

El control de la proliferació cel.lular a planàries: acció de neuropèptids mitògens (Substància P) i factors depenents de densitat cel.lular.

J. Baguñà i E. Saló.

Departament de Genètica, Facultat de Biologia, Universitat de Barcelona, Diagonal 645, 08028 Barcelona.

Abstract

The control of cell proliferation in planarians: effects of mitogenic neuropeptides (Substance P) and cell-density dependent factors.

How proliferation of cells in planarians is controlled is still an unsolved question. Here we show that the neuropeptide Substance P (SP) is a potent mitogen for intact and regenerating organisms. At nanomolar concentrations, SP markedly enhances cell proliferation as seen by the increase in the mitotic index and in the number of blastema cells. This mitogenic effect is probably due to mobilization of cytosolic calcium mediated by hydrolysis of inositol phospholipids, as has been shown to occur for other growth factors.

Moreover, using interspecific chimaeras between irradiated and unirradiated tissues and cells, it is suggested that an autocrine inhibitory feed-back mechanism do also occur to control cell proliferation. The interplay between this autocrine inhibitory mechanism and its paracrine stimulatory counterpart may control the overall proliferative rate in planarians.

Introducció

El mecanisme pel qual les cèl.lules decideixen proliferar o diferenciar-se és un aspecte central del desenvolupament dels organismes pluricel.lulars. Tan en l'embrió com en l'adult, les anomenades cèl.lules-soca retenen aquesta capacitat decisòria, i han esdevingut en conseqüència un dels millors models d'estudi del com les cèl.lules estableixen aquestes decisions.

A planàries, les cèl.lules-soca, o neoblasts, són una població de cèl.lules indiferenciades pluripotents (o totipotents) que donen lloc contínuament a tots els tipus cel.lulars diferenciats de l'adult; aquests darrers presenten una alta taxa de recanvi (Baguñà, 1976a, 1981; Baguñà i Romero, 1981). El flux de neoblasts que es van diferenciant és compensat per una taxa proliferativa que manté uns valors determinats que depenen principalment de la llargada de l'organisme (Baguñà, 1976a), del seu estat metabòlic i nutricional (Romero i Baguñà, 1984), i de la temperatura (Romero, 1983). Aquesta taxa basal s'incrementa temporalment i transitòriament després de la ingesta d'aliment (Baguñà, 1974; Betchaku, 1975; Ba-

guña i Romero, 1981) i durant el procés de regeneració (Baguñà, 1976b; Saló i Baguñà, 1984; Morita i Best, 1984). En ambdós casos, l'increment mitòtic és molt ràpid degut a l'entrada en mitosi de cèl.lules pre-existents en G2, es manté durant 3-4 dies amb 1 (o potser 2) cicles de replicació de l'ADN i divisió, i assoleix valors normals cap als 7-8 dies (Saló i Baguñà, 1984).

Els neoblasts són les úniques cèl.lules a planària amb capacitat provada de divisió, i representen del 15 al 25% de les cèl.lules totals. Aquest nombre tan alt de cèl.lules fa pensar, però, que sols una petita part serien veritables cèl.lules-soca, essent la resta cèl.lules en diferents estadis de determinació que mantenen la capacitat de divisió (compartiment d'amplificació). Experiments amb hidroxireua suggereixen que el nombre de veritables cèl.lules-soca seria el 20% dels neoblasts totals (aprox 3-4% de les cèl.lules totals) essent cèl.lules de cicle lent ($T_c = 1-5$ dies), mentre que el compartiment d'amplificació representaria el 80% dels neoblasts (aprox 15-20% de les cèl.lules totals) essent cèl.lules de cicle curt ($T_c < 24$ hores) (Saló i Baguñà, 1984). Malauradament, no es coneix avui en dia cap tipus de marcador (morfològic o funcional) que permeti distingir un grup de cèl.lules de l'altre. En conseqüència, les dades que esmentarem es referiran a la població de neoblasts en general.

Com es controla la proliferació dels neoblasts en l'organisme intacte?. A què es deu l'increment mitòtic després de la ingestió i al poc temps de l'amputació?. Com decideix un neoblast si proliferar o diferenciar-se, i en aquest darrer cas, cap a què?. Quins mecanismes operen per a mantenir més o menys constant la població de veritables cèl.lules-soca en un organisme en estat estacionari, i com aquesta població creix o decreix en % durant el creixement i el decreixement de l'organisme?. Quina modalitat de control de la proliferació hi ha: autocrina, paracrina, neuroparacrina?. Quin tipus de control exerceixen els presumptes factors o moléculs implicades: negatiu, positiu, o ambdós?. Quin paper juga la densitat cel.lular de les pròpies cèl.lules-soca o de les presumptes cèl.lules reguladores paracrines o neuroparacrines en el control de la proliferació?.

Malgrat que avui en dia és impossible respondre adequadament a aquestes qüestions, s'han anat acumulant recentment un seguit de dades de caire bioquímic i molecular que permeten dissenyar un quadre general força d'acord amb les idees actuals sobre el control de la proliferació als organismes pluricel.lulars. En primer lloc, es coneixen un seguit de factors, substàncies o productes, activadors o inhibidors de la proliferació a

planàries. Entre els primers cal esmentar els neurotransmissors serotonina, noradrenalina i dopamina (Franquinet, 1979, 1981), els ions Ca^{2+} (Martelly, 1983), el GMP cíclic (Lenicque, 1976), el dibutiril AMPc (Weinstein i Gavurin, 1977), factors neurosecretors (Friedel i Webb, 1979), poliamines (Forbes et al, 1979; Collet i Saló, 1983), i diferents tipus d'extractes tissulars (Lender, 1974; Sauzin-Monnot, 1976). Com a factors inhibidors podem esmentar, a part dels mil i un factors inespecífics (per a referències, vegeu Brønsted, 1969, i Lenicque, 1976), els antagonistes dels neurotransmissors (Lenicque, 1976; Franquinet, 1979, 1981), l'acetilcolina i l'AMPcíclic (Lenicque, 1976), i diferents tipus d'extractes tissulars (Lender, 1974; Steele i Lange, 1977). D'aquests factors, positius i negatius, esmentats, aquells relacionats amb activitats neurosecretores o neurohumorals han estat els més estudiats. Això es deu a què hi ha un paral·lelisme entre l'activitat mitòtica durant la regeneració i l'increment en neurosecreció (Sauzin-Monnot, 1972; Lender, 1974), així com una relació entre l'increment mitòtic després de la ingestió d'aliment i activitats neurohumorals (Baguñà, 1974; Betchaku, 1975). D'ací que sovint s'hagi establert un lligam de causa-efecte entre activitat neurosecretora i proliferació cel·lular (Lender, 1974; Baguñà, 1976b; Friedel i Webb, 1979).

El model avui en dia més coherent que tracta de lligar totes aquestes dades, i d'altres no esmentades, és el proposat pel grup de París (Martelly i Franquinet, 1984). En síntesi (fig 1) proposen una relació causal entre les variacions en les concentracions de neurotransmissors (serotonina, noradrenalina i dopamina), els increments en l'activitat de l'adenil ciclase i la concentració d'ions Ca^{2+} , i la síntesi de DNA i RNA. Més específicament, la serotonina, juntament amb la noradrenalina, estimula l'adenil ciclase que al seu torn fa pujar els nivells d'AMP cíclic. Aquest darrer indueix un increment transitori en la concentració intracel·lular de Ca^{2+} que a l'unir-se a la calmodulina duu a l'estimulació de les proteïna kinases dependents de Ca^{2+} . Aquestes darreres serien les que durien a la fosforilació de proteïnes importants per a l'inici de la síntesi de DNA, fet que succeeix a les 12-14 hores de regeneració. Un procés paral·lel, iniciat amb increments del nivell de dopamina duria a l'estímul de la síntesi de RNA a les 18-24 hores de regeneració. Punt comú a ambdós processos sembla ésser l'increment en la concentració de calci intracel·lular.

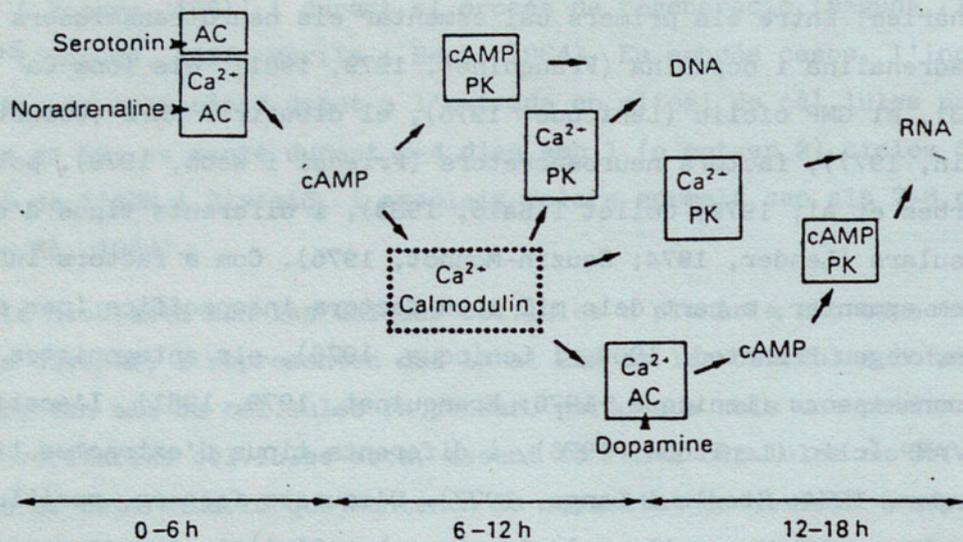


Figura 1. Diagrama representant els aconteixements bioquímics més importants implicats en l'activació cel·lular (proliferació i diferenciació) durant la regeneració de planàries. (Martelly i Franquinet, 1984).

Recentment però, s'ha demostrat en nombrosos sistemes (Berridge i Irvine, 1984; Nishizuka, 1984; Taylor et al, 1984; Farrar i Anderson, 1985), que els increments en la concentració de Ca^{2+} intracel·lular serien deguts, més que a un increment previ del AMPc, a què la interacció del factor de creixement o mitògen amb el receptor de membrana duu a una hidròlisi extremadament ràpida de inositol 4,5-bifosfat (PIP_2) donant lloc a inositol trifosfat (IP_3) i diacilglicerols. El primer és el que allibera Ca^{2+} del reticle endoplàsmic cap a l'espai intracel·lular; el segon sembla ésser l'activador de la proteïna kinasa dependent de Ca^{2+} i fosfolípids anomenada proteïna kinasa C. Ambdues substàncies són punts claus en la cascada d'esdeveniments que menen a la proliferació cel·lular (fig 2). D'altra banda, no cal oblidar que certs mitògens i hormones indueixen un rapidíssim increment ($< 30\text{s}$) de l'activitat de l'ornitina decarboxilasa i de la concentració de poliamines, que duen a l'alliberament de Ca^{2+} a l'espai intracel·lular (Koenig, 1983). Es a dir, les poliamines tindrien el paper de missatgers per tal d'incrementar també la concentració de calci intracel·lular.

Per tal d'aprofundir més en el control de la proliferació cel·lular a planàries, i tenint present les dades bioquímiques esmentades i la postu-

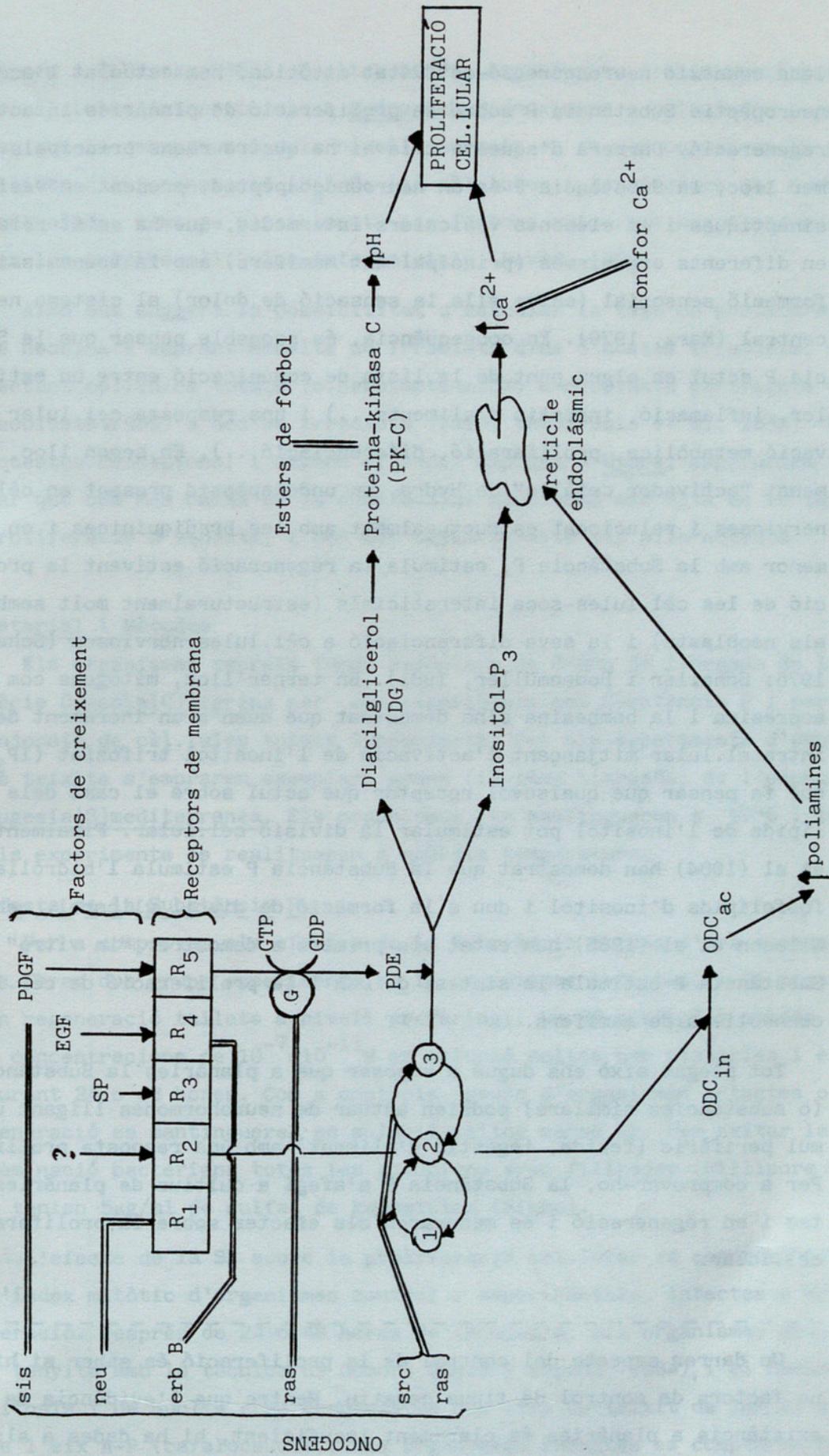


Figura 2. Diagrama de les principals reaccions implicades en el control de la proliferació cel·lular a cèl·lules eucariotes. Tret, lleugerament modificat, de Nishizuka (1984).

lada connexió neurosecreció-activitat mitòtica, hem estudiat l'acció del neuropèptid Substància P sobre la proliferació de planàries intactes i en regeneració. Darrera d'aquesta tria hi ha quatre raons principals. En primer lloc, la Substància P és un neuroundecapèptid, present en vesícules sinàptiques i en elements vesiculars intermedis, que ha estat relacionat en diferents organismes (principalment mamífers) amb la transmissió d'informació sensorial (entre ella la sensació de dolor) al sistema nerviós central (Marx, 1979). En conseqüència, és raonable pensar que la Substància P actua en algun punt de la línia de comunicació entre un estímul (dolor, inflamació, ingestió d'aliments,..) i una resposta cel.lular (activació metabòlica, proliferació, diferenciació,..). En segon lloc, l'anomenat "activador cefàlic" de *Hydra*, un undecapèptid present en cèl.lules nervioses i relacionat estructuralment amb les bradiquinines i en grau menor amb la Substància P, estimula la regeneració activant la proliferació de les cèl.lules-soca intersticials (estructuralment molt semblants als neoblasts) i la seva diferenciació a cèl.lules nervioses (Schaller, 1976; Schaller i Bodenmüller, 1981). En tercer lloc, mitògens com la vasopresina i la bombesina s'ha demostrat que duen a un increment del calci intracel.lular mitjançant l'activació de l'inositol trifosfat (IP_3), cosa que fa pensar que qualsevol receptor que actua sobre el camí dels fosfolípids de l'inositol pot estimular la divisió cel.lular. Finalment, Mantyh et al (1984) han demostrat que la Substància P estimula l'hidròlisi dels fosfolípids d'inositol i duu a la formació de diacil glicerol, mentre que Nilsson et al (1985) han estat els primers a demostrar "in vitro" que la Substància P estimula la síntesi de DNA i la proliferació de cèl.lules connectives de mamífers.

Tot plegat això ens dugué a suposar que a planàries la Substància P (o substàncies similars) podrien actuar de neurohormones lligant un estímul perifèric (ferida, ingestió d'aliment) amb una resposta proliferativa. Per a comprovar-ho, la Substància P s'afegí a cultius de planàries intactes i en regeneració i es mesuraren els efectes sobre la proliferació cel.lular.

Un darrer aspecte del control de la proliferació és saber si hi han o no factors de control de tipus negatiu. Mentre que l'evidència de la seva existència a planàries és clarament insuficient, hi ha dades a alguns sistemes que demostren l'existència de factors autocrins de tipus negatiu

(Sporn i Roberts, 1985). D'altra banda, experiments d'eliminació parcial de cèl.lules intersticials a Hydra amb hidroxiiurea o colquicina suggereixen que la recuperació dels nivells normals es fa per canvis en la probabilitat d'autorenovació (P_s) de les cèl.lules intersticials que sembla controlada, almenys parcialment, per factors autocrins negatius produïts per les pròpies cèl.lules intersticials (David, 1983).

Això ens suggerí la possibilitat d'estudiar la taxa de proliferació de neoblasts emprant empelts no irradiats dins d'hostes irradiats, o injectant cèl.lules totals (c.neoblasts α 25%) o neoblasts purificats (c. neoblasts \geq 90%) a hostes irradiats (Saló, 1984; Saló et al, 1984). En aquestes condicions, i segons el model exposat a Hydra, esperaríem trobar que com més baixa és la densitat de neoblasts més alta és la taxa de proliferació d'aquests, i com més baixa aquella més alta aquesta.

Material i Mètodes

Els organismes emprats foren exemplars de 6-8mm de llargada de l'espècie Dugesia(G)tigrina per als experiments amb Substància P i per a la injecció de cèl.lules totals i neoblasts. Per als experiments d'empelts de teixits s'empraren exemplars grans (12-16mm llargada) de l'espècie Dugesia(S)mediterranea. Els organismes es mantingueren a 17°C i tots els experiments es realitzaren a aquesta temperatura.

Efecte de la Substància P.

Per a comprovar els efectes de la Substància P (des d'ara anomenada SP) es feren dos grups experimentals: 1) organismes intactes, i 2) organismes en regeneració tallats a nivell prefaringi. La SP s'afegí a ambdós grups a concentracions de 10^{-7} - 10^{-11} M en solució salina per planàries i es deixà durant 24 o 48 hores. Com a controls, grups d'organismes intactes o en regeneració es mantingueren en solució salina sense SP. Per evitar la contaminació bacteriana totes les solucions eren filtrades (Millipore 0.22 μ m) i tenien 5 μ g/ml de sulfat de kanamicina (Sigma).

L'efecte de la SP sobre la proliferació cel.lular es comprovà mesurant l'índex mitòtic d'organismes control i experimentals, intactes o en regeneració. Després de 24 o 48 hores de incubació, els organismes eren fixats i tenyits amb la tècnica de Gomori (Saló i Baguñà, 1984), i el nombre de mitosis i de nuclis eren comptats en una tira de teixit de 1mm al llarg de l'eix A-P (cafalocaudal). Als organismes intactes es comptaren dues regions: prefaríngea i postfaríngea. Als organismes en regeneració es mesu-

raren el postblastema (pb) que cobreix el primer mil·límetre de teixit al voltant de la ferida, i la regió postfaríngea.

Com a mesura indirecta de la proliferació es comptà també el nombre de cèl·lules del blastema de regeneració als 3, 5 i 7 dies de regeneració en organismes control i experimentals mitjançant la tècnica de maceració (Baguñà i Romero, 1981).

En tots els experiments, i per a cada paràmetre i concentració provats, es compararen els valors obtinguts entre controls i experimentals, expressant-se els resultats com a percentatge d'activació (A(%)) dels organismes tractats (T) respecte als controls (C) segons l'expressió: $A(\%) = \frac{T-C}{C} \times 100$. Per a cada mesura s'empraren cinc organismes, i els resultats són la mitja de tres experiments diferents.

Efecte de la densitat cel·lular dels neoblasts sobre la taxa de proliferació.

Les tècniques d'irradiació (8000 rads), empelts entre teixits irradiats i no irradiats, purificació i injecció de neoblasts, i quantificació de l'activitat mitòtica es troben a Saló (1984), Saló i Baguñà (1984, 1985), i Saló et al (1984).

Resultats

1- Efecte de la SP sobre la proliferació cel·lular

La SP (10^{-7} - 10^{-11} M) incrementa significativament l'índex mitòtic de planàries intactes i en regeneració en comparació a organismes control (Taula 1). En organismes en regeneració (postblastema; pb), la SP té un efecte màxim a 100-1nM, efectes intermedis a 0.1nM i no presenta efecte a 0.01nM. Per altra banda, s'observa una resposta diferencial entre organismes intactes i en regeneració, i entre regions diferents d'organismes regenerants. Així, mentre l'índex mitòtic d'organismes intactes tractats augmenta x3-4 comparat a controls no tractats (fig 3a)($p < 0.005$), l'índex mitòtic a organismes tractats en regeneració augmenta 1.5-2 cops en el postblastema (fig 3b)($p < 0.01$) i 2-3 cops a la regió postfaríngea (fig 3c) ($p < 0.005$) en comparació als controls no tractats. Això indica que la SP té un clar efecte mitogènic tant en organismes intactes com en regeneració, i que l'efecte és tant més gran com menor és l'índex mitòtic inicial.

2- Efecte de la SP sobre el nombre de cèl·lules del blastema

La mida del blastema de regeneració a planàries és proporcional al nombre de les seves cèl·lules; aquest darrer és dependent de la proliferació cel·lular i la migració cel·lular en la regió del postblastema (Saló

Tractament	Index Mitòtic ^a	A(%)	Mida Blastema ^b	A(%)
Control	0.17 ± 0.01	---	39.1 ± 3.5	---
SP (10 ⁻⁷ M)	0.39 ± 0.05	125.7 ^{***}	46.5 ± 3.8	18.7 ^{**}
SP (10 ⁻⁸ M)	0.41 ± 0.06	134.2 ^{***}	47.3 ± 4.2	20.7 ^{**}
SP (10 ⁻⁹ M)	0.37 ± 0.06	114.2 ^{***}	45.5 ± 3.6	16.2 ^{**}
SP (10 ⁻¹⁰ M)	0.25 ± 0.04	45.1 ^{**}	44.8 ± 4.0	14.5 [*]
SP (10 ⁻¹¹ M)	0.19 ± 0.02	9.7	40.1 ± 3.2	2.5

^a Index mitòtic ± S.D. en la regió del postblastema després d'un dia de tractament amb SP (n=3; 5 organismes per experiment)

^b Nombre mig ± S.D. (x10³) de cèl.lules del blastema en blastemes de 7 dies (n=3; 5 organismes per experiment)

Taula I. Efecte de la SP sobre l'índex mitòtic i el nombre de cèl.lules del blastema a Dugesia(G)tigrina en regeneració

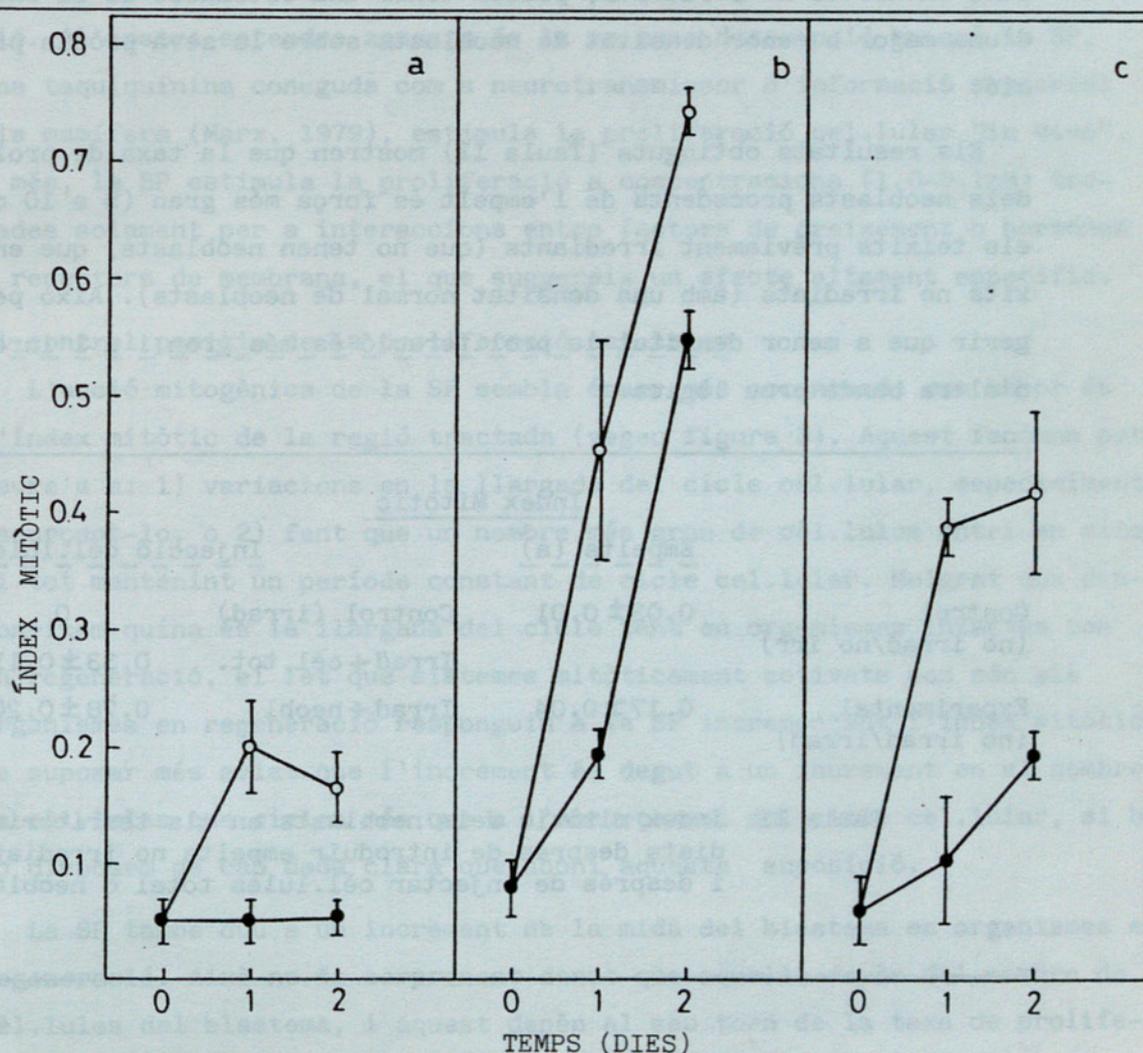


Figura 3. Efecte de la SP (10⁻⁸M) sobre l'índex mitòtic d'organismes intactes (a) i en regeneració (b, postblastema; c, postfaringe) després de 1 i 2 dies d'incubació.

i Baguñà, 1984). Donat que la SP incrementa l'index mitòtic dels organismes experimentals en regeneració, hauríem d'esperar que, en comparació a organismes control, el nombre de cèl.lules del blastema (i d'ací la seva mida) fos més gran en els organismes tractats. Els resultats obtinguts (Taula I; resultats per a blastemes de 7 dies) mostra que la SP incrementa per 15-20% el nombre de cèl.lules a concentracions de 100-0.1nM, mentre que ja no presente efecte a 0.01nM.

3- Efecte de la densitat de neoblasts sobre la seva taxa de proliferació.

Un procediment per comprovar si la pròpia densitat de neoblasts afecta la proliferació cel.lular consisteix a irradiar un organisme hoste (del que desapareixeran els neoblasts en 7-10 dies) i empeltar-li un tros de teixit sà. Els neoblasts d'aquest darrer repoblen lentament els teixits irradiats per proliferació i migració local. Comparant les taxes de proliferació d'aquests neoblasts amb les que es troben al fer empelts de teixits sans en hostes no irradiats, podem tenir una estimació de la influència d'una major o menor densitat de neoblasts sobre la seva pròpia proliferació.

Els resultats obtinguts (Taula II) mostren que la taxa de proliferació dels neoblasts procedents de l'empelt és força més gran (5 a 10 cops) en els teixits prèviament irradiants (que no tenen neoblasts) que en els teixits no irradiats (amb una densitat normal de neoblasts). Això permet suggerir que a menor densitat la proliferació és més gran i a l'inrevés, cosa d'altra banda prou lògica.

	<u>Index Mitòtic</u>	
	<u>Empelts (a)</u>	<u>Injecció cèl.lules (b)</u>
Control (no irradiat/no irr)	0.03 ± 0.01	Control (irradiat) 0 Irradiat + cèl.tot. 0.33 ± 0.11
Experimental (no irradiat/irradiat)	0.17 ± 0.04	Irradiat + neobl 0.78 ± 0.20

Taula II. Index mitòtic dels neoblasts en els territoris irradiats després de introduir empelts no irradiats (a), i després de injectar cèl.lules total o neoblasts (b).

Un altre procediment, formalment semblant a l'anterior si bé més informatiu, consisteix a introduir cèl.lules dissociades totals (de les quals el 25% són neoblasts) o neoblasts purificats ($\geq 90\%$) a hostes irradiats, i estudiar l'índex mitòtic dins dels teixits irradiats. Els resultats (Taula II(b)) mostren clarament que malgrat que la densitat de neoblasts és unes 3-4 vegades inferior en el primer grup (cèl.lules totals), l'índex mitòtic és solament la meitat del trobat en el segon grup; dit d'altra manera, com més baix és el nombre de neoblasts introduïts, més alt és l'índex mitòtic.

Discussió

Els resultats descrits fins ara indiquen d'una banda que el neuropèptid Substància P (SP) estimula la proliferació cel.lular en planàries intactes i en regeneració, i d'altra banda suggereixen la possible presència de mecanismes autocrins de tipus negatiu reguladors de la proliferació. Al nostre entendre aquesta és la primera descripció en què la SP, una taquiquinina coneguda com a neurotransmissor d'informació sensorial als mamífers (Marx, 1979), estimula la proliferació cel.lular "in vivo". A més, la SP estimula la proliferació a concentracions (1.0-0.1nM) trobades solament per a interaccions entre factors de creixement o hormones i receptors de membrana, el que suggereix un efecte altament específic.

El control positiu de la proliferació cel.lular

L'acció mitogènica de la SP sembla ésser més accentuada com menor és l'índex mitòtic de la regió tractada (vegeu figura 3). Aquest fenomen pot deure's a: 1) variacions en la llargada del cicle cel.lular, especialment escurçant-lo, o 2) fent que un nombre més gran de cèl.lules entri en mitosi tot mantenint un període constant de cicle cel.lular. Malgrat que desconeixem quina és la llargada del cicle tant en organismes intactes com en regeneració, el fet que sistemes mitòticament activats com són els organismes en regeneració responguin a la SP incrementant l'índex mitòtic fa suposar més aviat que l'increment és degut a un increment en el nombre de cèl.lules que ciclen més que a l'escurçament del cicle cel.lular, si bé no disposem de cap dada clara que aboni aquesta suposició.

La SP també duu a un increment de la mida del blastema en organismes en regeneració. Això no és sorprenent donat que aquella depèn del nombre de cèl.lules del blastema, i aquest depèn al seu torn de la taxa de proliferació a la regió del postblastema (Saló i Baguñà, 1984). El que sorprèn més, però, és la diferència entre l'activació de la proliferació al post-

blastema (100-150%) i l'activació del nombre de cèl.lules del blastema (15-20%), ja que en principi caldria esperar valors més semblants. Una explicació d'aquesta disparitat pot deure's a la modalitat de formació i creixement del blastema a planàries. S'ha demostrat (Morita i Best, 1984; Saló i Baguñà, 1984, 1985) que el blastema no presenta mitosi i que el seu creixement es deu a l'entrada continuada, per migracions locals i moviments a l'atzar, de neoblasts des del postblastema a la base del blastema. Aquesta entrada, però, és bàsicament deguda no a fenòmens de migracions direccionals sinó als moviments a l'atzar deguts a la proliferació cel.lular, i molt especialment a prop de la ferida. Si la proliferació al postblastema s'incrementa degut a l'acció de la SP, no totes les cèl.lules produïdes de més aniran cap a la base del blastema; solament un percentatge reduït d'aquestes ho faran. D'aquí que l'activació trobada en la mida del blastema sigui molt inferior a l'esperada potencialment si hi hagués una migració direccional de totes les cèl.lules produïdes de més.

La demostració que la SP actua com a un mitògen molt potent a planàries està plenament d'acord amb les dades de Nilsson et al (1985) sobre l'efecte mitogènic "in vitro" de les taquiquinines Substància P i Substància K a cèl.lules connectives de mamífer. A més, el fet que Mantyh et al (1984) trobin una gran correlació entre la presència de receptors de la SP i la hidròlisi de fosfolípids d'inositol abona aquest possible efecte mitogènic. D'altra banda, altres neuropèptids mitògens com la bradiquinina, la vasopresina i la bombesina actuen seguint el mateix patró bioquímic, i molt recentment Farrar i Anderson (1985) han demostrat que les interleucines 2 i 3 (IL-2 i IL-3) duen, mitjançant el diacil glicerol, al increment i redistribució de la proteïna kinasa C del citosol a la membrana i, a la llarga, a estimular la proliferació cel.lular. D'ací que no sigui gaire aventurat postular que, a planàries, la SP estimularia, unint-se a receptors específics de membrana, la hidròlisi dels fosfolípids de l'inositol, punt clau en la mobilització del Ca^{2+} intracel.lular i en l'activació de la proteïna kinasa C, esdeveniments clau que menen a la proliferació cel.lular (vegeu fig 2).

Com lligar, però, l'efecte tan específic de la SP a planàries i totes les dades bioquímiques esmentades (fig 2) amb el model proposat pels autors de l'escola de París (fig 1) sobre l'activació de la proliferació cel.lular a planàries?. Al nostre entendre, la diferència entre ambdós models és o bé sols temporal o respon a l'existència de dos mecanismes d'activació diferents emprant potser diferents receptors però que menen

a un mateix efecte: incrementar la concentració intracel.lular de calci. Així, d'una banda, el diagrama proposat a la fig 1 respon a reaccions i efectes que s'inicien a les 2-3 hores de regeneració mantenint-se i/o variant d'ací en endavant, mentre que les reaccions de la fig 2, de les que forma part l'estimulació per la SP, tenen lloc al cap de molt pocs minuts, reflectint probablement les reaccions inicial d'estimulació que menen a la llarga a la proliferació cel.lular. Alternativament, i tenint en compte que la fosforilació de les proteïnes endògenes no pot ésser únicament explicada per les activitats de les PK dependents d'AMPc i dependents de Ca^{2+} -calmodulina tal com proposen els autors francesos, ja que bona part d'aquests efectes es duen a terme a través de les PK-C dependents de Ca^{2+} -fosfolípids, justament la PK que queda activada per factors tals com la SP, l'EGF, la PDGF, etc., és possible que els esquemes de les figures 1 i 2 siguin el reflexe de dos mecanismes diferents. En aquest context, Martelly et al (1985) han demostrat molt recentment que la PK-C té a planàries una primera fase d'activació als 3-10 minuts de l'amputació, una segona fase entre 1-3 hores i una darrera a partir de 9 hores de regeneració. Aquestes dades suggereixen que els factors de creixement o activadors a planàries, com la SP i d'altres, activarien la proliferació, al menys inicialment, a través del diagrama especificat a la figura 2.

Un darrer aspecte que cal esmentar és que malgrat diferents neurohormones han estat descrites a planàries (somatostatina, neurofisina, ACTH, neurotensina, S-100, Met-encefalina, FMRF-amida; vegeu Saló i Baguñà, 1985, per a referències), no s'ha demostrat encara la presència de la SP en aquests organismes. D'ací, que es pugués aduir que malgrat els efectes mitogènics tan clars que té, la SP no actua en realitat a planàries. Si bé aquesta crítica és vàlida, hem d'assenyalar, a part d'altres raons que abonen la seva existència, que les concentracions a les que actua la SP a planàries (100-0.1nM) són les pròpies de les interaccions hormona/receptor i factors de creixement/receptors a d'altres sistemes, cosa que suggereix fortament la presència del receptor de la SP, i en conseqüència de la SP o substàncies semblants en aquests organismes.

Hi ha control negatiu de la proliferació?

Els resultats de colonització, per proliferació i migració local, dels territoris irradiats per part de neoblasts procedents de teixits no irradiats, demostren que la proliferació depèn certament de la densitat de neoblasts. Aquests resultats, però, es poden interpretar de dues maneres:

1) que a menor densitat de neoblasts la concentració d'activador/cèl.lula és major i consegüentment hi ha activació de la proliferació, mentre que a major densitat passaria al inrevés; o 2) que a menor densitat de neoblasts menor és també la quantitat de factors inhibidors autocrins i consegüentment hi ha més proliferació, mentre que si la densitat cel.lular és més gran hi ha més factors inhibidors i menys proliferació. No cal dir que ambdós factors, activadors i inhibidors, poden actuar alhora, i la taxa de proliferació dependre del balanç local entre ambdues substàncies.

Les dades obtingudes no són suficients certament per abonar clarament una alternativa o l'altre. De tota manera, una dada interessant, més d'acord amb el model autocrí negatiu, és que no hi ha una proporcionalitat exacta entre densitat i taxa de proliferació ja que com més baixa és la densitat més alta proporcionalment és la proliferació. Això és més fàcil d'explicar per un mecanisme autocrí de tipus negatiu que no per un paracrí de tipus positiu. D'altra banda, en els experiments de injecció de cèl.lules a hostes irradiats, els neoblasts introduïts formen petites clapes o clons que són de la mateixa grandària tant si s'injecten neoblasts purificats com neoblasts sense purificar. Això indica que la proliferació i el seu control és un fenomen local explicable per factors de tipus negatiu produïts pels mateixos neoblasts. Tot plegat ens duu a considerar un model de tipus autocrí negatiu, formalment semblant al model de la probabilitat P_s a Hydra (David, 1983), que suposa que la probabilitat P que un neoblast es divideixi està controlada negativament pels neoblasts veïns. Es a dir: 1) cada neoblast secreta un factor inhibidor difusible; 2) cada neoblast "mesura" la concentració externa local d'aquest factor; i 3) la concentració del factor determina el valor de P . Lògicament, la concentració del factor inhibidor dependrà del nombre i la proximitat dels neoblasts de l'entorn.

Com lligar aleshores els dos mecanismes: l'autocrí negatiu i el paracrí positiu?. Encara que a un nivell molt especulatiu, es pot pensar que als organismes intactes en estat estacionari la proliferació dependrà del balanç local d'ambdós factors. Ara bé, quan per ingestió d'aliment o per amputació, s'incrementa la concentració de factors activadors paracrins (produïts molt probablement pel sistema nerviós), la taxa de proliferació augmenta. La intensitat i durada de l'increment mitòtic dependrà d'una banda de la durada de l'activació i de la concentració assolida de factors activadors, i d'altra banda de la densitat local de neoblasts (inremen-

tada al seu torn per la pròpia proliferació i migració), fent que al cap d'un període de temps determinat es tornin a assolir els valors control.

Perspectives

Tres són els camps principals que resten oberts pels resultats d'aquest treball. D'una banda, i tenint en compte el desconeixement actual de si la SP és present o no a planàries, és el saber si la SP (o substàncies similars) existeix o no en aquests organismes. Si així fos, fora aleshores interessant estudiar: 1) la distribució axial (eix A-P i eix D-V) i la localització cel.lular de la SP i del receptor o receptors de la SP a l'organisme intacte, i els canvis que puguin succeir durant la regeneració, i molt especialment durant les primeres hores; 2) les relacions funcionals entre la SP i els activadors i inhibidors del seu lliurament. Ens referim en especial a estimuladors com la capsaicina, a inhibidors com la Met-enkefalina, o a certs antagonistes com el spantide (Nilsson et al, 1985); i 3) la cinètica mitòtica en resposta a la SP, i comprovar si la SP activa la proliferació seguint les línies esmentades al diagrama de flux de la Figura 2.

Un altra aspecte important a estudiar derivat d'aquest treball és la presència real dels presumptes inhibidors de la proliferació cel.lular a planàries. Això és especialment interessant tenint en compte que els factors inhibidors de la proliferació, cas de ésser-hi, són molt menys coneguts que els factors de creixement. A part de les encare hipotètiques i poc conegudes chalone, s'ha demostrat recentment la presència de factors autocrins de tipus inhibidor com el TGF- β que inhibeix a concentracions molt baixes (del ordre de picograms) la proliferació de molts tipus cel.lulars de morfologia epitelial i fibroblàstica, tumorals o no (Sporn i Roberts, 1985). Això és tant més interessant quan es pensa que les transformacions tumorals poden ésser degudes, a més de la producció o expressió excessiva de factors de creixement autocrins, a les alteracions en la síntesi, expressió, lliurament a l'exterior, o capacitat de resposta, de factors autocrins de tipus negatiu.

El darrer aspecte d'interès rau en la ja coneguda connexió factors de creixement-receptors de membrana-segons missatgers-proteïna kinasa-fosforilació proteica-proliferació cel.lular, i oncogens. Un diagrama sobre les possibles relacions es presenta a la Figura 2, on és evident d'una banda l'interès que presentaria el saber com la proliferació cel.lular es controla en condicions normals per a inferir els punts d'alteració en

les transformacions tumorals, i d'altra banda, estudiar a fons en sistemes proliferatius adequats (dels que els regeneratius en són un bon exemple) l'existència i funció de oncogens cel·lulars. En aquest sentit, detectar la presència d'oncogens cel·lulars en sistemes en regeneració com són els hepatòcits de mamífers o els neoblasts de planàries, seria particularment útil per tal d'acostar els fenòmens de regeneració a l'anàlisi molecular i genètic del control de la proliferació cel·lular.

Agraïments

Aquest estudi ha estat realitzat gràcies a un ajut de la Comisión Asesora de la Investigación Científica y Técnica (CAICYT) (ref 1108/81) a JB.

Bibliografia

- BAGUÑA, J. (1974). Dramatic mitotic response in planarians after feeding, and a hypothesis for the control mechanism. J.Exp.Zool. 190, 117-122.
- BAGUÑA, J. (1976a). Mitosis in the intact and regenerating planaria *Dugesia mediterranea* n.sp. I. Mitotic studies during growth, feeding and starvation. J.Exp.Zool. 195, 53-64.
- BAGUÑA, J. (1976b). Mitosis in the intact and regenerating planarian *Dugesia mediterranea* n.sp. II. Mitotic studies during regeneration and a possible mechanism of blastema formation. J.Exp.Zool. 195, 65-80.
- BAGUÑA, J. (1981). Planarian neoblasts. Nature 290, 14-15.
- BAGUÑA, J., ROMERO, R. (1981). Quantitative analysis of cell types during growth, degrowth and regeneration in the planarians *Dugesia mediterranea* and *Dugesia tigrina*. Hydrobiologia 84, 181-194.
- BERRIDGE, M.J., IRVINE, R.F. (1984). Inositol triphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. Nature 312, 315-321.
- BETCHAKU, T. (1975). Evidence favors that planarian neoblasts are true reserve cells. J.Cell.Biol. 67:31a.
- BRØNSTED, H.V. (1969). Planarian Regeneration. Pergamon Press Ltd., Londres.
- COLLET, J., SALÓ, E. (1983). Polyamine changes during planarian regeneration: regional content, and the effects of polyamine inhibitors on polyamine biosynthesis and blastema growth and differentiation. Arch.Anat. Microsc.Morph.Exper. 72, 244-245.
- DAVID, C.N. (1983). Stem cell proliferation and differentiation in hydra. In: Stem Cells (C.S.Potten, ed). Churchill Livingstone, Edinburgh. pp 12-27.
- FARRAR, W.L. i ANDERSON, W.B. (1985). Interleukin-2 stimulates association of protein kinase C with plasma membrane. Nature 315, 233-235.
- FORBES, W.R., PALMER, M.A., YEAGER, R.K. (1979). Stimulation of *Dugesia tigrina* auricle regeneration by exogenous putrescine, spermine or spermidine. Experientia 35, 318-319.

- FRANQUINET, R. (1979). Rôle de la sérotonine et des catécholamines dans la régénération de la planaire *Polycelis tenuis*. J.Embryol.exp.Morphol. 51, 85-95.
- FRANQUINET, R. (1981). Synthèse d'ADN dans les cellules de planaires cultivées in vitro. Rôle de la sérotonine. Biol.Cell. 40, 41-46.
- FRIEDEL, T., WEBB, R.A. (1979). Stimulation of mitosis in *Dugesia tigrina* by a neurosecretory fraction. Can.J.Zool. 57, 1818-1819.
- KOENIG, H., GOLDSTONE, A., LU, C.Y. (1983). Polyamines regulate calcium fluxes in a rapid plasma membrane response. Nature 305, 530-534.
- LENDER, T (1974). The rôle of neurosecretion in fresh-water planarians. In: Biology of the Turbellaria (Riser, N.W. i Morse, M.P. eds). McGraw-Hill, New York. pp 460-475.
- LENICQUE, P.M. (1976). Contrôle de la régénération de petits morceaux de planaire *Dugesia tigrina* par les nucléotides cycliques AMP et GMP. C.R.Acad.Sci.Paris. 283, 1317-1319.
- MANTYH, P.W., PINNOCK, R.D., DOWNES, C.P., GOEDERT, M., HUNT, S.P. (1984). Correlation between inositol phospholipid hydrolysis and substance P receptors in rat CNS. Nature 309, 795-797.
- MARTELLY, I. (1983). Effets du calcium sur le synthèse d'ARN et d'ADN de cellules de planaires cultivées in vitro. C.R.Acad.Sci.Paris. 297, 9-12.
- MARTELLY, I., FRANQUINET, R. (1984). Planarian regeneration as a model for cellular activation studies. TIBS 8, 468-471.
- MARTELLY, I., MORACZEWSKI, J., FRANQUINET, R. (1985). Etude de l'activité protéine-kinase C chez les planaires intactes et en régénération. 7e Colloque.Genet et Biol.Develop. Soc.Franc.Biol.Develop. Marseille. (Abstracts).
- MARX, J.L. (1979). Brain peptides: is substance P a transmitter of pain signals?. Science 205, 886-889.
- MORITA, M., BEST, J.B. (1984). Electron microscopic studies of planarian regeneration. IV. Cell division of neoblasts in *Dugesia dorotocephala*. J.Exp.Zool. 229, 425-436.
- NILSSON, J., VON EULER, A.M., DALSGAARD, C.J. (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by substance P and substance K. Nature 315, 61-63.
- NISHIZUKA, Y. (1984). The role of protein kinase C in cell surface signal transduction and tumour promotion. Nature 308, 693-698.
- ROMERO, R. (1983). Anàlisi quantitativa cel.lular del creixement i decreixement en les planàries *Dugesia(G)tigrina* i *Dugesia(S)mediterranea*. Biol.Desenv. 1, 243-249.
- ROMERO, R., BAGUÑA, J. (1984). Efecte de la nutrició i la temperatura sobre el creixement i decreixement de quatre espècies de planàries. Anàlisi dels paràmetres "a" i " ". Biol.Desenv. 2, 129-134.
- SALÓ, E. (1984). Formació del blastema i re-especificació del patró durant la regeneració de les planàries *Dugesia(S)mediterranea* i *Dugesia(G)tigrina*: Anàlisi morfològic, cel.lular i bioquímic. Tesi Doctoral, Univ. Barcelona.

- SALÓ, E., BAGUÑA, 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.Morphol. 83, 63-80.
- SALÓ, E., AULADELL, M.C., BAGUÑA, J. (1984). Efecte diferencial de la inyección de neoblasts i cèl.lules diferenciades a planàries irradiades. El paper del neoblast com a cèl.lula-soca i de regeneració. Biol.Desenv. 2, 257-264.
- SALÓ, E., BAGUÑA, J. (1985). Cell movement in intact and regenerating planarians. Quantitation using chromosomal, nuclear and cytoplasmic markers. J.Embryol.exp.Morphol. (en premsa).
- SALÓ, E., BAGUÑA, J. (1985). Stimulation of cell proliferation and cell differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia(G)tigrina* by the neuropeptide substance P. J.Exp.Zool. (en premsa).
- SAUZIN-MONNOT, M.J. (1972). Etude ultrastructurale du tissu nerveux et des produits de sécrétion nerveuse, au cours des premières heures de régénération de la planaire *Polycelis nigra* (Turbellarié-Triclade) au niveau de la blessure. Ann.Embryol.Morphog. 5, 257-265.
- SAUZIN-MONNOT, M.J. (1976). Action des broyats de blastemes de régénération sur l'activité synthétique de fragments postérieurs de planaires *Dendrocoelum lacteum*, sectionnées en arrière du pharynx. C.R.Acad.Sci. Paris. 282, 1885-1888.
- SCHALLER, H.C. (1976). Action of the head activator as a growth hormone in hydra. Cell.Differ 5,1-11.
- SCHALLER, C.H., BODENMÜLLER, H. (1981). Isolation and aminoacid sequence of a morphogenetic peptide from hydra. Proc.Natl.Acad.Sci.USA. 78, 7000-7004.
- SPORN, M.B., ROBERTS, A.B. (1985). Autocrine growth factors and cancer. Nature 313, 745-747.
- STEELE, V.E., LANGE, C.S. (1977). Characterization of an organ-specific differentiator substance in the planarian *Dugesia etrusca*. J.Embryol.exp.Morphol. 37, 159-172.
- TAYLOR, M.V., METCALFE, J.C., HESKETH, T.R., SMITH, G.A., MOORE, J.P. (1984). Mitogens increase phosphorylation of phosphoinositides in thymocytes. Nature 312, 462-465.
- WEINSTEIN, S., GAVURIN, L. (1977). The effect of adenosine-3',:5'-cyclic monophosphate on the mitotic rate in regenerating *Dugesia dorotocephala*. Cell.Differ. 5,311-322.