

Efecte de neuropèptids i factors de creixement sobre la proliferació cel.lular a planàries

J. Baguñà

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

Abstract

Effects of neuropeptides and growth factors on cell proliferation in planarians.

The neuropeptides Substance P (SP), bradykinin (BR), and Hydra Peptide (HP), and the Epidermal Growth Factor (EGF) are shown to be, at nanomolar concentrations, potent mitogens for planarian cells. Instead, bombesin (BO), a peptide isolated for Amphibian skin, does not stimulate or inhibit cell proliferation. These results suggest that the mitotic target cells, the neoblasts, should have in their cell membranes numerous receptors for growth hormones and neuropeptides to control their proliferation.

SP stimulates cell proliferation inducing G2 cells to enter into mitosis as shown by the very early (1-2 hrs) mitotic response after SP incubation. However, it is also possible, though not proved by our results, that SP, stimulates G1 cells to enter into the S phase.

Finally, substances that alter the release of SP by SP-producing cells, like the endogenous opiate Met-enkephalin (ENK) and its antagonist naloxone (NX), are shown to be, as expected, stimulators or inhibitors of cell proliferation in planarians.

Introducció

En treballs anteriors, Saló i Baguñà (1985, 1986) demostraren que el neuropèptid Substància P (SP), de la família de les taquiquinines, estimula la proliferació cel.lular a planàries, intactes i en regeneració, a concentracions (100-0.1nM) pròpies de certs factors de creixement i hormones estimuladores de la proliferació cel.lular (bombesina, bradiquinina, somatomedines, factors de creixement epidèrmic i fibroblàstic,...). Aquests resultats suggeriren que la SP podria ésser un dels factors essencials en el control de la proliferació a planàries.

Que l'efecte de la SP no era quelcom particular, i d'ací poc relevant, cenyit a planàries es demostrà poc després quan Nilsson i col (1985) demostraren l'efecte activador de dos taquiquinines, la substància P (SP) i la substància K (SK), en la proliferació de cèl.lules musculars i fibroblasts de ratolins i humans a concentracions de 100-0.1nM, així com l'efecte inhibitor d'un anàleg de la SP, el spantide, que competeix pel el receptor de les taquiquinines.

A nivell subcel·lular, les taquiquinines, semblantment al que s'ha demostrat per a d'altres factors de creixement, semblen causar el seu efecte estimulador a través de la coneguda cadena: receptor \rightarrow diacilglicerol + inositol- P_3 \rightarrow proteïna kinases + Ca^{2+} intracel·lular \rightarrow síntesi de DNA. D'ací, que aquests neuropèptids, apart de participar en altres aspectes de les reaccions davant estímuls o alteracions de qualsevol mena, puguin jugar un paper clau junt a d'altres factors, en el control i coordinació de la proliferació cel·lular a diferents sistemes.

L'acció mitogènica de la SP a planàries deixà oberta una sèrie d'interrogants (Saló i Baguñà, 1985). D'ells, els més importants serien: 1) saber si la SP existeix "in vivo" a planàries, on es sintetitza, i on actúa; 2) veure quina és la cinètica de resposta de les cèl·lules de planàries davant de la SP; i 3) establir les relacions funcionals amb d'altres factors estimuladors i inhibidors del seu lliurament i de la seva acció.

Mentre que determinar si la SP i altres taquiquinines són a planàries és un treball actualment en curs (Palacios, Saló i Baguñà, dades no publicades), aquest treball s'adreça bàsicament a determinar, en primer lloc, la resposta temporal de les cèl·lules en front de la SP, i en particular si actúa a G1 o a G2, o en ambdós períodes. En segon lloc, hem determinat l'efecte de dues substàncies que interactuen amb l'acció de la SP: la Met-encefalina (ENK) que inhibeix el lliurament de la SP, i el naloxone (NX), que inhibeix al seu torn l'acció de l'encefalina. Finalment, i com a dada adicional, hem comprovat el potencial mitogènic de quatre coneguts factors de creixement dels Vertebrats i Invertebrats: el factor de creixement epidèrmic ("Epidermal Growth Factor", EGF), la Met-Lys-bradiquinina (BR), la bombesina (BO), i el Pèptid de Hidra (HP).

Material i Mètodes

Els organismes emprats foren exemplars de 6-7mm de llargada (\approx 500.000 cèl·lules/individu; Baguñà i Romero, 1981; Romero, dades no publicades) de l'espècie Dugesia(G)tigrina, mantingudes al laboratori a 17°C i a la foscor. Tots els experiments es realitzaren a aquesta temperatura emprant animals dejunats una setmana.

Substàncies

Els productes emprats com a mitògens foren: Substància P (SP), Factor de Creixement Epidèrmic (EGF), Met-Lys-bradiquinina (BR), Bombesina (BO), i l'anomenat Pèptid de Hidra (HP). Tots els productes són de Sigma (Londres), i s'afegiren a concentracions de 10^{-6} a 10^{-8} M (1000-0.1nM).

La Met-enkefalina (ENK) i el naloxone (NX), també de Sigma (Londres) s'empra-
ren a concentracions de 10^{-5} - 10^{-6} M. Tots els productes, llevat del HP, es di-
solgueren en solució salina "Coward" per planàries (Saló, 1984) conservant-se
a -20°C en petits alíquotes (100 μ l). El pèptid de hidra (HP), molt hidrofòbic,
es disolgué en solució salina :metanol (1:1) i es guardà a -20°C .

Efecte dels factors de creixement, neuropeptids i altres substàncies sobre la proliferació cel.lular

Els factors a comprovar s'afegiren per dilució a petris que contenien planàries intactes en solució salina. A les 20 i 40 hores d'incubació, 3 exemplars es fixen i tenyeixen amb la tècnica de Gomori (Saló i Baguñà, 1984). El nombre de mitosi es contà en 3 línies transversals al llarg de l'eix A-P. El nombre de cèl.lules examinades equival al 15% del nombre total de cèl.lules essent ple-
nament significatiu. Els resultats s'expressen en índex mitòtic (IM)(nombre de mitos/100 cèl.lules), i són la mitja de 3 experiments diferents.

Efecte temporal de la SP

L'índex mitòtic de planàries intactes incubades 1,2,4,8,20,30 i 40 hores en SP(10^{-7} M) s'examinà emprant les tècniques descrites abans. Durant el recompte mitòtic s'anotà curosament la fase mitòtica a la que pertany cada mitosi per tal d'establir les variacions del percentatge de cada fase al llarg del perío-
de d'incubació.

Resultats

1) Efecte mitogènic de neuropeptids i factors de creixement.

A la Figura 1 representem els resultats obtinguts emprant els diferents factors de creixement (entre ells, de nou, la SP) sobre la proliferació cel.lular de planàries intactes. De les cinc substàncies provades, totes, llevat de la bombesina (BO), tenen un efecte estimulador. D'elles, la SP i el HP, en aquest ordre, tenen el màxim efecte, mentre que el EGF i la bradiquinina (BR) tenen efectes menors, si bé significatius.

Tenint en compte que les úniques cèl.lules que tenen capacitat de proliferar a planàries són les cèl.lules indiferenciades o neoblasts, i que les substàn-
cies provades actúen a concentracions molt petites via receptors específics de membrana, aquests resultats suggereixen que els neoblasts tindrien recep-
tors que reconeixerien aquestes substàncies, o d'altres afins.

2) Dinàmica de la resposta mitòtica a la SP

El descobriment de l'acció de la SP sobre cèl.lules de planàries fou realitzada incubant per 24 i 48 hores planàries intactes i en regeneració amb SP (Saló i Baguñà, 1985, 1986). Aquests períodes feien difícil escatir quin era el perío-

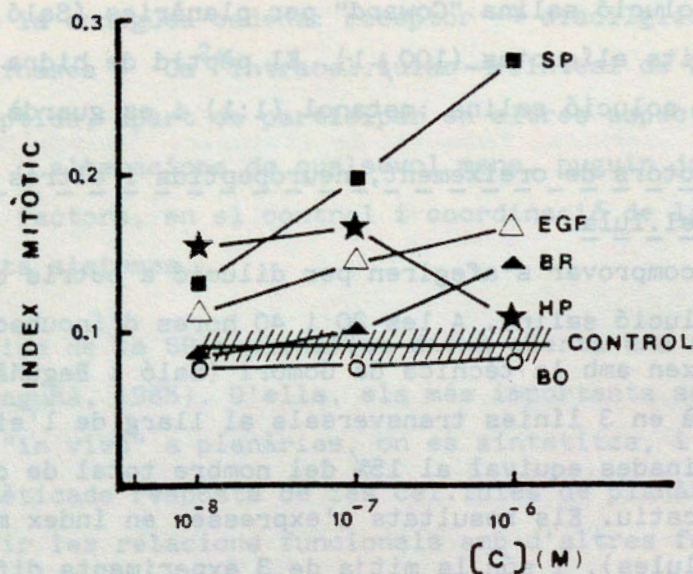


Figura 1. Estimulació de l'índex mitòtic en planàries de 6-7mm de llargada incubades 40 hrs en diferents neurogèptids i factors de creixement a concentracions de 10^{-6} a 10^{-8} M. SP: Substància P; EGF: Factor de creixement epidèrmic; BR: bradiquinina; HP: pèptid de hidra; BO: bombesina.

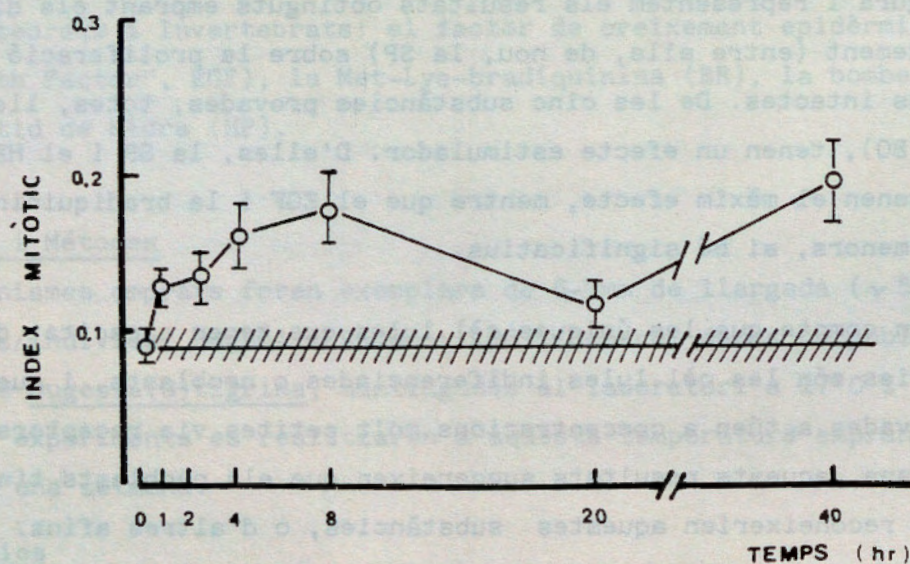


Figura 2. Índex mitòtic \pm S.D. (nombre mitosi/100 cèl.lules) a planàries de 6-7mm de llargada incubades amb SP (10^{-7} M) durant diferents intervals de temps.

de del cicle cel.lular activat per la SP; és a dir, si la SP estimulava a cèl.lules en G1(G0) a entrar en el període S com semblava pasaba a mioblasts i fibroblasts de mamífers (Nilsson i col, 1985), o si la SP estimulava per contra a cèl.lules en G2 a passar a la fase de mitosi. Cabia endemés la possibilitat de que la SP tingués una acció dual.

Les dades presentades a la Figura 2 mostren clarament que planàries intactes incubades amb SP presenten un increment significatiu de l'índex mitòtic tot just 1 hora després d'iniciar l'incubació. Aquesta resposta incrementa fins a un màxim a les 8 hores per decreixer a un mínim relatiu a les 20-24 hores, i atenyen un nou increment cap a les 40 hores d'incubació. Aquesta resposta tan ràpida suggereix d'inici que un dels efectes de la SP seria el d'estimular a cèl.lules en G2 a entrar en mitosi doncs una resposta mitòtica tan ràpida es inversemblant que es dongui a partir de cèl.lules en G1 que han de passar per la fase S. Malgrat tot, una hipòtesi alternativa si bé no tan plausible seria que la SP estimulés a les cèl.lules en el període S a entrar ràpidament en mitosi sense gaire bé aturar-se en la fase G2.

L'estudi dels canvis en els percentatges de les fases mitòtiques al llarg de la incubació en SP (Figura 3) apoya, creiem, la primera alternativa. Així, tot just a 1 hora d'incubació, el percentatge de profases, i en menor grau de metafases, incrementa significativament, mentre que el de telofases decreix. Aquesta alteració es redreça ràpidament doncs a les 2 hores, i especialment a les 4-8 hores, les profases cauen sota mínims mentre que metafases (4 hores) i telofases (8 hores) atenyen els seus màxims. La situació esdevé normalitzada a les 20 hores. Clarament doncs, la SP provoca una inducció brusca de profases, i en menor grau de metafases, a l'hora de incubació, fenòmen sols explicable per l'entrada brusca i sincrònica de cèl.lules en G2 a mitosi.

3) Efecte sobre la proliferació cel.lular de substàncies que interactuen amb la SP

Si la SP regula d'alguna manera la proliferació cel.lular a planàries, cal esperar que diferents substàncies que interactuen d'alguna manera amb el lliurament o l'acció de la SP, afectin al seu torn a la proliferació cel.lular. A la Figura 4 es mostra un diagrama hipotètic de l'acció d'alguna d'aquestes substàncies sobre la SP. D'elles, hem comprovat l'acció de la Metencefalina (ENK), un opiàci que inhibeix el lliurament de la SP, i del naloxone (NX), un antagonista de la ENK en unir-se als receptors d'aquesta (ENK-R), i conseqüentment un potencial estimulador de les mitosis degut a un lliurament potencialment més gran de SP.

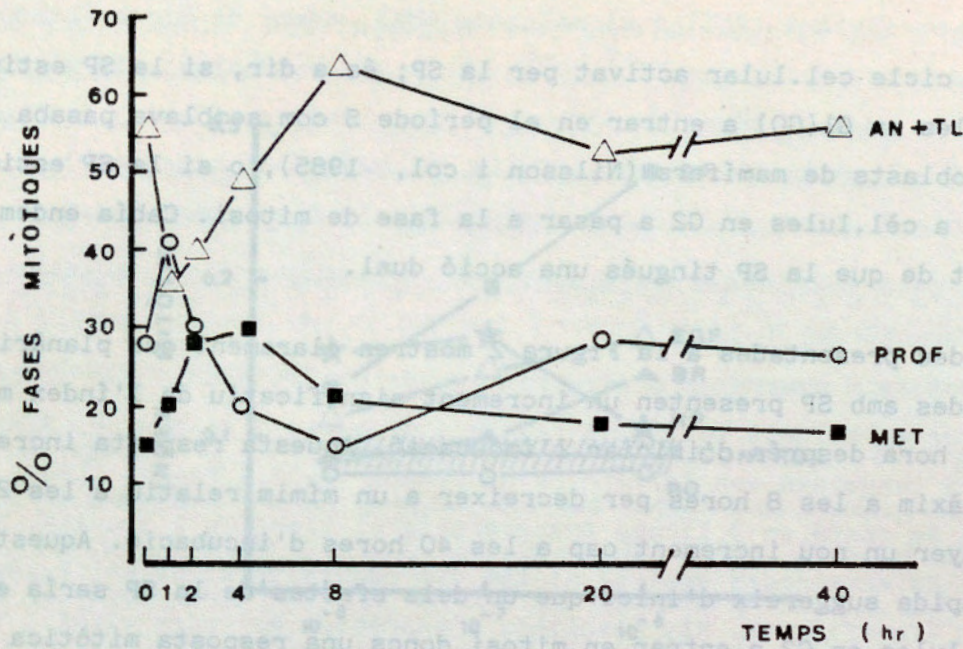


Figura 3. Canvis en el percentatge de cèl·lules en les diferents fases de la mitosi en organismes de 6-7mm de llargada incubats en SP (10^{-7} M). PROF: profases; MET: metafases; AN + TEL: anafases i telofases.

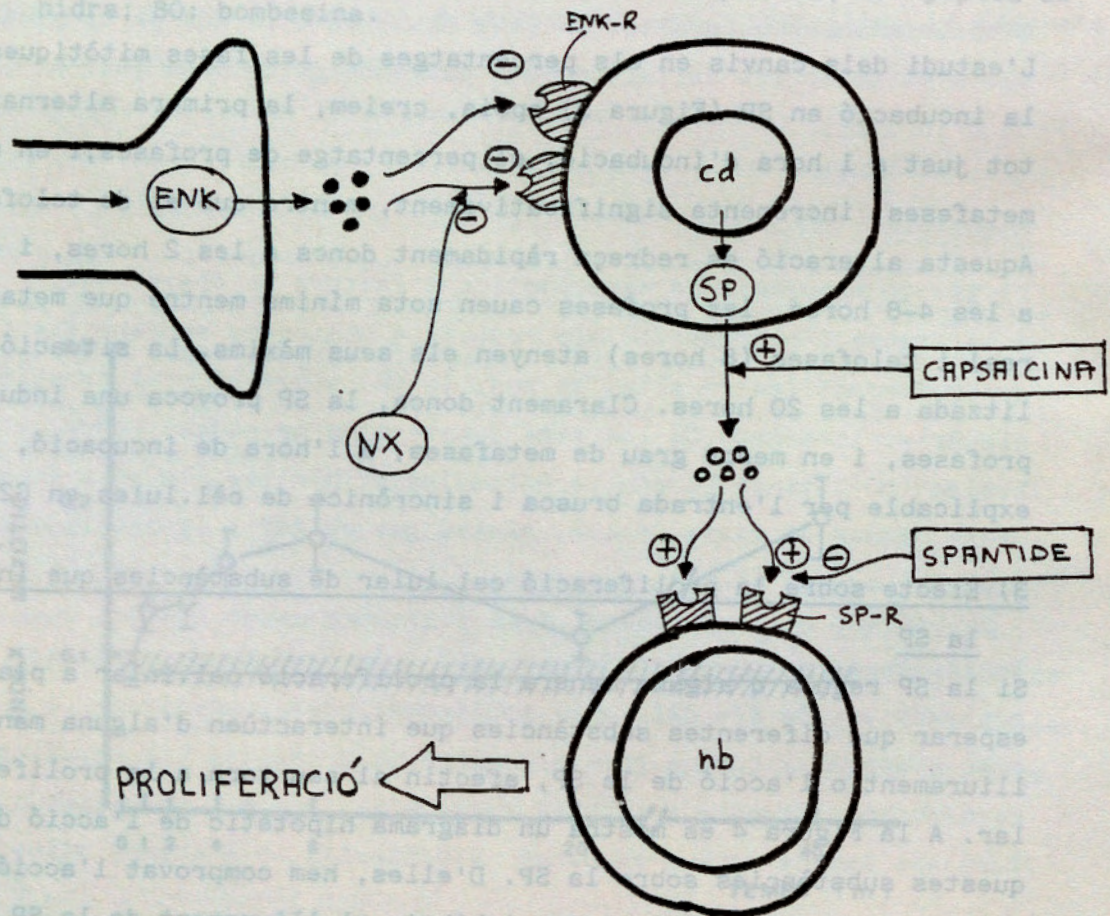


Figura 4. Esquema hipotètic de les relacions entre les cèl·lules productores de SP, factors que influeixen en el seu lliurament, i cèl·lules que responen mitogènicament. ENK: encefalina; R-ENK: receptor de l'encefalina; SP: substància P; R-SP: receptor de la substància P; cd: cèl·lules diferenciades; nb: neoblasts.

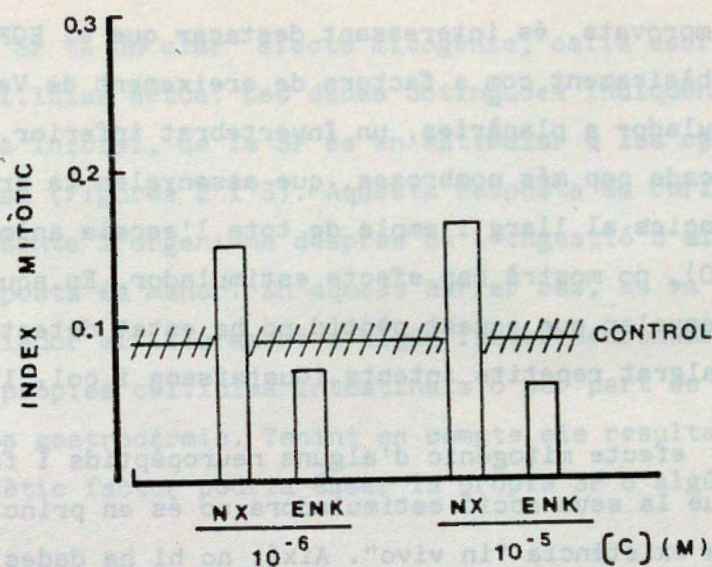


Figura 5. Index mitòtic de planàries de 6-7mm de llargada incubades durant 20 hores en Naloxone (NX) i Met-Enkefalina (ENK) (10^{-5} i 10^{-6} M).

Els resultats obtinguts (Figura 5) mostren que el NX té un efecte clarament estimulador de la proliferació cel.lular mentre que la Met-ENK té un paper inhibitor. Aquestes dades reforçen el model d'acció proposat de la SP en el control de la proliferació cel.lular a planàries.

Discussió

Les conclusions principals d'aquest estudi, encara molt provisional, són: 1) l'existència d'un nombre, cada cop més elevat, de factors de creixement i neuropèptids capaços d'estimular la proliferació a planàries; 2) el fet que la SP estimula inicialment a les cèl.lules en G2 a entrar en mitosi, per més tardanament fer-ho potser per a estimular el pas G1 S; i 3) l'acció de determinades substàncies que interfereixen, positiva o negativament, amb l'acció de la SP, afecten al seu torn a la proliferació cel.lular. En conjunt, aquests resultats indiquen que les cèl.lules indiferenciades de planària, els neoblasts, presentarien diversos receptors que reconeixerien a tota una gama de neuropèptids i factors de creixement, o substàncies afins, que regularien conjuntament o sinèrgicament la proliferació cel.lular. Això converteix als neoblasts en un bon sistema d'assaig, un cop disposem de cultius "in vitro" d'aquestes cèl.lules, de nombrosos factors de creixement i pèptids reguladors de la proliferació cel.lular.

Dels factors comprovats, és interessant destacar que el EGF i la BR, malgrat ésser coneguts bàsicament com a factors de creixement de Vertebrats, tenen un efecte estimulador a planàries, un Invertebrat inferior. Això està d'acord amb les dades, cada cop més nombroses, que assenyalen la presència d'aquest tipus de substàncies al llarg i ampla de tota l'escala animal. Per contra, la bombesina (BO), no mostrarà cap efecte estimulador. En aquest sentit, és interessant assenyalar que aquest pèptid no ha estat detectat encara als Plathelminths malgrat repetits intents (Gustafsson i col, 1986).

Malgrat el clar efecte mitogènic d'alguns neuropèptids i factors de creixement, cal dir que la seva acció estimuladora no és en principi prova suficient de la seva existència "in vivo". Així, no hi ha dades sobre l'existència del EGF i de la BR a planàries, mentre que els estudis menats a detectar el receptor de la substància P a planàries han donat, de moment, resultats negatius (Palacios, comunicació personal). Aquest darrer fet, en principi sorprenent donat el clar efecte de la SP, s'ha de prendre amb extrema cautela doncs pot ser que el hipotètic receptor de la SP a planàries hagi divergit suficientment com per no ésser detectat per el anticòs obtingut contra receptors de la SP de mamífers. Una altra possibilitat, força raonable, es que no hi hagi realment SP a planàries però si substàncies relacionades com la Substància K, i que la SP exògena interactua amb els receptors específics de la SK, neuropèptid que té un efecte mitogènic sobre cèl.lules de mamífer més gran encara que la SP (Nilsson i col, 1985).

Els resultats obtinguts emprant modificadors de l'acció de la SP (Figures 4 i 5) apoen clarament el model d'acció de la SP, o substàncies afins, sobre la proliferació cel.lular. Així, la ENK, coneguda als mamífers com a inhibidor, o neuromodulador, del lliurament de la SP, inhibeix significativament la proliferació cel.lular, mentre que el NX, un antagonista molt conegut dels opiacis que inhibeix l'acció de la ENK, incrementa la proliferació cel.lular, a través, molt probablement, d'un lliurament més elevat de SP. Si això fos així, caldria esperar la presència mútua de receptors d'opiacis i de SP en les cèl.lules productores d'aquesta.

Per aprofundir l'estudi sobre modificadors de l'acció de la SP caldria examinar el comportament de la proliferació enfront de la capsaicina, un producte que estimula el lliurament, i que provocaria, en conseqüència, un increment de la proliferació, així com del spantide, un anàleg de la SP que competeix amb aquesta per el receptor de la SP i que provocaria, en conseqüència, una inhibició de la proliferació.