a 22°C (Saló, 1984).

Per conèixer l'equivalència temporal entre regenerants mantinguts a 22°C i a 17°C, s'ha fet immunoreaccionar amb TCEN-49 tota una sèrie paral.lela de regenerants cefàlics de nivell E entre els dies 0 i 7 de regeneració. Les equivalències entre la regeneració morfològica (observada mitjançant la morfogènesi de la faringe) i molecular (aparició i evolució d'immunoreactivitat front TCEN-49) es representen a la figura 63. Aquesta equivalència és important ja que en molts treballs s'ha utilitzat la temperatura de 17°C com a temperatura "standard" (p.e., Saló, 1984).

En aquesta gràfica s'observa que el paral.lelisme entre la regeneració "morfològica" i la "molecular" es conserva a 22°C i 17°C, fent que, per exemple, coincideixi sempre l'aparició de les primeres cèl.lules immunoreactives amb l'inici de l'acumulació dels neoblasts que formaran el primordi de la faringe. Es pot dir que la temperatura

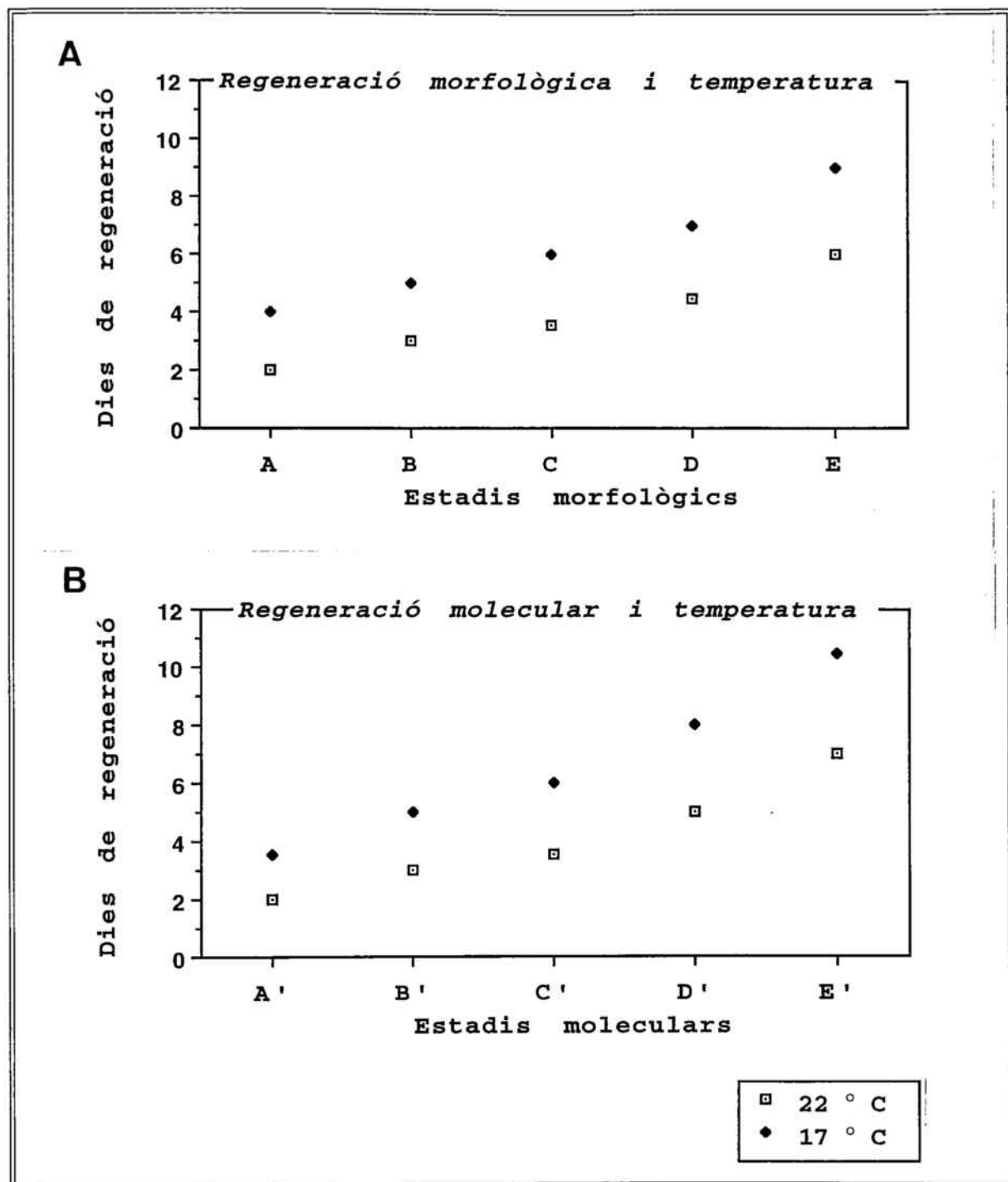


Fig. 63: Influència de la temperatura en el temps de regeneració morfològica i molecular. A) Regeneració morfològica. B) Regeneració molecular. A, aparició de la cavitat de la faringe; B, formació del primordi de la faringe; C, extrusió del primordi de la faringe; D, formació del lumen faringí; E, faringe regenerada; A', primera detecció de cèl.lules immunoreactives; B', marcatge en el primordi de la faringe; C', marcatge en la zona d'implantació de la faringe; D', immunoreacció generalitzada en cèl.lules secretores cianòfiles de la regió central; E', inici d'immunotinció en la resta de tipus cel.lulars de la regió central.

Resultats

afecta al procés global de la regeneració (Saló, 1984) sense afectar de manera diferencial a l'expressió de TCEN-49Ag.

Aquestes equivalències es conserven, com era d'esperar, en els diversos nivells de tall en que s'han obtingut regenerants puntuals mantinguts a 17°C (dada no mostrada). Les immunotincions fetes en aquests regenerants no han aportat dades noves sobre l'aparició i evolució de TCEN-49Ag durant la regeneració.

21.5 - Alteracions del marcatge de TCEN-49 mitjançant agents químics

Pensant que fora interessant provocar modificacions de l'expressió "normal" de TCEN-49Ag en organismes intactes i/o regenerants per les implicacions que això podria tenir sobre els mecanismes de formació i control del patró, s'han assajat diversos agents químics que afecten a la formació i control del patró en diversos organismes. Aquests han estat el 1,2-dioctanoyl-*sn*-glicerol (DG, Sigma), l'àcid araquidònic (AAq, Sigma) i l'àcid retinoic (AR, Sigma), ja que han estat emprats per diversos grups per modificar la formació del patró.

El DG i l'AAq han estat utilitzats en hidra per Müller i col. (1993) on indueixen un increment en els "valors posicionals", afectant al control del patró i provocant un eventual desenvolupament de caps ectòpics.

L'AR, utilitzat inicialment per Niazi i Saxena (1978) i per Kim i Stokum (1986) per la seva capacitat d'alterar el patró anteroposterior, ha estat utilitzat en extremitats de pollet per Wanek i col. (1991), Bryant i Gardiner (1992) i Tamura i col. (1993), on indueix activitat polaritzant en cèl.lules en posicions ectòpiques, provocant duplicacions anteroposteriors i sent, per tant, una substància "clau" per la formació del patró en el desenvolupament de les extremitats.

Per tant, i com a provatura preliminar per tal de comprovar la viabilitat de la tècnica, es va decidir tractar organismes intactes i regenerants de nivell E (veure fig. 57) amb aquests agents químics segons els protocols descrits a l'apartat 6.4. Diàriament s'ha buscat

l'aparició de possibles canvis morfològics i s'han sacrificat alguns organismes de cada tractament per ser immunotenyits amb TCEN-49.

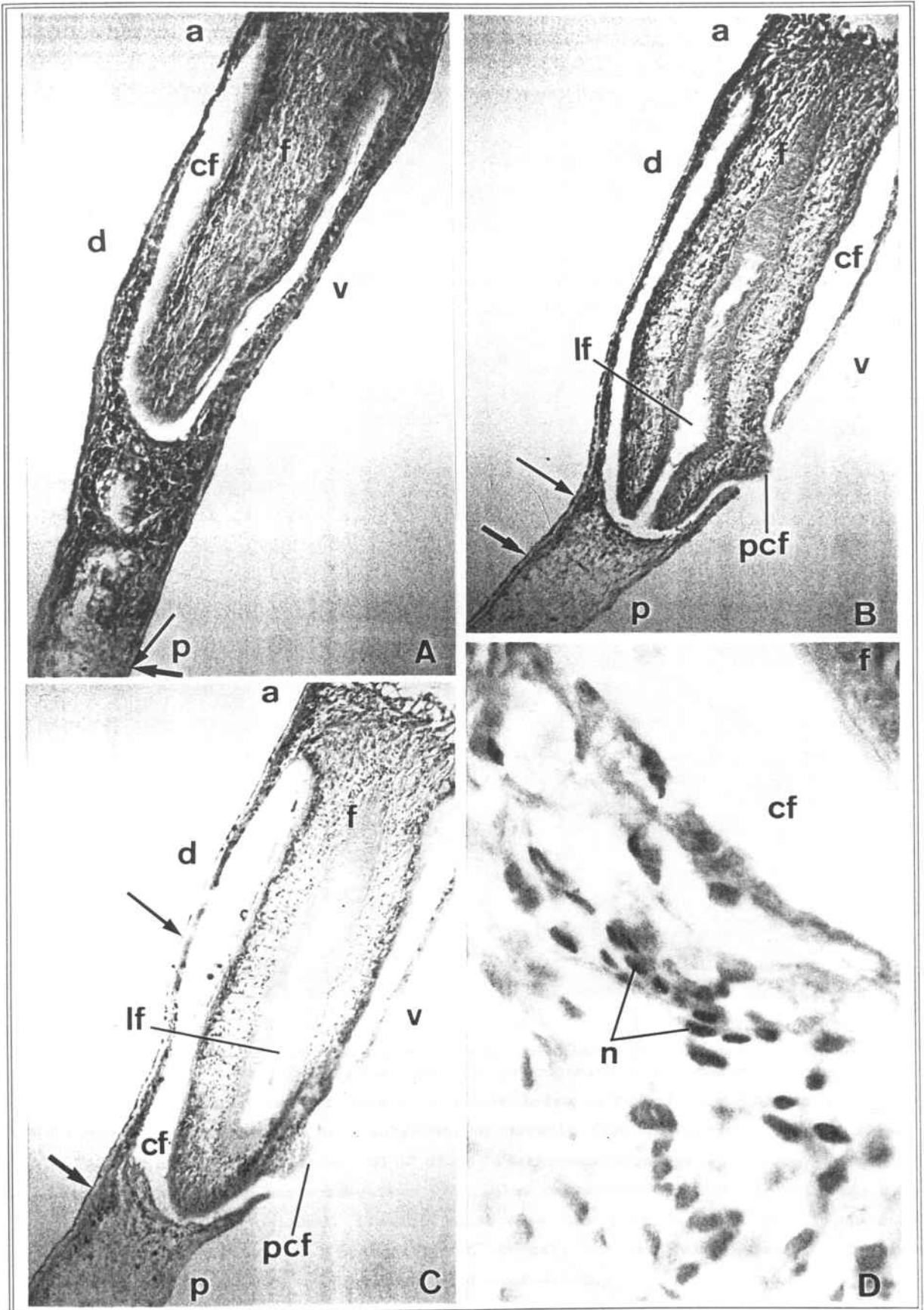
Els organismes tractats amb AAq i/o DG no han experimentat canvis ni morfològics ni d'expressió de TCEN-49Ag durant els 15 dies que ha durat el tractament. En canvi, els organismes tractats amb AR, als que tampoc no s'han detectat alteracions morfològiques, comencen a experimentar transtorns "d'orientació" a partir del 3^{er}-4^{art} dia de tractament. Aquests transtorns es manifesten en un moviment anormal dels organismes en cercles o en forma de tirabuixó en lloc d'avançar en una direcció més o menys rectilínia o restar quietes. Comencen a mostrar els transtorns de comportament al cap de 10-20 minuts després d'iniciar el pols diari i duren més hores com més dies de tractament porten (5 hores al 4^{art} dia, 16-20 hores el 10^è dia de tractament).

Més interessants han resultat les alteracions en l'expressió de TCEN-49Ag provocades per l'AR. En organismes intactes s'observa un desplaçament cap a zones més anteriors del límit posterior de la regió central, de manera que la regió posterior es veu incrementada, disminueix la central i, aparentment, no es modifica l'anterior (fig. 64). La disminució de la zona ocupada per la regió central, que s'inicia als 3^{er}-4^{art} dia de tractament, es va fent més evident a mesura que s'incrementen els polsos. A partir del 10^è dia, el límit posterior de la regió central ultrapassa el límit posterior de la cavitat de la faringe (fig. 64). Això representa una pèrdua aproximada de 1/4 a 1/3 del volum total de la regió central. Els organismes no es mantenen vius més enllà dels 12-15 dies de tractament.

Aquest no és, però, l'únic efecte observable. Durant el procés descrit, es veu que la desaparició del marcatge de TCEN-49 afecta primer a les cèl.lules cianòfiles i, quasi simultàniament, a la resta de teixits excepte el marcatge nuclear. Aquest es manté unes 24-48 hores més fins a desaparèixer totalment (fig. 64). Aquest procés de disminució de l'àrea marcada es produeix en sentit posteroanterior.

Quan el límit de la regió central arriba a posicions on hi ha la faringe, la desaparició del marcatge afecta simultàniament els teixits de la faringe i els teixits del parènquima que envolta la faringe, sense que aquesta desaparició hagi afectat encara a la part proximal de la faringe (on la faringe s'inserta al parènquima corporal).

Fig. 64: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes adults intactes incubats amb àcid retinoic. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) Control positiu incubat 8 dies amb el solvent de l'àcid retinoic (100x). Observi's el límit posterior de la regió central (sageta prima). B) 4^{art} dia de tractament amb àcid retinoic (100x). Desplaçament cap a posicions més anteriors del límit posterior de la regió central, iniciada per la desaparició del marcatge no nuclear (sageta prima). C) 8^a dia de tractament amb àcid retinoic (100x). El desplaçament del límit posterior del marcatge no nuclear ha ultrapassat el límit posterior de la faringe (sageta prima), i el límit posterior del marcatge nuclear ha arribat al límit posterior de la cavitat faríngia (sageta gruixuda). D) Ampliació del límit posterior del marcatge nuclear a 8 dies de tractament (1000x). *a*, anterior; *p*, posterior, *d*, dorsal; *v*, ventral; *f*, faringe; *cf*, cavitat de la faringe; *lf*, lumen faringi; *pcf*, porus de la cavitat de la faringe; *n*, marcatge nuclear; *sagetes primes*, límit posterior del marcatge no nuclear; *sagetes gruixudes*, límit posterior del marcatge nuclear. S'ha sobre-revelat la immunoreacció per detectar els marcatges febles.



Resultats

En organismes regenerants s'observa un retard en l'aparició de TCEN-49Ag:

- en els controls la primera immunoreacció es detecta als 3 dies de regeneració (ja que els regenerants es mantenen a 17°C), mentre que en els tractats amb AR no es detecta fins al 4-4.5 dies.

- en els controls l'expansió del marcatge comença al 5^e dia, mentre que en els tractats no comença fins el 8^a-9^e dia (fig. 65).

El grau d'immunoreacció a nivell de les cèl.lules cianòfiles i de la resta de teixits és menor que en els controls, exepete en els nuclis on es manté al nivell normal. Aquesta disminució diferencial del marcatge fa que la immunotinció en nuclis es faci més visible.

Paral.lelament a aquests endarreriments també s'endarrereix l'aparició del primordi de la faringe, de la cavitat faringia, etc., que a més a més apareixen malformats (fig. 65).

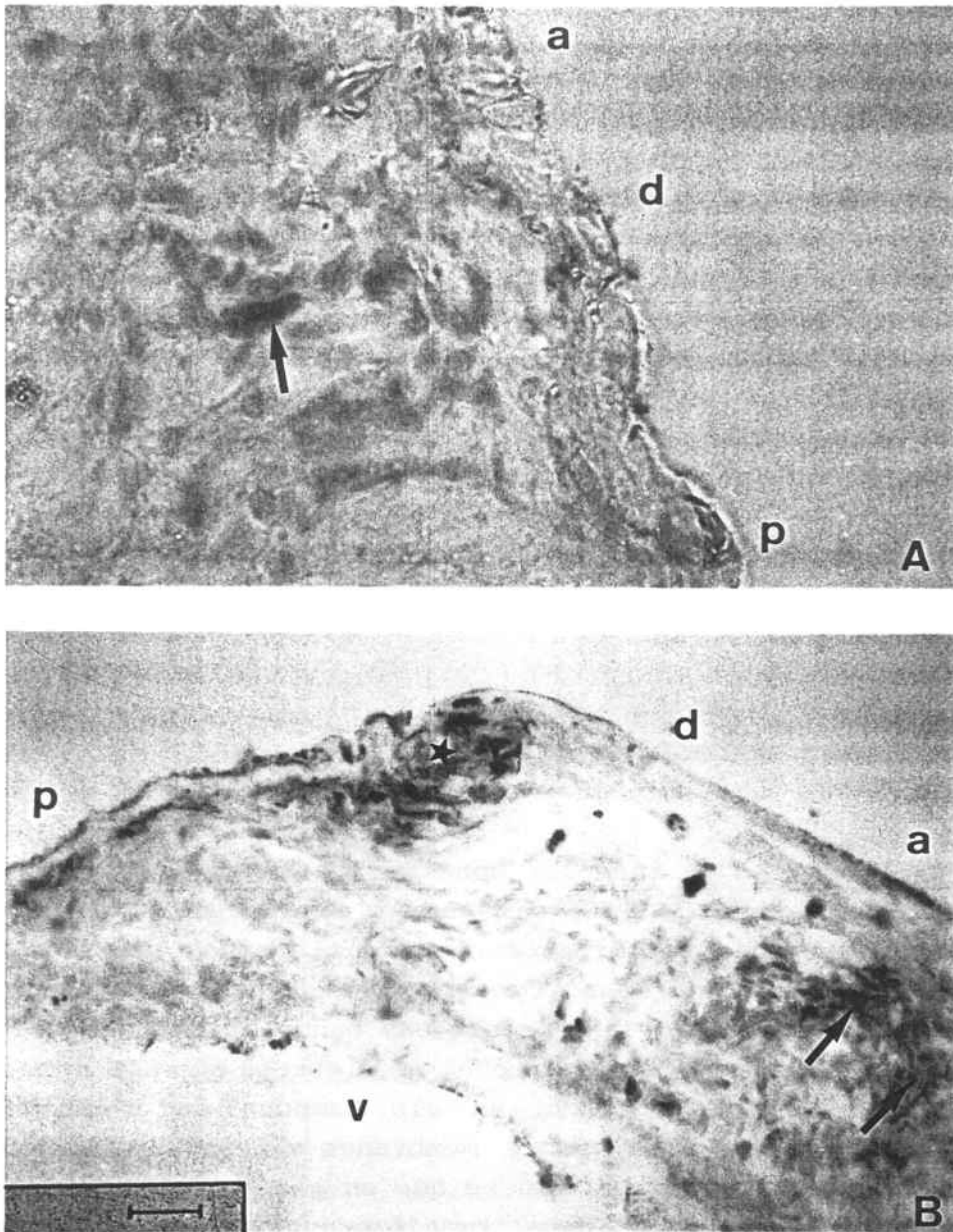


Fig. 65: Immunotinció amb TCEN-49 en organismes regenerants de nivell E incubats amb àcid retinoic. Seccions sagitals incloses en parafina. Mètode de detecció: ABC lligat a HRP. A) 4^{rt} dia de tractament/regeneració (1000x). Detecció de la primera cèl.lula immunoreactiva (sageta). B) 8^è dia de tractament/regeneració (400x). Increment del nombre de cèl.lules immunoreactives (cèl.lules secretores cianòfiles, sagetes) a la zona de formació del primordi faringi. Observi's les malformacions del regenerant (estrella). a, anterior; p, posterior; d, dorsal; v, ventral; sageta, cèl.lules immunoreactives; estrella, malformacions del regenerant.

21.6 - Caracterització bàsica de TCEN-49Ag

El marcatge obtingut amb TCEN-49 en organismes intactes, regenerats i les alteracions observades indueixen a pensar que TCEN-49Ag pot ser una molècula implicada en mecanismes de formació i manteniment de la polaritat (o del patró), situada en una posició o altra dins una hipotètica cadena (o xarxa) d'induccions-inhibicions-regulacions (veure Discussió). Es per aquest motiu que es va considerar important caracteritzar TCEN-49Ag a nivell bàsic. Aquesta caracterització primària inclou els següents punts:

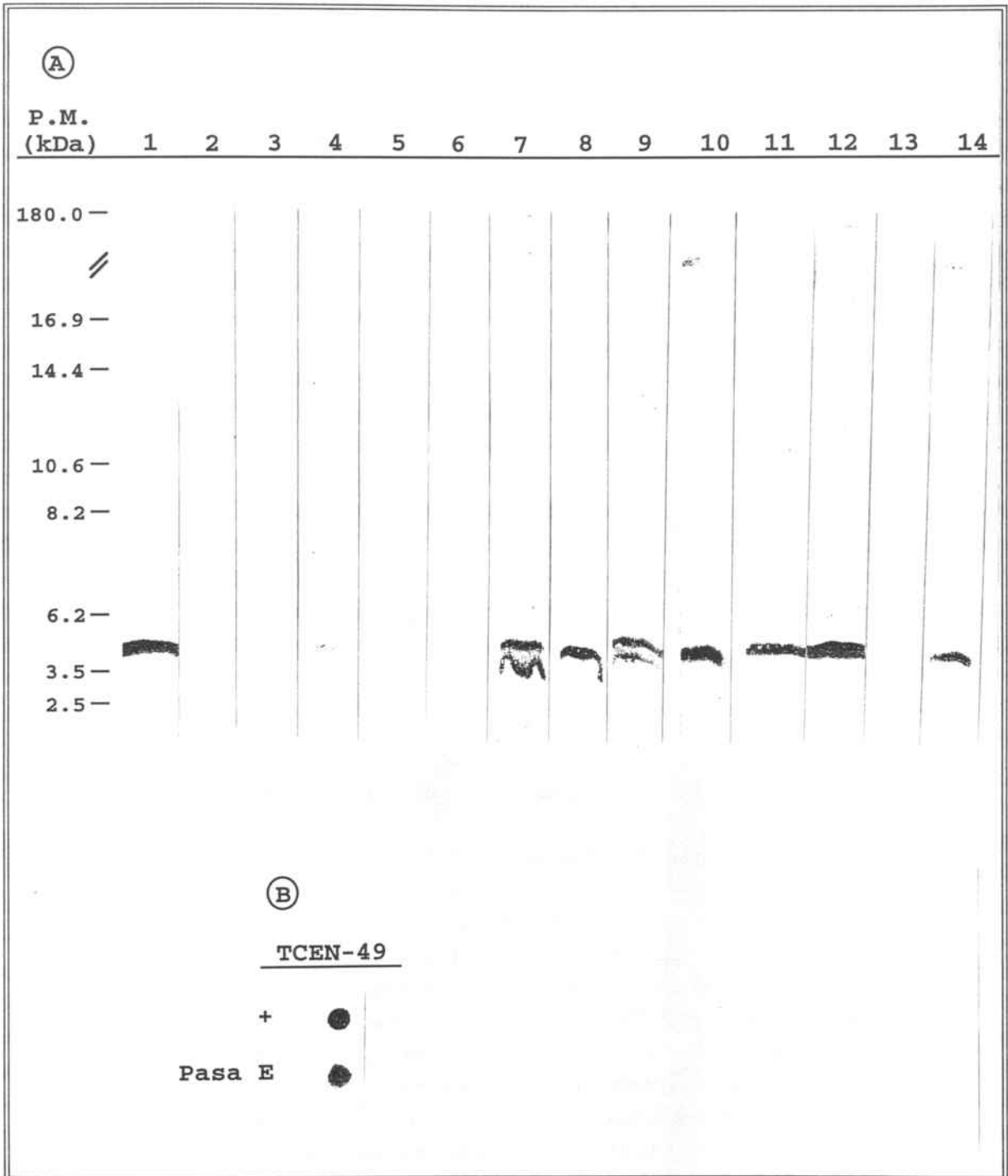
- massa molecular aparent (SDS-PAGE)
- natura de l'antigen

Els mètodes emprats amb aquest propòsit estan descrits a Material i Mètodes.

21.6.1 - Massa molecular aparent

Inicialment, es va intentar conèixer la massa molecular aparent de TCEN-49Ag amb gels SDS-PAGE mitjançant el sistema Mini-Protean II (BioRad) seguint les especificacions subministrades pel fabricant i transferir-lo a membrana de nitrocel.lulosa segons el procediment de Towkin (1978), però no es va detectar cap banda d'immunoreacció en el Western-blot. Tractant homogenat total de planària amb SDS a la mateixa concentració en què s'utilitza en els tampons de l'esmentat gel electroforètic i fixant-lo sobre membranes de nitrocel.lulosa, es perdia tota la immunoreacció, mentre que en els controls sense SDS es conservava. Per tant la desnaturalització provocada per l'SDS modifica suficientment l'epítop com per que no es produeixi el reconeixement

Fig. 66: Immunodetecció de TCEN-49Ag. A) Western-blot (SDS-PAGE 12 % acrilamida-bisacrilamida). B) Dot-blot d'homogenat total de planària incubat amb proteases. 1 i 2, homogenat total de regió central; 3, homogenat total de regió anterior i regió posterior; 4 i 5, homogenat de nuclis aïllats de regió central (40 planaries); 6, homogenat de nuclis aïllats de regió anterior i posterior (40 planaries); 7, homogenat total de regió central incubat amb endoglicosidasa H (Endo H); 8, homogenat de regió central incubat amb el tampó d'actuació d'Endo H; 9, homogenat total de regió central incubat amb endoglicosidasa F (Endo F); 10, homogenat total de regió central



incubat amb el tampó d'actuació d'Endo F; 11, homogenat total de regió central incubat amb sialidasa; 12, homogenat total de regió central incubat amb el tampó d'actuació de sialidasa; 13, homogenat de regió central incubat amb pronasa E; 14, homogenat de regió central incubat amb tampó d'actuació de pronasa E. En tots els homogenats de regions s'ha carregat l'extracte d'una regió a cada carril. Els carrils 2 i 5 s'han incubat amb medi de cultiu sense anticossos, i tots els altres carrils s'han incubat amb TCEN-49. +, fixació a filtre d'homogenat total de regió central incubat amb tampó d'actuació de pronasa E; Pasa E, homogenat total de regió central incubat amb Pasa E.

antigen-anticòs. Això fa suposar que l'epítop reconegut no és seqüencial sinó conformacional. Utilitzant gels no desnaturalitzants (isoelectroenfocament) i transferint-los a nitrocel·lulosa (Western), tampoc no es detecta cap immunoreacció.

Mitjançant el protocol de reextracció d'antígens de gels SDS-PAGE descrit per Bernabeu i col. (1977) (veure apartat 14), s'han extret els antígens continguts en segments de 1-1.5 mm de gel (SDS-PAGE) on s'havia fet avançar homogenat total de regió central. Aquests extractes han estat fixats en plaques d'ELISA i se'ls ha fet immunoreaccionar front TCEN-49, detectant-se immunoreacció en els extractes provinents dels segments situats per sota els 35 kDa de massa molecular aparent, sense que es pugui precisar més amb aquest mètode.

Utilitzant els tampons d'electrotransferència renaturalitzant descrits per Dunn (1986) amb el sistema Protean II (apartat 14.1) sobre gels SDS-PAGE no reductors, s'ha obtingut una única banda d'immunoreacció en Western-blot a partir d'homogenats totals de regió central. La mobilitat electroforètica SDS-PAGE d'aquesta banda (TCEN-49Ag) és de 4500 Da (de fet, entre 4000 i 5000 Da) (fig. 66). Aquests gels donen un gran recorregut a les mostres permetent una mesura molt acurada de la massa molecular aparent. En els controls fets amb extracte total de regió posterior no s'observa cap banda.

Per comprovar que el marcatge detectat en nuclis mitjançant tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques correspongui al mateix antigen detectat en la resta d'estructures s'ha intentat determinar la massa molecular aparent d'aquest amb la mateixa tècnica electroforètica. Amb aquesta finalitat, s'han obtingut per trencament per xoc osmòtic amb PBS-Tritó X-100 1% (Prats, 1991) de cèl·lules dissociades (apartat 7.2.4) extractes de nuclis de cèl·lules de regió central i de regió posterior (com a control). En el resultat obtingut (fig. 66) solament s'insinua una petita banda, gairebé no visible, a 4500 Da (la mateixa mobilitat que amb extractes totals de regions centrals). No s'observa cap banda en els extractes de nuclis de regió posterior. Les possibles implicacions d'aquest resultat estan comentats a la Discussió.

21.6.2 - Naturalesa de TCEN-49Ag

Per obtenir una mostra purificada de TCEN-49Ag s'ha muntat una columna d'immunoafinitat (apartat 15.1). Un cop, eluïda la columna i purificat l'antigen mitjançant HPLC (apartat 15.1), detectant en cada cas mitjançant ELISA les fraccions que contenien TCEN-49Ag, s'han fet córrer en gels SDS-PAGE pel sistema Mini-Protean II (BioRad) i Hoefer (apartat 14.1) i s'han tenyit amb Coomassie Brilliat Blue R-250 i amb nitrat de plata (apartats 14.2 i 14.3). En cap dels dos casos s'ha observat cap banda, ni tant sols la corresponent a TCEN-49Ag (fig. 67). Així mateix, en la mostra obtinguda no s'observa absorció de llum a 280 nm mitjançant espectrefotòmetre (LKB) tot i donar un títol molt alt mitjançant ELISA. Aquesta mostra, però, sí que absorbeix a 230nm i més encara a 210nm, longituds d'ona a les que absorbeixen els pèptids i els polisacàrids.

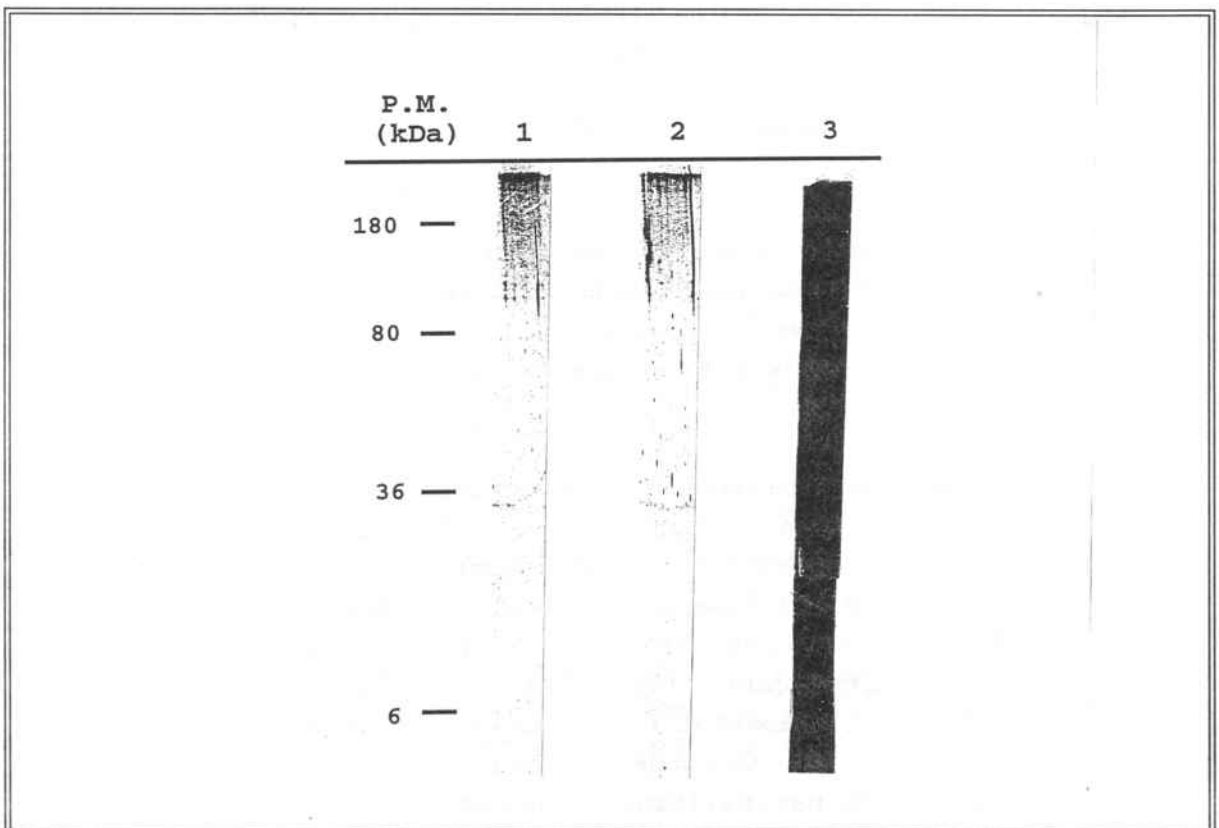


Fig. 67: SDS-PAGE (sistema Hoefer) de l'eluit de la columna d'immunoafinitat detectat per tinció de plata. 1, tampó de càrrega; 2, eluit de la columna d'immunoafinitat; 3, homogenat total de regió central.

Amb aquesta dada es va pensar que es podia tractar d'una glucoproteïna. Per comprovar-ho, s'ha utilitzat un "kit" de detecció de glicoconjugats (Boehringer) segons el procediment descrit per la casa comercial (apartat 15.2). Aquest test (fig. 68) mostra un fort marcatge per polisacàrids i un marcatge molt més lleu per proteïnes. Això indicaria que es tracta d'una glucoproteïna o bé d'un proteoglicà.

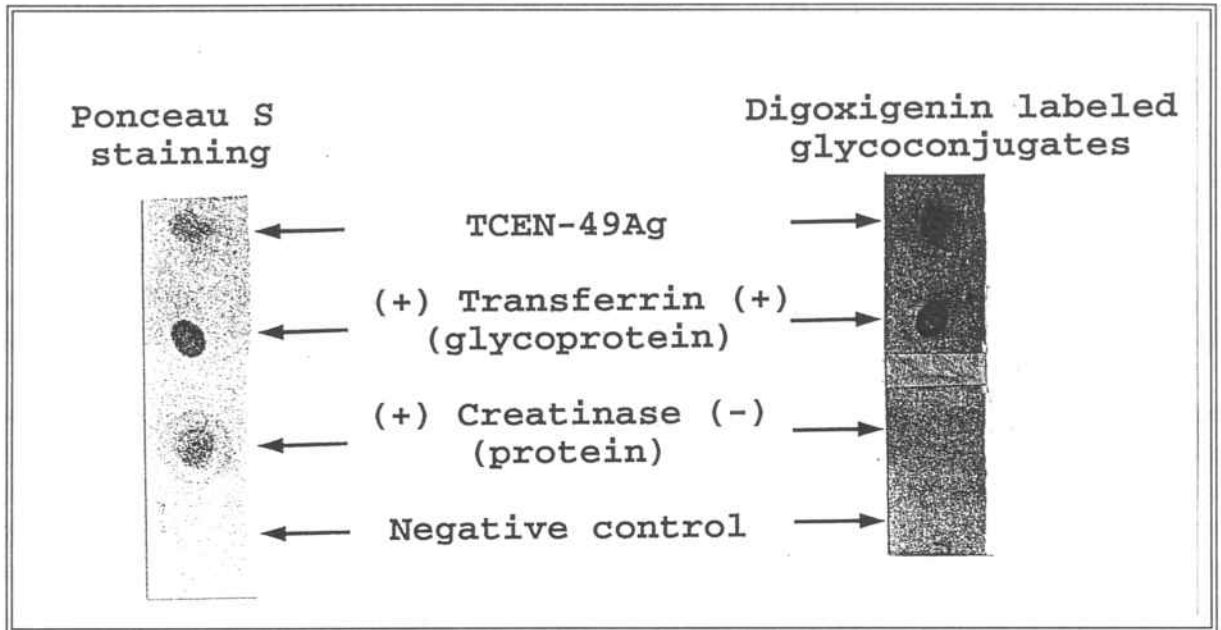


Fig. 68: Dot-blot de detecció de glicoconjugats (DIG glycan detection kit, Boehringer Mannheim). La transferrina ha estat utilitzada com a control de tinció de glicoproteïnes, i la creatinasa com a control de tinció de proteïnes. Com a control negatiu s'ha utilitzat també d'elució processada de la mateixa manera que el tampó que conté TCEN-49Ag.

Per confirmar aquesta dada s'han efectuat digestions d'homogenats de regió central i, com a control, de regió caudal, amb endo-B-acetilglucosaminidasa H (endo H), endo-B-acetilglucosaminidasa F (endo F), sialidasa i pronasa E, segons els mètodes descrits als apartats 15.4 i 15.5. Les mostres tractades amb pronasa E han estat immunodetectades mitjançant tècniques dot-blot i Western-blot (provinent de SDS-PAGE) (apartat 14.5). En canvi, les mostres tractades amb glucosidases sols han estat detectades mitjançant Western-blot ja que les condicions desnaturalitzants imposades pel tampó (que conté SDS) no permeten la seva visualització en dot-blot. En Western-blot es poden visualitzar sempre i quan s'emprin els tampons renaturalitzants de Dunn (1986) que en alguns casos permeten la recuperació del reconeixement de l'epítot per part de l'anticòs quan aquest es perd per efecte de l'SDS.

Els resultats de les digestions enzimàtiques amb els corresponents controls de mostres tractades amb els tampons de digestió sense enzim estan a la figura 66. En ella es pot veure un desdoblament en la banda de TCEN-49Ag en les mostres tractades amb Endo H i Endo F, senyal de la presència d'unions N-glicocídiques entre la fracció proteica i alguns sucres (Tarentino i col., 1984; Trimble i Maley, 1984; Steube i col., 1985; Beeley, 1985 per a una revisió general de tècniques en glicoproteïnes; Chaplin i Kennedy, 1986, per a una revisió general de tècniques en carbohidrats) probablement rics en manosa (Kobata, 1979).

Aparentment sembla que TCEN-49 no contingui àcid siàlic o, si més no, aquest no sigui accessible als enzims, ja que el tractament amb sialidasa no altera el patró de bandes obtingut. El fet de no haver tractat cap mostra per deglicosilar unions O-glicocídiques fa que no es pugui descartar ni afirmar en cap moment la presència de cadenes glucídiques amb aquesta unió a la fracció proteica.

En la mostra tractada amb pronasa E s'observa la desaparició de la banda en el Western-blot (conservat-se en el control), senyal inequívoca de l'existència de fracció proteica en TCEN-49Ag. D'altra banda, en el dot-blot s'observa immunoreacció encara que molt disminuïda respecte el control, indicant la participació de la fracció proteica en l'epítot detectat per TCEN-49.

Amb la mateixa mostra obtinguda en la columna d'immunoafinitat - HPLC s'ha fet una anàlisi de C i N per confirmar la presència d'aminoàcids (apartat 15.3). Un cop confirmada la presència d'aminoàcids es va confeccionar un aminograma (apartat 15.3), el resultat del qual es pot veure a la figura 67.

En aquest aminograma s'observa la presència d'aminoàcids que poden presentar unions a cadenes glucídiques: asparraguina (unió N-glicocídica), treonina i serina (unió O-glicocídica). La presència d'unions N-glicocídiques ha estat comprovada mitjançant la utilització d'Endo H i Endo F (fig. 66). La presència d'unions O-glicocídiques és possible ja que TCEN-49Ag té els aminoàcids implicats en aquest tipus d'unió. Aquesta no ha estat demostrada per no haver-se efectuat les proves escaients.

D'altra banda, la fracció proteica té un caràcter bàsic (19% de residus bàsics i 6% d'àcids). Aquests resultats s'han de prendre amb precaució degut a l'ampli marge d'error que aquest aminograma comporta, estimat en un 10% (Allen, 1989).

Resultats

POLARITAT DE LES CADENES LATERALS DELS AMINOACIDS	AMINOACIDS	%
No polars	Prolina	1
	Isoluecina	6
	Leucina	12
	Fenilalanina	6
No polars / Polars no carregades ^a	Valina / Cisteina	6
Polars no carregades	Glicina ^b	16
	Tirosina	8
	Treonina	2
	Serina	5
Polars no carregades / Acides ^a	Asparraguina / Aspartic	3
Acides	Glutàmic	6
Bàsiques	Lisina	7
	Histidina	8
	Arginina	4

Fig. 69: Aminograma de TCEN-49Ag obtingut a partir de l'antigen purificat per columnes d'immunoafinitat - HPLC. Percentatges estimats amb un error de $\pm 5\%$. ^a, aminoàcids no diferenciables degut al tractament hidrolitzant; ^b, percentatge dubtós ja que aquest aminoàcid forma part del tampó d'elució.

DISCUSSIO

22 - CONSIDERACIONS TECNQUES

22.1 - Obtenció d'hibridomes productors d'anticossos específics

En les 58 fusions realitzades s'han obtingut un total de 277 hibridomes productors d'anticossos específics. En l'obtenció d'aquests i en la seva especificitat han intervingut diversos factors que poden ser agrupats en dos tipus. Aquests són:

- factors variants (aquells que depenen de cada fusió en concret)
- factors invariants (aquells que són comuns per totes les fusions).

22.1.1 - Factors variants

Els factors variants que han (o poden haver) intervingut en l'obtenció i especificitat dels clons obtinguts són:

- soca parental
- protocol d'immunització
- immunogen emprat

Els dos primers factors no deuen haver intervingut massa en els resultats obtinguts en les fusions ja que han estat molt constants en totes elles.

22.1.1.1 - Soca parental

La soca parental utilitzada ha estat majoritàriament la NS1. Aquesta utilització no es deu a un estudi de quina soca (NS1 vs NP3) proporcionava uns millors resultats (en termes d'eficiència i especificitat), sinó a motius de força major provocats per una

contaminació de micoplasmes en la soca NP3 que va obligar a utilitzar l'altra soca. Un cop es va poder disposar novament de les dues soques, aquestes van ser comparades en termes d'eficiència d'hibridomes obtinguts. Aquesta comparació, lluny de ser exhaustiva (solament es va fer en dues fusions) donà una lleugera aventatge a la soca NS1 (no superior al 5%). Aquesta va ser seleccionada com a soca mielòmica per a realitzar la resta de fusions, més pel fet que era la que més s'havia utilitzat que no pas per aquesta lleugera diferència d'efectivitat (que evidenment també va influir en la decisió). En definitiva, la influència de la soca parental queda restringida al fet que és una soca no productora d'immunoglobulines (apartat 9.2). Per tant totes les immunoglobulines produïdes pels hibridomes provenen del limfòcit B que en forma part, estant influenciades per l'immunogen emprat.

22.1.1.2 - Protocol d'immunització

Els aspectes fonamentals del protocol d'immunització utilitzat han estat pràcticament els mateixos en totes les fusions. Totes elles s'han fet amb la seqüència temporal que generava una major resposta immunitària (apartat 18.2.2). Aquesta seqüència és de 10-20 dies entre immunitzacions, coincidint lògicament amb les cadències proposades pels manuals tècnics (Campbell, 1985; Harlow i Lane, 1988; Peters i Baumagsten, 1992). Així mateix, la ruta d'introducció de l'immunogen va ser també optimitzada amb anterioritat a l'inici de les fusions amb els mateixos criteris, i per tant totes les immunitzacions han estat fetes per aquestes vies (intraperitoneal i intravenosa). La influència que ha tingut o pot haver tingut el protocol d'immunització entre les diferents fusions respecte els resultats obtinguts en cada una d'elles és mínim.

Totes les immunitzacions s'han fet amb un mínim de 6 recordatoris i un màxim de 8, de manera que no s'ha assajat la influència de les variacions del nombre i temps total de recordatoris sobre l'especificitat dels anticossos obtinguts. En aquest interaval no s'han detectat diferències significatives en les especificitats dels clons obtinguts. Segons alguns autors (Campbell, 1985; Harlow i Lane, 1988; Peters i Baumagsten, 1992), l'increment del nombre total de recordatoris afavoreix els antígens més immunogènics ja que seran aquests els que a cada nou recordatori aniran incrementant el nombre de clons específics d'ells, fent que la proporció dels clons que han generat respecte als clons generats per antígens menys immunogènics sigui cada cop més desavantatjosa per aquests últims. Fent el raonament

invers, es pot esperar que amb un baix nombre de recordatoris, els clons produïts per antígens menys immunogènics tinguin una representació més alta (respecte el total de clons estimulats) encara que el nombre total de clons generats per la immunització sigui inferior. El fet que s'hagin obtingut pocs clons específics d'alguns tipus cel.lulars (p.e. cèl.lules nervioses), molts clons específics d'altres tipus cel.lulars (p.e. cèl.lules secretores) i cap cló específic exclusiu d'altres tipus cel.lulars (p.e. neoblasts) pot estar en connexió amb aquest fet entre altres raons (veure apartat 23).

D'altra banda, si es pot disposar de fraccions enriquides dels antígens poc immunogènics o de fraccions on s'hagin eliminat els que indueixen més resposta, un increment en el nombre d'immunitzacions pot ser aventatjós ja que s'estimularia un major nombre de clons específics d'ells sense interferències del altres antígens.

En aquest mateix sentit, no s'han assajat tampoc protocols de supressió de clons de ràpida estimulació (i presumiblement per part d'antígens molt immunogènics) (veure Peters i Baumagsten, 1992, per aquest tipus de protocols), que únicament deixarien funcionals aquells clons d'estimulació més lenta (i presumiblement per part d'antígens poc immunogènics).

22.1.1.3 - Immunògen

L'immunògen emprat és el factor variable que més ha intervingut, com és d'esperar, en l'especificitat dels clons generats. En les immunitzacions realitzades amb homogenats totals de planària la majoria de clons productors obtinguts eren específics de cèl.lules secretores. D'altra banda, amb les immunitzacions realitzades amb cèl.lules senceres (macerades) de planària s'obtenien clons específics de la majoria de tipus cel.lulars. Alguns d'ells, però, no eren representats (p.e. cèl.lules nervioses i neoblasts). Per tant, es decidí utilitzar immunògens més específics (apartats 7.2 i 18.2.1). Aquests poden ser classificats en quatre grups:

- antígens de neoblast i de blastemes de regeneració absorbits sobre anticossos ja generats (combinació de 15 MAbs i anticossos policlonals respectivament)
- poblacions enriquides de neoblast (amb cèl.lules macerades i dissociades)

- fraccions proteiques de cèl.lula nerviosa i neoblast
provinent de gels de poliacrilamida SDS-PAGE
- fraccions cel.lulars de poblacions enriquides en neoblast
(membranes i nuclis)

Els resultats obtinguts amb aquests tipus d'immunògens són diversos i depenen de la font de la que s'han obtingut.

Poblacions cel.lulars enriquides en neoblasts

Amb les immunitzacions fetes amb poblacions enriquides de neoblast es pretenia obtenir clons productors d'anticossos específics i exclusius d'aquest tipus cel.lular. En cap dels processats donats a les mostres (absorbts sobre anticossos ja generats, cèl.lules senceres, fraccions cel.lulars, i fraccions proteiques) s'ha obtingut cap cló amb aquesta especificitat. L'especificitat dels clons obtinguts en aquestes fusions ha depès del processat de l'antigen.

1) Poblacions enriquides en neoblast obtinguts per dissociació.

Totes aquelles immunitzacions en que la font d'antigen ha estat poblacions enriquides en neoblasts obtinguts per dissociació, han generat bàsicament clons específics de cèl.lules secretores. Aquesta especificitat es deu a que la principal font d'antígens contaminants en aquestes obtencions són vesícules de cèl.lules trencades. La major part d'aquestes vesícules són de secreció, amb un alt contingut en glúcids, glucoderivats i mucus (Pedersen, 1959a; Baguñà, 1973), tots ells amb un demostrat alt poder immunogènic. Aquest alt poder immunogènic està en concordança amb resultats obtinguts en *Dugesia japonica* per K. Agata (comunicació personal, 1992), que observa les mateixes desviacions en la resposta immunitària. Per eliminar aquests antígens indesitjats, s'hauria d'obtenir poblacions encara més pures de neoblasts. Un sistema d'obtenir aquestes poblacions més pures és mitjançant citofluorometria de fluxe (Prats, 1992). Amb aquest sistema, i marcant les cèl.lules amb colorants fluorescents específics de DNA (p.e. DAPI), es poden separar els neoblasts (per "cell sorter") donat que són els únics amb capacitat de divisió (Bronsted, 1969; Baguñà, 1973; Baguñà i col., 1983). Seran aquestes les úniques cèl.lules que en algun moment del seu cicle contindran doble quantitat de DNA (seran 4c o 6c en el cas de *Dugesia(G)tigrina*), i per tant doble intensitat de fluorescència. Aquest tipus d'enriquiment de poblacions de neoblasts l'està utilitzant a l'actualitat R. Romero (dades no publicades) amb

resultats de puresa dels neoblasts obtinguts del 95%, per la qual cosa es poden considerar molt esperançadors.

2) Poblacions enriquides de neoblast obtinguts per maceració.

Totes aquelles immunitzacions en què la font d'antígens han estat poblacions enriquides de neoblast obtinguts per maceració han generat bàsicament clons específics de cèl.lules musculars i nervioses (en menor nombre), sense que s'hagi detectat gairebé cap cló específic de cèl.lules secretores. Això es deu a la manera com s'obtenen els macerats cel.lulars. La solució maceradora no tant sols disgrega les cèl.lules sinó que al mateix temps les fixa, de manera que esdevenen molt més resistents i no adopten formes arrodonides. D'aquesta manera, en obtenir l'enriquiment de neoblasts per filtració, pràcticament no hi ha restes de vesícules (els contaminants majoritaris de les poblacions de neoblasts dissociats). En canvi, algunes cèl.lules musculars i nervioses són capaces de passar per la malla de filtració si ho fan amb l'orientació adequada, ja que agafen una forma allargassada durant la maceració. Per tant, potser la millor manera d'obtenir poblacions gairebé pures de neoblasts seria amb macerats cel.lulars (per la resistència que els confereix la solució maceradora, que no tant sols les disgrega sinó que també les fixa) i per mètodes més específics (que no permetin el pas d'altres cèl.lules), com el de citometria de fluxe ("cell sorter") esmentat anteriorment. De fet, aquesta és l'estratègia que s'està seguint a l'actualitat.

3) Fraccions proteiques específiques o majoritàries de neoblast.

Totes aquelles immunitzacions en què la font d'antígens eren fraccions proteiques de neoblasts no han generat tampoc cap cló específic d'elles. Els possibles motius pels quals no s'han generat aquests clons exclusius de cèl.lula soca estan discutits a l'apartat 23. Cal afegir que les absorcions d'antígens de neoblast sobre anticossos ja generats (per eliminar o, si més no, disminuir el nombre d'antígens molt immunogènics) han disminuït el nombre de clons específics de cèl.lules secretores obtinguts, però no ho han fet el suficient com per dir que aquests tipus cel.lulars (o els seus productes de secreció) hagin deixat de desviar la resposta immunitària cap a ells.

Blastemes de regeneració

En les immunitzacions en què la font d'antígens són blastemes de regeneració es pretenia obtenir clons específics de diversos estadis de regeneració o de cèl.lules en procés de determinació i/o diferenciació (ja que en el blastema de regeneració i en els seus voltants és on la concentració d'aquests estadis cel.lulars és més alta; Saló, 1984). En elles, el resultat no ha estat millor que en el cas anterior. El motiu pel qual no s'han obtingut clons específics d'aquests estadis poden ser diversos però, en el fons, tots ells relacionats. Per una banda, la baixa concentració en què es deuen trobar aquestes substàncies (Baguñà i col., 1990) pot no ser suficient, ni tant sols prèvia absorció sobre anticossos policlonals d'organismes no regenerants (apartat 7.2.8 i 18.2.1), com per estimular un nombre suficientment alt de clons de limfòcits B en els ratolins. Per tant, la probabilitat d'obtenir hibridomes d'ells és molt baixa.

D'altra banda, potser algunes o moltes d'aquestes substàncies tinguin un poder immunogènic baix, si més no comparat amb altres molècules que desvien la resposta immune cap a elles, o fins i tot podrien ser haptens (molècules que no generen resposta immunitària per sí mateixes). Per sol.lucionar aquests problemes caldria optimitzar encara més i per cada cas concret les tècniques d'absorció, obtenir més quantitat d'antígens específics i, pot ser, lligar-los a transportadors (carriers). A més a més, es podrien obtenir fraccions proteiques diferencials (Collet, 1990) a partir de gels 2D-PAGE i ser utilitzades com a immunògens. Aquesta estratègia ha donat molt bons resultats, en aquesta mateixa Tesi, en l'obtenció de clons específics de cèl.lules nervioses a partir de gels SDS-PAGE (veure paràgraf següent).

Fraccions proteiques de cèl.lules nervioses

Les fraccions proteiques específiques o majoritàries de cèl.lules nervioses obtingudes a partir de gels de poliacrilamida SDS-PAGE (apartats 7.2.7, 18.2.1 i 19.2.6) han donat un resultat excepcional, obtenint-se en elles la majoria de clons productors d'anticossos específics d'aquest tipus cel.lular. Aquests resultats, juntament amb el fet que amb una de les fraccions proteiques obtingudes (fracció 1, apartat 18.2.1) s'han generat sempre clons específics de cèl.lules musculars (que tenen l'antigen que els ha estimulat en aquesta fracció), donen validesa a la tècnica. Al mateix temps indiquen la presència de més d'un antigen en una fracció dels gels SDS-PAGE. Això suggereix la utilització de gels 2D-PAGE com a font d'antígens.

Els treballs realitzats per Collet (1990) amb aquesta tècnica i en aquest mateix organisme (destinats a obtenir patrons proteics diferencials de cèl.lules indiferenciades/diferenciades, regions i estadis de regeneració), no mostren, en la major part dels casos, taques proteiques específiques sinó tant sols majoritàries (es a dir, diferències en les concentracions).

Es podria concloure que el millor protocol d'immunització seria aquell que:

- utilitzi com a ruta d'introducció la intarperitoneal o intravenosa (depenent de la quantitat d'antigen de que es disposi)
- mantingui una freqüència de recordatoris de 10-20 dies
- realitzi un nombre total d'entre 6-8 immunitzacions, incrementant-lo o disminuint-lo en funció de la puresa de l'antigen a immunitzar i de la seva immunogeneitat.

Evidentment, com més alta sigui la puresa de l'antigen amb més probabilitats s'obtindran clons específics d'ell. Per obtenir aquesta puresa, les tècniques de filtració cel.lular són apropiades per antígens suficientment immunogènics, però no ho són pels altres. Aquests darrers requereixen mètodes de purificació més precisos aplicables a planària, com la citofluorometria de fluxe (per fraccions particulades) i tècniques electroforètiques (per fraccions proteiques). Així mateix, les absorcions poden ser una bona eina per a contribuir a purificar antígens sempre i quan s'optimitzin per cada cas concret i/o vagin acompanyades d'alguna altra tècnica purificativa.

22.1.2 - Factors invariants

Els factors invariants que han intervingut en l'obtenció de clons productors d'anticossos específics han estat els intrínsecs al mètode de producció d'hibridomes utilitzat (invariants perquè han estat els mateixos per a totes les fusions). Aquests formen part del procés de fusió en sí (apartat 9.5), del procés de selecció (apartat 9.6) i del clonatge (apartat 9.7). Dels dos primers no hi ha massa cosa a dir en aquesta Discussió ja que són protocols bastant estandaritzats, provats per un gran nombre d'autors (Harlow i Lane, 1988), i que per tant presenten els mateixos efectes en tots ells. Es durant el procés de clonatge quan més es pot influir en l'obtenció de clons, molt especialment en la decisió de en quin moment del creixement dels clons

és millor clonar. Aquesta decisió s'ha de prendre en funció de les característiques de cada treball.

En la major part de les descripcions metodològiques es recomana la clonació dels híbridomes productors tant bon punt puguin ser detectats. Aquesta estratègia és molt útil quan es generen híbridomes productors d'anticossos específics de molècules concretes que puguin ser obtingudes en un estat de relativa puresa, però no ho és quan es pretenen obtenir anticossos específics de sistemes antigènics molt complexos (Vilella, 1986). Aquest és el cas dels antigens específics cel·lulars, regionals i d'estadis de regeneració en planària ja que ni tant sols es coneixen les molècules implicades (Baguñà i col., 1990) (apartats 2.2 i 5.4).

En aquest cas no és efectiu clonar tots els híbridomes productors d'anticossos específics d'algun antigen de planària, ja que la clonació és un procés llarg i econòmicament costós. A més a més s'obté un gran nombre d'aquests clons en les fusions, pocs dels quals produiran un anticòs interessant (Vilella, 1986; Fibla, 1990). Per tant, és millor endarrerir el clonatge fins que s'hagi fet un estudi de l'especificitat de tots els sobrenedants de cultius i dedicar tots els esforços de la clonació als clons productors d'un anticòs interessant. A més a més, hi ha clons que són especialment febles i que es perden, sense possibilitat de recuperació, durant el procés de clonatge.

Per tant, l'estratègia seguida comporta un primer crivellatge dels sobrenedants de cultiu mitjançant ELISA per detectar tots els pous amb clons productors abans que aquests arribin a la confluència. Un cop han assolit la confluència, es fa un segon crivellatge tant sols amb els sobrenedants positius del primer mitjançant tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques. D'aquesta manera, es seleccionen els pous amb clons productors d'anticossos interessants i que a més a més són dominants (en el sentit de què desplacen als altres quan arriben a la confluència, o si més no, no són ràpidament desplaçats), i per tant sols es clonen aquells que són interessants i alhora relativament resistents. D'aquesta manera s'assegura l'èxit del clonatge. Aquesta estratègia és una modificació de la proposada per Vilella (1986).

El mateix que s'ha especificat respecte els clons seleccionats pel clonatge es pot dir respecte els crioconservats. Per construir la "MAbsteca" especificada als Objectius amb híbridomes no portats a la monoclonalitat convé no tant sols que aquests siguin productors d'anticossos interessants sino que també siguin resistents, de manera

que quan s'hagin d'utilitzar les possibilitats de que es perdin durant el procés de clonatge siguin les mínimes possibles.

El fet de seleccionar els clons dominants fa que s'hagin pogut perdre clons potencialment interessants més dèbils. D'altra banda, si s'hagessin clonat tots els clons productors d'anticossos no s'haurien pogut realitzar tantes fusions provinents d'immunitzacions diferents de manera que potser mai no haguessin aparegut alguns dels MAbs dels que es disposa a l'actualitat.

Seguint aquesta estratègia s'ha obtingut una mitjana de creixement de clons del 73% dels pous sembrats, dels quals un 1.6% han generat anticossos específics (referit solament a les fusions que han generat hibridomes). Aquests percentatges no estan allunyats dels obtinguts per altres autors (Nowinski i col., 1979).

22.2 - Mètodes de crivellatge

Els mètodes de crivellatge emprats poden ser classificats en dues categories:

- els què han permès discriminar entre clons productors d'anticossos (IgG) i clons no productors
- els què han permès discriminar l'especificitat de cada cló productor

Dins la primera d'aquestes categories es pot incloure la tècnica d'ELISA. En la segona es poden incloure les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques.

22.2.1 - La tècnica d'ELISA

La tècnica d'ELISA emprada durant el crivellatge de les plaques de cultiu ha resultat molt útil per discriminar entre clons productors

i no productors d'anticossos. L'estratègia seguida (apartat 11.1) ha consistit en incubar la placa d'ELISA amb els sobrenedants de cultiu per que s'unissin els anticossos continguts en ells, i ser detectats amb anticossos comercials específics d'IgG de ratolí (cabra anti IgG de ratolí). Aquesta estratègia ha permès no tant sols discriminar entre els clons productors d'anticossos i els no productors, sinó també visualitzar tan sols els clons productors de IgG. Els avantatges que ha suposat la utilització d'aquesta tècnica han estat els següents:

1) La discriminació de clons productors d'anticossos de clons no productors ha suposat un gran estalvi de temps i material en el procés de crivellatge ja que tant sols els clons positius per aquesta tècnica (productors d'anticossos) han estat crivellats amb les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques. Aquestes tècniques són més lentes i molt més delicades que la d'ELISA: mentre que en una placa d'ELISA es poden assajar 96 sobrenedants alhora, es necessiten diverses seccions o un alt nombre de cèl.lules (perque es trobin representats tots els tipus cel.lulars i teixits d'un organisme) repartits en un considerable nombre de portaobjectes per les altres tècniques. És molt fàcil manejar 5 plaques d'ELISA (que permeten fer el crivellatge de 5 plaques de cultiu, es a dir, d'una fusió) però no ho és manejar el nombre necessari de portaobjectes per crivellar el mateix nombre de sobrenedants de cultiu. A més a més, el resultat d'una placa d'ELISA es visualitza amb valors de densitat òptica subministrats quasi instantàniament per un lector d'aquest tipus de plaques, mentre que les seccions o cèl.lules macerades han de ser observades una a una.

2) La utilització d'un anticòs secundari específic d'IgG per comprovar la presència d'anticossos en el sobrenedant del cultiu ha suposat també un considerable estalvi de temps i material en el procés de clonatge (i/o crioconservació). En les fusions realitzades quan s'estaven posant a punt les tècniques, la majoria d'hibridomes productors generaven IgG, però sempre n'hi havia alguns que produïen altres tipus d'immunoglobulines. D'aquest darrers, la immensa majoria secretaven IgM. Aquest clons productors d'IgM resultaven problemàtics per dos motius: primer, eren bastant més difícils d'estabilitzar que els altres, necessitant molts més clonatges i perdent-se amb molta més facilitat, de manera que en la majoria de casos l'intent de clonar-los era una pèrdua de temps i material; segon, els anticossos obtinguts pertanyents al grup de les IgM, independentment de la seva especificitat, tenien una gran tendència a donar marcatge inespecífic. Això feia difícil establir la seva real especificitat al mateix temps que no els feia útils com a marcadors. D'aquesta manera, fent el crivellatge amb un anticòs secundari específic d'IgG, s'eliminaven tots

els clons productors d'altres tipus d'immunoglobulines i sols passaven les següents etapes de crivellatge i als corresponents clonatges (i/o crioconservacions) aquells clons productors d'IgG.

22.2.2 - Les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques

Les tècniques immunohistoquímiques i immunocitoquímiques emprades en el crivellatge dels sobrenedants de cultius s'han aplicat sobre seccions sagitals d'organismes inclosos en parafina (en totes les fusions), cèl.lules dissociades (F-5 i 7) i cèl.lules macerades (F-3, 6, i de la F-38 fins a la 58). Totes elles han estat utilitzades en aquells clons que han donat positiu en el crivellatge fet mitjançant la tècnica d'ELISA.

Les tècniques immunoquímiques sobre seccions i cèl.lules dissociades van ser optimitzades abans de començar a fer fusions. De totes maneres, l'aplicació sobre cèl.lules dissociades sols es va realitzar en dues fusions degut als problemes que comportava. Aquests han estat els següents:

1) La fragilitat de les cèl.lules dissociades durant els primers estadis del protocol de dissociació (fins que no es fixen) fa que es trenquin amb molta facilitat si es tracten en grans quantitats, i justament són grans quantitats el que es necessita per fer un crivellatge de sobrenedants de cultius.

2) El fet que no conservin la forma que tenien dins els teixits de l'organisme (ja que no són fixades fins un cop disgregades) i de que adoptin totes una morfologia arrodonida molt semblant (i sovint malmesa per la seva fragilitat), fa que sigui extremadament difícil assignar determinades especificitats als clons en un crivellatge.

3) Finalment, pocs dels anticossos obtinguts immunoreaccionen amb cèl.lules dissociades, fent que sigui una tècnica poc versàtil pel crivellatge de sobrenedants.

D'altra banda, la tècnica immunoquímica sobre macerats cel.lulars no va ser definitivament optimitzada fins a la F-38. Això deixa un buit de 38 fusions (pràcticament les 2/3 parts de les fusions realitzades)

sense un autèntic crivellatge a nivell cel.lular. Aquest buit pot haver representat la pèrdua d'algún cló potencialment valuós o assignacions d'especificitat incorrectes en alguns dels clons seleccionats. De totes maneres, la meticulositat amb que s'ha fet el crivellatge fa suposar que els clons afectats, si n'hi ha, són una minoria.

A partir de la fusió 38, en que es comença a utilitzar la immunotinció sobre cèl.lules macerades com a mètode de crivellatge, desapareix la possibilitat de pèrdua de clons potencialment valuosos per manca d'un crivellatge a nivell cel.lular. Aquest mètode té l'avantatge respecte als dissociats cel.lulars de que totes les cèl.lules no adopten una morfologia arrodonida, sino que adopten una forma característica per cada tipus cel.lular (Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987) que facilita la seva identificació. Al mateix temps, la capacitat fixadora de la solució maceradora (deguda a l'àcid acètic que conté, apartats 13.1 i 17.2) els confereix una relativa resistència als tractaments del protocol.

La immunotinció de cèl.lules macerades no ha resultat tant versàtil com la de seccions, ja que el 40% dels anticossos generats que mostren marcatge sobre seccions no ho fan en cèl.lules macerades (apartat 18.2.5). Això pot ser degut a les alteracions que pot provocar la solució maceradora sobre els antígens, ja que, com s'ha dit anteriorment, aquesta solució no tant sols disgrega les cèl.lules sinó que també les fixa. L'agent fixador de la solució maceradora és l'àcid acètic, que actua abans que siguin definitivament fixades amb paraformaldehid (fixador utilitzat en les seccions d'organismes inclosos en parafina).

La utilització del paraformaldehid com a fixador en les seccions és alhora un avantatge i un problema. L'avantatge és que en tractar-se d'un fixador suau no distorsiona excessivament els antígens (i per tant els epítops) permetent un bon reconeixement entre l'antigen i l'anticòs. El problema és que per ser un fixador suau no preserva massa bé la histologia en les planàries, obtenint-se, en moltes ocasions, unes preparacions de poca qualitat histològica.

Els assajos fets amb fixadors més forts milloren notablement la histologia, però fan disminuir dràsticament el nombre d'anticossos immunoreactius degut a una major pertorbació dels epítops. Per tant, i com que el que interessava era obtenir el màxim nombre d'anticossos específics, s'ha utilitzat el paraformaldehid com a fixador pels crivellatges. De totes maneres, en tots els MAbs utilitzats s'han assajat altres fixadors que no disminuïssin la immunoreactivitat i

milloressin la histologia (apartat 12.1), en una solució de compromís per cada relació antígen-anticòs.

Una alternativa per tal d'evitar l'ús de fixadors durant els crivellatges podria haver estat la criosecció d'organismes. El gran nombre de seccions necessàries combinat amb la lentitud amb que s'obtenen aquestes seccions (si més no comparat amb les seccions en parafina), desaconsellaven el seu ús. Tanmateix, en les provatures fetes mentre s'estaven posant apunt les tècniques immunohistoquímiques, la histologia que s'obtenia mitjançant la tècnica de criosecció no era millor en cap cas a la que s'obtenia amb organismes fixats inclosos en parafina.

L'elecció de les seccions sagitals en els crivellatges és fruit de la necessitat de tenir representada tota la planària (fent referència a tots els teixits, òrgans i tipus cel·lulars) en el mínim nombre de seccions possibles. Si s'utilitzen seccions orientades d'aquesta manera, solament amb dues seccions es poden tenir representats tots els teixits, òrgans i tipus cel·lulars de planària. Una secció ha de ser lateral (que agafi cordons nerviosos i els ulls de l'organisme) i una central (que agafi la faringe i els ganglis cefàlics).

22.3 - Altres mètodes

22.3.1 - Les seccions semifines i ultrafines

El punt principal en l'obtenció de seccions semifines i ultrafines d'organismes inclosos en Lowicryl ha estat trobar el compromís entre una bona preservació de l'estructura i un nivell acceptable d'immunoreacció. Aquest compromís, que s'ha d'adquirir amb el fixador, s'ha hagut de buscar per a cada relació antígen-anticòs, no sent possible en tots els casos satisfer les dues necessitats. Això demostra un cop més l'alta especificitat existent en el reconeixement de l'epítot per part de l'anticòs, que els converteix en una eina molt útil per distingir molècules i canvis produïts en elles, i alhora una eina problemàtica de manejar ja que qualsevol canvi produït pel fixador sobre l'epítot pot provocar la manca de reconeixement d'aquest per part de l'anticòs.

22.3.2 - Les tècniques electroforètiques

Donat l'ús que s'ha fet d'aquestes tècniques en el decurs d'aquesta Tesi, es poden remarcar vàries observacions:

1) La utilització de tampons desnaturalitzants pot provocar la manca de reconeixement entre l'antigen i l'anticòs sempre i quan la desnaturalització afecti l'epítop.

2) La utilització de tampons renaturalitzants pot recuperar el reconeixement entre l'antigen i l'anticòs, sempre i quan es recuperi la conformació de l'epítop reconegut. Amb els tampons utilitzats en aquesta Tesi s'ha pogut recuperar el reconeixement per part del MAb de l'antigen amb que s'ha provat (TCEN-49Ag). Segons els propis autors del mètode (Dunn, 1986), però, no tots els antigens (o epítops) responen de la mateixa manera i en alguns casos cal cercar altres tampons renaturalitzants.

3) Aquesta dualitat de tampons pot permetre diferenciar (com s'ha fet en aquesta Tesi) entre epítops de seqüència i conformacionals, ja que el reconeixement dels epítops seqüencials no es veu afectat pels tampons desnaturalitzants mentre que el reconeixement dels epítops conformacionals sí que es pot veure afectat. S'ha d'anar alerta, però, ja que potser no tots els epítops conformacionals es desnaturalitzen igualment bé amb els tampons desnaturalitzants (i no tots els anticossos són igualment "exigents" amb la conformació del seu epítop), i no tots els epítops desnaturalitzats poden ser recuperats amb els tampons renaturalitzants.

4) La renaturalització d'antigens per extracció del gel SDS-PAGE amb àcid acètic 66% (Bernabeu 1977) ha resultat un mètode útil per TCEN-49Ag. Aquest mètode pot ser una alternativa més per detectar epítops conformacionals. Encara que la unió d'aquests antigens en placa d'ELISA obtinguts de bandes de diferents mobilitats electroforètiques del gel SDS-PAGE (apartat 14.5) no doni un valor tan exacte de la mobilitat electroforètica de l'antigen en qüestió, sí que permet fer-ne una aproximació.

23 - PATRONS D'IMMUNOREACCIO DELS ANTICOSSOS OBTINGUTS

Amb els 277 clons productors d'anticossos específics obtinguts fins a l'actualitat s'ha constituït una MAbsteca (nom que se li ha donat a aquesta llibreria de clons productors d'anticossos específics). Aquesta MAbsteca és una col·lecció d'eines moleculars que permet marcar cèl·lules, estructures, teixits, fer els seguiments de processos de regeneració, creixement i decreixement dels organismes, i inferir dades sobre les qüestions que encara resten obertes dels processos biològics de planària i confirmar les que ja han trobat alguna resposta.

La utilitat de poder disposar d'aquesta MAbsteca queda corroborada pel treball realitzat per Espinosa (1993) en la confecció de la seva Tesina de Llicenciatura sobre la regeneració de la faringe per part de cues regenerants. En ella va poder triar aquells clons, entre tots els obtinguts fins aleshores, que pel seu tipus d'especificitat poguessin ser utilitzats com a marcadors dels diferents tipus cel·lulars i estructures implicades en aquest procés. Els resultats obtinguts van ser rellevants ja que van aportar noves dades sobre la regeneració d'aquesta estructura, la seqüència de determinació/diferenciació de diversos dels tipus cel·lulars implicats, etc.

Els clons seleccionats per formar part d'aquesta col·lecció han estat classificats, en funció d'uns criteris d'especificitat jeràrquics, en diversos grups per facilitar la seva tria segons el tipus de marcador que es vulgui disposar. Aquests criteris de classificació així com els diversos grups de clons obtinguts mereixen algunes consideracions especials.

23.1 - Criteris d'especificitat bàsica

Els clons seleccionats han estat classificats en cinc grans grups en funció dels següents criteris:

- A** - marcatge cel.lular (en cèl.lules concretes) » veure **B**
 - marcatge no cel.lular (en estructures no cel.lulars de planària o en orgànuls cel.lulars comuns a totes les cèl.lules) » **Específics d'estructures subcel.lulars**

- B** - marcatge en cèl.lules d'un sol tipus cel.lular » veure **C**
 - marcatge en cèl.lules de més d'un tipus cel.lular » veure **D**

- C** - marcatge en totes les cèl.lules d'un tipus cel.lular » **Específics de tipus cel.lular**
 - marcatge en algunes cèl.lules d'un tipus cel.lular » **Específics de subtipus cel.lular**

- D** - marcatge present en totes (o gairebé totes) les cèl.lules d'una regió de l'organisme » **Específics regionals**
 - marcatge present en diferents tipus cel.lulars no restringits regionalment » **Específics de més d'un tipus cel.lular**

La classificació dels clons segons aquesta clau dicotòmica presenta alguns punts conflictius:

1) Hi ha MAbs, com el TEPI-46 (apartat 19.2.1) que immunoreacciona alhora amb cèl.lules rabdítiques i epitelials, morfològicament diferents i descrites unes com a precursors de les altres (Skaer, 1961; Baguñà, 1973). O altres, com el TMUS-13, que és específic de cèl.lules musculars i immunoreacciona també amb alguns neoblasts (la diferenciació dels mioblasts a partir dels neoblasts ha estat demostrada per Le Moigne (1967) i Pedersen (1972)). En aquests dos casos, i en altres com aquests, s'han classificat com a específics cel.lulars, no com a específics de més d'un tipus cel.lular, ja que en ells un dels tipus cel.lulars està descrit com a precursor de l'altre. Per tant, l'antigen reconegut pot ser considerat com antigen de diferenciació (veure apartat 23.2.5 per la discussió de la definició d'antigen de diferenciació).

2) Hi ha MAbs, com molts dels que immunoreaccionen amb subpoblacions de cèl.lules cianòfiles, que poden plantejar el dubte de si realment són subtipus cel.lulars (definites segons els criteris morfològics clàssics), o si haurien de ser considerats com a tipus cel.lulars diferents segons criteris moleculars. En tots aquests casos se'ls ha considerat com a específics de subtipus cel.lulars ja que s'han trobat determinants antigènics comuns (anticossos que immunoreaccionen amb tots aquests subtipus alhora, però no amb altres tipus cel.lulars).

3) Hi ha MAbs que immunoreaccionen amb més d'un tipus cel.lular morfològicament descrit. L'existència de determinants antigènics comuns en tipus cel.lulars diferents pot estar relacionat amb llinatges cel.lulars, funcions cel.lulars, programes comuns de desenvolupament, etc (veure apartat 23.2.4 per la discussió d'aquests MAbs), però posa en entredit el punt anterior, ja que els subtipus cel.lulars establerts molecularment podrien ser considerats de la mateixa manera, com a tipus cel.lulars relacionats per llinatge, funció, programa comú de desenvolupament, etc. No sembla raonable, però, considerar com a subtipus cel.lulars els tipus cel.lulars morfològicament descrits que presenten determinants antigènics comuns (p.e., cèl.lules nervioses i gastrodèrmiques, reconegudes pel MAb TNER-47). També cal tenir present que la presència d'epitòps comuns no implica necessàriament la presència d'antígens comuns.

4) Finalment, hi ha autors (com Heimfeld, 1985), que consideren antígens restringits regionalment aquells que estan restringits en un tipus (o subtipus) cel.lular d'una determinada regió de l'organisme. En la classificació feta en aquesta Tesi, s'ha aplicat una definició molt més restrictiva d'antigen regional (apartat 9.1), considerant que els altres poden ser classificats com específics de subtipus cel.lulars amb una localització restringida a una determinada regió de l'organisme.

23.2 - Especificitat cel.lular

23.2.1 - Tipus cel.lulars que han generat anticossos específics

La majoria dels tipus cel.lulars de *D. tigrina* han generat clons productors específics. De fet, tant sols els neoblasts no han generat cap anticòs que els reconegui només a ells (específics i exclusius de neoblasts). De totes maneres hi ha MAbs, com el TMUS-13, que reconeixen un antigen present en cèl.lules musculars madures i també en alguns neoblasts (probablement en estat de diferenciació cap mioblast i cèl.lula muscular adulta; apartats 23.2.5 i 24). Tret del cas aïllat (però molt important) dels neoblasts, que serà comentat a l'apartat 23.2.7, tots els altres tipus cel.lulars han generat anticossos que els reconeixen específicament a ells.

Respecte la generació de clons productors per part dels tipus cel.lulars es poden fer les consideracions següents:

1) Les cèl.lules macerades totals han estat el tipus d'immunogen que amb menor esforç d'obtenció ha generat més clons específics de tipus cel.lulars. Aquest tipus d'immunogen ha generat anticossos contra tots els tipus cel.lulars diferenciats en poques fusions. El fet de ser una fracció particulada probablement la fa molt immunogènica (Harlow i Lane, 1988), al mateix temps que la resistència al trencament de les cèl.lules que confereix la maceració fa que no es trenquin les cèl.lules secretores (ni les altres), i que per tant no vessin els seus productes de secreció altament immunogènics. D'aquesta manera no tota la resposta immune del ratolí es desvia cap aquests antígens més immunogènics. Contràriament al que això fa suposar, els antígens reconeguts pels anticossos així generats no són de superfície cel.lular, sinó que la majoria són citoplasmàtics. Això probablement es deu al trencament de les cèl.lules en l'interior de la cavitat intraperitoneal per part del sistema immunitari del ratolí.

2) Hi ha tipus cel.lulars que han generat un gran nombre de clons específics d'ells. Aquests tipus cel.lulars corresponen a les cèl.lules secretores i a les musculars, indicant que aquests dos tipus cel.lulars són els que tenen antígens amb més alt poder immunogènic. En el cas de les cèl.lules secretores probablement aquesta alta immunogenicitat

resideixi en els productes de secreció que sintetitzen. Aquestes substàncies tenen un alt contingut en polisacàrids i han demostrat tenir un alt poder immunogènic en aquest i en d'altres sistemes (Mcglade-Mcculloch i col., 1990; Synder i col., 1990; Vielmeter i col., 1991; Paschke i col., 1992; Agata, 1992, comunicació personal).

En el cas de les fibres musculars aquesta alta immunogeneïtat deu residir en les proteïnes específiques de la fibra muscular, ja que en la majoria d'anticossos obtinguts el marcatge es restringeix en aquesta zona (apartat 19.2.5). En fusions fetes amb melses no immunitzades s'han obtingut també anticossos específics de cèl.lules musculars. Aquests anticossos es poden explicar per presuntes infeccions de paràsits (que els hagin estimulat), poc possibles per altra banda degut a les condicions d'estabulament en que es mantenen els ratolins, o senzillament, i de manera molt simplificada, pel fet que un organisme té limfòcits B capacitats per fer anticossos amb tants paratops (zona de l'anticòs que reconeix específicament l'epítip) com determinants antigènics possibles (en teoria il.limitats). En el moment de la immunització el que es fa és estimular la proliferació de determinats limfòcits B, però la seva especificitat ja estaria determinada d'antuvi (Burnet, 1957). Aquests MAbs obtinguts en melses no immunitzades potser indiquen una certa predisposició a ser generats per aquests ratolins.

3) Hi ha tipus cel.lulars que han generat un baix nombre d'anticossos, com és el cas de les cèl.lules flamígeres, les pigmentàries i les nervioses. El cas concret de les cèl.lules nervioses està discutit a l'apartat 23.2.6. El que les cèl.lules flamígeres hagin generat pocs clons específics poc ser degut a que és un tipus cel.lular poc representat respecte el total de cèl.lules de l'organisme (Baguñà, 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero i Baguñà, 1991). Els anticossos que s'han generat ho han fet en fusions fetes amb la totalitat d'antígens de planària (no havent-se fet cap fusió específica per obtenir anticossos específics d'aquest tipus cel.lular), havent de competir per tant amb els més immunogènics per l'activació dels clons. Un segon problema pot haver estat la dificultat de reconèixer aquest tipus cel.lular en seccions sagitals combinat amb el fet de que no s'ha disposat d'un crivellatge típicament cel.lular fins la fusió F-38.

En el cas de les cèl.lules pigmentàries, la dificultat està en decidir si el marcatge observat en aquest tipus cel.lular és específic o no. Això es deu a què les cèl.lules pigmentàries tenen la particularitat de "segrestar" alguns dels anticossos generats, de manera totalment inespecífica, i sobre tot a la dificultat de distingir entre el precipitat de color de la reacció de la peroxidasa i el propi

color del pigment. Per evitar clonar i/o crioconservar falsos positius, s'ha estat molt restrictiu en la selecció de clons amb aquesta especificitat, fent que se n'hagin crioconservat molt pocs.

Els anticossos específics de tipus cel.lulars obtinguts (apartat 19.2) poden ser utilitzats per:

- descripcions anatòmiques de l'organisme, com s'ha fet amb el MAb TMUS-13 (apartat 19.2.5 i 24), i com han fet diversos autors amb altres sistemes (p.e. Koizumi, 1992, amb l'anell nerviós de l'hipostoma d'hidra; en el mateix sistema; o Shimizu, 1992a, en epíteli traqueal de rata)

- seguiment de processos de desenvolupament i regeneració, com ha fet Espinosa (1993) en la regeneració de la faringe en planàries amb anticossos generats en aquesta Tesi, com s'ha fet amb el MAb TCEN-49 (apartats 21 i 25), i com han fet diversos autors en altres sistemes (p.e. Fujita, 1987, en la neurogènesi de *Drosophila*; Javois, 1990, en la dinàmica de la formació del cap en hidra; Koizumi, 1992, en el desenvolupament de l'anell nerviós de l'hipostoma en hidra; Shimizu i col., 1992b, en la regeneració de l'epíteli traqueal de rata)

- seguiment de llinatges cel.lulars, com quasi s'ha fet amb el MAb TMUS-13 (apartats 19.2.5 i 24), o com es podrà fer amb el MAb TEPI-46 (apartat 19.2.1) que reconeix cèl.lules rabdítiques i cèl.lules epitelials (precursora les primeres de les segones; Skaer, 1961; Baguñà, 1973), tal i com han fet diversos autors en altres sistemes (p.e. Littlefield, 1985, en l'espermatogènesi d'hidra; Mita-Miyazawa, 1987, en l'especificació cel.lular en l'ascidia *Hocynthia roreti*). Per aplicar amb aquesta finalitat els MAb obtinguts amb el màxim rendiment possible seria necessari obtenir nous MAb específics de diversos estadis de determinació/diferenciació dels diversos tipus cel.lulars de planària.

- establiment de la seqüència de determinació del patró i localització i seguiment de l'aparició de noves estructures durant la regeneració. A aquest efecte es poden utilitzar MAb com els específics de cèl.lules gastrodèrmiques, musculars, nervioses, etc. Així mateix, amb els MAb que immunoreaccionen amb neoblasts en procés de diferenciació es podria estudiar si els neoblasts que formen el blastema hi arriben ja determinats o es determinen un cop assolida la seva posició.

- aïllament per citofluorometria de fluxe, mitjançant "cell

sorter", dels diferents tipus (i subtipus) cel·lulars marcats amb l'anticòs corresponent lligat a una molècula fluorescent, podent ser llavors utilitzats per a una millor caracterització o per altres estudis on convingui tenir tipus cel·lulars aïllats.

23.2.2 - Subtipus cel·lulars que han generat anticossos específics

En aquesta Tesi s'ha utilitzat indistintament l'expressió subtipus cel·lular i subpoblació cel·lular davant la impossibilitat de seguir uns criteris objectius ja que cada autor utilitza indistintament una de les dues expressions. En el nostre cas poden ser donades com a sinònimes ja que tots dos fan referència a subconjunts de cèl·lules que estan englobades en un conjunt més ampli.

La majoria d'anticossos generats que han mostrat especificitat per subtipus cel·lulars reconeixen subpoblacions cel·lulars de cèl·lules secretores. La majoria d'aquests subtipus cel·lulars estan restringits territorialment (en el cap, en la cua, en la zona dorsal, en la faringe, etc.; apartat 19.3.1). Aquesta restricció territorial, que en alguns casos coincideix amb les localitzacions descrites per Baguñà (1973) per subtipus cel·lulars morfològicament diferenciats, és deguda a antígens que solament s'expressen en aquestes zones. Aquests antígens poden ser de localització (antígens que donarien una determinada posició a la cèl·lula) o ser productes de secreció diferencials entre les cèl·lules d'un mateix tipus cel·lular en diferents regions de l'organisme. De les dues alternatives la més factible per la majoria dels casos és la segona, ja que el marcatge en aquestes cèl·lules és molt intens (i per tant l'antígen és molt abundant), i han generat molts clons específics (i per tant són altament immunogènics), com correspon a un producte de secreció (apartat 23.2.2).

Aquest marcatge en subtipus cel·lulars podria ser utilitzat com a marcador en la regeneració de les seves respectives zones d'expressió. En la majoria dels casos, però, l'expressió d'aquests antígens en els territoris de nova formació és molt tardana (Espinosa, 1993). Aquesta expressió tan tardana es pot relacionar amb que els antígens reconeguts per aquests MAbs siguin productes de secreció, ja que aquests productes no seran sintetitzats fins que la cèl·lula arribi a la maduresa.

En el cas de les subpoblacions de cèl.lules epidèrmiques (apartat 19.3.3) detectades, aquest reconeixement diferencial per part dels anticossos pot indicar diferents funcions per part de les cèl.lules implicades, diferències en el seu llinatge i/o en el seu origen. Aquests poden ser el cassos del MAb TEPI-15.4, que reconeix algunes cèl.lules ciliades però no totes, l'anticòs TF-58.2, que reconeix les cèl.lules epidèrmiques de la faringe, o l'anticòs TEPI-17.1, que reconeix únicament les cèl.lules epidèrmiques dorsals (apartat 19.3.3). El cas del MAb TEPI-15.4 també pot ser explicat considerant que podria tractar-se de cèl.lules en diferents estadis de diferenciació o de maduració.

L'anticòs TEPI-17.1 (epidermis dorsal) podrà ser utilitzat durant la regeneració com a marcador del recobriment de la ferida per part de l'epidermis (formació de l'epiteli cicatricial). D'aquesta manera es podria estudiar el recobriment diferencial de la ferida proposat per Chandebos (1980) (apartat 2.2). Aquest model postula el recobriment epidèrmic com a regió frontera per determinar la polaritat, assenyalant l'epidermis dorsal com a responsable del recobriment de la ferida en regeneracions cefàliques i l'epidermis ventral en el cas de les caudals. Amb aquest anticòs es podria distingir si hi ha recobriments diferencials de la ferida, i si és així quina epidermis intervé en cada cas.

El mateix podria ser aplicat al MAb que reconeix específicament les cèl.lules musculars longitudinals. L'antigen reconegut pot ser degut a una diferent funcionalitat d'aquests dos subtipus de cèl.lules musculars o podria ser un reflex d'un llinatge i/o origen diferent entre aquests dos tipus de cèl.lules.

En les immunodeteccions de subtipus cel.lulars de difícil classificació (apartat 19.3 4) les cèl.lules reconegudes no estan restringides territorialment ni s'observa cap relació entre ells massa clara. L'existència d'aquests subtipus cel.lulars pot ser deguda a diferències en la seva funció o a que estiguin en diferents estadis de maduració (antígens de diferenciació, apartat 23.2.5). Seria molt interessant comprovar de quin dels dos casos es tracta en cada anticòs, ja que si fos el segon cas potser es podrien començar a establir llinatges complets de tipus cel.lulars.

Finalment, cal dir que l'elevat nombre de subtipus cel.lulars immunològicament detectats mostra una gran heterogeneïtat a nivell de marcadors moleculars. Aquesta heterogeneïtat era esperada ja que, amb aquestes tècniques, s'estan detectant simplement molècules que poden

diferir si canvia l'estat de la cèl.lula, el seu tipus de funció (per petit i aparentment insignificant que sigui el seu canvi), la seva localització, etc. Aquests resultats estan en concordança amb les descripcions fetes per altres autors (p.e. Dunne, 1985, en subpoblacions de neurones en hidra; Mackenzie i col., 1989, en subpoblacions de cèl.lules epidèrmiques de ratolí; Shimizu i col., 1992a, en subpoblacions de cèl.lules epitelials de tràquea de rata; Go i col., 1992, en petites subpoblacions de neurones en sistema nerviós central de *Drosophila*).

Aquestes subpoblacions cel.lulars poden ser utilitzades com marcadors en regeneració i desenvolupament, com fa p.e. Fujita (1987) a la neurogènesi de *Drosophila*, o Shimizu i col. (1992b) amb subpoblacions de cèl.lules epitelials de tràquea de rata.

23.2.3 - Relacions antigèniques entre tipus cel.lulars diferents

Els tipus cel.lulars diferents que han presentat marcatge front el mateix anticòs tenen en alguns casos el mateix origen embrionari, com és el cas del MAb TG-15.1 que reconeix cèl.lules goblet i cèl.lules columnars de la gastrodermis (endoderm), o el MAb TEPI-46 que reconeix cèl.lules rabdítiques i epitelials (ectoderm). Aquests casos permeten suposar, però no demostrar, la presència d'antígens comuns a un programa o llinatge embrionari concret. Tenint en compte la manca de dades específiques, seria convenient esbrinar si aquests antígens s'expressen en cèl.lules indiferenciades precursors del tipus cel.lular considerats.

En altres casos, els tipus cel.lulars reconeguts no tenen un mateix origen embrionari. Cal citar, per exemple, el cas del MAb TNER-47, que immunoreacciona amb les cèl.lules nervioses i amb les gastrodèrmiques. Encara que l'origen embrionari sigui diferent, es pot argumentar el caràcter "epitelial" d'ambdós (ectoderm i endoderm), o el fet que s'hagin detectat neuropèptids i neurohormones comunes en ambdós teixits (Gustafsson i Reuter, 1990).

Un altre exemple és el del MAb TF-17.1 (o TCAV1), que immunoreacciona alhora amb cèl.lules epitelials de la cavitat faríngia, del lumen faríngi, cèl.lules goblet i cèl.lules columnars gastrodèrmiques. En organismes intactes es dona una continuïtat física

entre aquests tipus cel·lulars ja que la gastrodermis contacta directament amb l'epiteli del lumen faríngi, i aquest ho fa amb el de la faringe i cavitat faríngia. Es més, durant la regeneració de la faringe, la cavitat faríngia i la faringe s'originen dins el parènquima, junt a la gastrodermis, connectant més tard amb l'epiteli extern de l'organisme. Aquest cas pot suggerir-nos un programa comú entre l'epiteli faríngi i la gastrodermis, però cal esbrinar la presència de cèl·lules precursoras indiferenciades que expressin aquests antígens.

Les possibles relacions, més o menys aventurades, entre tots els altres casos detectats estan esquematitzades a la figura 41 de l'apartat 19.4. Aquestes relacions antigèniques entre tipus cel·lulars diferents s'han trobat també en altres espècies de planària (Shirakawa i col., 1991, troba determinants antigènics comuns entre epidermis i gastrodermis en *Phagocata vivida*) i en altres grups d'organismes. Cal citar, per exemple, el cas detectat per Goldhamer i col. (1989) en tritó, on les cèl·lules de l'epiteli de recobriment en regeneració i les cèl·lules especialitzades en transport presenten un mateix antigen implicat en canals o bombes d'ions.

Cal tenir sempre ben present, però, que els MAb's detecten determinants antigènics, no molècules, encara que sovint es faci servir l'expressió "l'antigen detectat per l'anticòs". Aquesta puntualització és necessària ja que pot ser que dos antígens diferents tinguin un epítot igual o molt semblant, i sigui justament aquest el que detecti l'anticòs.

23.2.4 - Especificitat subcel·lular

Les estructures subcel·lulars (apartats 19.1 i 23.1) que han generat anticossos específics són la làmina basal i els nuclis de tots els tipus cel·lulars.

Les molècules de la làmina basal reconegudes pels anticossos amb aquesta especificitat deuen ser components d'ella, però no s'ha fet cap estudi concret.

Dels anticossos amb especificitat nuclear obtinguts s'ha caracteritzat el MAb TNU-46 (apartat 19.5.2). El reconeixement d'aquest MAb no es dóna en proteïnes nuclears sinó que es dóna en el

DNA, com ho demostren els tractaments amb DNAases i amb proteases. Aquest reconeixement es veu corroborat pel fet que reconeix DNA de totes les espècies en que s'ha assajat (veure apartat 19.5.2).

El fet d'obtenir MAbs anti DNA fa reflexionar sobre les conseqüències que això comporta pel ratolí:

1) Si l'estimulació del cló productor es va generar amb la immunització, vol dir que en el fons es va induir una malaltia autoimmune en el ratolí, ja que els anticossos generats pels clons així estimulats reconeixen també el DNA del ratolí. La malaltia del "lupus eritromatós" consisteix justament en el reconeixement del DNA per part dels anticossos del propi organisme.

2) Si el cló productor ja estava estimulat, vol dir que el ratolí estava afectat per aquesta o una altra malaltia autoimmune similar.

Sigui com sigui, la capacitat del sistema immune de generar anticossos anti DNA ja hi era abans de la immunització, fet que aparentment contradia la teoria de la selecció clonal ja que aquest tipus d'especificitat no s'hauria de produir mai. De totes maneres, es pot considerar que el fet que la soca de ratolí utilitzada (Balb/C) sigui isogènica fa que sigui propensa a presentar problemes d'aquest estil, de manera que un individu salvatge ("heterogènic") potser no pugui desenvolupar mai aquest tipus d'anticossos. Seria interessant, però, aprofundir més en aquesta qüestió.

La resta d'anticossos específics de nucli no han estat caracteritzats de manera que no es pot dir si reconeixen també DNA o si són específics de proteïnes nuclears.

23.3 - Tipus cel.lulars vs subtipus cel.lulars

Una de les primeres qüestions que sorgeixen quan s'observen les cèl.lules detectades pels anticossos obtinguts, és fins a quin punt els criteris moleculars per definir tipus cel.lulars s'adapten als criteris morfològics, definint criteris moleculars en aquest cas concret com la presència de determinants antigènics generals i/o exclusius. En la majoria dels casos, hi ha una absoluta concordança entre els dos criteris, però en d'altres hi ha discrepàncies aparents. Aquestes

resideixen en la definició de subtipus cel·lular. Si es defineix com un grup de cèl·lules que presenten, en un determinat moment, unes característiques que permeten diferenciar-les d'altres cèl·lules, però que tenen el mateix origen i en general, la mateixa funció i/o morfologia, aquesta discrepància desapareix.

En les observacions fetes amb aquest anticossos no hi ha sempre una correspondència entre els subtipus cel·lulars definits morfològicament i els definits molecularment. Aquesta aparent falta de correspondència sembla justificada en que els marcadors moleculars són més "sensibles" que els morfològics, en el sentit de ser molt més susceptibles a canvis d'expressió, de localització, d'estadi de maduració, etc. Es més, molts dels subtipus morfològics estan descrits com a precursors els uns dels altres (Baguña, 1973). Per tant, i juntament amb l'existència de MAb's que immunoreaccionen indistintament amb els diferents subtipus cel·lulars que constitueixen un únic tipus cel·lular, sembla lògic seguir considerant-los com a subtipus cel·lulars.

23.4 - Antigens de determinació vs antígens de diferenciació

Per antigen de diferenciació (desde el punt de vista d'aquest anàlisi molecular amb anticossos) s'ha entès aquell antigen que, estant present en cèl·lules diferenciades (madures), també es troba present en cèl·lules indiferenciades i/o en vies de diferenciació. Es pot citar, per exemple, el cas de l'antigen reconegut pel MAb TMUS-13 (neoblasts i cèl·lules musculars) i el reconegut pel MAb TEPI-46 (cèl·lules rabdítiques i epidèrmiques).

En canvi, aquells antígens que estiguessin presents en cèl·lules indiferenciades i solament en els primers estadis de diferenciació serien definits (des del mateix punt de vista anterior) com antígens de determinació (determinarien al neoblast cap a un destí concret).

De totes maneres, aquestes definicions són molt laxes i depenen de com s'entenguin les fronteres (si es que n'hi ha) entre determinació i diferenciació (Hall i Watt, 1989; Potten i Loeffler, 1990).

23.5 - Per què alguns tipus cel.lulars han generat pocs clons? El cas de les cèl.lules nervioses

Les cèl.lules nervioses han generat molt pocs clons específics, i la majoria d'aquests s'han detectat en fusions en que s'utilitzaven immunògens molt concrets: fraccions proteiques de cèl.lula nerviosa i fraccions cel.lulars enriquides en cèl.lula nerviosa. Per altra banda, i a diferència d'altres sistemes, no s'ha obtingut cap marcador de subpoblacions de cèl.lules nervioses, com les detectades per Dunne (1985) en hidra, o Masahiro (1992) en *Drosophila*, per exemple.

El baix nombre d'anticossos específics d'aquest tipus cel.lular, i sobre tot el no haver obtingut cap cló específic de subtipus de cèl.lules nervioses, ha estat un "handicap" per alguns treballs fets sobre sistema nerviós de planària (Burgaya, 1992), en els quals hagués estat interessant el poder-ne disposar. Amb la utilització de MAbs específics de poblacions de cèl.lules nervioses es podrien inferir dades sobre l'estructura i funcionalitat del sistema nerviós.

Hi ha varis motius pels que potser no s'hagin generat suficients clons:

1) Malgrat la presència en sistema nerviós de molècules exclusives d'ell, podrien trobar-se en quantitats suficientment baixes com per no ser capaces d'activar clons específics d'elles. Això pot tenir una especial importància en les hipotètiques subpoblacions de cèl.lules nervioses, ja que probablement els possibles marcadors d'elles no serien detectats en un gel SDS-PAGE per la dificultat d'aïllar "a priori" aquestes subpoblacions (Fujita, 1997).

2) Encara que alguna molècula estigués molt representada en les cèl.lules nervioses, podria tractar-se d'un haptè que no estimulés la formació de clons específics d'ella a no ser que anés acompanyada d'un "carrier" (i no s'ha fet cap immunització amb homogenat provinent d'un enriquiment en cèl.lules nervioses lligat a un "carrier").

3) Encara que els determinants antigènics de les hipotètiques poblacions de neurones estiguessin ben representats en elles, potser aquestes subpoblacions (si es que existeixen) són tant petites que aquests antigens no són suficients (i més si han de competir amb molècules altament immunogèniques) com per estimular la generació de clons específics.

23.6 - Per què alguns tipus cel.lulars no han generat cap cló específic i exclusiu d'ells? El cas del neoblast

Els neoblasts són l'únic tipus cel.lular contra el que no s'ha generat cap cló específic i exclusiu, encara que hi ha anticossos específics de cèl.lules diferenciades que reconeixen cèl.lules amb morfologia indiferenciada, com per exemple el MAb TMUS-13 (apartats 19.2.5, 20.1 i 24) o el MAb TCEN-49 (apartats 21.2 i 25). Quan s'examinin amb molt més detall tots els anticossos obtinguts, es trobaran probablement bastants més que presentin aquest patró de marcatge. Es pot considerar que les cèl.lules "indiferenciades" immunoreactives haurien començat el camí de la diferenciació o estarien a punt de fer-ho.

Per tant, únicament ens quedaria trobar un marcador específic de les autèntiques cèl.lules soca, totalment indiferenciades i indeterminades, capaces de donar tots els altres tipus cel.lulars.

Els intents realitzats per diversos grups de marcar els neoblasts amb nucleòtids tritiats o amb brom deoxiuridina (ja que els neoblasts són les úniques cèl.lules amb capacitat de divisió) no han reeixit. Amb la mateixa finalitat, i mentre s'estava escrivint aquesta Tesi, s'ha intentat trobar immunoreacció en els neoblasts amb anticossos comercials específics de ciclins (PCNA) Casaco i col., 1993). Les ciclins són antigens nuclears de proliferació cel.lular, proteïnes auxiliars de la DNA polimerasa delta (Miyachi i col., 1978; Bravo i Celis, 1985; Ten i col., 1986; Prlich i col., 1987), i que sols expressaran els neoblasts per ser les úniques cèl.lules de planària amb capacitat de ciclar. Les provatures fetes fins a l'actualitat no han estat exitoses.

Suposant l'existència d'aquesta subpoblació de neoblasts (Baguñà i col., 1990), i suposant que tingui determinants antigènics exclusius d'ella, pot haver diversos motius pels quals no s'hagi generat cap cló específic d'elles:

1) Malgrat els neoblasts representen un 20-30% del nombre total de cèl.lules de planària, tant sols representen un 4-6% del volum corporal, de manera que si s'utilitzen homogenats totals els determinants antigènics propis quedaran molt diluïts en el total.

2) La quantitat de citoplasma que presenten els neoblasts és molt minsa, i encara que s'utilitzin poblacions enriquides en neoblasts, el 20-30% de cèl.lules contaminants (apartats 7.2.5 i 22.1.1.3) fan que els antigens específics de neoblast es trobin molt diluïts.

3) Els possibles determinants antigènics dels neoblasts poden ser molècules amb una representació molt baixa (tipus receptors, per exemple) i/o ser molt poc immunogèniques i fins i tot haptens.

4) Aquests tres motius queden accentuats si considerem que els neoblasts poden ser una població heterogènia, formada per unes poques "stem cells" autèntiques i diferents subpoblacions de neoblasts en diferents estadis i/o en diversos camins de diferenciació (Baguñà i col., 1990; veure apartat 3, fig. 5), tal i com es pot despendre dels resultats obtinguts amb els MABs TMUS-13 i TCEN-49, ja que tots dos reconeixen cèl.lules amb morfologia de neoblasts. Si considerem les dades que es tenen en planària (Baguñà, 1973; Saló i Baguñà, 1984; Baguñà i col., 1990; Auladell, 1990) i les dades que es tenen amb altres sistemes similars, potser tant sols un 3-5% dels neoblasts siguin autèntiques cèl.lules soca (apartat 3). Extrapolant a la resta d'anticossos de que es disposa, el fet que el MAB TCEN-49 immunoreaccioni amb molts dels neoblasts de la regió central de l'organisme (apartats 21.2 i 25) i que el MAB TMUS-13 ho faci amb bastantes de les cèl.lules morfològicament indiferenciades que formen el primordi de la faringe (apartats 19.2.5 i 24; Espinosa, 1993), pot portar a considerar que el nombre d'autèntiques cèl.lules soca representaria una fracció molt petita del total de neoblasts. Així mateix, segons els teballs relitzats per Baguñà (1973, 1976, 1981), Saló (1984), Romero (1987), Romero i Baguñà (1988), Baguñà i col. (1989) i Baguñà i col. (1990), sembla molt més probable que sí existeixi una població, per reduïda que sigui, d'autèntiques "stem cells".

Per tant, els possibles determinats antigènics de les autèntiques cèl.lules soca estarien en un nombre molt reduït de cèl.lules i probablement amb poca quantitat, tant si són citoplasmàtics (ja que els neoblasts són cèl.lules amb una quantitat de citoplasma molt minsa, Baguñà 1973; Baguñà i Romero, 1981; Romero, 1987; Auladell, 1990), com si estan ancorats a membrana (per semblances a altres sistemes).

Cal plantejar-se la possibilitat, encara que remota, que no tinguin determinants antigènics exclusius. De fet, en patrons proteics diferencials fets amb gels 2D-PAGE entre cèl.lules diferenciades i neoblasts per Collet (1990), no s'observen proteïnes específiques de

neoblast sinó solament expressions diferents en algunes d'elles. Si això fos així, no tendria sentit seguir buscant marcadors exclusius d'autèntiques cèl.lules soca. De totes maneres el més probable es que tinguin algunes molècules exclusives, tals com receptors, mecanismes de transducció de senyals, ciclines, etc. (Fujita, 1987; Hall i Watt, 1989; Potten i Loeffler, 1990).

Es evident que seria molt útil poder disposar d'un marcador d'aquesta població de neoblats ja que podria ser utilitzat durant la regeneració, en l'estudi de llinatges cel.lulars, etc. A més a més, la molècula reconeguda tindria, probablement, un paper primordial en els processos de determinació/diferenciació dels neoblats, o de manteniment del seu estat indiferenciat "pur". Per aconseguir aquest marcador, s'estan obtenint a l'actualitat fraccions molt pures de neoblats separant les cèl.lules amb doble contingut de DNA (mesurat per marcatge fluorescent amb DAPI) per "cell sorter" mitjançant citofluorometria de fluxe (R. Romero, comunicació personal), ja que totes elles seran neoblats (les úniques cèl.lules a planària amb capacitat de divisió). Els resultats obtinguts fins ara són esperançadors, però cal tenir ben present les dificultats comentades en aquest apartat.

23.7 - Per què algunes estructures no han generat cap cló específic d'elles? El cas dels blastemes de regeneració

Cap de les immunitzacions fetes amb blastemes de diversos estadis de regeneració ha generat clons específics d'algun d'aquests estadis. En totes aquestes fusions, el crivellatge s'ha fet sobre organismes regenerants en el mateix estadi de regeneració de manera que si s'hagués generat un cló productor s'hauria hagut de detectar. Els motius pels quals no s'ha detectat cap determinant antigènic específic poden ser els ja esmentats en el cas de les cèl.lules nervioses i dels neoblats. Breument, aquests serien:

- antígens expressats en baixes proporcions, quedant "emascarats" per altres antígens més abundants
- antígens poc immunogènics, potser fins i tot haptens

A més a més, caldria afegir la possibilitat de que no s'haguessin triat correctament els estadis de regeneració. Aquesta tria s'ha fet en funció dels estadis on s'han detectat augments forts de síntesi de RNA i proteïna (Saló, 1984), amb la idea que seria més probable trobar molècules específiques d'estadis de regeneració després d'aquests pics de màxima síntesi, donat que aquestes es trobarien representades amb el seu màxim grau.

En alguna fusió es pot haver generat algun cló específic que detectés un determinant antigènic de territoris adults i que estigués absent del blastema de regeneració (com han aïllat, per exemple, Yang i col. (1992) en extremitats d'amfibis). En totes les fusions s'han generat clons productors d'anticossos que immunoreaccionen amb tots els teixits de planària, però en cap cas s'han fet reaccionar amb organismes regenerants per veure si l'antigen reconegut estava present o no en la zona del blastema.

En les fusions relitzades amb blastemes de regeneració es pretenia també aïllar clons específics de cèl.lules en diversos estadis de diferenciació (ja que en un blastema s'haurien de trobar cèl.lules en els diversos estadis de determinació/diferenciació) i de molècules implicades en el reestabliment del patró i de les diverses estructures i teixits (com per exemple molècules "guia"), com han fet en altres organismes, per exemple, Denburg i col. (1989), en neurones en creixement; Mcglade-Mcculloh (1990), en els primers estadis de desenvolupament neural en hirudinis; Synder i col., (1990), en la mateixa situació en aus; Vielmetter i col. (1991) i Paschke i col. (1992), en axons retinals de carpa en creixement.

Els motius pels quals no s'han detectat anticossos específics d'els diversos estadis de determinació/diferenciació cel.lular i de molècules implicades en el reestabliment d'estructures poden ser els mateixos que els comentats pels blastemes de regeneració.

Seria interessant poder disposar d'aquests marcadors per fer seguiments en regeneració, llinatges cel.lulars, establir diversos estadis moleculars de la formació i desenvolupament del blastema, etc., ja que ajudarien a entendre els mecanismes de desenvolupament i regeneració implicats en aquests processos. Per aconseguir-los, s'hauria de treballar, per exemple, amb electroforesis 2D-PAGE buscant antigens diferencials entre blastemes de regeneració i organismes no regenerants, de manera que si es continuessin fent fusions, probablement es podrien trobar alguns clons amb aquestes especificitats.

24 - TMUS-13, DE LA DIFERENCIACIO CEL.LULAR A LES DIFERENCIES FILETIQUES

24.1 - TMUS-13 reconeix un determinant antigènic específic de Filum

En les immunodeteccions fetes amb el MAb TMUS-13 en espècies de diversos Filums tant d'invertebrats com de vertebrats, s'observa que tant sols presenten immunoreacció les espècies pertanyents al Filum Platihelminthes, i en cap cas s'ha detectat immunoreacció en espècies d'altres Filums (nemertins, artròpodes, moluscs i vertebrats), assajant-se sobre musculatura llisa i estriada (en moluscs i vertebrats), cardíaca (en vertebrats) i llisa prèvia a l'aparició de l'estriada (nemertins i artròpodes).

Dels resultats obtinguts podem assumir que el determinant antigènic reconegut per TMUS-13 no és comú a tots el tipus de musculatura, ni tant sols a tota la musculatura llisa (el tipus de fibres presents a planària), sinó que es present a totes les espècies de platelmints, tant en organismes de vida lliure com en paràsits. Aquest fet és força interessant i a la llarga pot tenir aplicacions en la detecció de platelmints (especialment interessant en el cas dels paràsits) (Ayala, 1983).

L'antigen reconegut no forma part de les estructures contràctils de la fibra muscular sinó del sarcoplasma que les envolta, tal i com es desprèn de les immunotincions sobre cèl.lules macerades utilitzant com anticòs secundari un anticòs comercial lligat a or coloidal (veure apartat 19.2.5). Aquesta localització subcel.lular de l'antigen no és observable quan s'utilitzen anticòsos secundaris lligats a HRP (peroxidasa de rave), que proporciona un marcatge menys concret i que s'escampa per tota la fibra muscular.

24.2 - TMUS-13, marcador de la diferenciació dels neoblasts en cèl.lules musculars

El Mab TMUS-13 ha estat emprat en regeneració, de manera preliminar, per fer un seguiment de la contracció de la zona de la ferida prèvia a la cicatrització, en el que s'han corroborat els resultats obtinguts per Saló (1984) i M. Ribas (dades no publicades) sobre aquest procés. En les immunotincions fetes s'observa la forta contracció de la musculatura durant les primeres hores de regeneració, seguida d'un posterior relaxament de la mateixa un cop la ferida ha quedat coberta per l'epiteli cicatricial (Saló, 1984; Ribas i Baguñà, 1986).

Més interessant és que l'antigen reconegut per aquest MAb sigui present en neoblasts que s'estiguin diferenciant cap a cèl.lules musculars, fet ja esmentat per Espinosa (1993). Mercés aquest marcatge es pot establir que les cèl.lules musculars que formen la musculatura de la faringe durant la regeneració d'aquesta no provenen de cèl.lules musculars madures del parènquima circumdant sinó que es formen "de novo", per epimorfosi (veure apartat 2.2), a partir de neoblasts dins el primordi de la nova faringe (apartat 20.1).

Aquest marcatge planteja una sèrie de qüestions importants sobre els mecanismes de determinació/diferenciació cel.lular durant la regeneració així com sobre els models de llinatges cel.lulars:

- les cèl.lules morfològicament indiferenciades que expressen aquest antigen en el primordi de la faringe (format per acumulació de neoblasts que han migrat fins aquesta localització, Saló, 1984), estan ja determinades quan van a formar part del primordi de la faringe, o es determinen dins d'ell?

- aquestes mateixes cèl.lules, es van dividint abans de completar la seva diferenciació, o ja perden (o han perdut) la capacitat de divisió un cop expressen aquest antigen?

Amb estudis més exhaustius amb aquest i altres MAb es podran obtenir dades que permetin dilucidar, d'entre altres qüestions:

- quin dels models d'amplificació, determinació i diferenciació de la població de neoblasts és el predominant en planària (apartat 3) (1.- equivalència dels neoblasts del compartiment d'amplificació vs 2.-

llinatges definits desde la cèl.lula soca; Hall i Watt, 1989; Potten i Loeffler, 1990; Baguñà i col., 1990)

- els neoblasts que formen els blastemes de regeneració són autèntiques cèl.lules soca (segons la definició de l'apartat 3) o molts d'ells estan ja determinats a algun tipus cel.lular concret i es troben dins el compartiment d'amplificació.

25 - LES RESTRICCIONS MOLECULARS REGIONALS A PLANÀRIA

25.1 - Les regions de planària

El cos de planària ha estat tradicionalment dividit en cinc regions en funció de criteris morfològics (Bronsted, 1969; Baguñà, 1973): cefàlica, prefaríngia, faríngia, postfaríngia i caudal (apartat 21.2.1, fig. 48). Els criteris morfològics emprats per l'establiment d'aquestes regions són la presència d'estructures identificables com la faringe i els ganglis cefàlics (que donarien la regió cefàlica i la faríngia), la proximitat a alguna de les estructures abans esmentades (que donarien la regió pre i postfaríngia), i per exclusió la regió caudal. Aquests criteris morfològics, tret potser de la faringe, deixen un ampli marge en la definició dels límits entre elles.

Aquestes regions presenten un transfons detectable durant els fenòmens de regeneració, creixement i decreixement (Baguñà, 1973, Saló, 1984), basat, d'entre altres factors, en el percentatge de cèl.lules indiferenciades respecte les diferenciades (més alt a les regions pre i post-faríngia). De totes maneres, cal plantejar-se fins a quin punt les diferències morfològiques observades entre elles són degudes a una expressió diferencial de determinades molècules (o a l'activitat de determinats gens) en aquestes regions concretes, o bé si aquestes activitats gèniques diferencials actuen entre uns límits diferents als establerts per aquestes regions per manifestar-se després en forma de les diferències regionals observades.

L'antigen detectat pel MAb TCEN-49 és el primer d'àmbit regional detectat a planària (i l'únic fins a l'actualitat). La detecció d'aquest antigen regional, definit segons els criteris de l'apartat 9.1, representa la primera dada molecular de diferències regionals a planària. La regions determinades per la presència/absència de TCEN-49Ag no coincideixen amb les definides per criteris morfològics, ja que la regió central comprèn tota la regió faríngia, part de la prefaríngia i part de la postfaríngia. Malgrat la discrepància, aquests dos criteris (molecular i morfològic) no són mutuament excloents. Ben al contrari, es complementen ja que representen nivells d'observació diferents i a la vegada íntimament relacionats.

25.2 - Creixement i decreixement: canvis en les proporcions regionals

Els canvis en les proporcions regionals observats en els territoris definits molecularment durant el creixement i decreixement de l'organisme coincideixen amb els observats en les regions definides morfològicament (Baguñà, 1973). D'aquesta manera, la regió anterior (molecular) mostra una alometria negativa igual que la cefàlica i la prefaríngia (morfològiques) (veure la fig. 48 de l'apartat 21.2.1 per les equivalències entre les regions); la regió posterior (molecular) la mostra positiva igual que la regió postfaríngia i caudal (morfològiques); i la regió central (molecular) la mostra negativa però menys acusada que l'anterior, fruit de la combinació de la part de regió prefaríngia i de la faríngia (amb alometries negatives) i de la part de la postfaríngia (amb alometria positiva) que comprèn dins d'ella (morfològiques totes tres).

Una de les claus de la presència d'alometria positiva en la regió posterior de planària durant el creixement resideix en el fet de que la taxa de proliferació cel.lular és més alta en aquesta regió que en les més anteriors (Baguñà, 1973; Romero, 1987), de manera que quan la planària creix té tendència a fer-ho per aquesta regió més que per les altres. Aquesta regió, que mostra una major capacitació de créixer, coincideix amb la zona on es produeix la fissió durant la reproducció de les races asexuals. La fissió es produeix sempre en la regió postfaríngia aproximadament en el límit entre la regió posterior i la central.

Durant el creixement de l'organisme, els límits anterior i posterior de la regió central es desplacen en sentit postero-anterior, i durant el decreixement ho fan antero-posteriorment, com a conseqüència de les alometries observades (o sent la seva causa). Això significa que aquests límits són molt sensibles i podrien ser un reflex dels canvis de valors posicionals al llarg de l'eix a/p durant el creixement i decreixement.

La correspondència en les alometries observades entre les regions determinades morfològicament i molecular, com a reflex d'un valors posicionals (sigui quina sigui la forma en que vinguin donats), indiquen que tant el patró d'estructures com el patró molecular comparteixen al menys una part dels mecanismes de manteniment del patró, probablement formant part de la mateixa xarxa de processos.

25.3 - L'expressió de TCEN-49Ag en organismes intactes

L'expressió de TCEN-49Ag en organismes intactes es dona entre uns límits molt ben definits (apartat 21.2.1, fig. 47 i 49), no detectant-se mai presència d'aquesta molècula fora d'ells. No s'observa cap estructura morfològica que els justifiqui, de manera que es necessari suposar que els mecanismes que mantenen la restricció espacial de l'antigen han d'actuar d'una manera molt fina.

Dins els límits esmentats, la localització del marcatge és força heterogènia en totes les tècniques utilitzades (seccions en parafina, semifines, ultrafines i macerats cel·lulars, apartat 21.2, figs. 47, 49, 52, 53 i 55):

- hi ha una forta immunoreacció dins les vesícules de secreció de les cèl·lules secretores cianòfiles de tipus 2 (Baguñà 1973) (fig. 55 A, B, C i D), de manera molt més intensa que en la resta d'estructures immunoreactives;

- s'observa marcatge en la matriu extracel·lular (fig. 55 E i F) en forma de gradient decreixent amb inici en les proximitats de les cèl·lules cianòfiles de tipus 2. S'ha detectat secreció interna (en matriu extracel·lular) d'aquest antigen per part d'aquestes vesícules secretores (fig. 55 C i D);

- s'ha detectat marcatge molt a prop de la cara externa de la membrana cel·lular o associat a ella (fig. 55 G i H).

- està present en vesícules poc electrodenses (fig. 55 I i J), probablement de naturalesa glucídica i/o amb glucoderivats, en el citoplasma de tots els altres tipus cel·lulars amb representació en la regió central (excepte cèl·lules epitelials);

- hi ha immunoreacció en la cara interna de la membrana nuclear de tots els tipus cel·lulars amb representació dins la regió central inclosos els neoblasts (excepte les cèl·lules epitelials), associat sempre a heterocromatina (fig. 55 K i L).

Discussió

La detecció de TCEN-49Ag d'una manera tant heterogènia es pot explicar de diverses maneres:

- considerant que és una molècula amb funcionalitat extracel.lular (punts 1 i 2)
- considerant que és una molècula amb funcionalitat nuclear (punts 3 i 4)

1) Podria tractar-se d'una molècula amb funcionalitat extracel.lular (p.e. d'adhesió cel.lular, unint-se a determinats factors de creixement, etc., tal i com actuen alguns proteoglicans i glucoproteïnes; veure Wight i col., 1992, per a una revisió general; fig. 70 A) que fos secretada per un determinat tipus cel.lular secretor, de manera que romangués activa en matriu extracel.lular com a "balisa" indicadora de posició o bé que fos reconeguda per algun receptor de membrana amb una finalitat semblant. En aquest cas, el marcatge en vesícules poc electrodenses i en nucli seria degut a reacció creuada de l'anticòs amb altres molècules (entenent per reacció creuada el reconeixement per part de l'anticòs de molècules diferents per la similitut d'algun dels seus determinants antigènics).

Aquest model estaria en concordança amb el fet que no es detecta cap banda clara en Western-blot fet a partir de nuclis aïllats (fig. 66), observant-se tant sols una petita immunoreacció, quasi inapreciable, en la zona de 4500 Da (on es detecta TCEN-49Ag). Aquesta banda es podria explicar per la presència d'algunes vesícules de secreció contaminants durant el procés d'aïllament de nuclis. De tota manera, no es detecta mai marcatge nuclear fora de la regió central, de manera que aquesta reacció creuada s'hauria de donar amb una molècula present tant sols en la regió central, amb els mateixos límits d'expressió que TCEN-49Ag i que no es detecta en Western-blot.

2) Podria tractar-se d'una molècula amb funcionalitat extracel.lular que fos secretada en grans quantitats per un determinat tipus cel.lular (cèl.lules secretores cianòfiles) i en quantitats més modestes per la resta de tipus cel.lulars, actuant com el cas descrit anteriorment. En aquest cas el marcatge en vesícules poc electrodenses correspondria a la secreció dels altres tipus cel.lulars, mentre que les cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2 la secretarien a partir de les seves vesícules de secreció característiques. D'aquesta manera, el marcatge en nuclis seria una reacció creuada amb un altre molècula.

3) Podria tractar-se d'una molècula amb funcionalitat nuclear (p.e. un factor de transcripció), que fos sintetitzada per cada cèl.lula i transportada fins a nucli mitjançant les vesícules poc electrodenses. En aquest cas, el marcatge en cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2 seria degut a una reacció creuada de l'anticòs amb alguna altra molècula.

En contra d'aquest model estaria el fet que no es detecta immunoreacció en cèl.lules cianòfiles de tipus 2 fora de la regió central, de manera que aquesta reacció creuada s'hauria de donar amb una molècula present tant sols en la regió central, amb els mateixos límits d'expressió que TCEN-49Ag i que no es detectaria en Western-blot. Així mateix, es difícil explicar que no es detecti la presència d'antigen en Western-blot en nuclis aïllats i sí en extracte total de regió central, havent-se detectat un marcatge immunohistoquímic similar a nivell de nuclis i de vesícules poc electrodenses. A més a més, no concorda amb les observacions de marcatge en cèl.lules secretores de regió (o futura regió) central en organismes regenerants.

4) Podria tractar-se d'una molècula amb funcionalitat nuclear, que fos sintetitzada per un tipus cel.lular concret (en aquest cas per les cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2), i que mitjançant difusió per matriu extracel.lular arribés a les cèl.lules diana on seria internalitzada, intacte o bé modificada, i transportada per vesícules fins al nucli, el seu destí final (fig. 70 B).

Hi ha un model semblant a aquest, descrit per Busch i col. (1992) i per Wight i col. (1992), en el qual la molècula (un proteoglicà) és processada a nivell extern de la membrana cel.lular per receptors de membrana i molècules associades, internalitzant-se únicament la fracció glucídica (fig. 70). Segons aquests autors, la fracció internalitzada actuaria a nivell nuclear com a regulador de factors de transcripció, unint-se a ells.

La majoria dels resultats obtinguts concordarien amb aquest model:

a) TCEN-49Ag és una molècula amb una fracció proteica (com es desprèn del tractament amb pronasa E i la tinció amb Ponceau S, apartat 21.6) i amb una fracció glucídica (com es desprèn dels tractaments amb Endo H, Endo F i del marcatge amb digoxigenina amb el "DIG glycan detection kit", apartat 21.6). Es tracta per tant d'una glucoproteïna o d'un proteoglicà.

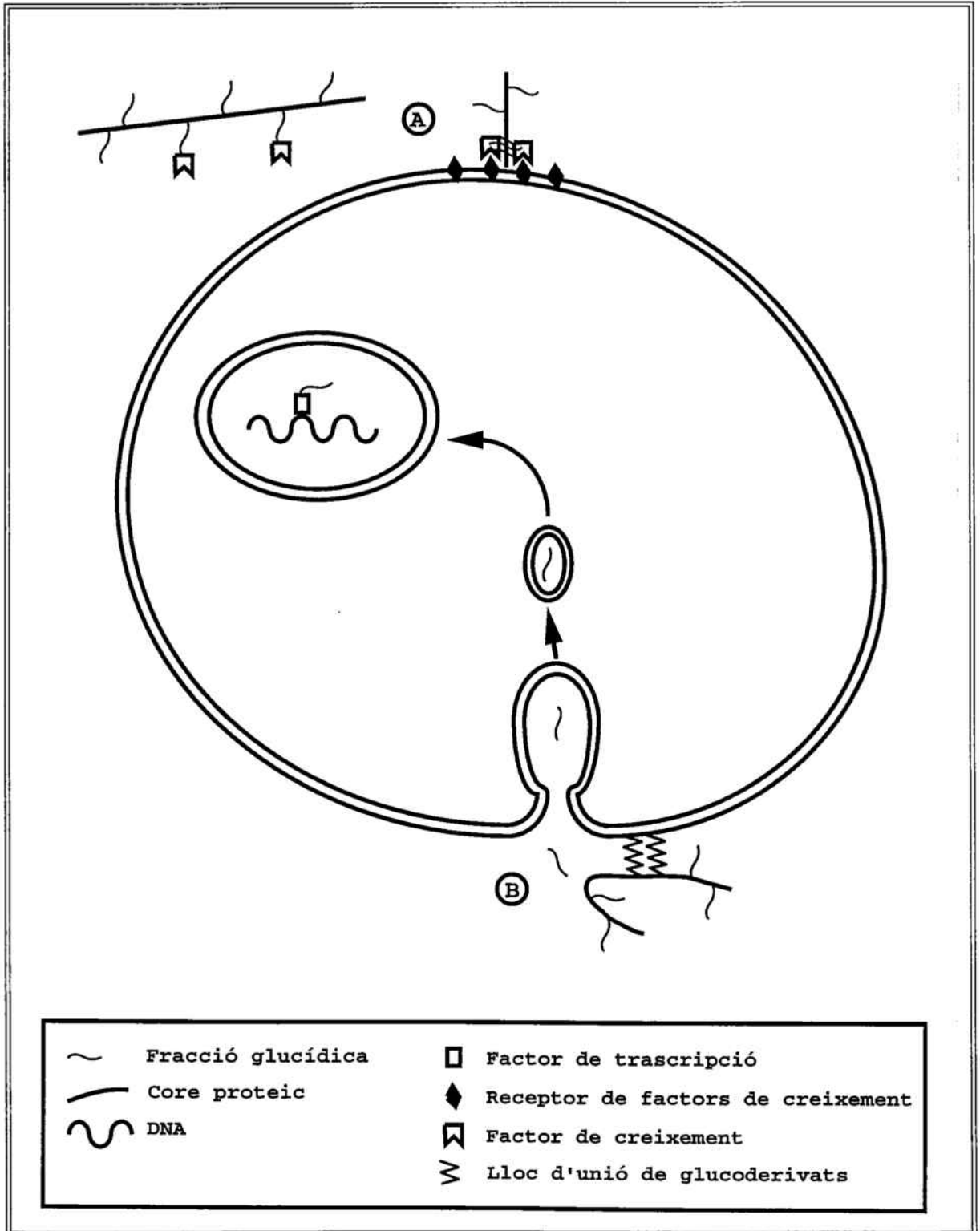


Fig. 70: Model d'actuació de glicoderivats com a moduladors de factors de creixement i de factors de transcripció. Adaptat de Wight i col., 1992. A) unió de glicoconjugats a factors de creixement per cooperar en la seva unió a receptors o per competir amb aquests. B) unió de la fracció glucídica processada provinent de glicoconjugats a factors de transcripció per modular la seva activitat.

b) L'epítop reconegut és conformacional (com es desprèn dels efectes dels gels SDS-PAGE desnaturalitzants i renaturalitzats, apartat 21.6) i es conserva parcialment quan la mostra es tractada amb pronasa E (dot-blot, apartat 21.6). Per tant, la fracció glucídica es reconeguda per TCEN-49 encara que potser amb una afinitat menor. El fet que les mostres tractades amb pronasa E no siguin detectades en Western-blot es degut a que la fracció glucídica no migra bé en un gel SDS-PAGE (però si queda fixada en un dot-blot).

c) El model s'ajusta a la distribució de la immunoreactivitat observada amb TCEN-49 (vesícules secretores, matriu extracel.lular i nucli; apartat 21.2).

d) En extractes de nuclis aïllats es detecta solament una petita banda, quasi inapreciable, a 4500 Da que es pot interpretar com a contaminació provinent d'algunes vesícules de secreció durant el procés d'aïllament de nuclis. Això és el que s'esperaria observar si solament la fracció glucídica fos internalitzada.

e) En organismes regenerants, les primeres cèl.lules que expressen TCEN-49Ag (tant si el marcador ha d'aparèixer "de novo" com quan s'expansiona la regió central) són sempre cèl.lules secretores cianòfiles, detectant-se posteriorment immunoreacció a la resta de teixits (apartat 21.4). Això és el que tal s'esperaria si l'antigen fos secretat per un sol tipus cel.lular per actuar sobre la resta de teixits.

f) En organismes en que s'altera el patró regional mitjançant àcid retinoic (apartat 21.5), el desplaçament cap a posicions més anteriors que experimenta el límit posterior de la regió central es veu iniciat per la desaparició de marcatge en cèl.lules cianòfiles, seguit de la desaparició en matriu extracel.lular i, finalment, en nucli. Si considerem que l'efecte observable d'aquest agent químic sobre TCEN-49Ag és la inhibició de la seva síntesi (apartat 25.5) (sigui quina sigui la base del fenomen), l'ordre en la desaparició del marcatge indicaria la direcció de la difusió i transport de TCEN-49Ag.

g) La massa molecular aparent de TCEN-49Ag (4500 Da, apartat 21.6) és adequada per suposar que difon per matriu extracel.lular per arribar a totes les cèl.lules de la regió central.

h) Les cèl.lules cianòfiles de classe 2 (que sintetitzen TCEN-49Ag) estan repartides per tota la regió central, de manera que TCEN-

49Ag podria arribar a totes les cèl.lules d'aquesta regió. Just a la frontera entre regions ja no hi ha cèl.lules que el sintetitzin, establint-se així el límit entre elles. El fet que en el límit no hagi cèl.lules cianòfiles secretant l'antigen explicaria la disminució del marcatge en aquesta zona, la qual cosa permetria observar clarament la immunoreacció en nuclis (apartat 21.2.1).

Les discrepàncies observades respecte el model proposat (Fig. 70; Busch i col., 1992; i Wight i col., 1992, entre d'altres) radiquen bàsicament en que les molècules descrites per aquests autors, i que podrien seguir un model com aquest, tenen totes una massa molecular aparent de més de 20 kDa, sent aquesta més de 5 vegades superior a la de TCEN-49Ag. La massa molecular aparent de TCEN-49Ag (4500 Da) podria resultar insuficient tenint en compte la complexitat que solen mostrar les glicoproteïnes i proteoglicans implicats en aquest processos, però s'ha demostrat que té la mateixa naturalesa i potser no cal, en aquest cas concret, tanta complexitat estructural.

Encara que aquest darrer model sigui molt atractiu, tant per la correlació amb les dades de que es disposa com per la novetat que representa, s'ha de prendre amb molta precaució fins que no es comprovi o, al menys, es pugui disposar de més dades.

25.4 - Evolució de l'expressió de TCEN-49Ag en organismes regenerants

L'evolució de l'expressió de TCEN-49Ag en organismes regenerants depèn del nivell de tall a que s'hagin obtingut:

1) En regenerants cefàlics obtinguts a nivell E i en regenerants caudals obtinguts a nivell A (fig. 71), la regió immunoreactiva apareix "de novo" seguint una seqüència distoproximal (de posicions més properes a la zona de la ferida i del blastema a posicions més allunyades). Les primeres cèl.lules immunoreactives es detecten a 1.5 dies de regeneració en els regenerants E i als 4-5 dies en els regenerants A (apartat 21.4, fig. 57).

El major període de temps necessari per l'aparició de cèl.lules immunoreactives en regenerants de nivell A es pot correlacionar amb el menor nombre de neoblasts que hi ha a la regió cefàlica comparat amb

els de la regió caudal (Baguñà, 1973; Saló, 1984) i que pot suposar una major dificultat pel regenerant per regenerar les estructures. A més a més, això podria influenciar i/o venir influenciat pels mecanismes de formació del patró, els quals podrien necessitar més temps per establir els nous valors posicionals en aquesta regió de l'organisme (fig. 72 i 73).

2) En els regenerants obtinguts en els nivells C, D i F (apartat 21.4, fig. 57; fig. 71) la regió immunoreactiva es modifica per adaptar-se als nous valors posicionals establint una nova regió central proporcionada i posicionada correctament en funció de les noves dimensions de l'organisme. Els canvis són més radicals com menys tros de la regió central es conserva en el regenerant, ja que l'establiment del nou patró d'estructures implica una major reestructuració dels valors posicionals en un menor territori preexistent (en el model de regeneració proposat per planària, epimòrfic-morfalàctic (Saló, 1984), part de les estructures, com la faringe, es formen en territoris preexistents (per morfalaxi, veure apartat 2.2), i part de les estructures, com els ganglis cefàlics, es formen dins el blastema de regeneració (per epimorfosi, veure apartat 2.2)).

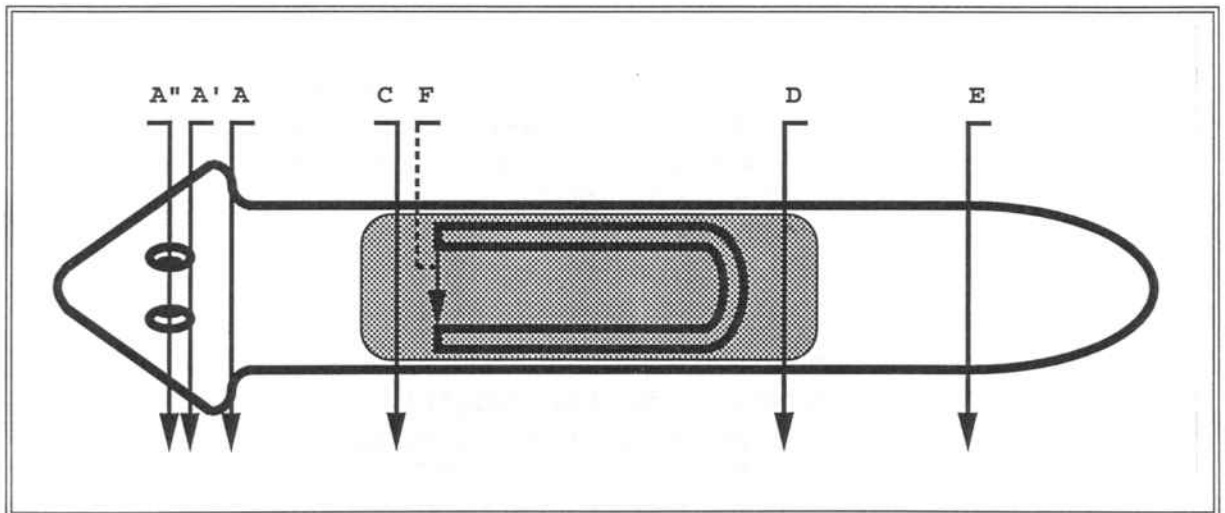


Fig. 71: Esquema dels nivells d'obtenció de regenerants. Reproducció de la figura 7 (apartat 2.2) on s'ha incorporat el territori immunoreactiu a TCEN-49 per facilitar el seguiment de la discussió.

Dins d'aquests darrers, potser els regenerants més informatius són els de nivell D: en ells s'observa un desplaçament anteroposterior (distoproximal) de la immunoreacció desde la localització inicial fins a la zona on s'ha de formar la nova regió central. Aquest desplaçament pot ser interpretat com el reajustament dels valors posicionals per desplaçament dels valors ja existents.

En els regenerants caudals obtinguts a nivell C i en els regenerants cefàlics obtinguts a nivell D la regió central s'expandeix seguint una seqüència proximodistal (i per tant postero-anterior en el regenerant C i antero-posterior en el D, apartat 21.4, fig. 57). En tots dos casos, el marcatge es situa dins la zona on es comença a formar el primordi de la faringe cap als 2 dies de regeneració.

En tots els regenerants, la detecció del marcatge en la localització definitiva de la regió central és coetània amb la formació del primordi de la faringe i es produeix sobre aquest. Aquesta simultaneïtat pot indicar que els dos successos depenen d'un mateix fenomen (el de reestabliment del patró) que es troba en la seva base, o bé que TCEN-49Ag es sintetitza induït per les estructures de faringe. En els regenerants F, on s'ha seccionat únicament la faringe i part de la prefaringe, no s'observa cap modificació en l'expressió de TCEN-49Ag. Per tant es pot suposar que l'aparició del primordi de la faringe i la detecció del marcatge en la localització definitiva de la regió central són successos independents entre ells però gairebé coetanis i dependents d'un mateix substrat posicional.

En els regenerants E, la primera cèl.lula immunoreactiva detectada està situada dins l'incipient primordi de la faringe (acumulació de cèl.lules indiferenciades), i es dona en una cèl.lula que aparentment ja no té la morfologia de neoblast, però tampoc té la morfologia de cèl.lula secretora cianòfila (apartat 21.4, fig. 58). Adquireix la morfologia de cèl.lula madura 24 hores després. Per tant, es pot dir que aquesta primera expressió de TCEN-49Ag es dona en cèl.lules que podrien estar en procés de diferenciació. En canvi, i a l'igual que en els regenerants en que es conserva part de la regió central (C i D), l'expansió de les cèl.lules immunoreactives es produeix en cèl.lules secretores cianòfiles ja madures.

L'aparició de cèl.lules immunoreactives i els canvis en l'expressió de TCEN-49Ag durant la regeneració es produeixen en intervals molt curts de temps, en moltes ocasions inferiors a les 12 hores, indicant que l'expressió d'aquesta molècula és molt sensible als canvis de valors posicionals al llarg de l'eix a/p, sent per tant un bon marcador per seguir els canvis d'identitat posicional de la regió central del cos.

25.5 - "Posteriorització" de planària amb àcid retinoic

La utilització d'àcid araquidònic (AAq) i/o diacil glicerol (DG), descrits per Müller i col. (1993) com agents químics que provoquen increments en els valors posicionals per acció sobre proteïna quinasa C en hidra, no ha provocat cap modificació morfològica ni molecular (de TCEN-49Ag) detectable. Aquesta manca de modificacions pot ser deguda a varis factors:

- no haver emprat les dilucions més adients
- haver fet tractaments massa curts
- haver fet polsos massa curts
- manca de penetrabilitat de l'AAq i el DG
- que aquests agents químics no tinguin efectes en planària (al menys sobre la morfologia d'aquest organisme i sobre l'expressió de TCEN-49Ag)

L'agent químic que sí ha provocat modificacions en l'expressió de TCEN-49Ag ha estat l'àcid retinoic (AR). Els efectes de l'AR van ser descrits inicialment per Dencker i col. (1990) en ratolí, Utsumi (1990) en rata i Ferreti i col. (1991) en pollet, com a morfogen exogen. Wanek i col. (1991), Noji i col (1991) i Tamura i col. (1993) entre d'altres, descriuen la seva actuació en extremitats de pollet induint la formació de ZPA (cèl.lules amb activitat polaritzant amb localització posterior) en zones anteriors. Aquestes ZPA ectòpiques provoquen l'aparició de duplicacions anteroposteriors de dígit, actuant per interaccions cèl.lula-cèl.lula (Bryant i Gardiner, 1992).

L'efecte produït per l'AR en planàries intactes pot ser definit com de "posteriorització", ja que el límit posterior de la regió central es desplaça a posicions més anteriors fent que augmenti el volum ocupat per la regió posterior, sense que s'observi, amb les dosis subministrades i amb la durada del tractament realitzat, canvis en la posició de la faringe ni cap variació tissular ni cel.lular aparent. Amb les dades obtingudes és massa aventurat discutir sobre els mecanismes pels quals actua l'AR, si ho fa induint zones d'activitat polaritzant ectòpiques, si actua com a morfogen (encara que a pollet s'ha demostrat que no és aquest el mecanisme d'actuació; Bryant i Gardiner, 1992), o si ho fa per altres mecanismes.

En planàries regenerants és encara més difícil extreure cap conclusió, ja que no tant sols TCEN-49Ag apareix amb un considerable retard (apartat 21.5), sinó que a més a més es produeixen malformacions en el regenerant que dificulten el seguiment del marcatge.

De totes maneres, queda demostrat que l'AR té efectes observables sobre planària, quedant com un camí obert que pot aportar dades interessants sobre els mecanismes d'establiment i manteniment del patró.

25.6 - Inferències sobre la possible funció de TCEN-49Ag

Amb totes les dades obtingudes sobre la naturalesa i expressió de TCEN-49Ag es pot dir que és un antigen d'expressió regional, que dóna identitat posicional a les cèl.lules de la regió central, i que és molt sensible als canvis de valors posicional al llarg de l'eix a/p responent ràpidament i precisa a ells. Aquestes característiques fan pensar que es tracte d'un antigen implicat en la funció de donar identitat posicional a les cèl.lules i estructures de la regió central, com una manera de "diferenciar-les" dels mateixos tipus cel.lulars que resideixen en les altres regions de l'organisme.

Aquesta identitat posicional vindria donada per la interacció de TCEN-49Ag amb molècules de les cèl.lules immunoreactives per TCEN-49. La interacció es podria donar:

- amb receptors de membrana (veure Wight i col., 1992, per a una revisió general)

- per interacció amb determinats factors de creixement, com descriuen per glucoderivats Yamaguchi i col. (1990) i Ruoslathi i Yamaguchi (1991) entre d'altres (veure Wight i col., 1992, per a una revisió general).

- amb molècules de localització nuclear. En aquest cas, fins i tot podrien interactuar directament amb factors de transcripció, modificant-los. Mecanismes com aquest han estat descrits per determinats glucoderivats (Jackson i col., 1991; Busch i col., 1992; Wight i col., 1992, per a una revisió general).

S'ha detectat la presència de TCEN-49Ag en races sexuades de *Dugesia(G)tigrina* i en *Dugesia(S)polichroa*. La presència d'aquest antigen regional en més d'una espècie indica el paral·lelisme existent en els mecanismes d'identitat posicional entre diferents espècies de planària. No s'ha detectat en cap de les altres espècies on s'ha assajat: *Dugesia(S)mediterranea*, *Dugesia(D)ibèrica*, *Dugesia(D)gonocephala*, *Dendrocoelum lacteum*, *Planaria torva*, *Discocelis tigrina* (apartats 6.1 i 21.2). Això pot ser degut a que tant sols aquestes dues espècies expressen TCEN-49Ag, o bé a que l'epítot reconegut per TCEN-49 no està conservat en totes les espècies.

Una tercera possibilitat introdueix una qüestió important. **Per què TCEN-49Ag s'expressa en organismes intactes i no tant sols en regenerants?** Fins a cert punt seria lògic pensar que sols s'expressés en organismes regenerants o durant el desenvolupament embrionari, situacions en les quals cal un posicionament molt exacte de les estructures. Podria ser que en la resta d'espècies on s'ha assajat sols s'expressés en aquestes condicions, com descriu Denburg (1989) en la regeneració de neurones d'escarabat, McGlade-McCulloh (1990) en el desenvolupament neural de sangonera, Synder i col. (1990) en regeneració de nervis perifèrics d'aus o com la glicoproteïna de matriu extracel·lular descrita per Klatt i col. (1992) en les proximitats de les cèl·lules indiferenciades en la regeneració d'extremitats de tritó, entre molts d'altres.

L'expressió en organismes adults (no regenerants) es pot justificar considerant que és una molècula necessària durant tota la vida de l'organisme per activar i/o inhibir determinats programes gènics específics regionals per interacció amb altres molècules com les decrites anteriorment (factors de transcripció, factors de creixement, etc.).

Una solució a aquest problema passa per la generació d'anticossos policlonals (treball en curs) que reconeguessin més d'un determinant antigènic i per tant permetessin detectar TCEN-49Ag en les diferents espècies de planària.

25.7 - Implicacions sobre la formació i manteniment del patró axial a planària

25.7.1 - La formació del patró axial

El model més recent de formació del patró proposat a planàries és el model mixte epimòrfic-morfalàctic (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984), que incorpora elements de tots dos models encara que, tal i com es comenta a la Introducció, potser no hi ha diferències tant clares entre el model epimòrfic i el morfalàctic com tradicionalment s'ha pensat (Espinosa, 1993). Aquest model mixt es caracteritza per suposar un mecanisme de determinació territorial ràpid i seqüencial en sentit disto-proximal que es duria a terme pràcticament sense proliferació (morfalaxi), i seria ampliat, modulad i refinat per proliferació i diferenciació amb l'aparició del blastema de regeneració (epimorfosi).

Els resultats obtinguts en organismes regenerants en els que no es conserva cap tros de regió central (nivells A i E) i en els que s'ha de regenerar totalment una de nova (i per tant s'han de definir de nou els valors posicionals corresponents a aquesta regió), el marcatge inicial amb TCEN-49 apareix en el límit més proper a la ferida de la futura regió central (anterior en regenerants de nivell E, i posterior en els de nivell A). Aquest marcatge es va ampliant seguint sempre una seqüència disto-proximal (es a dir, antero-posterior en regenerants de nivell E i postero-anterior en regenerants de nivell A), corroborant el model proposat (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984).

En els regenerants en què es conserva part de la regió central (nivells C i D), i en els que solament s'ha de resituar i ampliar la nova regió central (i per tant al menys alguns dels valors posicionals corresponents a aquesta regió no s'han de definir de nou sinó que tant sols s'han de recolocar), l'ampliació del marcatge obtingut amb TCEN-49 també es fa sempre en sentit proximo-distal (es a dir, antero-posterior en regenerants cefàlics de nivell D i postero-anterior en regenerants caudals de nivell C). D'aquesta manera, el límit proximal de la regió central queda pràcticament fixat des del reposicionament (de fet, aquest límit encara s'ajustarà una mica en el decurs de la regeneració, però no representa ni el 10% de l'ampliació del marcatge en sentit disto-proximal).

L'aparició del marcatge amb TCEN-49 en la regeneració de nivell E i els reposicionaments del marcatge experimentats en la regeneració de nivells C i D en etapes molt primerenques de la regeneració suposen una confirmació del mecanisme ràpid de determinació territorial inicial que proposa el model epimòrfic-morfalàctic (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984).

25.7.2 - Els neoblasts de la regió central

En les immunotincions de seccions ultrafines s'observa marcatge amb TCEN-49 en la cara interna de la membrana nuclear associat a heterocromatina en els neoblasts (marcatge descrit i il·lustrat a l'apartat 21.2). Degut a la poca presència de marcatge observat no és possible afirmar que tots els neoblasts de la regió central siguin immunoreactius per TCEN-49 (i per tant tots tinguin TCEN-49Ag) o que alguns no ho siguin (suposant que el marcatge nuclear no sigui degut a una reacció creuada). Segons les observacions fetes, en el cas d'haver neoblasts no immunoreactius aquests representen una minoria.

Per tant cal plantejar-se si la presència de TCEN-49Ag en neoblasts implica que estiguin determinats a neoblasts de regió central. Si considerem que ho estan (i per tant estarien determinats a donar cèl·lules i estructures pròpies de regió central), TCEN-49Ag podria estar actuant sobre altres molècules nuclears com un senyal posicional, fent que s'activessin o inhibissin determinats programes gènics específics d'aquesta regió. El fet que durant la regeneració desaparegui el marcatge observat en ells (ja que passarien a formar part de la regió anterior o posterior segons els casos durant el reposicionament del patró axial) implicaria fenòmens de transdeterminació d'aquests neoblasts. Si alguns neoblasts de la regió central fossin TCEN-49Ag(-), aquests podrien representar el compartiment de veritables cèl·lules soca (Hall i Watt, 1989; Potten i Loeffler, 1990; Baguñà i col., 1990).

En canvi, si considerem que la presència de TCEN-49Ag no significa una determinació dels neoblasts de la regió central sinó tant sols un mecanisme que dona identitat a les cèl·lules d'aquesta regió (incloent els neoblasts), no cal suposar fenòmens de transdeterminació per explicar els resultats observats. En aquest cas es podria considerar que TCEN-49Ag estaria regulant la determinació i diferenciació dels neoblasts de manera que, durant el renovament

cel.lular constant de planària, els neoblasts de regió central donarien lloc a cèl.lules diferenciades típiques de regió central i no d'altres regions de l'organisme.

Sigui com sigui, potser caldria considerar les regions moleculars de l'organisme com les unitats d'estructuració a nivell funcional del patró de planària.

25.7.3 - La regulació de l'expressió de TCEN-49Ag

En la majoria d'organismes en què s'han descrit molècules implicades en la determinació, formació i manteniment del patró s'han trobat gradients de substàncies i/o expressions gèniques diferencials entre les diferents regions (segments, àrees, zones, etc.) dels organismes.

En els casos en què s'han descrit gradients de morfògens, aquests actuen activant diferents programes gènics en funció de la seva concentració. Dins d'aquests es pot citar, per exemple, els gradients de morfògens descrits a *Drosophila* que actuen induint respostes diferents en funció de les diferents concentracions del morfogen (Struhl i col., 1992, amb el gradient de *hunchback*; Liaw i Lengyel, 1993, amb *bicoid*; Govind i col., 1993, amb *dorsal* i *cactus*, entre les publicacions més recents), o les descripcions fetes per French i Brackefield (1992) en les taques oculars de les ales de les papallones.

En els casos en que s'han descrit expressions gèniques diferencials actuant com mecanismes de determinació i formació del patró, la majoria de gens implicats contenen seqüències homeòtiques (McGinnis i Krumlauf, 1992). S'han aïllat (i es segueixen aïllant) un alt nombre d'aquests gens en organismes molt diversos, tant en vertebrats (Forhman i col., 1990; Holland, 1992, per a una revisió general), com en invertebrats (Bürglin i Rivkun, 1993, i Wang i col., 1993, en *C. elegans*, on 3 d'aquests gens determinen el destí cel.lular de les cèl.lules de tres regions (central, posterior i caudal); Nardelli-Haeffliger i Shankland, 1992, on descriuen un gen homòleg a Ubx i abd A amb expressió en els segments centrals de sangonera; Shenk i col., 1993, en hidra; i els clusters clàssicament descrits a *Drosophila*, on es pot citar p.e. la descripció d'un gen amb homeobox que dona identitat central en l'embrió feta per Huang i Dawid, 1990, entre molts d'altres. Veure Bürglin, 1993, per a una revisió general).

En moltes d'aquestes expressions gèniques diferencials no es coneix què o com es provoca aquesta expressió diferent.

Finalment, s'han descrit models teòrics i teòric-experimentals de la formació del patró axial d'estructures per interaccions cèl.lula-cèl.lula entre regions frontera. Dins d'aquests es pot citar, per exemple, les descripcions fetes per Maden (1977) en extremitat d'amfibi, o les fetes per Bryant i Gardiner (1992) en extremitat de pollet a partir de zones d'activitat polaritzant.

En el cas concret de planària no es coneixen les molècules implicades en aquest procés. Malgrat diversos autors han proposat l'existència de gradients de morfògens a planària (Child, 1911; Wolff i col., 1964; Gierer i Meinhard, 1972; veure apartat 2.2), cap d'ells ha estat mai detectat. Així mateix, encara no ha estat demostrada (ni refutada) la hipòtesi formulada per Chandebos (1980), segons la qual el patró axial a planària vindria donat per l'establiment de valors posicionals per interaccions cèl.lula-cèl.lula entre regions frontera, considerant com a tals la interacció entre l'epiteli de recobriment i el mesènquima.

Malgrat s'han detectat i aïllat gens amb domini homeòtic a planària (Garcia-Fernandez i col., 1991; Garcia-Fenandez, 1993; Saló i col., 1994), els que han estat caracteritzats fins a l'actualitat no mostren ni l'homologia ni un patró d'expressió com el descrit pels gens amb dominis homeòtics implicats en aquests processos. Els gens aïllats en planària (Dth1 i Dth2) mostren un 80% d'homologia amb gens de la família NK, que estan implicats en fenòmens de determinació i diferenciació cel.lular (McGinis i Krumlauf, 1992), dada aparentment confirmada per l'expressió de Dth1 i Dth2 (en gastrodermis i cèl.lules subepidèrmiques respectivament; Garcia-Fernandez, 1993). Recentment han estat aïllats 4-6 gens amb dominis homeòtics que mostren una alta homologia amb gens de les famílies HOM/Hox (Saló i col., 1994), justament les implicades en aquests processos. Malauradament, però, no es disposa encara de dades sobre la seva expressió.

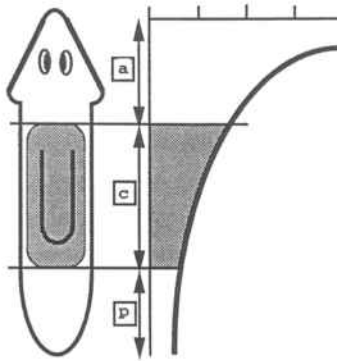
En comparar les característiques de les molècules implicades en la formació i manteniment del patró axial en altres organismes amb les de TCEN-49Ag (apartat 21), s'observa que no presenta aparentment cap semblança amb elles: ni forma un gradient, ni té la naturalesa ni expressió típica dels productes gènics amb dominis homeòtics, ni es mostra com una molècula d'interacció cel.lular. Per altra banda, la ràpida i fina resposta que mostra als canvis de valors posicionals durant la regeneració i el creixement/decreixement suggereix que TCEN-

Discussió

49Ag és una molècula que podria estar regulada, de forma directa o mitjançant intermediaris, per algun d'aquests factors esmentats, de tal manera que es trobaria en una posició final "down stream" d'un o varis d'aquests factors.

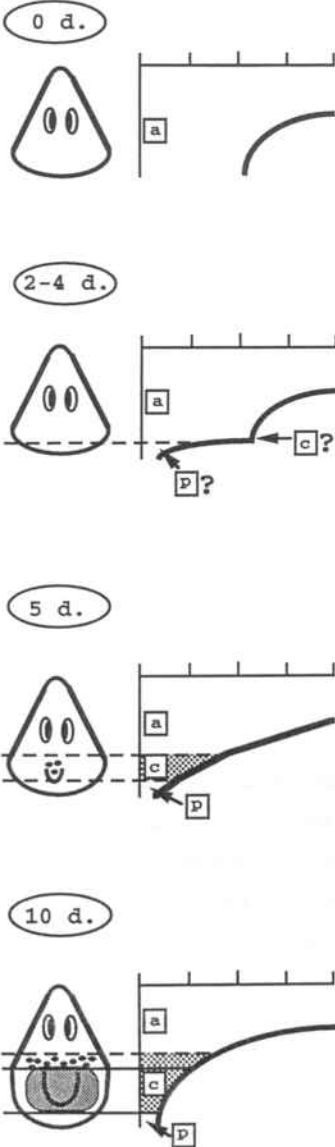
En aquest sentit, es poden correlacionar els canvis en l'expressió de TCEN-49Ag observats durant la regeneració amb hipotètics gradients de morfògens. El gradient més simple trobat i que provocaria en tots els casos una resposta de TCEN-49Ag com l'observada (incluint el retard en la regeneració d'organismes tallats a nivell A) és el que suposa la font del morfogen en posició cefàlica, coincidint amb el gradient proposat per Saló (1984). En la figura 72 es pot observar la interpretació dels canvis d'expressió de TCEN-49Ag en funció d'aquest gradient a tres nivells de regeneració (sent igualment vàlid pels altres nivells). Es considera que durant la regeneració el primer fenomen que es produeix és la recuperació del nivell de morfogen en la zona de la ferida, equilibrant-se posteriorment el gradient en la resta del regenerant.

Fig. 72: Interpretació de l'aparició i evolució del marcatge amb TCEN-49 en funció d'un hipotètic gradient de morfogen que tinguéss la seva font en posicions molt anteriors de l'organisme. S'han esquematitzat tres dels nivells de tall més representatius als temps de regeneració més simbòlics. Aquest model s'adapta igualment als altres nivells i temps de regeneració. *a*, regió anterior; *c*, regió central; *p*, regió posterior; *?*, hipotètic establiment transitori de regions que no poden ser detectades amb aquest marcador; línia contínua, límit entre regions; línia discontinua, límit de regions en procés d'expansió.

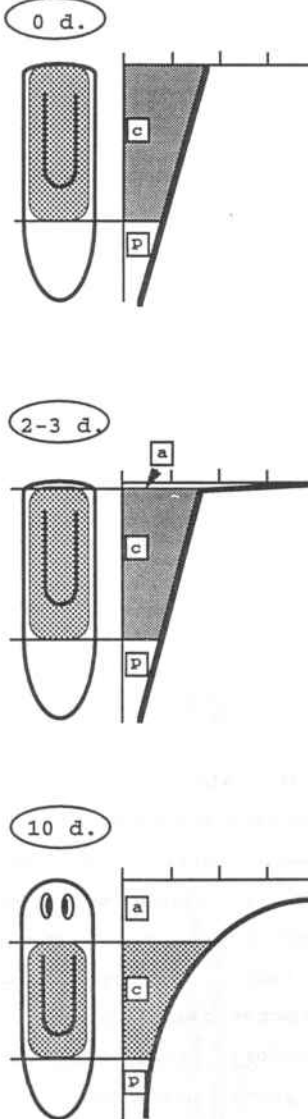


NIVELL DE REGENERACIO

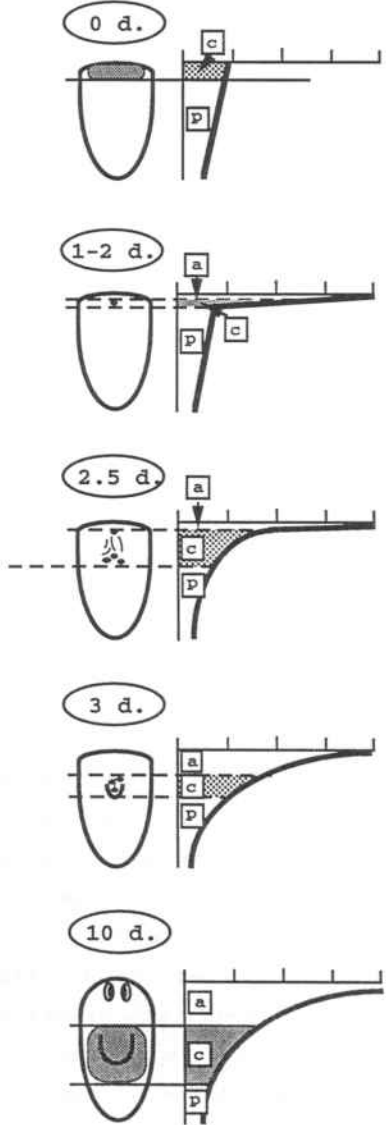
A



C

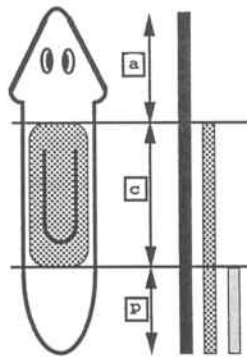


D

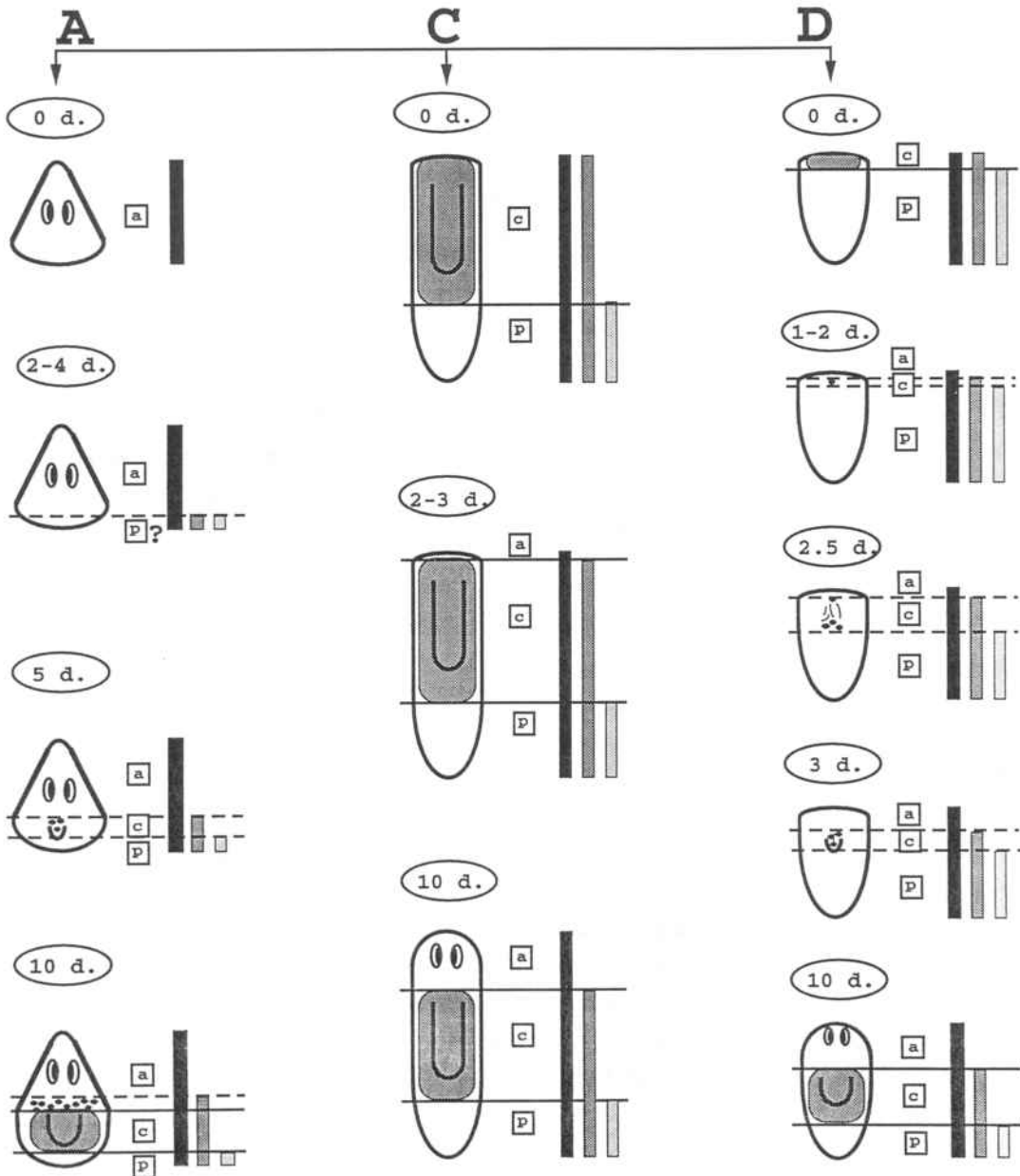


Així mateix, també es poden correlacionar els canvis d'expressió de TCEN-49Ag amb expressions diferencials de gens HOM/Hox, segons el model proposat per Saló i col. (1994) en base a l'aïllament de 4-6 d'aquests gens en *Dugesia(G)tigrina*, dels quals no es coneix el seu domini d'expressió. Aquests autors proposen un model amb 5 gens diferents per homologia amb les cinc regions clàssicament descrites a planària amb criteris morfològics, cada un dels quals tindria com a domini d'expressió una d'aquestes regions. En la figura 73 es pot observar la interpretació dels canvis d'expressió de TCEN-49Ag en funció de 3 gens amb expressió diferencial a tres nivells de regeneració (els mateixos que per la figura 72), sent igualment vàlid pels altres nivells de regeneració. S'ha fet coincidir la zona d'expressió d'aquests 3 gens amb les tres regions molecularment definides per simplificar el model. En aquest es considera que durant el procés de regeneració s'assoleix novament l'expressió de tots 3 gens mitjançant estadis transitoris que podrien explicar l'evolució del marcatge observada i, fins i tot, els retards observats en la regeneració d'organismes regenerants de nivell A.

Fig. 73: Interpretació de l'aparició i evolució del marcatge amb TCEN-49 en funció d'uns hipotètics gens homeòtics HOM/hox. S'han representat tres d'aquests gens i s'ha fet concordar els seus dominis d'expressió amb les tres regions molecularment definides per simplificar el model. L'esquema està realitzat als tres dels nivells de tall més representatius i als temps de regeneració més simbòlics. Aquest model s'adapta igualment als altres nivells i temps de regeneració. *a*, regió anterior; *c*, regió central; *p*, regió posterior; *?*, hipotètic establiment transitori de regions que no poden ser detectades amb aquest marcador; *línia contínua*, límit entre regions; *línia discontinua*, límit de regions en procés d'expansió.



NIVELL DE REGENERACIO



S'han aïllat relativament pocs gens o molècules situades "down stream" de gens homeòtics (veure la revisió de Botas, 1993, sobre aquests factors sota control de gens HOM/Hox). Entre els descrits fins a l'actualitat, TCEN-49Ag presenta unes certes semblances a nivell del percentatge de residus aminoacídics amb el producte gènic 1.28 descrit per Mahaffey i col. (1993), donat que tots dos tenen un caràcter marcadament bàsic (15-19% de residus bàsics i 5.5-6% d'àcids). 1.28 està situat "down stream" del gen homeòtic *Deformed* encara que, segons aquests autors, necessita d'algun altre factor (no detectat encara) per la seva correcta expressió. Malgrat tot, la diferència en el seu pes molecular aparent és notable (4.5 kDa en TCEN-49Ag i 22 kDa en el producte de 1.28).

Per tant, podria ser que TCEN-49Ag fos una molècula situada "down stream" de gens amb homeobox o de determinats gradients de morfògens, estant imbrincat en una hipotètica cadena o xarxa d'induccions-inhibicions-regulacions amb aquests factors i d'altres situats sota el seu control o modulació (apartat 25.6), i on potser jugui algun paper el sistema nerviós (Bronsted, 1969), com pot despendre's del marcatge observat amb TCEN-49 en cèl.lules en contacte amb el sistema nerviós durant els primers dies de regeneració (nivell D, apartat 21.4). Més encara, potser en el mecanisme de reestructuració del patró intervé una combinació d'aquests mecanismes, on TCEN-49Ag podria ser la molècula mitjançera entre els mecanismes desencadenants de la formació del patró i la formació i manteniment del mateix a nivell regional.

26 - PRESPECTIVES

La majoria dels anticossos obtinguts no han estat encara utilitzats. Els que han estat emprats marquen en certa manera la pauta de les possibilitats que la MAbsteca generada ofereix. Aquesta pot servir per fer:

- descripcions morfològiques
- seguiment dels processos de regeneració
- seguiment i establiment dels llinatges cel.lulars
- diferenciació cel.lular
- aïllament de substàncies implicades en els processos de formació del patró, determinació territorial, etc.

A més a més d'aquests anticossos, es podran generar nous híbrids productors emprant les tècniques posades a punt i descrites en aquesta Tesi.

En aquest moment hi ha alguns treballs en marxa centrats bàsicament en els MAbs específics de cèl.lules epitelials, en el MAb TMUS-13 i el TCEN-49. A grans trets i sense entrar en detalls, aquests són:

1) MAbs específics de cèl.lules epitelials

Amb aquests MAbs s'està realitzant un treball sobre el recobriment diferencial de la ferida per part de l'epidermis com a mecanisme de regió-frontera per l'establiment del patró durant la regeneració tal i com proposa Chandeboise (1980).

2) TMUS-13

Amb aquest MAb s'estan continuant els treballs començats sobre la diferenciació dels neoblasts en cèl.lules musculars i les implicacions que pugui tenir sobre els mecanismes de formació del blastema, així com sobre la restricció filètica de l'antigen reconegut i les seves possibles aplicacions en detecció de platelmints parasits.



3) TCEN-49

Amb aquest MAb s'estan continuant els treballs de caracterització de TCEN-49Ag, tant de la fracció glucídica com de la proteica, incloent l'aïllament i seqüenciació del gen que la codifica (**TCEN-49G**). Amb aquesta seqüència es podran establir analogies amb altres gens coneguts i, a llarg termini, s'intentaran buscar altres gens que estiguin implicats en el procés i establir els possibles factors "up stream" i "down stream" de TCEN-49Ag així com el seu mecanisme d'actuació.

Així mateix, també s'està intentant detectar la presència d'aquest antigen en altres espècies de planària utilitzant anticossos policlonals obtinguts per immunització amb la fracció de 4.5 kDa provinent de SDS-PAGE que conté TCEN-49Ag i/o amb nous MAb obtinguts d'ella. Aquest treball no s'ha de restringir solament a organismes intactes (adults) ja que existeix la possibilitat de que TCEN-49Ag s'expressi tant sols durant el desenvolupament i regeneració en algunes d'aquestes espècies.

Està previst detectar l'aparició i evolució de l'expressió de TCEN-49Ag durant l'embriogènesi en organismes amb reproducció sexual: raça sexuada de *Dugesia (G)tigrina* i *Dugesia (S)policroa*, ambdues amb una regió central TCEN-49Ag(+) immunodetectada.

També està previst fer transplantaments ectòpics, tant de regió central a altres regions com d'altres regions a regió central, per veure com actuen els efectes inhibitoris de les diferents regions descrits per Saló (1984) sobre l'expressió de TCEN-49Ag i inferir més dades sobre els mecanismes de determinació, formació i manteniment del patró axial.

4) Obtenció de nous marcadors

Per altra banda, s'està intentant obtenir anticossos específics i exclusius de cèl.lula soca i s'intentaran obtenir nous marcadors regionals (en forma de MAb, mitjançant llibreries de cDNA diferencials i d'expressió) que, combinats amb el ja existent, permetin inferir més dades sobre els mecanismes d'establiment, formació i manteniment del patró i la polaritat en planàries.

CONCLUSIONS

1) S'han obtingut 277 hibridomes productors d'anticossos específics de tipus i subtipus cel.lulars, estructures subcel.lulars i regions de la planària *Dugesia(G)tigrina*. Tots aquests anticossos s'han classificat i colleccionat en una llibreria d'hibridomes ("MAbsteca").

2) Dels 277 hibridomes productors d'anticossos obtinguts, 114 són específics de tipus cel.lulars, 92 són específics de subtipus cel.lulars, 49 són específics de determinants antigènics compartits per tipus cel.lulars diferents, 21 són específics d'estructures subcel.lulars, i 1 és específic regional.

3) S'han detectat anticossos específics de tots els tipus cel.lulars de la raça assexuada de *Dugesia(G)tigrina* excepte de neoblasts. No s'han detectat anticossos exclusius de cèl.lula soca, però s'han obtingut anticossos monoclonals que reconeixen determinants antigènics presents en cèl.lules diferenciades i alhora en cèl.lules amb morfologia de neoblast.

4) Estudis fets en organismes regenerants posen en evidència la utilitat dels anticossos monoclonals com a marcadors moleculars per abordar els diferents aspectes del desenvolupament a planària esmentats als Objectius. Tanmateix, seria de gran utilitat obtenir marcadors moleculars de cèl.lula soca (neoblasts) i estadis de regeneració, així com nous marcadors d'estadis cel.lulars i de regions per tal de completar la "MAbsteca" formada.

5) El MAb TMUS-13 reconeix un determinant antigènic específic de cèl.lules musculars del Filum Plathelminthes, de 125 kDa de pes molecular aparent, que és present en les cèl.lules musculars madures i en cèl.lules amb morfologia de neoblast. Amb aquest MAb s'ha demostrat per primera vegada la presència de fibres musculars que envolten els diverticles intestinals en espècies del Gènere *Dugesia*.

6) La utilització de TMUS-13 com a marcador en organismes regenerants confirma les expectatives de utilització dels MAbs en els processos esmentats en permetre visualitzar, de manera senzilla i directa, la contracció muscular en la zona de la ferida i la posterior relaxació, així com la diferenciació de les cèl.lules musculars a partir dels neoblasts.

7) El marcatge de TCEN-49 determina regions molecularment definides donat que reconeix un determinant antigènic present en totes les cèl.lules (excepte les epidèrmiques) de la regió central de l'organisme. Aquesta zona comprèn la regió faríngia, part de la prefaríngia i part de la postfaríngia definides segons criteris morfològics (Bronsted, 1969; Baguñà, 1973).

8) TCEN-49Ag és una molècula glicoproteica (glucoproteïna o proteoglicà) de caràcter bàsic amb una massa molecular aparent detectada mitjançant Western-blot de 4500 Da. Difon a partir de cèl.lules secretores cianòfiles de tipus 2 cap a totes les altres cèl.lules de la regió central.

9) L'aparició i evolució del marcatge de TCEN-49Ag durant la regeneració confirma la ràpida determinació territorial i la seqüència proximodistal de l'establiment de les noves estructures durant la regeneració de planària tal i com postula el model mixte epimòrfic-morfalàctic proposat per aquests organismes (Saló, 1984; Saló i Baguñà, 1984).

10) El marcatge obtingut amb TCEN-49 en organismes intactes, regenerants, i les alteracions observades amb tractaments amb àcid retinoic fan pensar que TCEN-49Ag pot ser una molècula implicada en mecanismes de formació i manteniment de la polaritat (o del patró) antero-posterior situada dins una hipotètica cadena (o xarxa) d'induccions-inhibicions-regulacions. L'evolució del marcatge de TCEN-49Ag en organismes regenerants i durant el creixement/decreixement de planària fa que els possibles mecanismes de regulació de l'expressió de TCEN-49Ag concordin tant amb models que postulen un gradient de morfogen (Child, 1911; Wolff i col., 1964; Gierer i Meinhard, 1972; Saló, 1974) com amb els que postulen expressions diferencials de determinats gens (com gens amb seqüències HOM/Hox; Saló, 1994).

11) El marcatge observat en tots els tipus cel.lulars de la regió central excepte les cèl.lules epidèrmiques (inclosos els neoblasts) fa pensar que aquestes regions moleculars poden ser considerades com les unitats d'estructuració del patró de planària a nivell funcional.

BIBLIOGRAFIA

- Allen, L.** 1967. Lymphatics and lymphoid tissues. Annu. Rev. Physiol. 29: 197-224.
- Allen, G.** 1989. Sequencing of proteins and peptides. In: Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology, Vol. 9. Ed. Elsevier.
- Amzel, L.M. i Poljak, R.J.** 1979. Three-dimensional structure of immunoglobulins. Annu. Rev. Biochem. 49; 961-997.
- Auladell, M.C.** 1990. Análisis de la heterogeneidad estructural y funcional de las células indiferenciadas (neoblastos) de la planaria *Dugesia (G)tigrina*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Ayala, F.J.** 1983. Enzymes as taxonomic characters. Systematics Association, Special Volume n°24. Protein polymorphism: Adaptive and taxonomic significance. Ed. G.S. Oxford i O. Rosillon. Academic Press.
- Baguñà, J.** 1973. Estudios citotaxonómicos, ecológicos e histofisiología de la regulación morfogénica durante el crecimiento y la regeneración en la raza asexuada de la planaria *Dugesia mediterranea*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Baguñà, J.** 1976. Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n. sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. J. Exp. Zool. 195; 53-64.
- Baguñà, J. i Ballester, R.** 1978. The nervous system in planarians: peripheral and gastrodermal plexuses, pharynx innervation, and relationship between central nervous system structure and acoelomate organization. J. Morph., 155; 237-252.
- Baguñà, J., Saló, E. i Romero, R.** 1980. Les planàries d'aigua dolça a Catalunya i a les Illes Balears. I. Clau sistemàtica i distribució geogràfica. Butll. Inst. Cat. Hist. Nat., 45 (Sec. Zool., 3): 15-30.
- Baguñà, J.** 1981. Planarian neoblasts. Nature, 290; 14-15.

Bibliografia

- Baguña, J. i Romero, R.** 1981. Quantitative analysis of cell type during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. Hydrobiologia, 84; 181-194.
- Baguña, J., Saló, E., Romero, R., Collet, J., i Auladell, M.C.** 1983. Planària com a model experimental per a estudis de regeneració, creixement i decreixement. Biol. Desenv. 1; 205-220.
- Baguña, J., Saló, E., Auladell, M.C. i Ribas, M.** 1988. Cellular, molecular and genetic approaches to regeneration and pattern formation in planarians. Free-living and Symbiotic Plathelminthes. P. Ax, U. Ehlers, Sopott-Ehlers (ed). Gustav Fisher Verlag. Stuttgart. New York. Vol. 36; 65-77.
- Baguña J., Saló, E. i Romero, R.** 1989. Effects of activators and antagonists of the neuropeptides substance P and substance K on cell proliferation in planarians. Int. J. Dev. Biol. 33; 261-264.
- Baguña, J., Romero, R., Saló, E., Collet, J., Auladell, M.C., Ribas, M., Riutort, R., Garcia-Fernandez, J., Burgaya, F. i Bueno, D.** 1990. Growth, degrowth and regeneration as developmental phenomena in adult fresh-water planarians. In: Experimental Embryology of Aquatic Plants and Animals. H.J. Marthy Ed. NATO-ASI Series, Plenum Press. New York; 129-162.
- Beeley, J.G.** 1985. Glycoprotein and proteoglycan techniques. Laboratory techniques. In: Biochemistry and Molecular Biology. Ed. Elsevier.
- Bernabeu, C., Conde, F.P. i Vazquez, O.** 1977. Extraction of pure ribosomal protein and removal of Coomassie Blue from acrylamide gels. In: Protein Extraction from Gels. Academic Press.
- Botas, J.** 1993. Control of morphogenesis and differentiation by HOM/Hox genes. Curr. Op. Cell Biol. 5; 1015-1022.
- Bravo, R. i Celis, J.E.** 1980. A search for differential polypeptide synthesis throughout the cell cycle of HeLa cells. J. Cell. Biol. 84; 795-802.
- Bronsted, H.V.** 1969. Planarian Regeneration. Pergamon Press, London.
- Bryant, P.J. i Fraser, S.E.** 1988. Wound healing, cell communication, and DNA synthesis during imaginal disc regeneration in *Drosophila*. Developmental Biology 127; 197-208.

- Bryant, S.V. i Gardiner, D.M.** 1992. Retinoic acid, local cell-cell interactions, and pattern formation in vertebrate limbs. Develop. Biol. 152; 1-25.
- Bueno, D., Sumoy, L., Soriano, M.A., Espinosa, Ll., Batlle, E., Baguñà, J. i Romero, R.** 1991. Anticossos monoclonals com a marcadors d'antígens específics cel·lulars i regionals a la planària *Dugesia (G) tigrina*. Biologia del Desenvolupament, Volum 9: 197-205.
- Bueno, D., Espinosa, Ll., Soriano, M.A., Batlle, E., Baguñà, J. i Romero, R.** 1992. Relacions antigèniques entre tipus cel·lulars a la planària *Dugesia(G)tigrina* mitjançant MAbs: possibles implicacions en el seu llinatge. Biologia del Desenvolupament, Volum 10; 71-82.
- Bueno, D., Espinosa, Ll., Soriano, M.A., Batlle, E., Baguñà, J. i Romero, R.** 1994a: TCEN-49, a monoclonal antibody that identifies a central body antigen in the planarian *Dugesia(G)tigrina*. Implications for pattern formation and positional signalling mechanisms. Hydrobiologia. (In press).
- Bueno, D., Batlle, E., Soriano, M.A., Espinosa, Ll., Baguñà, J. i Romero, R.** 1994b. TCAV-1, a monoclonal antibody specific of epithelial pharyngeal cells in the planarian *Dugesia(G)tigrina*. Application to pattern formation of the pharynx during regeneration. Hydrobiologia. (In press).
- Bullock, G., i Petrusz, P.** 1985. Techniques in Immunocytochemistry. Vol. 3. Academic Press, Inc.
- Burgaya, F.** 1992. Estudi immunocitoquímic del sistema neuroendocrí, i aïllament i caracterització del producte gènic d'una tirosina-kinasa de la planària *Dugesia(G)tigrina*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Burgaya, F. i Baguñà, J.** 1992. Seguiment per mètodes immunohistoquímics de la regeneració del sistema nerviós a planàries processades "in toto". Biologia del Desenvolupament, Volum 10; 201-210.
- Bürglin, T.R. i Ruvkun, G.** 1993. The *Caenorhabditis elegans* homeobox gene cluster. Curr. Op. in Genetics and Develop. 3; 615-620.

Bibliografia

- Bürglin, T.R.** 1993. The homeodomain phylum. In: A Guidebook for Homeobox Genes. D. Duboule (ed.). Oxford: Oxford University Press (in press)
- Burnet, F.M.** 1957. A modification of Jerne's theory of antibody production using the concept of clonal selection. Austral J. Sci. 20; 67.
- Busch, S.J., Martin, G.A., Barnhart, R.L., Mano, M., Cardin, A.D. i Jackson, R.L.** 1992. Trans-repressor activity of nuclear glycosaminoglycans on Fos and Jun/AP-1 oncoprotein-mediated transcription. J. Cell Biol. 116; 31-42.
- Campbell, A.M.** 1985. Monoclonal antibody technology. In: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, vol 13. Elsevier.
- Casaco, A., Giordano, M., Danova, M., Casaco, M., Cornaglia, A.I. i Calligaro, A.** 1993. PC10 monoclonal antibody to proliferating nuclear antigen as probe for cycling cell detection in developing tissues. Histochemistry 99; 191-199.
- Catty, D. i Raykundalia, C.** 1988. Production and quality control of policlonal antibodies. In: Antibodies, a Practical Approach. Vol I. IRL Press.
- Chandebois, R.** 1980. The dynamics of bound closure and its role in the programming of planarian regeneration. II. Distalization. Develop., Growth and Differ. 22(4); 693-704.
- Chaplin, M.F. i Kennedy, JF.** 1986. Carbohydrat analysis. A practical approach. In: The practical approach series. IRL Press Ltd.
- Child, C.M.** 1911. Experimental control of motphogenesis in the regulation of planaria. Biol. Bull. 20; 309-331.
- Chisholm, A.** 1991. Control of cell fate in the tail region of *C.elegans* by the gene *egl-5*. Development 111; 921-932.
- Clark, S.G., Chisholm, A.D. i Horvitz, H.R.** 1993. Control of cell fates in the central body region of *C. elegans* by the homeotic gene *lin-39*. Cell 74; 43-55.

- Collet, J.** 1990. Síntesi de RNA i anàlisi del patró proteic durant la regeneració de la planària *Dugesia(G)tigrina*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Cummings, F.W.** 1990. A model of morphogenetic pattern formation. J. Theor. Biol. 144(4); 547-566.
- Davis, D.R. i Metzger, H.** 1983. Structural basis of antibody function. Annu. Rev. Biochem. 1; 87-117.
- Denburg, J.L.** 1989. The reappearance of a developmental stage-specific antigen in adult regenerating neurons of the cockroach. J. Neuroscience 9 (10); 3491-3504.
- Dencker, L., Annerwall, E., Busch, C. i Eriksson, U.** 1990. Localization of specific retinoid-binding sites and expression of cellular retinoic-acid-binding protein (CRABP) in the early mouse embryo. Development 110(2); 343-352.
- Dubois, F.** 1949. Contribution à l'étude de la régénération chez les planaires dulcicoles. Bull. Biol. 83; 213-283.
- Dunn, S.D.** 1986. Effects of the modification of transfer buffer composition and the renaturation of proteins in gels on the recognition of proteins on Western Blots by monoclonal antibodies. Anal. Biochem. 157; 144-153.
- Dunne, J.F., Jovojs, L.C., Huang, L.W. i Bode, H.R.** 1985. A subset of cells in the nerve net of *Hydra oligactis* defined by a monoclonal antibody: its arrangement and development. Developmental Biology 109; 44-53.
- Ehlers, U.** 1985. Das Phylogenetische System der Plathelminthes. G. Fischer. Stuttgart.
- Espinosa, Ll., Bueno, D., Batlle, E., Soriano, M.A., Baguñà, J. i Romero, R.** 1992. Estudi de la regeneració de la regió faríngia a la planària *Dugesia(G)tigrina* mitjançant la utilització de MAbs. Biologia del Desenvolupament, 10; 211-220.
- Espinosa, Ll.** 1993. Anàlisi espacial i temporal de la regeneració de la faringe i cavitat faríngia de la planària *Dugesia(G)tigrina* mitjançant anticossos monoclonals. Tesina de Llicenciatura. Universitat de Barcelona.

Bibliografia

- Ferreti, P., Brockes, J.P. i Brown, R.** 1991. A new type II keratin restricted to normal and regenerating limbs and tails is responsive to retinoic acid. Development 111(2); 497-508.
- Fibla, J.** 1990. Anàlisi immunoquímica de la alcoholdehidrogenasa de *Drosophila*. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Forhman, M.A., Boyle, M. i Martin, G.R.** 1990. Isolation of the mouse Hox-2.9 gene; analysis of embryonic expression suggests that positional information along the antero-posterior axis is specified by mesoderm. Development 119; 589-607.
- French, V. i Brakefield, P.M.** 1992. The development of eyespot patterns on butterfly wings: Morphogen sources or sinks? Development 116(1); 103-109.
- Freund, J. i McDermott, K.** 1942. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 49: 548-553.
- Freund, J.** 1956. The mode of action of immunologic adjuvants. Adv. Tuberc. Res. 7: 130-148.
- Fujita, S.C.** 1987. Monoclonal antibody approaches to neurogenesis. Curr. Top. Neur. Chapter 10; 255-275.
- Galfre, G., Howe, S.C., Milstein, C., Butcher, G.W. i Howard, J.C.** 1977. Antibodies to major histocompatibility antigens produced by hybrid cell lines. Nature 266: 550-552
- Gally, J.A.** 1973. Structure of immunoglobulins. In: The Antigens 1 (ed M. Sela), 162-298. Academic Press. New York.
- Garcia-Fernandez, J., Baguña, J. i Saló, E.** 1991. Planarian homeobox genes: cloning, sequence analysis, and expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88; 7338-7342.
- Garcia-Fernandez, J.** 1992. Aïllament, caracterització i anàlisi de l'expressió temporal i espacial de gens amb "homeobox" a planàries. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Gehring, W.J.** 1987. Homeoboxes in the study of development. Science 236: 1245-1252.

- Gierer, A. i Meinhardt, H.** 1972. A theory of biological pattern formation. Kybernetik 12; 30-39.
- Gillette, R.W.** 1987. Alternatives to pristane priming for ascitic fluid and monoclonal antibody production. J. Immunol. Methods 88; 21-23.
- Go, M.J., Yoshihara, M. i Hotta, Y.** 1992. Monoclonal antibodies which stain small subsets of neurons in the *Drosophila* central nervous system. Dev. Brain Res. 68; 282-285.
- Goding, J.W.** 1983. Monoclonal Antibodies: Principles and Practice. Academic Press, Inc.
- Goldhamer, D.J., Tomlinson, B.L. i Tassava, R.A.** 1989. A developmentally regulated wound epithelial antigen of the newt limb regenerate is also present in a variety of secretory/transport cell types. Developmental Biology 135; 392-404.
- Govind, S., Brennan, L. i Steward, R.** 1993. Homeostatic balance between dorsal and cactus proteins in the *Drosophila* embryo. Development 117(1); 135-148.
- Greningi, V.** 1988. Planarian regeneration: an overview of some cellular mechanisms. Zool. Sci. 5; 1153-1163.
- Hall, P.A. i Watt, F.M.** 1989. Stem cells: the generation and maintenance of cellular diversity. Development 106; 619-633.
- Harlow, E. i Lane, D.** 1988. Antibodies, a Laboratory Manual. Cold Spring Harbour Laboratory.
- Heimfeld, S., Javois, L.C., Dunne, J.F., Littlefield, C.L., Huang, L. i Bode, H.R.** 1985. Monoclonal antibodies: a new approach to the study of hydra development. Arch. Sc. Genève 38; 429-438.
- Herbert, W.J. i Fristensen, F.** 1986. Laboratory animal techniques for immunology. In: Handbook of Experimental Immunology (ed. D.M. Weir i col.), chap 133: 1-36. Blackwell Scientific, Oxford.
- Holland, P.W.H.** 1992. Homeobox genes in vertebrate evolution. BioEssays 14; 267-273.

Bibliografia

- Hsu, S.M. i Soban, E.** 1982. Color modification of diaminobenzidine (DAB) precipitation by metallic ions and its application for double immunohistochemistry. J. Histochem. Cytochem 30; 1079
- Hu, J.G., Yokoyama, T. i Kitagawa, T.** 1990. Studies on the optimal immunization schedule of experimental animals. VI. The optimal age and sex of mice, and the influence of booster injections. Chem. Pharm. Bull. 38; 448-451.
- Huang, D. i Dawid, I.B.** 1990. The maternal-effect gene *fsH* is essential for the specification of the central region of the *Drosophila* embryo. New Biologist 2(2); 163-170.
- Jackson, R.L., Besch, S.J. i Cardin, A.D.** 1991. Glycosaminoglycans: molecular properties, protein interactions and role in physiological processes. Physiol. Rev. 71; 481-539.
- Javois, L.C.** 1990. Patterning of the head in hydra as visualized by a monoclonal antibody: III. The dynamics of head regeneration. J. Exp. Zool. 254 (2); 155-164.
- Jennings, J.B.** 1957. Studies on feeding, digestion and food storage in free living flatworms (Platyhelminthes, Turbellaria). Biol. Bull. Woods Hole. 112; 63-84.
- Jeske, D.J. i Capra, J.D.** 1984. Immunoglobulins: Structure and function. In: Fundamental immunology (ed. W.E. Paul), 131-165. Raven Press. New York.
- Jiang, J. i Levin, M.** 1993. Binding affinities and cooperative interactions with bHLH activators delimit threshold to the dorsal gradient morphogen. Cell 72(5); 741-752.
- Jonak, Z.L., Owen, J.A., Machy, P., Laserman, L.D. i Greig, R.G.** 1988. Gene transfection and lymphocyte immortalization: a new approach to human monoclonal antibody production. Adv. Drug Deliv. Rev. 2; 207-228.
- Johnstone, A. i Thorpe, R.** 1987. Immunocytochemistry in Practice. Second Edition. Blackwell Scientific Publications.

- Kaufman, T.C., Lewis, R. i Wakimoto, B.** 1980. Cytogenetic analysis of chromosome 3 in *Drosophila melanogaster*: the homeotic gene complex in polytene chromosome interval 84A-B. Genetics 94; 115-133.
- Kenyon, C.** 1986, A gene involved in the development of the posterior body region of *C. elegans*. Cell 46; 477-487.
- Kido, T.** 1961. Studies on the pharynx regeneration in planarian *Dugesia gonocephala*. I- Historical observation in the transected pieces. Science Report of the Kenazawa University. Vol. VII. n°2.
- Kim, W.S. i Stocum, D.L.** 1986. Devel. Biol. 114; 170-179.
- Klatt, K.P., Yang, E.V. i Tassava, R.A.** 1992. Monoclonal antibody MT2 identifies an extracellular matrix glycoprotein that is co-localized with tenascin during adult newt limb regeneration. Differentiation 50(3); 133-140.
- Klima, J.** 1961. Elektronenmikroskopische Studien über die Feinstruktur der Tricladen (Turbellaria). Protoplasma. 54; 101-162.
- Kobata, A.** 1979. Use of endo- and exoglycosidases for structural studies of glycoconjugates. Anal. Biochem. 100; 1-14.
- Kohler, G. i Milstein, C.** 1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. Nature 256; 495.
- Kohler, G. i Milstein, C.** 1976. Derivation of specific antibody producing tissue culture and tumor lines by cell fusion. Eur. J. Immunol. 6; 292.
- Koizumi, O., Itazawa, M., Mizumoto, H., Minobe, S., Javois, L.C., Grimmlikhujzen, C.J.P. i Bode, H.R.** 1992. Nerve ring of the hipostome in Hydra: I. Its structure, development, and maintenance. J. Comp. Neurol. 326; 7-21.
- Krause, R.M.** 1970. The search for antibodies with molecular uniformity. Adv. Immunol. 12; 1.
- Lacalli, T.C.** 1990. Modelling the *Drosophila* pair-rule pattern by reaction-diffusion: Gap input and pattern control in a 4-morphogen system. J. Theor. Biol. 144(2); 171-194.

Bibliografia

- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature, 227; 680-685.
- Lane, D. i Koprowski, H.** 1982. Molecular recognition and the future of monoclonal antibodies. Nature 296; 200.
- Lentz, T.L.** 1967. Rhabdite formation in planaria: the role of microtubules. J. Ultras. Res. 17; 114-126.
- Le Moigne, A.** 1967. Bull. Soc. Zool. France. 92; 617-628.
- Lewis, E.B.** 1978. A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. Nature 276; 565-570.
- Liang, P. i Pardee, A.B.** 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. Science 257; 967-971.
- Liaw, G.J. i Lengyel, J.A.** 1993. Control of tailless expression by bicoid, dorsal and synergistically interacting terminal system regulatory elements. Mech. of Develop. 40; 47-61.
- Lieberman, R., Douglas, J.O.A. i Mantel, N.** 1960. Production in mice of ascitic fluid containing antibodies induced by *Staphylococcus*- or *Salmonella*- adjuvant mixtures. J. Immunol. 84; 514-529.
- Littlefield, C.L., Dunne, J.F. i Bode, H.R.** 1985. Spermatogenesis in *Hydra oligactis*. I. Morphological description and characterization using a monoclonal antibody specific for cells of the spermatogenic pathway. Developmental Biology 110; 308-320.
- Mackenzie, I.C., Mackenzie, S.L. i Rittman, G.A.** 1989. Isolation of subpopulations of murine epidermal cells using monoclonal antibodies against differentiation-related cell surface molecules. Differentiation 41; 127-138.
- Maden, M.** 1977. The regeneration of positional information in the amphibian limb. J. Theor. Biol. 69; 735-753.
- Mahaffey, J.W., Jones, D.F. Hickel, L.A. i Griswold, C.M.** 1993. Identification and characterization of a gene activated by the deformed homeoprotein. Development 118; 203-214.

- McGinnis, W. i Krumlauf, R. 1992. Homeobox genes and axial patterning. Cell 68; 283-302.
- Mcglade-Mcculloh, E., Muller, K.J. i Zisper, B. 1990. Expression of surface glycoproteins early in leech neural development. J. Comp. Neurology 299; 123-131.
- Miles, L.E.M i Hales, C.N. 1968a. The preparation and properties of purified ¹²⁵I-labeled antibodies to insuline. Biochem. J. 108: 611-618.
- Miles, L.E.M i Hales, C.N. 1968b. Labelled antibodies and immunological assay systems. Nature, 219:186-189.
- Miralles, A. 1992. Aïllament i caracterització de seqüències POU-box a planària. Tesina de Llicenciatura. Universitat de Barcelona.
- Mita-Miyazawa, I., Nishikata, T. i Satoh, N. 1987. Cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in eggs and embryos of the ascidian *Halocynthia roretzi*. Development 99; 155-162.
- Miyachi, K., Frizler, M.J. i Tan E.M. 1978. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. J. Immunol. Methods 109; 49-59.
- Morita i Best, 1984. Electron microscopic studies of Planarian Regeneration. IV Cell Division of Neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. J. Exp. Zool. 229; 425-436.
- Morgan, T.H. 1901. Regeneration. McMillan, New York.
- Mueller, U.W., Hawes, C.S. i Jones, W.R. 1986. Monoclonal antibody production by hybridoma growth in Freund's adjuvant primed mice. J. Immunol. Methods 87; 193-196.
- Müller, W.A., Leitz, T., Stephan, M. i Lehamann. 1993. Arachidonic acid and the control of body pattern in *Hydra*. Roux's Arch. Dev. Biol. 202; 70-76.
- Nardelli-Haefliger, D. i Shankland, M. 1992. Lox2, a putative leech segment identity gene, is expressed in the same segmental domain in different stem cell lineages. Development 116(3); 697-710.
- Niazi, I.B. i Saxena, S. 1978. Folia Biol. 26; 3-11.

Bibliografia

- Nohono, T., Noji, S., Koyama, E., Ohyama, K., Myokai, F., Kuroiwa, A., Saito, T. i Taniguchi, S. 1991. Involvement of the Chox-4 chicken homeobox genes in determination of anteroposterior axial polarity during limb development. Cell 64(6); 1197-1205.
- Noji, S., Nohono, T., Koyama, E., Muto, K., Ohyama, K., Aoki, Y., Tamura, K., Ohsugi, K., Ide, Y., Taniguchi, S. i Saito, T. 1991. Retinoic acid induces polarizing activity but is unlikely to be a morphogen in the chick limb bud. Nature 350; 83-86
- Nossal, G.J i Ledreberg, J. 1958. Antibody production by single cells. Nature 181; 1419, 1958.
- Nowinski, R.C., Lostrom, M.E., Tam, M.R., Stone, M.R., i Burnette, W.N. 1979. The isolation of hybrid cell lines producing monoclonal antibodies against the p15(E) protein of murine leukemia viruses. Virology 93: 111-126.
- Orii, H., Agata, K. i Watanabe, K. 1993. Homeobox genes and POU-domain genes in *Dugesia japonica*. Proceedings: VII International Symposium on the Biology of the Turbellaria.
- Paschke, K.A., Lottspeich, F. i Stuermer, C.A. 1992. Neurolin, a cell surface glycoprotein on growing retinal axons in the goldfish visual system, is reexpressed during retinal axonal regeneration. J. Cell Biol. 117; 863-875.
- Pascolini, R. 1967. Research and observations on the pharynx of *Dugesia lugubris*, Rev. Biol. Suppl. 60. 49
- Pascolini, R., Facchini, L. i Farnesi, R.M. 1971. Boll. Soc. Ital. Biol. Sper. 47; 378-381.
- Pedersen, K.J. 1958. Morphogenetic activities during planarian regeneration as influenced by triethilen melamine. J. Embriol. Exp. Morph. 6; 308-350.
- Pedersen, K.J. 1959a. Some features of the fine structure and histochemistry of planarian subepidermal gland cells. Z. Zellf. 50; 121-142.
- Pedersen, K.J. 1959b. Cytological studies on the planarian neoblast. Z. Zellf. 50; 799-817.

- Pedersen, K.J.** 1961. Studies on the nature of planarian connective tissue. Z. Zellforsch. 53; 569-608.
- Pedersen, K.J.** 1972. Studies on regeneration blastemas of the planarian *Dugesia tigrina* with special reference to differentiation of the muscle-connective tissue filament system. Wilhelm Roux' Archiv. 169; 134-169.
- Peters, J.H. i Baumagsten, H.** 1992. Monoclonal Antibodies. Springer Laboratory (Eds. Peters, J.H. i Baumagsten, H.).
- Plickert, G. i Kroiher, M.** 1988. Proliferation kinetics and cell lineages can be studied in whole mounts and macerated cells by means of BrdU/anti-BrdU technique. Development 103; 791-794.
- Plickert, J.** 1990. Experimental analysis of developmental processes in marine hydroids. In: Experimental Embryology of Aquatic Plants and Animals. H.J. Marthy Ed. NATO-ASI Series, Plenum Press. New York; pp. 59-82.
- Poole, T.B.** 1987. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory Animals, 6th edition. Longman Scientific and Technical, London.
- Potten, C.S. i Loeffler, M.** 1990. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the Crypt. Development 110; 1001-1020.
- Prats, J.** 1991. Anàlisi del contingut de DNA a planàries d'aigües dolces per citometria de flux i citoespectrofotometria. Tesina de Llicenciatura. Universitat de Barcelona.
- Prelich, G., Tan, C.K., Kostura, M., Mathews, M.B., So, A.G., Downey, K.M. i Stillman, B.** 1987. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerasa-delta auxiliary protein. Nature 326; 517-520.
- Rathjen, D.A., Underwood, P.A. i Whalley, J.M.** 1986. An evaluation of some in vivo immunization strategies for the production of monoclonal antibodies to insulin and ACTH. J. Biol. Stand. 14: 1-14.

Bibliografia

- Remsen L.G., Strain, G.M., Newman, M.J., Satterlee, N. i Daniloff, J.K.** 1990. Antibodies to the neural cell adhesion molecule disrupt functional recovery in injured nerves. Exp. Neurology 110; 268-273.
- Ribas, M. i Baguñà, J.** 1986. El procés de cicatrització durant la regeneració a planàries: seqüència temporal i possible paper en la determinació del patró. Biol. Desenv. 4; 189-202.
- Ribas, M.** 1990. Cariologia, sistemàtica i biogeografia de les planàries d'aigües dolces als Països Catalans. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Richards, F.F., Konigsberg, W.H., Rosestern, R.W. i Varga, J.M.** 1975. On the specificity of antibodies. Science 187; 130.
- Rieger, R., Salvenmoser, W., Legniti, A., Reindl, S., Adam, H., Simonsberger, P. i Tyler, S.** 1991. Organization and differentiation of the body wall musculature in *Macrostomum* (Turbellaria, Macrostomidae). Hydrobiologia 227; 119-130.
- Rieger, R.M., Tyker, S., Smith III, J.P.S. i Rieger, G.E.** 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. A Microscopic Anatomy of Invertebrates, 3: Platyhelminthes and Nemertenea. 7-140. Harrison, F.W. and Bogitsh, B.J., Eds. Wiley-Liss, Inc.
- Romero, R.** 1987. Anàlisi cel·lular quantitativa del creixement i de la reproducció a diferents espècies de planàries. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Romero, R. i Baguñà, J.** 1988. Quantitative cellular analysis of life-cycle strategies of iteroparous and semelparous triclads. Fortschr. Zool. 36; 283-289.
- Romero R. i Baguñà, J.** 1991. Quantitative cellular analysis of growth and reproduction in freshwater planarians (Turbellaria, Tricladida). I. A cellular description of the intact organism. Inv. Repr. and Dev. 192; 157-165.
- Romero, R., Fibla, J., Bueno, D., Sumoy, L., Soriano, M.A. i Baguñà, J.** 1991. Monoclonal antibodies as markers of specific cell types and regional antigens in the freshwater planarian *Dugesia (G) tigrina*. Hydrobiologia 227: 73-79.

- Ruoslahti, E. i Yamaguchi, Y. 1991. Proteoglycans as modulators of growth factor activities. Cell 64; 867-869.
- Saló, E. 1984. Formació del blastema i reespecificació del patró durant la regeneració de les planàries *Dugesia(S)mediterranea* i *Dugesia(G)tigrina*. Anàlisi morfològic, cel.lular i bioquímic. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.
- Saló, E., i Baguñà, J. 1984. Regeneration and pattern formation in planarians. I. The pattern of mitosis in anterior and posterior regeneration in *Dugesia(G)tigrina*, and a new proposal for blastema formation. J. Embryol. Exp. Morph. 83; 63-80.
- Saló, E., i Baguñà, J. 1989. Regeneration and pattern formation in planarians. II. Local origin and role of cell movements in blastema formation. Development 107; 69-76.
- Saló, E., Muñoz-Mármol, A.M., Bayascas-Ramirez, J.R., Garcia-Fernàndez, J., Corominas, M. i Baguñà, J. 1994. The freshwater planarian *Dugesia(G)tigrina* contains a great diversity of homeobox genes. Hydrobiologia (in press).
- Sanbook, J., Fritsch, E.F. i Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning. A Laboratory Manual. 2^o Edition.
- Sanz, A., Garcia-Barreño, B., Nogal, M.L., Viñuela, E. i Enjuanes, L. 1985. Monoclonal antibodies specific for African swin fever virus proteins. Journal of Virology 54: 199-206.
- Sarnat, H.B. 1984. Muscle histichemistry of the planarian *Dugesia tigrina* (Turbellaria: Tricladida): Implications in the evolution of muscle. Trans. Amer. Microsc. Soc. 103(3); 284-294.
- Schawaller, M., Schenck, K., Hoffmeister, S.A.H., Schaller, H. i Schaller, H.C. 1988. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing head activator in precursor form and immunocytochemical localization of head activator precursor and head activator peptide in the neural cell line NH15-CA2 and in hydra. Differentiation 38; 149-160.
- Sharon, J., Morrison, S.L. i Kabat, E.A. 1979. Detection of specific hybridoma clones by replica immunoadsorption of their secreted antibodies. Proc. Natl. Acad. Sci. 76: 1420-1424.

Bibliografia

- Shenk, M.A., Bode, H. i Steele, R.E.** 1993. Expression of Cnox-2, a HOM/HOX homeobox gene in hydra, is correlated with axial pattern formation. Development 117; 657-667.
- Shimizu, T., Nettesheim, P., Eddy, E.M. i Randell, S.H.** 1992a. Monoclonal antibody (Mab) markers for subpopulations of rat tracheal epithelial (RTE) cells. Exp. Lung Res. 18; 323-342.
- Shimizu, T., Nettesheim, P., Ramaekers, F.C.S. i Randell, S.H.** 1992b. Expression of "cell-type-specific" markers during rat tracheal epithelial regeneration. Ann. J. Resp. Cell Mol. Biol. 7; 30-41.
- Shirakawa, T., Sakurai, A., Inoue, T., Sasaki, K., Nishimura, Y., Ishida, S. i Teshirogi, W.** 1991. Production of cell- and tissue-specific monoclonal antibodies in the freshwater planarian *Phagocata vivida*. Hydrobiologia 227; 81-91
- Synder, D.S., Barbu, M. i Uzman, B.G.** 1990. Expression of G1N1 immunoreactive glycoproteins during development and regeneration in avian peripheral nerve. Develop. Neuroscience 12; 172-195.
- Skaer, R.J.** 1961. The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Iijima). Quart. J. Micr. Sci. 102; 295-317.
- Spackman, D.H., Stein, W.H. i Moore, S.** 1962. Anal. Chem. 30; 1190-1206.
- Specian, R.D. i Oliver, M.G.** 1991. Functional biology of intestinal goblet cells. American Physiological Society. 183.
- Steube, K., Gross, V. i Heinrich, P.C.** 1985. Deglycosylation of Ó1-proteinase inhibitor by endo-β-N-acetylglucosaminidase F. Biochemistry 24; 5587-5592.
- Struhl, G., Johnston, P. i Lawrence, P.A.** 1992. Control of *Drosophila* body pattern by the hunchback morphogen gradient. Cell 69(2); 237-249.
- Talhamer, J. i Freund, J.** 1984. Cascade immunization: a method of obtaining polyspecific antisera against crude fractions of antigens. J. Immunol. Methods 66: 245-251.

- Tamura, K., Aoki, Y. i Ide, H.** 1993. Induction of polarizing activity by retinoic acid occurs independently of duplicate formation in developing chick limb buds. Develop. Biol. 158, 341-349.
- Tan, C.K., Castillo, C., So, A.G. i Downey, K.M.** 1986. An auxiliary protein for DNA polymerase-delta from fetal calf thymus. J. Biol. Chem. 261; 255-263.
- Tarentino, A.L., Gómez, C.M. i Plummer Jr., T.H.** Deglycosilation of asparagine-linked glycans by peptide: N-glycosidase F. Biochemistry 24; 4665-4671.
- Tonegawa, S., Hozumi, N., Matthysens, G. i Schuller, R.** 1977. Somatic changes in the content and context of immunoglobulin genes. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. 41; 877-889.
- Tonegawa, S.** 1983. Somatic generation of antibody diversity. Nature 302; 575-581.
- Towbin, H., Staehelin, T. i Gordon, J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulosa sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76; 4350-4354.
- Tracy, R.P. i Young, S.** 1984. Clinical Applications of Two-Dimensional Gel Electrophoresis. In: Two-Dimensional Gel Electrophoresis of Proteins. Academic Press.
- Trimble, R.B. i Maley, F.** 1984. Optimizing hydrolisis of N-linked high-mannose oligosaccharides be endo- β -N-acetylglucosaminidase H. Anal. Biochem. 141; 515-522.
- Utsumi, H.** 1990. The localization of cellular retinoic acid binding protein in the developing rat brain. J. Tokyo Women's Med. Col. 60(9); 837-846.
- Vielmeter, J., Lottspeich, F. i Stuermer, C.A.O.** 1991. The monoclonal antibody E587 recognizes growing (new and regenerating) retinal axons in the goldfish retinotectal pathway. J. Neuroscience 11 (11); 3581-3593.
- Vilella, R.** 1986. Anticuerpos monoclonales dirigidos contra antígenos de superficie leucocitaria. Tesi Doctoral. Universitat de Barcelona.

Bibliografia

- Wanek, N., Gardiner, D.M., Muneoka, K. i Bryant, S.V. 1991. Conversion by retinoic acid of anterior cells into ZPA cells in the chick wing bud. Nature, 350; 81-83.
- Wang, B.B., Müller-Immergluck, M.M., Austin, J., Robinson N.T., Chisholm, A. i Kenyon, C. 1993. A homeotic gene cluster patterns the anteroposterior body axis of *C. elegans*. Cell 74; 29-42.
- Wight, T.N., Kinsella, M.G. i Qwarnström, E.E. 1992. The role of proteoglycans in cell adhesion, migration and proliferation. Curr. Op. in Cell Biol. 4; 793-801.
- Wikgren, M.C. i Reuter, M. 1985. Neuropeptides in a microturbellarian-whole mount immunocytochemistry. Peptides 6(3); 471-475.
- Wolff, E. 1962. Recent researches on the regeneration of planarian. In: Regeneration. 20th Growth Symposium. The Ronald Press Co; 53-84.
- Wolff, E., Lender, T. i Ziller-Sengel, C. 1964. Le rôle de facteurs autoinhibiteurs dans la régénération des planaires. Rev. Suisse Zool. 71; 75-89.
- Wray, W., Boulikas, T., Wray, W.P. i Hancock, R. 1981. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels. Analytical Biochemistry 118; 197-201.
- Yamaguchi, Y., Mann, D.M. i Ruoslahti, E. 1990. Negative regulation of transforming growth factor- β by the proteoglycan decorin. Nature 346; 281-284.
- Yang, E.V., Shima, D.T. i Tassava, R.A. 1992. Monoclonal antibody ST1 identifies an antigen that is abundant in the axolotl and newt limb stump but is absent from the undifferentiated regenerate. J. Exp. Zool. 264; 337-350.
- Zimmermann, U. 1982. Electric-field mediated fusion and related electrical phenomena. Biochim. Biophys. Acta 694; 227-277.