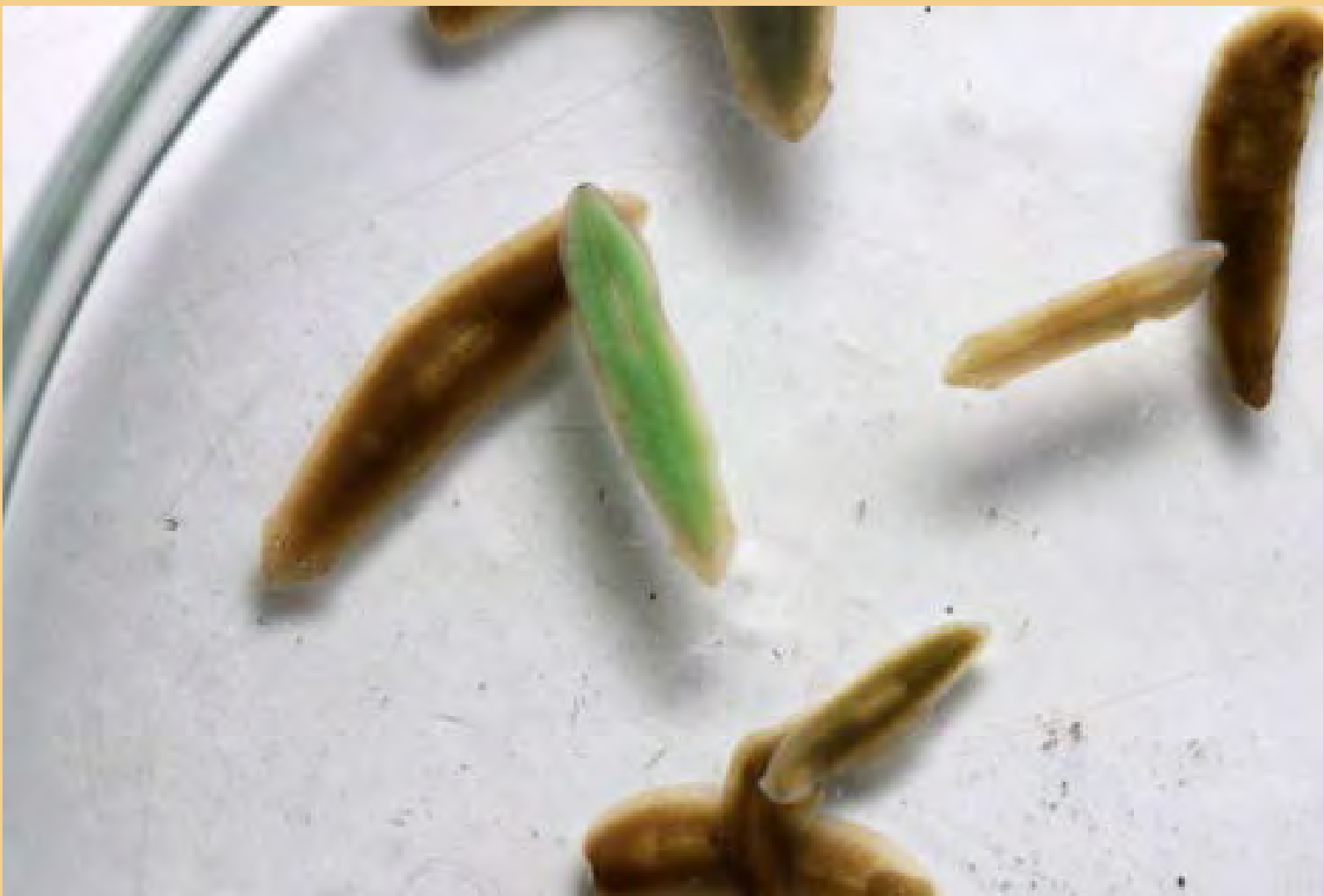


# Introducció a l'estudi de les planàries.

Manteniment, descripció i recerca



Treball de recerca

Quim Abril Carenys

Tutors: Dr. Josep Marí Torres / Eudald Pascual Carreras

Novembre de 2016

## Índex

|                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Pròleg i Objectius .....                                                                      | 05 |
| 1. Introducció i antecedents .....                                                            | 06 |
| 1.1 Cèl·lules mare .....                                                                      | 06 |
| 1.2 Regeneració en el regne animal.....                                                       | 08 |
| 1.3 Planàries .....                                                                           | 08 |
| 1.3.1 Característiques generals.....                                                          | 09 |
| 1.3.2 Tipus de planàries a Catalunya .....                                                    | 10 |
| 1.4 Planàries a l'Escola (antecedents) .....                                                  | 11 |
| 2. Material i mètodes .....                                                                   | 12 |
| 2.1 Instal·lacions per les planàries .....                                                    | 12 |
| 2.1.1 Cerca d'individus en el seu medi .....                                                  | 13 |
| 2.2 Condicions de regeneració .....                                                           | 14 |
| 2.3 Obtenció d'imatges .....                                                                  | 14 |
| 2.4 Fixació .....                                                                             | 15 |
| 2.5 Tinció immunohistoquímica .....                                                           | 16 |
| 3. Resultats .....                                                                            | 18 |
| 3.1 Estudi de les planàries en el seu hàbitat natural .....                                   | 18 |
| 3.1.1 Riu Tordera .....                                                                       | 18 |
| 3.1.2 Santa Fe del Montseny .....                                                             | 19 |
| 3.1.3 Parc Mossèn Cinto Verdaguer i Viviers dels Tres Pins .....                              | 20 |
| 3.1.4 Comparació amb el bassal .....                                                          | 21 |
| 3.2 Adaptació de les planàries a l'escola .....                                               | 21 |
| 3.3 Treball de laboratori .....                                                               | 23 |
| 3.3.1 Estudi de les variables en regeneració de <i>S. polychroa</i> i <i>G. tigrina</i> ..... | 23 |
| 3.3.1.1 Descripció <i>in vivo</i> de les espècies .....                                       | 23 |
| 3.3.1.2 Descripció de la regeneració de les planàries en diferents variables .....            | 23 |
| 3.3.1.2.1 Variació de pH .....                                                                | 23 |
| 3.3.1.2.2 Variació d'exposició lumínica .....                                                 | 24 |
| 3.3.2 Descripció <i>in vivo</i> de la planària <i>Schmidtea mediterranea</i> .....            | 24 |
| 3.3.2.1 Individu intacte.....                                                                 | 24 |
| 3.3.2.2 Individu regenerant .....                                                             | 25 |
| 3.3.3 Descripció molecular de la planària <i>Schmidtea mediterranea</i> .....                 | 27 |
| 3.3.3.1 Individu intacte .....                                                                | 27 |
| 3.3.3.2 Individu regenerant .....                                                             | 29 |
| 4. Discussió .....                                                                            | 31 |
| 5. Conclusions .....                                                                          | 33 |
| 6. Bibliografia .....                                                                         | 34 |
| 7. Annexos .....                                                                              | 35 |
| 7.1 Notícia a El Periódico .....                                                              | 35 |
| 7.2 Protocol gràfic per a la localització de planàries a la natura .....                      | 36 |
| 7.3 Annex fotocronològic .....                                                                | 39 |
| Agraïments i mencions especials .....                                                         | 61 |

## Pròleg i Objectius

Aquest treball de recerca és el primer que es fa a Escola sobre les planàries, uns animals que estan sent estudiats actualment en molts laboratoris degut a la seva gran capacitat de regeneració.

He escollit aquest treball ja que sempre havia pensat que els treballs de biologia eren els més interessants, i aquest no n'era una excepció. Però el que més em va fer decantar per aquest treball va ser una sortida a la Facultat de Biologia, allà hi vam realitzar unes pràctiques. Després d'aquestes, vam anar a parlar amb un exalumne, l'Eudald Pascual, que està fent un doctorat amb les planàries. Ell ens va explicar quina feina estava fent allà, i em va interessar molt.

La idea d'aquest treball, va sorgir per la proposta que va fer l'Eudald al meu tutor del treball de recerca. Ell li va proposar de compartir la tutoria d'aquest treball, ja que a part d'haver proposat el treball, ell podia ajudar-me amb tots els seus coneixements sobre aquest organisme tan peculiar.

En aquest treball de recerca pretenem aconseguir obtenir una colònia estable de planàries al bassal del Pati de les tortugues de l'Escola. Per fer-ho, estudiarem les planàries més freqüents que es troben en aigües catalanes, analitzarem l'aigua dels seus hàbitats i la seva resposta a diferents condicions ambientals per veure quina és l'espècie més idònia per a introduir al bassal i que s'hi pugui desenvolupar de forma autosuficient.

Però, com he comentat abans, també m'he interessat per les tècniques modernes que s'utilitzen actualment en l'estudi d'aquests animals "model" en recerca biomèdica. És per això que en aquest treball es poden veure dues vessants, la de camp, treballada en sortides, al bassal i unes petites proves fetes al laboratori de Biologia de l'Escola, i la de laboratori, feta en un dels laboratoris del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona (UB).

En concret, els objectius del meu treball són:

- Aprendre a localitzar i a identificar planàries a la natura.
- Comparar els diferents factors ambientals (conductivitat, pH i temperatura) de l'hàbitat natural de les planàries i el bassal.
- Estudiar la capacitat regenerativa de les planàries davant de diferents variables ambientals
- Aconseguir establir una colònia de planàries a l'Escola.
- Estudiar la regeneració amb l'ajuda de diferents tècniques moleculars

Abans de començar a tractar la metodologia de la part experimental, s'introduiran alguns conceptes com ara les cèl·lules mare, el procés de regeneració i les característiques generals de les planàries. També s'esmentaran aspectes o estudis sobre aquests animals que s'hagin iniciat o realitzat anteriorment a l'Escola. Per a poder conèixer els detalls d'aquest darrer punt es consultaran els documents fotocronològics<sup>1</sup> d'anys anteriors, disponibles com annex en els treballs de recerca del projecte del Pati de les tortugues penjats al web de l'Escola<sup>2</sup>. Finalment, en aquest treball també es farà ús dels annexos, sobretot de l'annex fotocronològic, realitzat conjuntament amb els meus companys Ferran Jiménez i Pau Vilaseca.

---

<sup>1</sup> El document fotocronològic consisteix en mostrar amb explicacions curtes i grups de fotografies (generalment agrupades de 3 en 3) les activitats i tasques més rellevants dels projectes "El Pati de les tortugues" i "Treballant la fotografia" de l'Escola, portat a terme pels alumnes que realitzen el seu treball de recerca en un d'aquests àmbits..

<sup>2</sup> <http://www.escolamestral.cat/mon-cientific/el-pati-de-les-tortugues/treballs-de-recerca-cronologia.html>

## 1. Introducció i antecedents

### 1.1 Cèl·lules mare

Els éssers humans estem formats per diferents parts, en general aquestes parts s'agrupen per funcionalitat, com per exemple el sistema nerviós encarregat de percebre l'entorn i donar ordres, el sistema respiratori que oxigena cada part del nostre cos o el sistema muscular que ens permet la locomoció. Però tots aquests sistemes per més diferents que siguin un dels altres, tenen un fet en comú, tots ells estan formats per cèl·lules. De fet, cada sistema està format per diferents tipus de cèl·lules o tipus cel·lulars, que tenen una funció concreta i específica. Així doncs al sistema nerviós hi trobem les neurones que transmeten senyals bioelèctrics, al sistema respiratori trobem els alvèols que permeten l'intercanvi de gasos o les cèl·lules musculars que es contrauen.

Com veiem, tots els tipus cel·lulars tenen una funció concreta, però totes les cèl·lules tenen el mateix contingut genètic, és a dir, que totes les cèl·lules d'un mateix individu tenen el mateix contingut de gens (el mateix genoma). El que fa que una cèl·lula sigui diferent d'una altra serà l'activació (expressió) d'uns determinats gens o uns altres, per tant, no trobarem activats els mateixos gens en una neurona i en una cèl·lula muscular.

Aquesta gran varietat de tipus cel·lulars s'adquireixen i es formen al llarg del desenvolupament, el procés pel qual un zigot (la cèl·lula resultant de la unió d'un espermatozoide i un òvul) va creixent i formant un organisme adult.

Les cèl·lules clau per tal de que el procés de desenvolupament es dugui a terme són les cèl·lules mare (CM). De fet, el zigot és la primera cèl·lula mare del nou organisme. Les cèl·lules mare tenen dues característiques bàsiques.

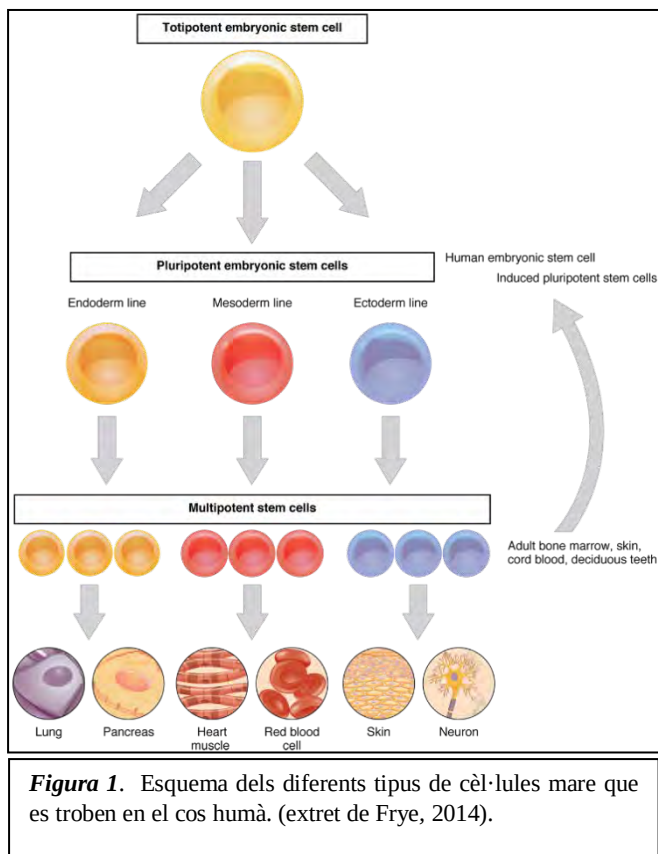
- Capacitat d'autorenovar-se. A partir d'una divisió mitòtica, on el contingut genètic es duplica, pot donar una cèl·lula igual.
- Diferenciació. A partir de la divisió mitòtica, s'obté una segona cèl·lula que serà una mica més diferenciada que la cèl·lula mare, i per tant ja serà una mica més similar a una cèl·lula amb una funció final i clara.

De cèl·lules mare n'hi ha de diferents tipus, el motiu que les diferencia és la capacitat de donar un tipus de cèl·lula filla més o menys diferenciat. Així doncs trobem:

- CM Totipotents: són capaces de dividir-se en qualsevol tipus de cèl·lula. Procedeixen de la fecundació d'un òvul i un espermatozoide (en els cas dels animals) o bé són espores (en el cas del regne animal). Son capaces de formar cèl·lules embrionàries (espermatozoides o òvuls en animals), originant un individu sencer.
- CM Pluripotents: són capaces de fer qualsevol cèl·lula menys les embrionàries.
- CM Multipotents: són capaces de formar diferents tipus de cèl·lules, però no totes.
- CM Unipotents: són únicament capaces de fer un tipus de cèl·lula.

Tots els diferents tipus de cèl·lules mare es troben representats en l'organisme d'una persona adulta al llarg de la seva vida. Trobem cèl·lules mare a dins dels ossos per la producció de cèl·lules de la sang, a la musculatura per poder refer les ferides musculars, a sota la pell per poder refer les ferides que ens fem. Les cèl·lules mare juguen un paper molt important al llarg de tota la vida d'un ésser humà.

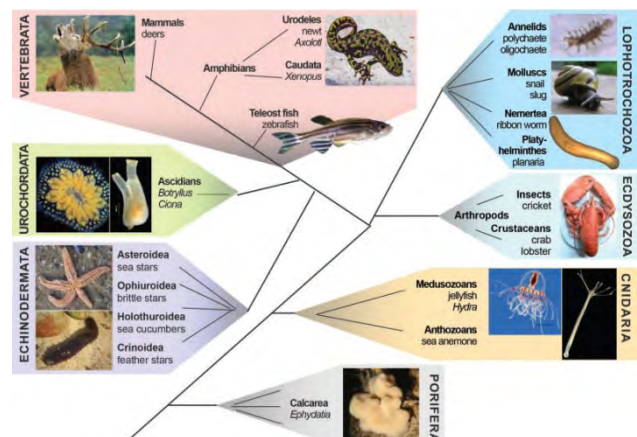
L'enorme potencial d'aquestes cèl·lules per ser utilitzades amb el fi de curar malalties fins ara incurables, ha fet que aquestes juntament amb els animals model (les planàries entre ells) hagin esdevingut el centre de la majoria dels estudis en la biomedicina moderna. (Handberg-Thorsager, Fernandez & Saló, 2008) (dibuix <sup>3</sup>esquemàtic cèl·lula mare)



<sup>3</sup> <http://clubhousenews.com/cloning-breakthrough-stem-cells-created-from-adults/>

## 1.2 Regeneració en el regne animal

La capacitat de regenerar, existeix en quasi tots els grups animals, des dels invertebrats com les planàries, fins als mamífers com nosaltres. Les planàries no han estat els primers animals model en el camp de la regeneració, s'han utilitzat des de fa anys els tritons i salamandres, capaços de regenerar una extremitat, i el peix zebra, que és capaç de regenerar mig cor. Aquests però, no són els únics animals que tenen aquesta capacitat. Tot i no ésser tan estudiades, les estrelles de mar, tenen una capacitat regenerativa molt gran; a partir de l'amputació d'una pota, regeneren tant la pota des del cos, com el cos des de la pota (Figura 2). La regeneració arriba fins a l'àmbit humà, tenint la capacitat de regenerar les ungles, el cabell o la pell després d'un tall, o bé també som capaços de regenerar una part del fetge, un òrgan vital per a nosaltres (Galliot *et al.*, 2010).



**Figura 2.** Distribució de la capacitat de regeneració en el regne animal. Adaptat de Galliot, B i al. (2010).

La ciència s'ha interessat per la regeneració des de finals del segle XIX. Ha evolucionat la idea de regeneració, però fins a principis del segle XXI es considerava que la capacitat de regeneració es podia classificar en dos tipus:

- Morphallaxis, és la regeneració a través de remodelació i re-establiment de patrons dins d'un teixit preexistent, amb poc creixement. La regeneració de l'Hidra n'és un exemple.
- Epimorphosis, en canvi, es produeix quan parts perdudes es construeixen de nou a través del creixement de nous teixits. Els exemples més típics són la regeneració en la cua i les extremitats en tritons (Handberg-Thorsager, Fernandez & Saló, 2008).

Actualment és té una visió més complexa del procés de regeneració, on els dos processos anteriors juguen un paper molt important i no s'exclouen.

## 1.3 Planàries

### 1.3.1 Característiques generals

Les planàries són uns cucs plans de vida lliure, la majoria de les espècies són no paràsites, i formen part del fílum dels platihelminths. Els individus d'aquest fílum poden ser de vida terrestre o aquàtica (d'aigües continentals o marines), tot i que el meu treball es centrarà exclusivament en les d'aigua dolça, concretament en les dels rius de Catalunya. Les planàries són uns éssers tous, sense esquelet i aplanats dorsoventralment, és a dir, que són plans d'esquena a tòrax. No presenten sistema circulatori ni respiratori, així que oxigenen el cos a partir de la difusió de gasos directament amb el medi. Aquests organismes tenen una clara cefalització, amb un cervell a la part anterior i, en general, dos ulls en aquesta posició que detecten la llum (Figura 3<sup>4</sup>). Aquests organismes presenten un intestí cec molt ramificat que reparteix l'aliment per tot el cos (Figura 4); l'intestí connecta amb una faringe evaginable amb la qual pot ingerir l'aliment. La faringe surt per la boca, situada ventralment en l'organisme.

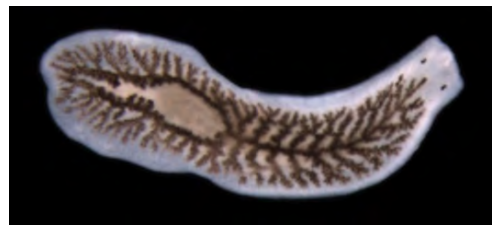
<sup>4</sup> imatges extretes de Planmine: <http://planmine.mpi-cbg.de/planmine/begin.do>

Les planàries tenen diferents tipus cel·lulars, alguns d'especialitzats com ara neurones, cèl·lules musculars o bé cèl·lules secretores. Però també tenen un gran percentatge (20-30%) de cèl·lules mare, els neoblasts, distribuïdes al llarg de tot l'organisme, excepte per davant dels ulls i tampoc en tenen a la zona de la faringe. És gràcies als neoblasts pels quals les planàries són capaces de regenerar després d'una amputació. És gràcies a aquesta gran capacitat regenerativa, juntament amb el fet de presentar un gran nombre de cèl·lules mare en els organismes adults, que ha convertit a les planàries en un organisme model ideal. De fet, ja va ser estudiat per Morgan al 1914 que va definir aquests organismes com immortals sota la fulla d'una ganiveta (Cebrià *et al.*, 2011).

Per tant, veiem que aquests organismes tenen una reproducció asexual, ja que després d'una amputació apareix un individu nou. Aquest fet, també es pot donar de manera natural, de manera que quan una planària adquireix una mida gran es pot fisionar deixant anar una cua i com a conseqüència obtenir un nou individu. A part d'aquesta capacitat reproductiva, algunes espècies de planària també presenten reproducció sexual, és a dir, que tenen aparells reproductors. Així doncs els organismes que presenten els dos sexes (hermafrodites) poden tenir una reproducció creuada i fertilitzar-se. Com a conseqüència, les planàries generen unes càpsules poliembriòniques anomenades cocoons, així doncs de cada un d'aquests cocoons sortiran més d'un individu juvenil que anirà creixent fins a convertir-se en adult (Saló, E., 2006).



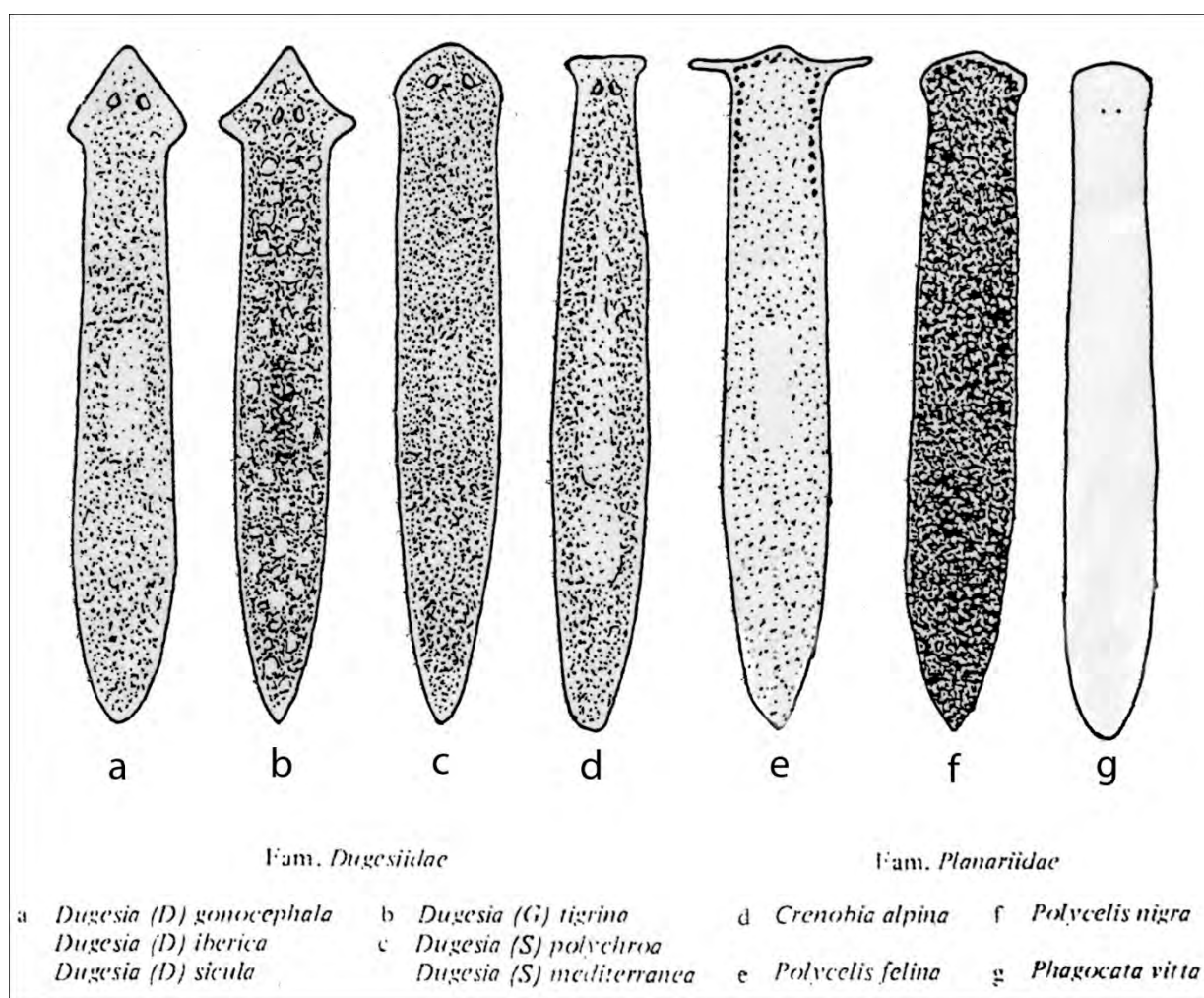
**Figura 3.** Planària *Schmidtea mediterranea* (Extret de *Planmine*; vegeu text).



**Figura 4.** Planària *Dendrocoelum lacteum*, la seva pigmentació mostra el sistema digestiu, on podem veure que és molt ramificat. (Extret de *Planmine*).

### 1.3.2 Tipus de planàries a Catalunya

Un cop s'han descrit les planàries a nivell morfològic, passaré a descriure les diferents espècies de planària que trobem a Catalunya. Al llarg dels anys s'han descrit unes deu espècies diferents al llarg del territori català. Originalment s'han separat en dos grans grups, *DugesIIDae* i *Planariidae*. Actualment les espècies de planària *Dugesia tigrina*, *Dugesia polychroa*, i *Dugesia mediterranea*, han canviat de gènere i han passat anomenar-se *Girardia tigrina*, *Schmidtea polychroa* i *Schmidtea mediterranea*, respectivament. Aquestes planàries estan distribuïdes per Catalunya en zones mitjanes i baixes dels rius on l'aigua és més quieta i té una temperatura més alta. Per altra banda, en les zones altes dels rius, on les aigües són més fredes, hi trobem les espècies *Polycelis felina* i *Crenobia alpina*.



**Figura 5.** Representació gràfica (vista dorsal) de les espècies de planàries d'aigua dolça presents a la Península Ibèrica. Les espècies no estan representades a la mateixa escala. (Extret d'una publicació interna del grup del Dr. Jaume Bagunyà).



#### 1.4 Planàries a l'Escola (antecedents)

A part del coneixement obtingut de planàries per les pràctiques realitzades a l'assignatura de Biologia a 1r de Batxillerat i consultant els documents fotocronològics de treballs de recerca del Pati de les tortugues d'anys anteriors, vaig comprovar que s'havien utilitzat planàries per fotografia biològica (Sònia Marías, 2015) i que s'havien introduït al bassal alguns exemplars de *Girardia tigrina* (*G. tigrina*) i de *Schmidtea polychroa* (*S. Polychroa*), procedents d'una sortida al riu Tordera el curs passat (Laia Ginestà, 2015).

En aquesta sortida es va poder comprovar la necessitat de mantenir els falcon<sup>5</sup> on anaven les planàries a dins d'un termo per al transport refrigerat fins al seu destí final, ja que les que no s'hi van mantenir, malgrat portaven menys temps als pots, van arribar mortes (Figura 6). Aquesta observació va ser accidental, perquè la raó de no posar el segon falcon a l'interior del termo va ser senzillament que no hi cabia, ja que el termo utilitzat era massa petit i també massa estret<sup>6</sup>.



**Figura 6.** Primera introducció de planàries procedents d'indrets naturals al bassal del Pati de les tortugues. A l'esquerra, termo i dos recipients falcon, el de tap lila amb planàries vives perquè havia viatjat a dins del termo refrigerat, mentre que en el de tap vermell havien mort totes. Al mig i a la dreta la Laia Ginestà i la Sònia Marías alliberant les planàries procedents del falcon de tap lila al bassal. Imatge procedent del document fotocronològic del curs passat (Laia Ginestà, 2015).

Durant el curs, nosaltres com alumnes de Biologia a 1r de Batxillerat, abans del treball de recerca també en vam introduir algunes que ens havia proporcionat l'Eudald quan li vam fer la visita al Departament de Genètica de la Facultat de Biologia (UB), aprofitant una estada de pràctiques de Bioquímica a la mateixa Facultat.

En aquest cas es tractava de l'espècie *Schmidtea mediterranea* (*S. mediterranea*), procedent de les basses dels viviers dels Tres Pins de Montjuïc, on el Departament de Genètica hi manté una població estable que distribueix a tots els laboratoris del Món<sup>7</sup> que treballen amb aquesta espècie, una de les més utilitzades.

Nosaltres també hem visitat aquestes bases i hem mesurat *in situ* algunes característiques de les seves aigües perquè ens interessava, però no hi hem agafat planàries (vegeu Annex fotocronològic del dia 5/08/2016).

<sup>5</sup> recipients de plàstic amb tapa de rosca, molt adequats per el transport de mostres d'aigua i de petits invertebrats.

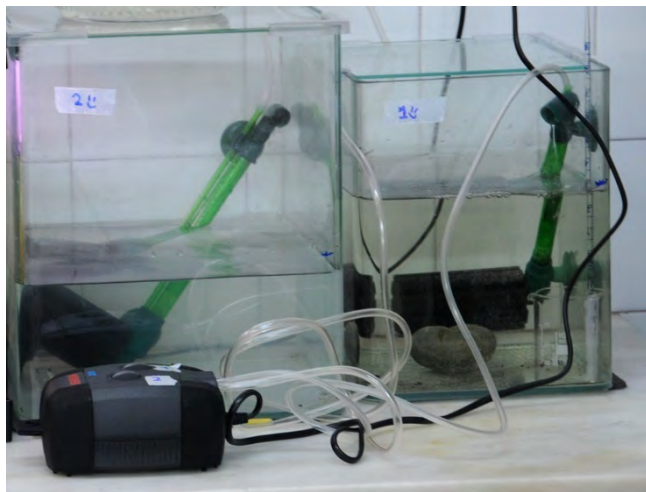
<sup>6</sup> informació aportada pels meus tutors.

<sup>7</sup> Informació extreta de l'article de El Periodico "El bronzejat del cuc" del 4/07/2016 (vegeu annex 7.2).

## 2. Material i mètodes

### 2.1 Instal·lacions per les planàries

Per a dur a terme aquest projecte, el primer que necessitàvem era un lloc en el qual poguéssim deixar i mantenir les planàries en condicions idònies i també homogènies, per tal de poder disposar d'un reservori



**Figura 7.** Sistema de filtració d'aigua utilitzat a l'Escola per a mantenir planàries.

d'exemplars equivalents per a la realització de proves al laboratori de l'Escola. Aquesta instal·lació havia de ser relativament petita per poder agafar fàcilment els exemplars, havia de permetre alimentar a voluntat a les planàries i tenir un dispositiu de circulació de l'aigua per la seva correcta oxigenació. Per tot això, vam optar per utilitzar un sistema molt semblant al que tenen al Departament de Genètica i, degut al seu baix preu, vam comprar el mateix sistema de compressor i filtres que disposen ells. El sistema consisteix en un filtre d'aigua connectat a una bomba d'aire de manera que es crea una corrent que absorbeix tota la brutícia que hi hagi a l'aigua (Figura 7).

Però nosaltres també necessitàvem una instal·lació diferent, en la que no haguéssim d'afegir aliment a les planàries perquè volíem que representés una versió en petit de les condicions del bassal del Pati de les tortugues. Per això havia de ser una instal·lació relativament gran, que permetés realitzar proves *in situ*, també amb certa circulació d'aigua.

Per fer aquesta segona instal·lació vam aprofitar l'aqua-terrari gran, on hi havia la salamandra que vam retornar al bassal del Pati de les tortugues (vegeu Annex fotocronològic del dia 8/08/2016). Ara ja disposàvem d'una instal·lació de bones dimensions (Figura 8). El vam netejar bé, li vam posar un filtre en el que l'aigua queia en cascada i hi vam posar aigua del bassal, juntament amb alguna elodea (*Elodea canadensis*) i alguns exemplars de gambúsia (*Gambusia affinis*) i també un parell de fulles de nenúfar en estat de semi descomposició, amb la intenció que es generi l'aliment que les planàries i els peixos introduïts necessitin. També hi vam introduir diverses pedres perquè les planàries poguessin amagar-se de la llum durant el dia.



**Figura 8.** Aquaterrari del laboratori transformat en aquari per les planàries, que representa un model de les condicions del bassal del Pati de les tortugues.

A part de les instal·lacions abans esmentades, construïdes o adaptades per a mantenir planàries, la més important, sens dubte, és el bassal del Pati de les tortugues. Aquí no hi fem cap modificació. Els avantatges del pati de les tortugues és que allà les planàries tenen molt d'espai, de manera que l'aigua varia més i poden posar-se on millor estiguin, a part del fet que no hem de preocupar-nos d'alimentar-les ja que hi ha una gran biodiversitat tal com es pot veure en el treball de recerca de "*Increment de la biodiversitat al pati de les tortugues*" (Albert Marsà, 2010). El que sí que s'ha fet, com hem vist, des del curs passat i també aquest, és introduir exemplars de diverses espècies de planàries amb l'esperança que alguna s'hi adapti bé.

### 2.1.1 Cerca d'individus en el seu medi

Un cop havíem definit com podíem establir les poblacions de planàries, vam anar a buscar planàries en el medi on es troben. Per tal de dur a terme aquesta recerca primerament ens vam basar en les instruccions que vam trobar explicades a l'annex fotocronològic dels treballs de recerca del curs passat (Sònia Marías, 2015). Per altra banda, vam contactar amb el grup de la Dra. Marta Riutort (Departament de Genètica, Microbiologia i Estadística, Facultat de Biologia, UB) que estudia com van evolucionar les planàries i fan recerques molt exhaustives a diferents regions. Ells em van cedir una guia d'on trobar planàries i de com agafar-les (vegeu annex 7.2). Tal com s'indica en el document annexat hem necessitat diferents estris. Per altra banda, per realitzar diferents mesures de paràmetres ambientals, vam adquirir un conductímetre que, a part de la conductivitat, també mesura la temperatura i el pH de l'aigua, de manera que podíem determinar fàcilment aquests tres paràmetres dels diferents llocs on trobàvem les planàries (Figura 9).

Per tal d'aconseguir trobar les planàries al seu medi, hem seguit les recomanacions de l'esmentada guia i ens hem informat d'observacions realitzades anteriorment explicades en l'annex fotocronològic dels treballs de recerca del curs passat (Sònia Marías, 2015). Un cop vam trobar les planàries les vam agafar amb l'ajuda d'un pinzell, que ens permet desenganxar-les, i tot seguit les posem en un tub falcon que ha estat prèviament omplert amb aigua del mateix riu.

Un cop va finalitzar la recerca, vam prendre les mesures dels paràmetres abans esmentats dels diferents indrets del riu on vam trobar planàries i també dels llocs que no en vam trobar, per tal de poder fer una relació entre les característiques de l'aigua i la quantitat de planàries que vam trobar.



**Figura 9.** Mesurador portàtil de conductivitat, temperatura i pH utilitzat en les mesures de camp.

Com vam llegir a l'annex fotocronològic del curs passat (vegeu figura 6), sabíem que el transport dels individus era clau per la seva supervivència, així que vam posar els tubs falcon amb les planàries dins d'un termo omplert amb l'aigua del riu, per tal que no s'escalfés l'aigua i no morissin durant el viatge (vegeu Annex fotocronològic del dia 12/07/2016).

## 2.2 Condicions de regeneració

En aquest treball hem mirat d'entendre quin comportament té el procés regeneratiu davant de diferents estímuls ambientals, per fer-ho hem utilitzat les planàries com a organisme model de la regeneració. Així doncs, vam seccionar diferents animals i vam exposar els fragments a diferents estímuls ambientals: variació de pH i variació de l'exposició lumínica (vegeu apartat

3.3.1).

Per entendre quin era el pH idoni per la supervivència de les planàries, vam començar a estudiar l'aigua del bassal, ja que les planàries hi viuen bé i el vam denominar pH òptim. El bassal presentava un pH de 8,4, així doncs vam variar el pH a partir de 8,4 acidificant-lo o basificant-lo. Per fer-ho vam afegir a poc a poc àcid clorhídric diluït per tal de baixar el pH de l'aigua inicial fins a pH de 6,4 i 7,4. Per a fer-lo més bàsic, vam preparar una solució de sosa càustica (hidròxid de sodi) i de la mateixa manera, la vam anar abocant a l'aigua inicial fins a obtenir uns pHs de 9,4 i 10,4. Llavors, vam seccionar les planàries de manera que ens quedessin caps i troncs i vam observar durant els següents dies com evolucionava el procés regeneratiu.

L'altre estímul ambiental que vam voler estudiar va ser l'exposició lumínica. És conegut que les planàries són uns organismes fotofòbics, i vam voler veure si aquest fet afectava a la seva regeneració. Així doncs, vam decidir exposar-les a tres tipus d'il·luminacions diferents: il·luminació permanent, on rebien una il·luminació constant de llum freda, absència d'il·luminació, on no van rebre mai llum, i llum natural, on rebien un cicle natural de llum (nit i dia). A partir d'aquí, vam tallar les planàries en tres parts (cap, tronc i cua) i les vam deixar en els 3 tipus d'il·luminació estudiant el procés regeneratiu.

## 2.3 Obtenció d'imatges

Quan vam plantejar aquest treball vam haver de pensar com obtindríem imatges. A l'inici del treball ens va sorgir la necessitat de fer fotos a les planàries que teníem a l'Escola. Per fer-ho hem utilitzat una lupa binocular amb càmera acoblada *Moticam* connectada a l'ordinador. Per no malmetre les planàries mentre vam realitzar les fotografies les vam il·luminar amb llum freda.





**Figura 10.** Imatge d'una planària feta amb la càmera de la lupa binocular

Després d'una sortida per buscar planàries, vam voler fer fotos al conjunt de les planàries. Per tal d'obtenir les imatges, vam utilitzar una càmera rèflex amb un objectiu macro. Vam posar un full blanc de fons i un focus LED (de llum freda) enfocant-les per tal que es veiés millor el contrast de les planàries amb el fons.

Durant les pràctiques realitzades a la Facultat de Biologia, vaig poder utilitzar una lupa binocular Zeiss Stemi SV6 i una càmera associada per l'obtenció de les imatges Nikon Coolpix, que és un sistema molt més sofisticat que el que tenim a l'Escola. A més a més, allà tenen un sistema de treball que els permet enfocar i centrar la planària i alhora poder fer fotografies, ja que disposen d'un pedal connectat al ratolí, de manera que amb les dues mans pots enfocar

i centrar la planària mentre amb el peu fas la foto. A l'Escola, en canvi, sempre hem de ser dues persones per poder fer fotos amb la lupa binocular o amb el microscopi, perquè mentre un controla el seguiment per mantenir la planària en el camp visual, l'altre enfoca i fa la foto.

Per l'obtenció d'imatges de fluorescència es va utilitzar una càmera Jenoptik ProgRes C3 emprant el programa *ProgRes CapturePro*.

## 2.4 Fixació

Gràcies a l'Eudald, vaig tenir l'oportunitat d'anar a la Facultat de Biologia a fer unes pràctiques, així que, havent treballat amb el procés de regeneració de les planàries davant de diferents condicions, vaig voler veure què passava a nivell molecular durant la regeneració. També volia veure com eren les planàries en condicions d'homeòstasi, és a dir, en condicions on les planàries no reben cap estímul, per tal de poder comparar com afectava a la planària un tall. Per poder veure els diferents marcadors moleculars, primer les vam fixar. El procés de fixació permet que totes les molècules quedin unides entre elles i que es puguin mantenir al lloc on es trobaven.

Per fixar les planàries, el primer pas, va ser matar-les i extreure el moc per optimitzar el procés de tinció posterior. Així doncs, per tal de matar-les i treure el moc les vam posar en una solució d'àcid clorhídric (HCl) al 2% durant 5 minuts en gel. Un cop mortes, vam treure l'àcid i vam fer un rentat amb PBSTx (Phosphate-buffered saline+Tritó) per treure les restes d'HCl. El PBS, és una solució d'aigua amb sals tamponadores (que eviten la variació del pH) i el Tx (Tritó) és un sabó que ajuda a la permeabilització.

El PBS és una solució salina molt emprada al laboratori, així doncs en comptes de preparar-la constantment, preparen una solució concentrada deu cops de PBS.

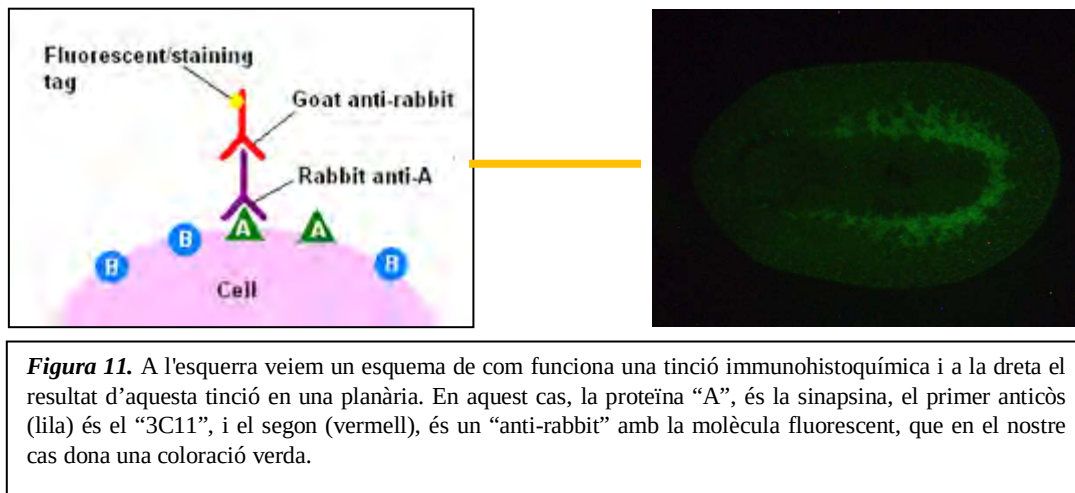
Un cop vam tenir el PBS 10x preparat, el vam diluir a PBS 1x (100 ml de PBS 10x i s'enrasa a 1 litre amb aigua). Finalment li afegim el tritó a una concentració final del 0,3% en volum, així que hem d'afegir 0,15ml de tritó 10x a la solució final. Al tenir preparat el PBSTx vam poder iniciar els rentats. Un cop hem fet uns quants rentats a les planàries, les fixem. El procés de fixació consisteix en incubar els individus 15 minuts en formaldehid al 4%. Finalment, per que la tinció es pugui apreciar amb major claredat, es fa un procés de blanquejament dels organismes ("bleaching"), utilitzant una solució de PBSTx amb H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 6%.

**Taula 1.** Com es prepara el PBS 10x

|                                  |                      |
|----------------------------------|----------------------|
| PBS 10x                          | 1l                   |
| KCl (sal comuna)                 | 80g                  |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 2g                   |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 11,5g                |
| H <sub>2</sub> O (aigua)         | enrasar              |
| HCl/NaOH                         | Ajustar pH a 7,2/7,4 |

## 2.5 Tinció immunohistoquímica

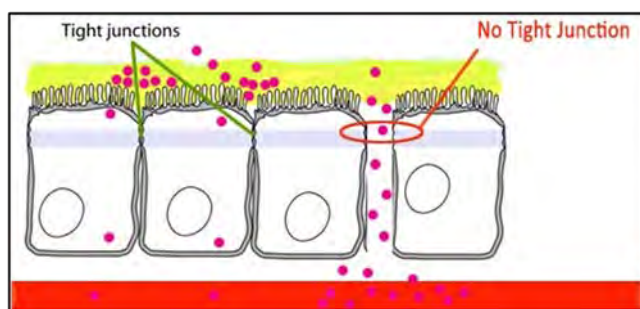
Una tinció immunohistoquímica consisteix a marcar les proteïnes de les cèl·lules a partir de la utilització d'anticossos. Aquestes molècules es troben en el sistema immunitari de moltes espècies i les ajuden a identificar els organismes patògens que es troben al seu cos. Aprofitant aquesta característica s'utilitzen els anticossos per reconèixer proteïnes específiques i veure la seva localització. Així doncs, s'utilitza un anticòs primari que s'uneix a la proteïna a estudiar, però aquest, per si sol no es pot veure a simple vista, així que s'ha de posar un anticòs secundari que s'enganxi al primari. El secundari, que reconeix el primari, té una molècula fluorescent, així que sota la llum adequada, es pot veure on es localitzen les molècules (Figura 11).



Un cop les planàries han estat fixades, afegim "blocking solution". El "blocking solution" serveix per evitar unions inespecífiques dels anticossos a altres molècules. Aquesta solució està composta per BSA (Bovine Serum Albumin) al 1% dissolt en PBST. El procés de bloqueig dura dues hores, i un cop finalitzat, s'afegeixen els anticossos primaris, que es deixen incubant tota la nit.

**Taula 2.** Taula resum dels anticossos utilitzats. S'hi mostra el nom comercial, la proteïna que detecta i a la cèl·lula que correspon amb la seva parella corresponent i on afecta. I l'anticòs secundari que el detecta.

| Anticòs primari (nom comercial) | Cèl·lules que afecta (proteïna que detecta) | anticòs secundari corresponent | Anticòs primari | Cèl·lules que afecta (proteïna que detecta) | anticòs secundari corresponent |
|---------------------------------|---------------------------------------------|--------------------------------|-----------------|---------------------------------------------|--------------------------------|
| VC1                             | Ulls (arrestina)                            | Ratolí                         | FMRF            | S. Nerviós                                  | Conill                         |
| 3C11                            | S. Nerviós (sinapsina)                      | Ratolí                         | H3P             | Neoblast en fase Mitosi                     | Conill                         |
| T9026                           | Cilis (alfa-tubulina)                       | Ratolí                         | $\beta$ cat2    | Cèl·lules epidèrmiques (tight junction)     | Conill                         |
| 22C10                           | Ulls(Futch)                                 | Ratolí                         | piwi            | Neoblast (cossos cromatòids dels neoblasts) | Conill                         |
| JLA20                           | Membrana basal epidèrmica (actina)          | Ratolí                         |                 |                                             |                                |



**Figura 12.** Dibuix esquemàtic de les unions intercel·lulars (tight junction) (Extret de Briers, 2012).

Un cop s'han posat els anticossos, es deixen incubant tota la nit (fora). L'endemà, es fan rentats de PBSTx durant tot el dia per treure les restes d'anticòs. Tot seguit, es torna a fer un bloqueig per preparar les mostres per l'anticòs secundari que també passarà tota la nit unint-se amb el primari. L'endemà es faran més rentats de PBSTx per treure les restes d'anticòs secundari.

Un cop fets els rentats de PBSTx ja podríem observar la mostra en la lupa de fluorescència, però també ens interessa observar la posició dels nuclis, per això utilitzem el DAPI, aquesta molècula s'intercala amb l'ADN i com a conseqüència tenyeix els nuclis de les cèl·lules.

Un cop fetes les tincions, s'han de muntar les mostres per tal de tenir-les en un bon estat a l'hora de prendre les imatges. El primer pas és netejar i desengreixar un portaobjectes amb etanol i paper de filtre. Llavors, hi posem les planàries i amb una pipeta Pasteur hi traiem l'aigua que sobra. Llavors, hi posem glicerol al 70%, que serveix com a medi de muntatge. Amb l'ajuda del microscopi, col·loquem les planàries en la posició que més ens convingui amb unes pinces i un pèl, per tal de no danyar-les. Finalment, hi posem un cobreobjectes, posem una capa d'esmail al seu voltant per tal d'aïllar la mostra, i amb un retolador permanent, escrivim el que hi ha en aquell portaobjectes.

Vam voler comparar com eren els individus intactes i com eren els regenerants, però teníem un gran interès a conèixer com estaven estructurades les planàries així que vam utilitzar cinc parelles d'anticossos per als individus intactes i només una per als regenerants. Aquests últims organismes els vam tallar de diferents maneres, per veure si variava el procés de regeneració, i els vam fixar a diferents punts del procés regeneratiu. En aquests individus regenerants vam utilitzar els anticossos 3C11 i el H3P.

### 3. Resultats

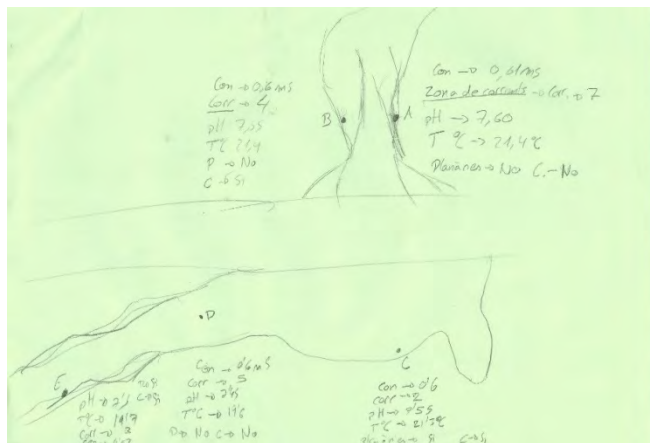
#### 3.1 Estudi de les planàries en el seu hàbitat natural

En aquest apartat parlaré dels resultats obtinguts en cada lloc que hem trobat planàries en els diferents indrets de Catalunya que hem anat.

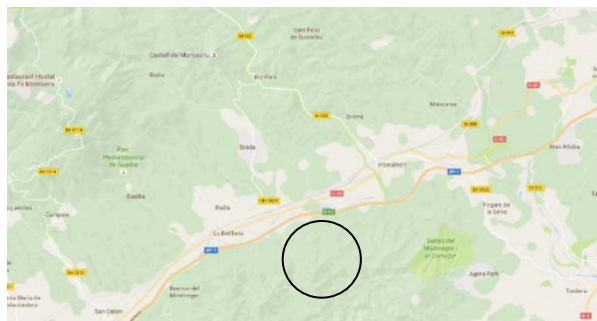
##### 3.1.1 Riu Tordera

**Taula 3.** Dades obtingudes al riu Tordera

|             | ZONES  | pH   | Conductivitat | temperatura | corrent | planàries | espècies                                                |
|-------------|--------|------|---------------|-------------|---------|-----------|---------------------------------------------------------|
| Riu Tordera | zona a | 7,6  | 0,61          | 21,4        | 4       | No        | <i>Girardia tigrina</i> i<br><i>Schmidtea polychroa</i> |
|             | zona b | 7,55 | 0,6           | 21,4        | 7       | No        |                                                         |
|             | zona c | 7,55 | 0,6           | 21,3        | 2       | Si        |                                                         |
|             | zona d | 7,45 | 0,6           | 19,6        | 5       | No        |                                                         |
|             | zona e | 7,5  | 0,61          | 19,7        | 3       | Si        |                                                         |



**Figura 13.** Dibuix a mà alçada del riu Tordera amb els diferents trams estudiats i les dades corresponents que vam prendre allà.



**Figura 14.** Ubicació de l'emplaçament on vam buscar planàries en el Riu Tordera. Imatge extreta de Google Maps

Com vaig poder observar en l'annex fotocronològic del curs anterior, els alumnes de TR van anar al Riu Tordera per trobar planàries.

Aquest riu està situat als peus del Montseny, a prop de Sant Celoni. En aquest riu vam trobar moltes planàries, de dues espècies diferents: *Schmidtea polychroa* i *Girardia tigrina*. Majoritàriament estaven situades en zones on circulava l'aigua, però on no hi havia gaire corrent. En mesurar els paràmetres físico-químics de l'aigua del riu vam constatar que el pH i la temperatura no variaven d'un indret a l'altre, gairebé igual que la conductivitat. Per altra banda, ens va semblar interessant mesurar la intensitat del corrent com a indicador de la disposició de les planàries al riu. Com que no teníem cap instrument per mesurar el corrent de manera exacta, vam realitzar una escala arbitrària d'intensitat del corrent, i vam donar valors en relació als diferents corrents que observàrem en aquesta zona del riu.



### 3.1.2 Santa Fe del Montseny

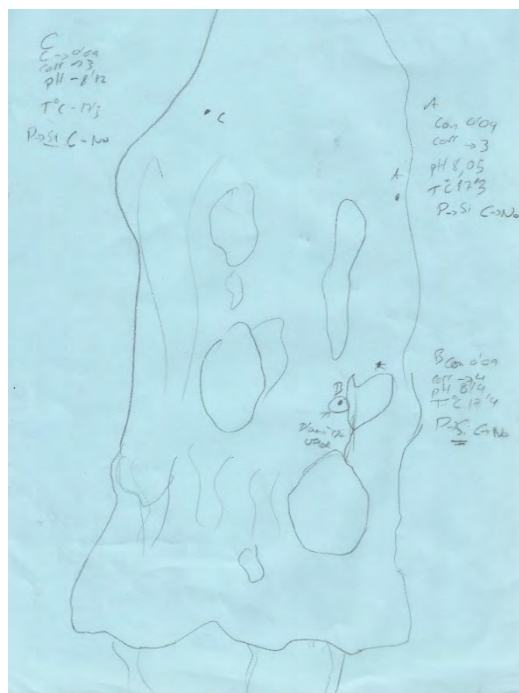
La fageda de Santa Fe del Montseny es troba a la zona més aviat alta del Montseny. Allà hi ha un embassament amb diferents rierols que hi van a parar. Aquests rierols eren força diferents del riu Tordera, ja que tenien una aigua més freda i la conductivitat era molt més baixa.

**Taula 4.** Dades obtingudes en la primera zona de Santa Fe del Montseny

|                         | ZONES  | pH   | Conductivitat (mS/cm) | temperatura °C | corrent | planàries | espècies                |
|-------------------------|--------|------|-----------------------|----------------|---------|-----------|-------------------------|
| Santa Fe del Montseny-1 | zona a | 8,05 | 0,09                  | 17,3           | 3       | Si        | <i>Girardia tigrina</i> |
|                         | zona b | 8,14 | 0,09                  | 17,4           | 4       | Si        | <i>Schmidtea</i>        |
|                         | zona c | 8,12 | 0,09                  | 17,3           | 3       | Si        | <i>polychroa</i>        |

**Taula 5.** Dades obtingudes en la segona zona de Santa Fe del Montseny

|                         | ZONES  | pH   | Conductivitat (mS/cm) | temperatura °C | corrent | planàries | espècies                |
|-------------------------|--------|------|-----------------------|----------------|---------|-----------|-------------------------|
| Santa Fe del Montseny-2 | zona a | 8,05 | 0,05                  | 14,2           | 5       | Si        | <i>Polycelis felina</i> |



**Figura 15.** Dibuix a mà alçada de la primera zona del riu de Santa Fe del Montseny amb les corresponents dades obtingudes allà.



**Figura 16.** Ubicació de l'emplaçament on vam buscar planàries a Santa Fe del Montseny. Imatge extreta de Google Maps.

En aquelles condicions no hi vam trobar moltes planàries, però tot i així vam acabar trobant-ne. Vam trobar individus de les espècies *Girardia tigrina* i *Schmidtea polychroa*. Aquests individus eren totalment diferents dels vistos anteriorment, tenien unes tonalitats verdoses, en especial una que tenia un to verdós brillant que des del primer moment ens va cridar molt l'atenció (vegeu Annex fotocronològic del

dia 12/07/2016 i portada del treball).

Ens vam allunyar una mica de la primera ubicació estudiada i ens va costar una mica més trobar planàries. En aquest indret la temperatura era més baixa i el pH i la conductivitat es van mantenir, i el corrent era més intens. Per altra banda, el riu era molt uniforme, de manera que només vam prendre una única dada. Les planàries que vam trobar eren diferents de les altres que havíem trobat fins llavors, aquestes eren fosques amb el cap pla i els sortien dues banyes a la part anterior. La vam identificar com *Polycelis felina* (vegeu figura 5e).

### 3.1.3 Parc de Mossèn Cinto Verdaguer i Vivers dels Tres Pins

Un cop havíem trobat planàries en el seu hàbitat natural, vam decidir buscar-ne a llocs més urbans, així que vam decidir anar al Parc Mossèn Cinto Verdaguer, ja que ens havien comentat que podria ser un bon indret per trobar-ne. Aquest parc és situat a la muntanya de Montjuïc, i té una sèrie de bassals plens de nenúfars connectats entre ells per unes petites cascades.

A aquest parc hi vam anar dues vegades. La primera per comprovar si realment hi havia planàries; era a la tarda, ja una mica tard, i no portàvem ni el conductímetre ni falcons, únicament uns petits flascons que el Marí sempre porta a sobre. Trobàrem moltes planàries al revers de les fulles dels nenúfars, sobretot en els indrets més propers on queia el rajolí d'aigua que comunicava els bassals del jardí (vegeu Annex fotocronològic del dia 10/07/2016). Vam decidir tornar-hi un altre dia equipats amb tot el material.

Abans de tornar a aquest, un dia vam anar als vivers dels Tres Pins de Montjuïc per veure les famoses basses de les quals han sortit les planàries més utilitzades en investigació (vegeu Annex 7.1). Però l'encarregat no hi era i ens vam limitar a mesurar els paràmetres de l'aigua de dos indrets ben diferents, un d'aigua sense corrent, situada a ple Sol i a una temperatura força alta i l'altra, les veritables basses, d'aigua més fresca, a l'ombra i amb bastant corrent d'aigua. Únicament trobàrem planàries en aquest segon indret, de l'espècie *Schmidtea mediterranea*, en vam agafar una per fotografiar-la i després la vam tornar a deixar a la bassa (vegeu Annex fotocronològic del dia 5/08/2016).



**Figura 17.** Ubicació del Parc Mossèn Cinto Verdaguer. Imatge extreta de Google Maps

**Taula 6.** Dades obtingudes de les basses dels vivers dels Tres Pins

| Vivers dels Tres Pins | Zona   | pH  | Conductivitat (mS/cm) | Temperatura (°C) | Corrent | Llum | Planàries |
|-----------------------|--------|-----|-----------------------|------------------|---------|------|-----------|
|                       | zona a | 7,9 | 1,6                   | 27,2             | 0       | Si   | no        |
|                       | zona b | 7.6 | 2.76                  | 21.7             | 3       | No   | si        |

| Mossèn Cinto Verdaguer | Zona   | pH   | Conductivitat (mS/cm) | Temperatura (°C) | Corrent | Llum | Planàries |
|------------------------|--------|------|-----------------------|------------------|---------|------|-----------|
|                        | zona a | 7,3  | 1,41                  | 23,5             | 2       | No   | si        |
|                        | zona b | 7,35 | 1,47                  | 25,6             | 2       | Si   | si        |
|                        | zona c | 7,27 | 1,27                  | 24,6             | 0,5     | Si   | no        |
|                        | zona d |      |                       |                  | 0,5     | No   | si        |

**Taula 7.** Dades obtingudes del Parc Mossèn Cinto Verdaguer

La segona vegada que vam anar als jardins de Mossèn Cinto Verdaguer (vegeu Annex fotocronològic del dia 8/8/2016) vam buscar a diferents parts dels bassals, en llocs on hi havia corrent, però no en vam trobar. Llavors vam buscar en altres punts que estaven allunyats del corrent, així que vam decidir valorar

un altre factor i vam afegir la llum (entenent aquí per llum la directa del Sol). La majoria de les planàries estaven situades a la zona on hi havia ombra i vam veure que sí que hi havia planàries on hi havia una mica de llum i corrent, però estaven situades a la tija (en realitat el pecíol) dels nenúfars. Possiblement estaven baixant per la tija cap al fons allunyant-se de la superfície i per tant de la llum. Això explicaria que en el mateix indret on n'havíem vist moltes ara no en trobéssim tantes perquè, a diferència de l'altre dia (que era a la tarda, tard), aquest era al matí quan el Sol estava ben alt.

### 3.1.4 Comparació amb el bassal

A continuació, presentem la mitjana de les dades obtingudes en els diferents indrets on hem trobat planàries per així entendre millor els resultats i per poder discutir-los amb més facilitat després. Com podem observar a la taula 8, no hi ha gaire diferències de pH en els diferents indrets observats, ja que només hi ha un marge de pH d'una unitat, malgrat podem observar que el del bassal del Pati de les tortugues és el més elevat. La conductivitat sí que és un paràmetre que ha variat molt en els diferents

**Taula 8.** Dades obtingudes amb els valors mitjans dels diferents indrets on hem trobat planàries

| Valors mitjans                   | pH  | Conductivitat (mS/cm) | Temperatura (°C) | Corrent |
|----------------------------------|-----|-----------------------|------------------|---------|
| Bassal del Pati de les tortugues | 8,4 | 1,82                  | 19,5             | 1,5     |
| Riu Tordera                      | 7,5 | 0,60                  | 20,7             | 4,2     |
| Santa Fe del Montseny-1          | 8,1 | 0,09                  | 17,3             | 3,3     |
| Santa Fe del Montseny-2          | 8,0 | 0,05                  | 14,2             | 5       |
| Mossèn Cinto Verdaguer           | 7,3 | 1,38                  | 24,6             | 1,5     |
| Vivers dels Tres Pins            | 7,8 | 2,18                  | 24,5             | 1,5     |

indrets comparats, canviant fins a quasi 50 vegades del menor al major paràmetre. Pel que fa a la temperatura, també hem observat un rang força gran de temperatures i entre la major i la menor hi ha 10 °C de diferència. Finalment, el corrent ha estat un paràmetre una mica més complicat de valorar, però tot i això veiem que també varia entre els indrets estudiats. L'aigua que s'assembla més a la del bassal de l'Escola és la de les basses dels jardins de Mossèn Cinto Verdaguer, on n'hem trobat gran quantitat de l'espècie *Schmidtea polychroa*.

### 3.2 Adaptació de les planàries a l'Escola

Un cop introduïdes les primeres planàries al bassal i als aquaris, hem pogut veure els primers resultats.

El mètode de filtratge, ha funcionat bé. Ha mantingut l'aigua bastant neta durant tot el treball. L'únic que no era capaç de filtrar, va ser les restes de fetge i una substància que segreuen les planàries, que formava una escuma a la superfície de l'aigua.

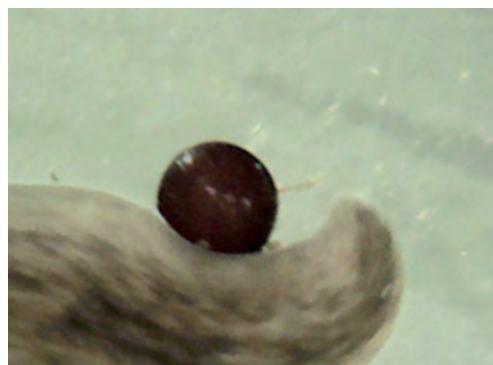
Dos mesos després d'introduir les planàries al bassal, vam voler comprovar com estaven i com estaven distribuïdes. Vam trobar unes dades que ens podien dir molt de les planàries. Primer vam buscar en el bassal en si, i en vam trobar poques. Una planària en cada zona amb poc corrent i cap en una zona fangosa, sense pedres. Després, en una zona on hi havia més corrent en vam trobar quatre, però que seguien sent poques tenint en compte les que havíem introduït al bassal.



**Figura 18.** Dibuix (esquerra) de com trobarem distribuïdes les planàries al bassal del Pati de les tortugues i fotografia (dreta) del mateix indret.

Llavors, en vam trobar moltes, però en un lloc inesperat. Estaven situades en el rierol del costat, que comunica amb el bassal per mitjà d'una petita cascada. Per tant, aquelles onze planàries que vam trobar, o bé havien remuntat la cascada, o bé van passar per tot el circuit de filtratge fins a arribar allà. De manera que podem concloure que hem arribat a aconseguir tenir una població estable de planàries al bassal del Pati de les tortugues, però malauradament, en aquest últim mes, hem detectat que el bassal ha anat perdent aigua durant un cert temps i l'hem hagut de reomplir amb aigua de l'aixeta en diverses ocasions. Finalment (vegeu Annex fotocronològic del dia 3/10/2016) hem hagut d'aturar la bomba que fa arribar l'aigua al rierol. Això, juntament amb un canvi de les condicions de l'aigua (per haver reomplert repetidament el bassal amb aigua corrent, que té clor) suposem que han estat les causes que aquests darrers dies no hàgim trobat planàries al bassal. Però com a mínim sabem que, en les condicions de funcionament correcte de circulació tancada de l'aigua, al bassal s'hi poden mantenir planàries.

Respecte a la introducció de planàries al aquaterrari, ha estat un èxit. Les planàries s'han adaptat molt bé i fins i tot han posat cocoons. Estan totes situades en les pedres més planes, independentment del corrent que hi hagi (potser perquè al ser un indret relativament petit el corrent generat en un extrem és suficient per oxigenar la totalitat de l'aigua). Un dels aspectes que en certa manera ens preocupava era que no sabíem si els peixos (gambúsies) es menjarien a les planàries, així que vam fer un petit experiment; teníem unes gambúsies que feia dies que no menjaven cap suplement, així que sabíem que es menjarien qualsevol cosa que els hi poséssim. Llavors, vam agafar una planària i la vam posar davant d'una gambúsia, assegurant-nos que la veia, i vam veure com se la va empassar ràpidament. Uns instants després, la va expulsar i se la va tornar a introduir a la boca, fins que, finalment, la torna a expulsar i la deixa en pau. Això, ens va fer pensar que potser és la substància que deixava en la superfície de l'aigua dels aquaris, de la qual hem parlat abans, la que fa que el peix no se la pugui menjar.



**Figura 19.** Imatge de un cocoon trobat al bassal del Pati de les tortugues.

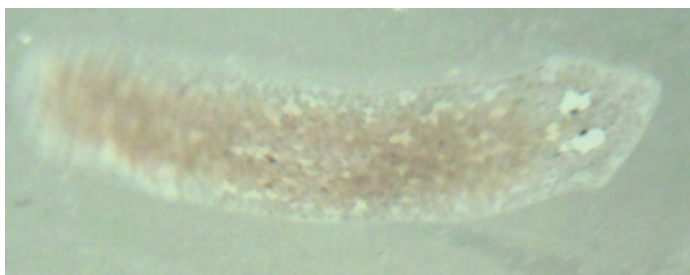
### 3.3 Treball de laboratori

#### 3.3.1 Estudi de les variables en regeneració de les espècies *Schmidtea polychroa* i *Girardia tigrina*

##### 3.3.1.1 Descripció *in vivo* de les espècies

L'espècie de planària *Girardia tigrina* presenta una clara forma triangular del cap amb un lleuger arrodoniment de la punta anterior. En la zona cefàlica es poden distingir dos ulls situats força junts. Presenten una coloració variable, però es poden distingir al presentar un color marró clar uniforme amb taques de diverses tonalitats de marró amb altres taques de color blanc distribuïdes de manera irregular al llarg del cos de organisme. Finalment, la part ventral es troba despigmentada, i hi podem distingir la faringe, que és blanca.

*Schmidtea polychroa* és força diferent a *Girardia tigrina*. En comptes tenir el cap amb forma triangular presenta un cap completament arrodonit. Aquesta també té



**Figura 20.** Foto de *Girardia tigrina* feta a l'Escola on observem el cap en forma triangular



**Figura 21.** Foto de *Schmidtea polychroa* feta a l'Escola.

dos ulls clarament diferenciats situats en la zona central del cap. *Schmidtea polychroa*, té una coloració menys variable, generalment presenta coloracions fosques amb tonalitats marronoses. La part ventral és despigmentada i se li pot veure la faringe i l'aparell reproductor.

##### 3.3.1.2 Descripció de la regeneració de les planàries en diferents variables

Aquestes proves les vaig fer al laboratori de biologia de l'Escola, seguint les recomanacions dels meus tutors, per tal d'agafar experiència en la manipulació d'aquests organismes abans d'anar a fer les pràctiques al laboratori del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia. És per això que aquests primers estudis són poc exhaustius però, malgrat tot, en faré una petita explicació.

###### 3.3.1.2.1 Variació de pH

Per tal d'entendre si la variable pH afectava a la regeneració de les planàries, vaig tallar uns quants individus i els vaig posar en solucions amb diferents pH (vegeu Material i mètodes). Durant els següents dies vaig poder observar com els animals anaven regenerant. Inicialment els individus que estaven entre els pH 7,4 i 9,4 van regenerar amb normalitat, mentre que els que es trobaven a pH 6,4 i a 10,4 ho feien amb més lentitud. Entre els pH 7,4 i 9,4, els individus van mantenir aquest ritme i van aconseguir una regeneració completa. A pH 10,4, tot i que van tardar més, les planàries també van ser capaces de



regenerar-se per complet, mentre que a pH 6,4 les planàries no tan sols no van aconseguir regenerar sinó que tampoc van poder sobreviure.

#### 3.3.1.2.2 Variació d'exposició lumínica

Per tal d'entendre si la variable exposició lumínica afectava a la regeneració de les planàries, vaig tallar uns quants individus i els vaig posar en diferents condicions lumíniques (vegeu Material i mètodes). Durant els següents dies vaig poder observar com els animals de totes 3 condicions anaven regenerant de manera normal, és a dir, presentaven un blastema als primers dies de regeneració com es veu a la Figura 22. Finalment vaig observar que només els individus que es trobaven en cicle de llum/fosc i fosc absolut havien regenerat correctament, mentre que els van estar en llum constant no només no van aconseguir regenerar sinó que van morir.



**Figura 22.** Cues de dos dies de regeneració. Primera imatge en condició de fosc constant. Segona imatge en condició de llum constant. Tercera imatge en condició de cicle dia/nit.

#### 3.3.2 Descripció *in vivo* de la planària *Schmidtea mediterranea*

##### 3.3.2.1 Individu intacte

*Schmidtea mediterranea* és la planària que és utilitzada en els laboratoris de tot el món per a estudiar les planàries. Té el cap completament arrodonit, com *Schmidtea polychroa* abans comentada. Té dos ulls situats en la zona central del cap. *Schmidtea mediterranea* té una coloració poc variable, coloracions marronoses, amb tonalitats des d'una mica clares a molt fosques, gairebé negres. La part ventral és despigmentada i se li pot veure la faringe i no té aparell reproductor.

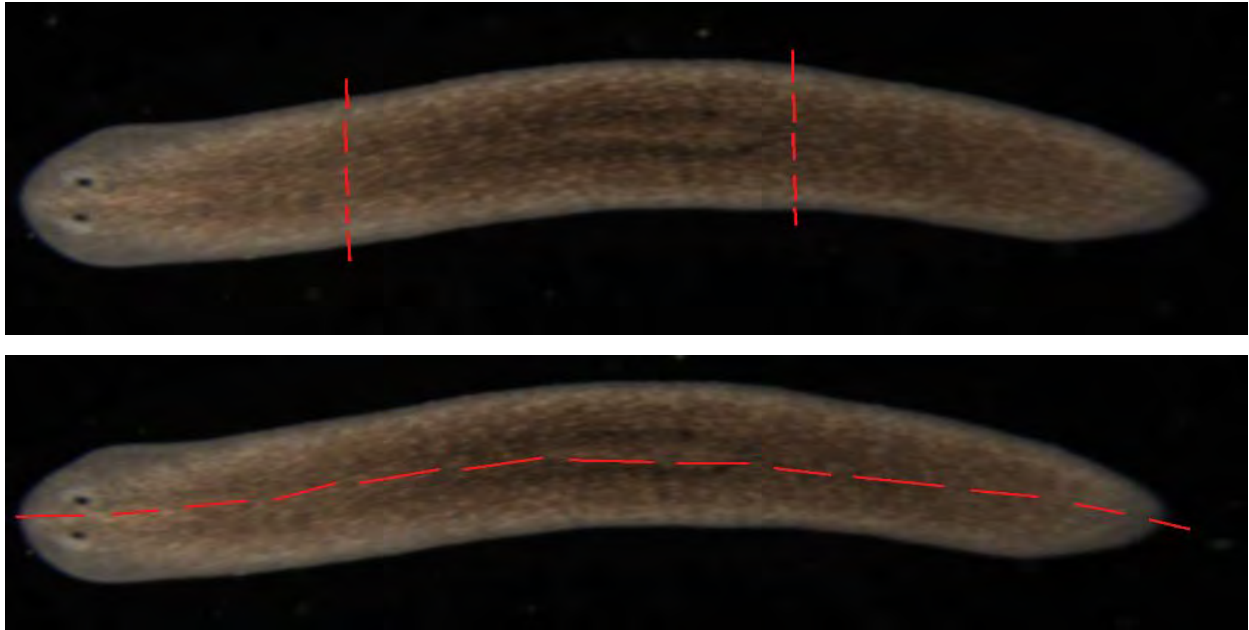


**Figura 23.** *Schmidtea mediterranea*. Individu intacte.



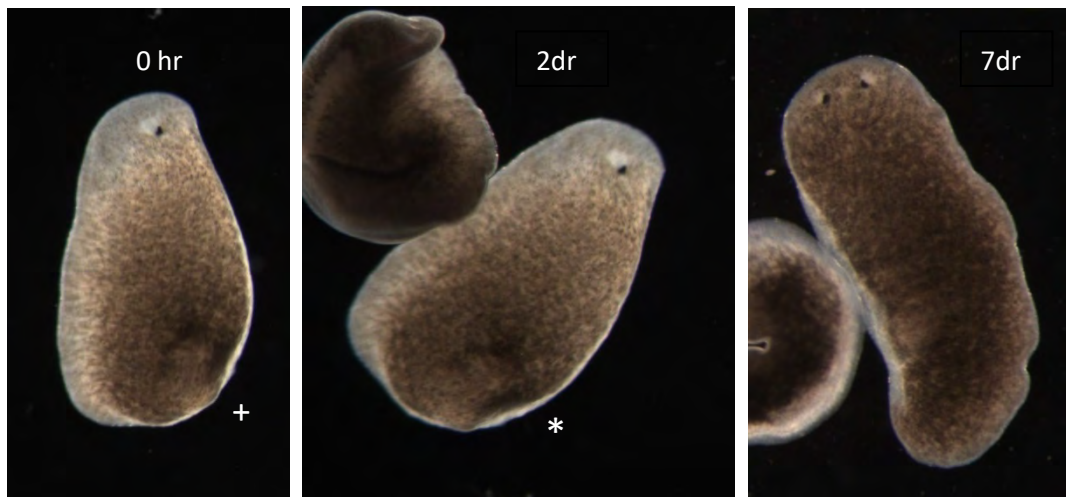
### 3.3.2.2 Individu regenerant

Una de les pràctiques que vaig dur a terme a la Facultat, va ser la descripció del procés regeneratiu *in vivo*. Així que vaig amputar en diferents plans de tall les planàries i vaig fer un seguiment de com regeneraven (Figura 24).

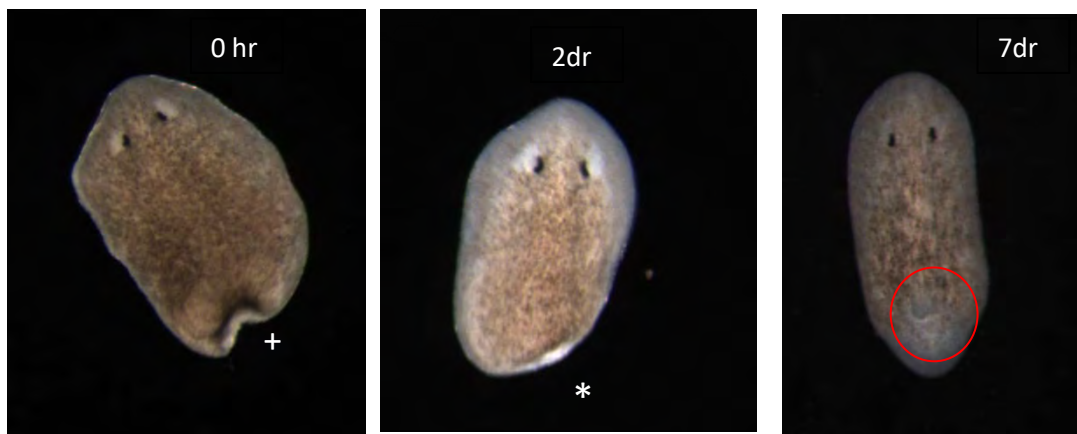


**Figura 24.** Tipus de talls realitzats. A la imatge superior es veu (línia vermella discontinua) dues amputacions transversals que acaben donant 3 fragments: cap, tronc i cua. A la imatge inferior veiem (línia discontinua vermella) una amputació sagital que acaba donant 2 fragments.

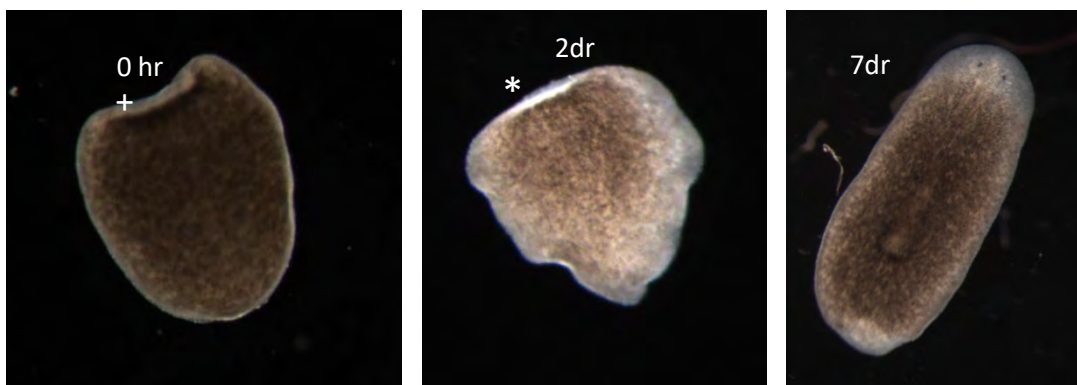
Un cop s'ha seccionat una planària, podem observar que en el moment del tall, hi ha una contracció muscular a la zona del tall que permet tancar la ferida (Figures 25 a 27, esquerra). Durant les següents 48 hores de regeneració es forma una acumulació de cèl·lules despigmentades, anomenada blastema (Figures 25 a 27, centre). El blastema està format per cèl·lules indiferenciades però no per neoblasts, és a dir, hi ha cèl·lules que s'han començat a diferenciar però que encara no s'han establert i no tenen una funció determinada. Al final del procés regeneratiu, a 7 dies de l'inici de la regeneració, podem observar que quasi tots els fragments han regenerat les parts que havien perdut (Figures 25 a 27, dreta). Així doncs, els fragments "cap" han regenerat la faringe i una gran part del cos, i els fragments "cua" han pogut regenerat també la faringe a més del cap.



**Figura 25.** Time course de regeneració d'un fragment tallat sagitalment. Veiem diferents punts del procés regeneratiu d'una meitat de planària: en el moment de tall (0hr), dos dies (2dr) i set dies (7dr). \* blastema / + contracció muscular



**Figura 26.** Time course d'una cap. Veiem diferents punts del procés regeneratiu: en el moment de tall (0hr), dos dies (2dr) i set dies (7dr) \* blastema / + contracció muscular / o faringe

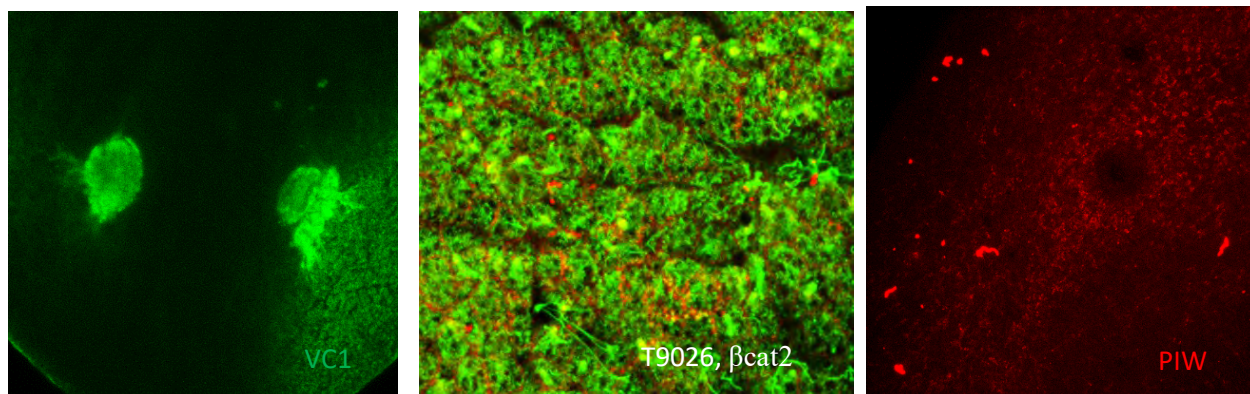


**Figura 27.** Time course de regeneració d'una cua. Veiem diferents punts del procés regeneratiu: en el moment de tall (0hr), dos dies (2dr) i set dies (7dr). \* blastema / + contracció muscular

### 3.3.3 Descripció molecular de la planària *Schmidtea mediterranea*

Un cop vam poder fer la descripció *in vivo* de les planàries i poder descriure com afectaven diferents variables ambientals el procés regeneratiu, vaig anar a la Facultat de Biologia amb l'Eudald on vaig poder realitzar una caracterització amb diverses tincions immunohistoquímiques que em van ajudar a veure diferents molècules que contenen les planàries i que ens serveix per veure diferents tipus cel·lulars.

#### 3.3.3.1 Individu intacte



**Figura 28.** Tinció immunohistoquímica en individus intactes. VC1, T9026,  $\beta$ cat2 i PIWI

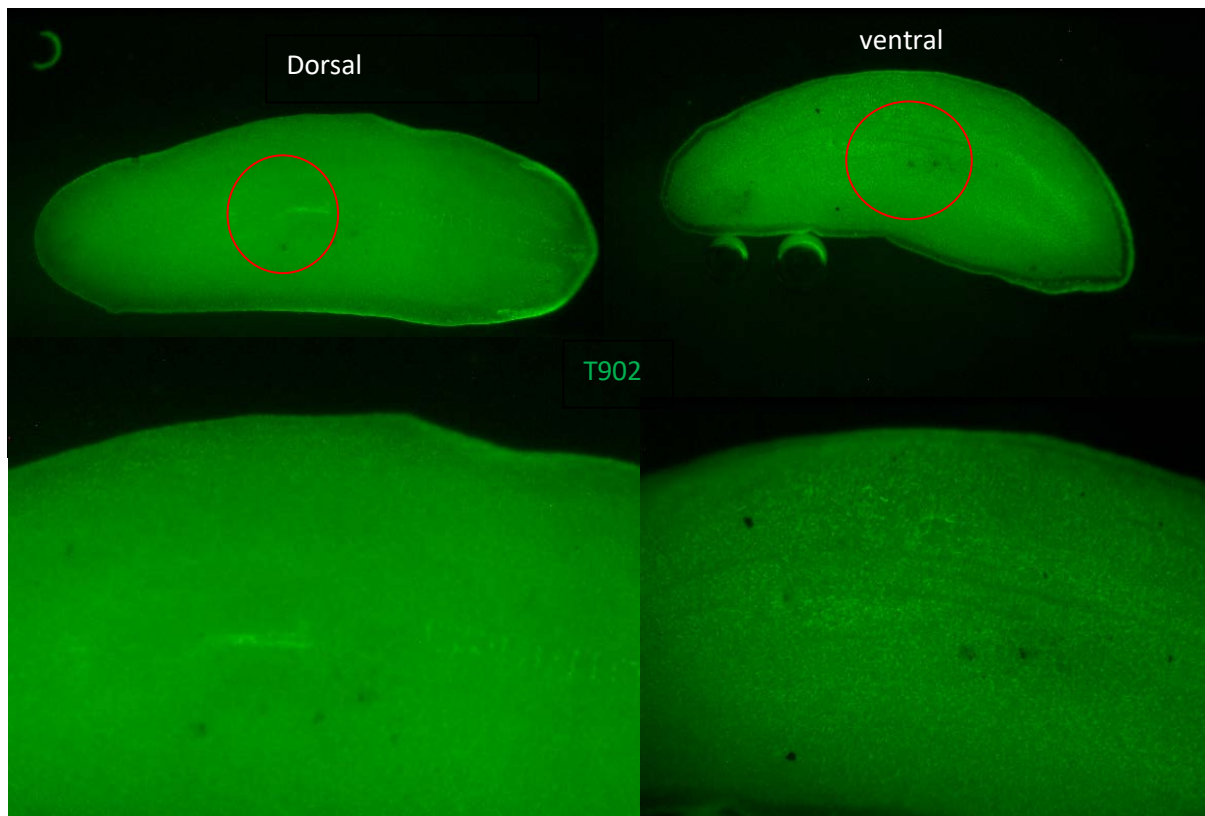
La primera caracterització la vam dur a terme en animals intactes, i vam utilitzar els marcadors abans explicats (veure material i mètodes). A continuació (Taula 9) podem veure quatre marcadors que hem utilitzat. El primer és l'anticòs VC1, que detecta l'Arrestina, una proteïna que està localitzada als ulls. Com podem observar els ulls presenten un gran nombre de cèl·lules fotoreceptores. En la segona, hi tenim dos marcadors alhora; el verd (T9026) que detecta la proteïna  $\alpha$ -tubulina presentats cilis, mentre que el vermell ( $\beta$ Cat2) ens

mostra les “tight junction” situades a les cèl·lules epidèrmiques. Amb aquesta imatge dorsal de l'animal podem observar que presenta una gran presència de cilis. En l'última imatge hem utilitzat un anticòs que s'uneix específicament a la proteïna PIWI, que es troba localitzada en els neoblasts, les cèl·lules mare de les planàries. Es tracta d'una imatge ventral, que ens permet veure com es distribueixen els neoblasts per

**Taula 9.** Taula resum dels anticossos

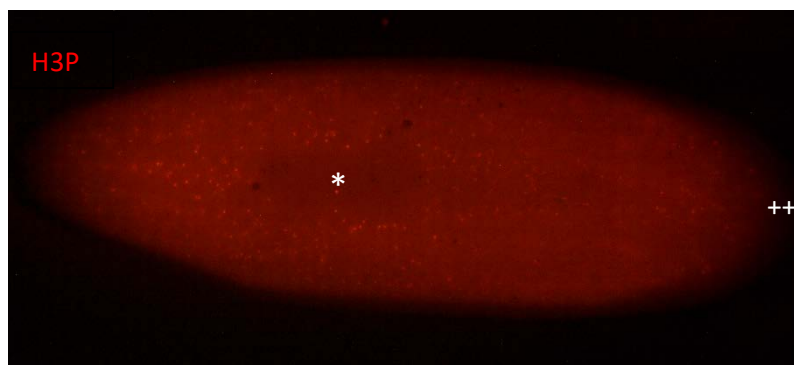
| Anticòs primari (nom comercial) | Cèl·lules que afecta      | Anticòs primari | Cèl·lules que afecta                    |
|---------------------------------|---------------------------|-----------------|-----------------------------------------|
| VC1                             | Ulls                      | FMRF            | S. Nerviós                              |
| 3C11                            | S. Nerviós                | H3P             | Neoblast en fase Mitosi                 |
| T9026                           | Cilis                     | $\beta$ cat2    | Cèl·lules epidèrmiques (tight junction) |
| 22C10                           | Ulls                      | piwi            | Neoblast                                |
| JLA20                           | Membrana basal epidèrmica |                 |                                         |

tot l'organisme, a més a més, podem distingir clarament la boca, l'obertura per on s'evaginarà la faringe.



**Figura 29.** Tinció immunihistoquímica amb l'anticòs T9026 en individus intactes. Posicions dorsals i ventrals. Les imatges inferiors estan capturades a més augments.

En la Figura 29 podem veure una planària en posició dorsal i ventral. L'anticòs utilitzat va ser T9026 que marca els cilis. Es pot veure com en la part dorsal de la planària hi ha una línia de cilis que recorre l'animal del pol anterior al posterior. I a la part ventral de la planària podem observar que està completament recoberta de cèl·lules ciliars.



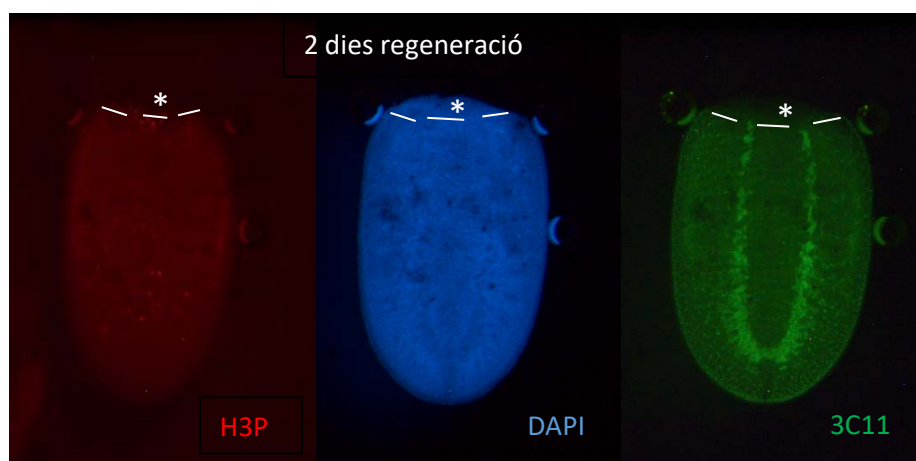
**Figura 30.** Tinció immunihistoquímica amb l'anticòs H3P en individus intactes. \* faringe / ++ zona per davant dels ulls.

En la Figura 30 podem observar una tinció immunohistoquímica amb l'anticòs H3P, marcador de cèl·lules mare en mitosi. Aquesta imatge ens permet veure que els neoblasts en fase mitòtica estan repartits per tot el cos de la planària menys en la faringe i per davant dels ulls.

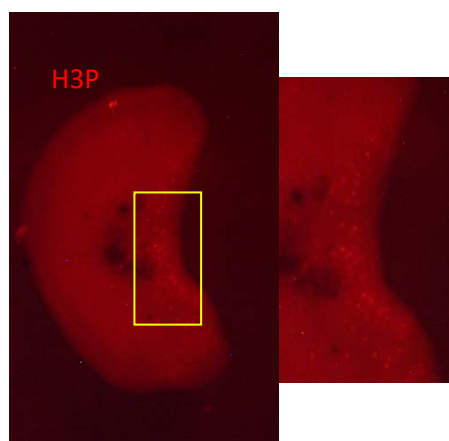


### 3.3.3.2 Individu regenerant

Un cop havíem pogut "descriure" l'interior de les planàries amb diferents marcadors moleculars, vam pensar que seria interessant triar-ne algun d'ells i veure quin comportament tenien durant la regeneració; així doncs, vam utilitzar els anticossos H3P i 3C11 en animals que s'havien fixat a 2 dies post-amputació (Figura 31) i animals a 7 dies post-amputació (Figura 33).



**Figura 31.** Tinció immunihistoquímica amb els anticossos H3P i 3C11 d'un cap regenerant a 2dR. Marcatge nuclear amb DAPI. Línia blanca discontinua – zona de tall / \* blastema

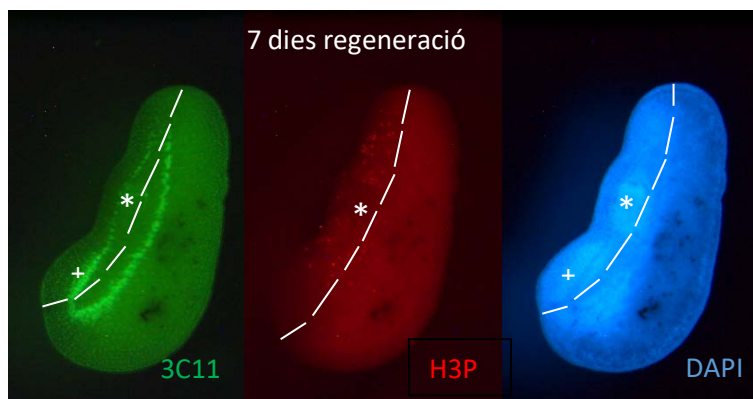


**Figura 32.** Tinció immunihistoquímica amb l'anticòs H3P en un fragment sagital a 2dR. L'àrea groga marca la zona d'on s'ha adquirit una imatge de més augmenten.

En els fragments de dos dies de regeneració (dR), pel que fa al marcador H3P (neoblasts que es troben en divisió mitòtica) podem veure que n'hi ha una acumulació a la zona de la ferida. Com ja sabem els neoblasts són les cèl·lules mare de les planàries, i en aquest cas s'ha descrit que en 2 dies de regeneració hi ha una gran activitat mitòtica situada a prop de la ferida (Reddien *et al.*, 2010).

Pel que fa a l'altre marcador (3C11) veiem que 2dR els fragments han començat regenerar el seu sistema nerviós però encara no han restablert les parts perdudes com el cervell, la faringe o la totalitat dels cordons nerviosos. En canvi, a 7dR, veiem com el sistema nerviós es troba molt més regenerat, ja que els fragments que havien de regenerar el cervell el presenten i els que havien de regenerar les parts posteriors han regenerat la faringe i els cordons nerviosos.

A més a més, en totes les imatges, s'hi va afegir DAPI (marcador de nuclis) que ens va ajudar a visualitzar el cervell i altres parts anatòmiques. A més, el DAPI ens revela que tant el 3C11 com el H3P, no ens marquen una zona que haurien de marcar mentre que el DAPI sí que és capaç de fer-ho. Aquesta és la zona on s'origina el blastema i que, per tant, això ens mostra que les cèl·lules del blastema, encara no fan cap funció.



**Figura 33.** Tinció immunohistoquímica amb els anticossos H3P i 3C11 d'un cap regenerant a 7dR. Marcatge nuclear amb DAPI. Línia blanca discontinua – zona de tall / lòbul del cervell regenerat / \* faringe

En la Figura 33 observem un individu de 7 dR tallat sagitalment marcat amb els anticossos 3C11 i H3P, i els nuclis tenyits amb DAPI. Pel que fa al 3C11, podem veure que el sistema nerviós ha regenerat gairebé del tot, ja que el nou lòbul del cervell ha estat regenerat (+) igual que el cordo nerviós paral·lel a l'existent. A més a més, també podem veure la faringe, ja que aquest òrgan presenta moltes terminacions nervioses. Amb el marcador H3P observem que es troba més repartit al llarg de tot l'organisme, excepte a la

zona de la faringe, tractant-se ja d'un individu quasi regenerat. Amb el marcador nuclear, DAPI, podem observar amb claredat la regeneració del cervell i de la faringe.

Per últim vam portar a terme una tinció immunohistoquímica amb l'anticòs VC1, que és específic dels ulls (vegeu imatge de la contraportada del treball de recerca).



#### 4. Discussió

Les planàries en el seu hàbitat natural, juntament amb l'aclimatació de les planàries a l'Escola, han estat uns estudis que ens han aportat una gran quantitat de resultats que passaré a discutir a continuació.

La distribució de les planàries en el seu hàbitat va ser un tema que em va interessar molt, així que en analitzar les dades de distribució al Pati de les tortugues vaig poder observar que majoritàriament estaven situades a la zona del baixant d'aigua, aquest fet ens va sorprendre, ja que era el punt més allunyat d'on les havíem deixat en les diverses alliberacions. Creiem que van acabar situant-se allà, ja que és el punt del bassal amb més corrent i això ajudaria a realitzar la respiració per difusió d'aquests animals. Per altra banda, les observacions de distribució realitzades al bassal on semblava que l'aigua estava més oxigenada, també van confirmar la distribució d'aquests organismes en relació a aquest paràmetre, ja que els vam trobar situats majoritàriament a les zones amb més corrent. Val a dir que per poder afirmar-ho aquest rang de distribució per l'oxigen hauríem de fer un estudi de la concentració d'oxigen en diversos indrets del bassal i dels rius en els indrets naturals on les vam trobar.

Un altre factor que afecta la distribució d'aquests individus és la temperatura. Aquest aspecte no el vam poder estudiar a fons al bassal del pati, ja que la temperatura no ha estat gaire variable al llarg d'aquests mesos i sempre hi hem trobat un nombre de planàries similar. Però pel que fa als diferents indrets on n'hem anat a buscar hem pogut observar que aquests organismes es distribueixen en un rang de temperatures força gran, ja que n'hi ha des dels 14 °C fins a 24 °C, però les espècies trobades en cada zona han estat diferents. Per exemple l'espècie que vam trobar en aigües més fredes era la *Polycelis felina* i no vam trobar individus d'altres espècies, però en canvi només vam trobar individus de les espècies *Schmidtea polychroa* i *Girardia tigrina* en els altres indrets on l'aigua no era tan freda. A més a més, si ens fixem en les planàries que tenim a l'aqua-terrari del laboratori de biologia de l'Escola (on la temperatura es manté estable) veiem que no han patit cap davallada en el seu nombre; a més, aquesta població ha dipositat cocoons, fet que denota que es troba estable i ben establerta. Per tant podem concloure que la temperatura marca un límit d'algunes espècies per viure en alguns indrets determinats.

Dos altres paràmetres que han estat estudiats són el pH i la conductivitat, el primer presenta molt poques variacions en totes les aigües estudiades, mentre que el segon, la conductivitat, varia molt més, sobretot entre l'aigua del Montseny, de conductivitat extremadament baixa, i la resta. Aquest també podria ser un altre factor que determini, juntament amb el de la temperatura, que l'espècie *Polycelis felina* no es trobi a cap altre indret.

A més del corrent (que produeix una oxigenació de l'aigua), la temperatura, el pH i la conductivitat, hem pogut observar que hi ha altres variables que afecten la distribució de les planàries. Quan vam anar al Parc Mossèn Cinto Verdager vam poder observar una variable nova, l'exposició lumínica del Sol directe en relació a la llum menys intensa (per exemple d'última hora de la tarda). Vam veure que les planàries no es trobaven al revers de les fulles dels nenúfars com havíem observat a la tarda, sinó que es situaven als pecíols de les fulles durant les hores de màxima intensitat lumínica, evitant-la. Possiblement realitzen una migració vertical que seria interessant de comprovar en un proper treball. A més, a l'aqua-terrari vam poder observar que les planàries prefereixen situar-se sota pedres planes evitant la llum. Per tant, d'aquestes observacions podem concloure que les planàries també es distribueixen segons l'exposició lumínica.

No hem trobat cap indret natural en què els paràmetres de l'aigua s'assemblin als del bassal del Pati de les tortugues pel que fa a pH i conductivitat, però sí un indret menys natural, però més proper, les basses dels jardins de Mossèn Cinto Verdager, en les que, a més a més, hi ha gran quantitat de planàries, sobretot de l'espècie *Schmidtea polychroa*, que és la que precisament s'ha adaptat més bé al bassal.

Hem discutit quina distribució segueixen les planàries en el medi, però alhora m'interessava veure si algunes d'aquestes condicions també afectaven la regeneració. Així que com exposo a resultats vaig estudiar el procés regeneratiu davant de les variables pH i exposició lumínica. Amb la primera variable ens vam adonar que el pH és molt influent en la regeneració (i en la vida com hem discutit en els paràgrafs anteriors), així que els individus no només no regeneraven sinó que morien. Aquest fet el vaig poder discutir amb l'Eudald, ja que recentment han tingut una davallada en la població de planàries del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia, ja que l'aigua on es trobaven les planàries es va acidificar accidentalment fins a pH 4, provocant la mort de la majoria d'individus. En el cas de l'exposició lumínica també he observat que una exposició constant evita la regeneració i a més provoca la mort dels animals suggerint que altes dosis de llum els hi provoca la mort. Aquest fet, si s'acaba comprovant, entraria en contradicció amb una publicació recent (vegeu Annex 7.1) on descriuen que llargues exposicions de llum blanca en planàries els fa perdre el pigment. En tot cas, podem concloure que el pH és una de les variables ambientals més importants per entendre la supervivència de les planàries, i que l'exposició de llum també és una variable molt important però caldria fer més experiments per validar-ho.

Un cop discutit la feina realitzada a l'Escola i *in situ* en el camp, passaré a discutir els resultats obtinguts a la Facultat. Gràcies a les tincions immunohistoquímiques he pogut veure la complexitat que presenten aquests cucs, ja que aquests organismes semblen molt simples a ull nu. Hem pogut descriure el seu sistema nerviós amb dos ganglis cefàlics situats a la part anterior amb dos cordons nerviosos que recorren l'organisme de la part anterior a la part posterior; i hem pogut observar que tenen una faringe amb moltes terminacions nervioses. A més a més, hem observat la complexitat dels ulls (VC1) on veiem que tenen unes projeccions sinàptiques i un gran nombre de cèl·lules que els formen. També he pogut observar la distribució dels neoblasts amb diversos marcadors, entenent que aquests es troben distribuïts per tot l'organisme menys a la faringe i per davant dels ulls i que, per tant, aquestes són les dues úniques regions que no podrien regenerar per si soles. Pel que fa a la regeneració, hem pogut observar que els neoblasts tenen una activitat proliferativa (mitòtica) molt important i que realment actuen com a cèl·lules mare, ja que als primers dies dins del blastema no veiem teixit diferenciats, com el sistema nerviós (3C11), però que després de 7dR ja hi ha marcadors de teixit diferenciats o bé teixits clarament diferenciats (faringe amb DAPI).

## 5. Conclusions

En relació als objectius inicialment marcats podem considerar que s'han assolit satisfactòriament:

- He après a localitzar i a identificar planàries a la natura, en concret he trobat i he pogut identificar 4 de les 7 espècies de planàries d'aigua dolça presents a la península Ibèrica.
- De la comparativa realitzada de paràmetres ambientals entre els diversos indrets de Catalunya i el bassal, hem vist que no n'hi ha cap que coincideixi, però hem descobert un indret més humanitzat que sí que coincideixen les característiques de l'aigua, les basses dels jardins de Mossèn Cinto Verdaguer de Montjuïc, en les que hi habita una gran població de planàries de l'espècie *Schmidtea polychroa*.
- Hem aconseguit arribar a tenir una població estable de planàries de l'espècie *Schmidtea polychroa* al bassal del Pati de les tortugues, malgrat que no l'hem pogut mantenir per un problema que ha sorgit al bassal durant l'últim mes.
- Finalment, he estudiat la capacitat regenerativa de les planàries davant la variació de diferents factors ambientals al laboratori de l'Escola i he pogut seguir i descriure satisfactòriament la regeneració amb diferents marcadors moleculars i tincions immunohistoquímiques al laboratori del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

## 6. Bibliografia

ALGUACIL, JÚLIA (2013). *Macrofotografia i micromons*. Treball de recerca de batxillerat de l'Escola Mestral. (Premi Recerca Jove CIRIT 2014). [En línia]. Disponible a Internet: < [https://issuu.com/escolamestral/docs/macrofotografia i micromons ar tot](https://issuu.com/escolamestral/docs/macrofotografia_i_micromons_ar_tot) >

BRIERS, D. (2012) *Junctions Between Cells Simplified*. <http://www.dbriers.com/tutorials/2012/12/junctions-between-cells-simplified/>

CEBRIÀ, F., ADELL, T., FRANCESC, J., SALÓ, E. (2011). *La regeneració i l'homeòstasi en les planàries, un model clàssic de biologia del desenvolupament*. En Organismes model en biologia (Montserrat Corominas i Marc Valls, ed.). *Treballs de la SCB*. Vol. 62 93-106.

CUSÓ, ÒSCAR (2007). *El bassal del Pati de les tortugues*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 64 pp. (Premi Baldiri-Reixac 2008). [En línia]. Disponible a Internet: <[https://issuu.com/escolamestral/docs/bassal\\_ocusco?backgroundColor=](https://issuu.com/escolamestral/docs/bassal_ocusco?backgroundColor=)>

FRYE, C. (2014). *Cloning breakthrough: Stem cells created from adults*. CCNN Writer. Daily Clubhouse News.

GALLIOT, B I GHILA, L. (2010). *Cell plasticity in homeostasis and regeneration*. *Molecular Reproduction and Development*. Vol.77. Pàg.837-855

HANDBERG-THORSAGER, M., FERNANDEZ, E., SALO, E. (2008) "Stem cells and regeneration in planarians" [Frontiers in Bioscience 13, 6374-6394].

MARÍAS, SÒNIA (2015). *La tècnica fotogràfica time-lapse i la seva aplicació biològica a l'Escola*. Treball de recerca de batxillerat. Escola Mestral. 70 pp. [En línia]. Disponible a Internet: < <http://www.escolamestral.cat/treballs-de-recerca/2015-16/resums/SONIA%20MAR%C3%8DAS.pdf> >

MARSÀ, ALBERT (2010). *Increment de la biodiversitat al Pati de les tortugues*. Treball de recerca. Escola Mestral. [En línia]. Disponible a internet : < [https://issuu.com/escolamestral/docs/amarsa\\_vfinal\\_96?backgroundColor=](https://issuu.com/escolamestral/docs/amarsa_vfinal_96?backgroundColor=)>.

PASCUAL, E., HERRERIAS, L., VENDRELL, A, MARÍ, J., MARTÍNEZ, A. I SOLER, J. (2011). *Aportacions a les variacions de pes durant el procés d'hibernació en Testudo hermanni hermanni* (Gmelin 1789). Butlletí de la Societat Catalana d'Herpetologia nº19.

PASCUAL, EUDALD (2013). *Caracterització funcional del gen Man1 en Schmidtea mediterranea*. TFG Biologia. Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona.

REDDIEN, P I WENEMOSER, D. (2010). *Planarian regeneration involves distinct stem cell responses to wounds and tissue*. NCBI. *Dev Biol*. 2010 Aug 15;344(2):979-91.

SALÓ, E. (2006). *The power of regeneration and the stem-cell kingdom: freshwater planarians (Platyhelminthes)*. BioEssays: news and reviews in molecular, cellular and developmental biology. Bioessays 28 : 546 – 559.

### **Agraïments i mencions especials**

Per començar vull donar les gràcies al Dr. Josep Marí per donar-me l'oportunitat de fer aquest treball i proporcionar-me les eines necessàries per desenvolupar-lo i estructurar-lo.

A l'Eudald Pascual, biòleg i doctorant del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona, per oferir-se a compartir la tutoria d'aquest treball amb el Marí, per la seva ajuda constant durant tot el treball i per guiar-me a l'hora de fer-lo.

Al Dr. Emili Saló per permetre'm realitzar la part pràctica i utilitzar el material i instruments laboratoris del Departament de Genètica de la Facultat de Biologia de la Universitat de Barcelona.

Als meus companys Ferran Jiménez per prendre les dades quan jo no podia i el Pau Vilaseca per deixar-se la mà a l'hora d'ajudar-me.

I als meus pares per proporcionar-me tot el material necessari per a fer aquest treball.



