

Immunodetecció de factors de creixement (EGF) i neuropèptids mitogènics moduladors (Substància P; Leu-Encefalina i FMRF-amida) a la planària *Dugesia(G)tigrina*.

F. Burgaya, D. Bueno, L. Sumoy, R. Romero i J. Baguñà.

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

Abstract

Immunocytochemical demonstration of growth factors (EGF) and mitogenic and modulatory peptides (SP, Leu-ENK, FMRF-amide) in the planarian *Dugesia(G)tigrina*.

Several neuropeptides and growth factors, first detected in higher organisms, have been shown in the last 10-15 years to be present in lower invertebrates. Using immunocytochemical methods, we show here the presence of immunoreactivity (IR) to antisera against the neuropeptides FMRF-amide, Substance P (SP) and Leu-Enkephalin as well as against the Epidermal Growth Factor (EGF), in the planarian *Dugesia(G)tigrina* (Platyhelminthes; Turbellaria; Tricladida).

As expected, immunoreactivity is basically located within the central and peripheral nervous system, with different but overlapping sets of neurons and nerve processes reacting to each antiserum. The pattern of distribution found agrees with the reported stimulatory (SP, EGF) and inhibitory (Leu-Enk) action of these substances in intact planarians, suggesting a main role for these (and others to be found) neuropeptides and growth factors in controlling cell proliferation in planarians.

The implications of these results, namely the first report of EGF-like IR in a lower invertebrate, to unravel the evolution of the neuroendocrine system as well as the control of cell proliferation during regeneration, are also discussed.

Introducció

Saló i Baguñà (1985, 1986) demostraren que el neuropèptid Substància P (SP) estimula la proliferació cel.lular a planàries intactes i en regeneració. Coetàniament, Nilsson et al. (1985) demostraren un efecte similar per a la pròpia Substància P (SP) i per a una altra taquiquinina, la Substància K (SK),

en la proliferació de les cèl·lules musculars de ratolí i de fibroblasts humans. Això suggerí que certs neuropèptids, descrits en d'altres organismes com a mitogènics, podrien ésser responsables de l'activació dels neoblasts a planària, induïnt-ne la proliferació, i fins i tot la diferenciació cap a altres tipus cel·lulars; per abastir així el recanvi cel·lular en organismes intactes, o la reconstrucció de l'organisme en regeneració.

Posteriorment, Baguñà (1986) i Baguñà i col. (1989) demostraren que els neuropèptids Substància P (SP), pèptid de Hydra (HP), Substància K (SK) i el Factor de Creixement Epidèrmic (EGF), es comporten com a potents agents mitogènics a planàries a concentracions pròpies de l'actuació d'hormones. L'especificitat d'aquest efecte es mostrà a través de la inhibició de l'acció mitogènica de la SP per la Met-Encefalina (opiàci inhibidor de l'alliberament de la SP) i la recuperació de l'efecte mitogènic pel Naloxone (NX), descrit com un antagonista de les encefalines, en unir-se competitivament als receptors cel·lulars d'aquestes (ENK-R) (Baguñà, 1986).

Aquests resultats suggerien que el control de la proliferació a planària està modulats per aquests mateixos (i probablement d'altres) neuropèptids i factors de creixement. Seguint aquest raonament calia detectar i localitzar la presència d'aquestes substàncies en organismes intactes i, molt especialment, determinar si és el sistema nerviós el principal responsable de la seva producció.

En aquest treball, i mitjançant tècniques immunocitoquímiques, hom demostra la presència *in vivo* de SP-like, Leu-Enk-like i EGF-like a nivell de Sistema Nerviós Central i Perifèric en organismes intactes de la planària *Dugesia(G)tigrina*, així com del neuropèptid cardioexcitatori de moluscs (FMRF-amida), relacionat probablement amb la contracció muscular. D'aquests resultats, que aporten dades d'interès sobre l'evolució del sistema neuroendocrí, cal destacar en especial la detecció, per primer cop en invertebrats inferiors, d'activitat EGF-like.

Material i Mètodes

Organismes intactes de 7-11 mm de llargada de l'espècie *Dugesia(G)tigrina* varen ser fixats en paraformaldèhid al 4% en tampó fosfat 100 mM (pH 7.2) durant 4 hores a 4°C, i rentats en el mateix tampó *overnight* a la mateixa temperatura. Prèvia deshidratació en la sèrie alcohòlica usual varen ser inclosos en parafina (51-53°), tallats a 10µm i muntats en portaobjectes gelatinats amb cromalum-gelatina.

Tinció immunocitoquímica

El protocol seguit és basicament l'emprat per Reuter et al. (1984) amb lleugeres modificacions. Després de desparafinar amb xilè (2 x 3 min.) i rehidratar en la sèrie alcohòlica, els talls es permeabilitzen amb pepsina al 0.4% en HCl 0.1 N (pH 5.0), digerint-los durant 15 minuts a 37°C. Per inhibir les peroxidases endògenes, es tracten amb aigua oxigenada al 0.3% en tampó TBS durant 15 minuts a temperatura ambient. Per saturar els llocs de lligam inespecífic, s'incuben en una solució de llet en pols desnatada (Molico-NESTLE) al 10% en TBS, durant 30 minuts a temperatura ambient.

Els talls s'incuben durant 16-18 hores a 4°C i en cambra humida en les diferents dil.lucions en TBS-Molico a l'1% de cadascun del anticossos primaris (conill-anti-SP 1:200, ratolí-anti-Leu-Enk 1:50, conill-anti-EGF humà 1:200 i conill-anti-FMRF-amida 1:2000). Tot seguit, es renten en TBS-Triton X-100 al 0.25% (3 x 5 min.) i s'incuben en els corresponents anticossos secundaris (cabra-anti-conill, conill-anti-ratolí) a dil.lució 1:100, per després rentar (3 x 5 min.) en la solució de rentat abans esmentada. Finalment s'incuben en el complex PAP dil.luit 1:100 durant 30 minuts a temperatura ambient (PAP-conill, PAP-ratolí).

Seguidament, els talls es renten amb tampó Tris-HCl 100 mM (3 x 5 min.) i es procedeix a revelar la presència de peroxidasa tractant-los amb una solució de DAB al 0.03% i aigua oxigenada al 0.01% en TBS 100 mM, a la qual s'hi afegeix sulfat amònic de níquel a una concentració final del 0.15% durant 7 minuts a temperatura ambient, i a la foscor.

Per tal d'obtenir preparacions permanents es deshidraten els talls en la sèrie alcohòlica usual, es passen tot seguit per xilè i es monten en DPX.

Resultats

El Sistema Nerviós de la planària *Dugesia(G)tigrina* presenta immunoreactivitat (IR) enfront als anticossos anti-FMRF-amida, anti-EGF, anti-SP i anti-Leu-Enk, amb diferents patrons de distribució segons l'anticòs utilitzat; patrons que estan bàsicament d'acord amb les diferents funcions que presuposem per a cadascun dels neuropèptids implicats:

(1) Anti-FMRF-amida

La IR contra FMRF-amida és intensa. A la regió cefàlica, les fibres i cossos IR abasten totalment els ganglis cefàlics. La tinció és intensa al llarg dels cordons nerviosos i comissures, principalment a nivell de fibres. Hi ha marcatge, més lleu, a tots els plexes: el plexe subepidèrmic no es tenyeix sempre, però la regió que envolta la cambra faríngia presenta en tot moment una intensa IR. Hi ha fibres tenyides travessant el parènquima, implicades en la inervació del plexe gastrodermal i també de les fibres musculars dorso-ventrals i es tenyeixen els feixos nerviosos que, des dels cordons i a nivell de les comissures i nervis laterals s'estenen cap a la superfície dorsal i els marges del cos. A la faringe es tenyeixen intensament ambdós plexes i les fibres que els connecten.



FIGURA 1: Immunodetecció de FMRF-amida a nivell dels ganglis cefàlics, on es detecten cossos i fibres amb IR. Observi's l'ull al damunt del cervell (1044x).

(2) Anti-EGF

L'antisèrum contra EGF humà ens ofereix IR de menor intensitat, localitzada preferentment a les fibres. En conseqüència, la marca més intensa la trobem a nivell dels cordons nerviosos longitudinals. Sorprenentment, la tinció és especialment minsa als ganglis cefàlics, on la densitat de cossos neuronals és alta; la IR es localitza preferentment a nivell axonal i és difícil trobar cossos tenyits. D'altra banda, trobem IR al llarg del plexe subepidermal dorsal i ventral. Al parènquima la tinció resulta especialment difícil de veure, estant situada a nivell dels feixos que el travessen verticalment, probablement relacionats amb el plexe subepidèrmic dorsal; de fet, no es pot excloure que hi hagi inervació gastrodermal. A la faringe, la tinció és moderada i restringida al plexe extern

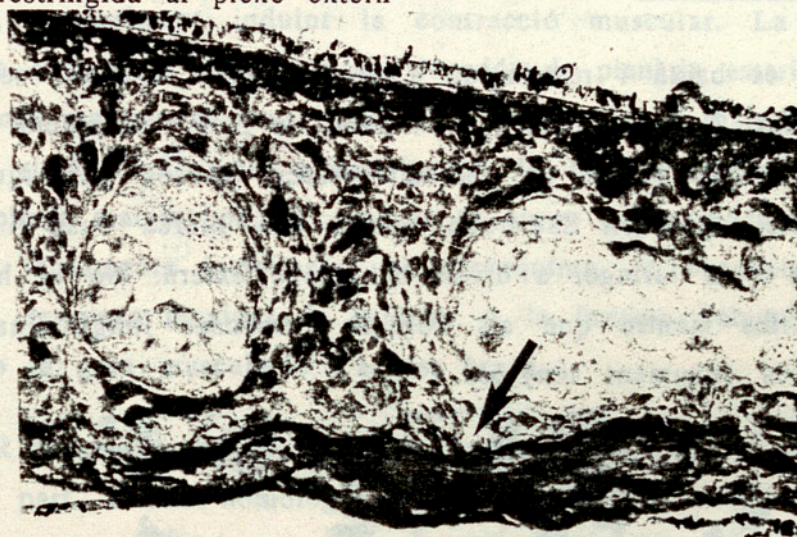


FIGURA 2: Tall sagital on es mostra la IR EGF-like a nivell dels cordons nerviosos (fletxa). Damunt d'aquests, es visualitzen els cecs intestinals, l'epidermis dorsal i entremig d'ambdós les cèl·lules pigmentàries (1044x).

(3) Anti-SP

La IR contra SP és intensa i especialment neta; això pot ésser una conseqüència de la seva escassa presència a nivell del Sistema Nerviós perifèric. Els cossos neuronals i axons estan intensament tenyits tant a nivell cefàlic com en els cordons nerviosos. L'únic plexe fortament tenyit és el faringi extern, que contrasta amb la baixa IR que presenta l'intern (només algunes fibres tenyides, procedents del plexe extern). No hi ha marcatge associat a la gastrodermis, ni a fibres musculars ni a d'altres àrees del parènquima.



FIGURA 3: Tall transversal on apareixen els dos cordons nerviosos fortament marcats amb anticòs anti-SP (1280x).

(4) Anti-Leu-Enk

La IR és baixa i restringida a unes poques cèl.lules, sense connexió clara entre elles. Donada la seva proximitat, es poden considerar associades a la gastrodermis. A voltes es detecten fibres emeses per aquests cossos, inervant l'epiteli gàstric. Es troba també una marca suau i aparentment desorganitzada a la faringe, a nivell del plexe extern. No hi ha senyal als ganglis cefàl.lics mentre que als cordons nerviosos longitudinals apareixen fibres disperses suaument tenyides.

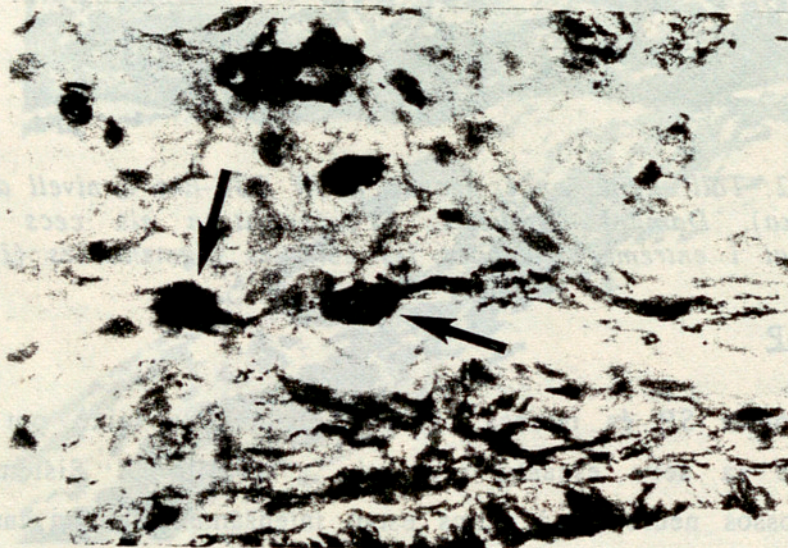


FIGURA 4: Cossos cel.lulars propers als diverticles intestinals immunoreactius amb anti-Leu-enk (fletxes); el marcatge s'estén a les ramificacions axonals dirigides cap a l'intestí (3200x).

Discussió

Als darrers anys hom ha demostrat palesament la presència de nombrosos neuropèptids als platihelminths (Reuter et al, 1988). Alguns d'aquests neuropèptids havien estat detectats prèviament als vertebrats i la seva presència als invertebrats inferiors té evidents implicacions evolutives, especialment a nivell de conèixer quina és la seva funció original i com aquesta pot haver anat canviant en el decurs de l'evolució.

A la planària *Dugesia (G)tigrina* l'antisèrum contra FMRF-amida dona la marca més intensa i més estesa. FMRF-amida fou descoberta en el cor del cargol *Lymnaea*, on actua com a cardioexcitador (Price i Greenberg, 1977); avui dia ja s'ha caracteritzat tota una família de neuropèptids moduladors, on s'hi inclouria aquell (Keller et al, 1989) que semblen actuar com a moduladors, generalment induint la contracció muscular. La presència de FMRF-amida a gairebé tot el Sistema Nerviós de planària estaria d'acord amb aquesta funció malgrat no han estat fetes encara proves fisiològiques amb el neuropèptid sintètic. Acceptat aquest paper, la IR gastrodermal fóra la més difícil d'explicar malgrat podem suposar té algun paper modulador, relacionat potser amb moviments intestinals. Al parènquima, la connexió entre fibres musculars i neurones tenyides és evident. A la faringe, l'abundosa IR estaria d'acord amb la gran musculació d'aquest òrgan.

La IR obtinguda amb anti-EGF és clara però de baixa intensitat. Això pot deure's, en part, a una homologia parcial entre l'EGF humà i el producte tenyit en aquest cas. Malgrat aquest supòsit, la localització neural i l'efecte biològic d'EGF a planàries (veure Introducció) són clars; podem concloure doncs que el Sistema Nerviós de planària conté un neuropèptid força homòleg a l'EGF de vertebrats quant a estructura i funció. Els nivells aparentment baixos d'EGF-like, la seva proximitat als epitelis i el seu afavoriment de proliferació està d'acord amb aquesta idea. Actualment s'intenta detectar les cèl·lules sensibles a EGF per tal de caracteritzar-ne els receptors i estudiar el seu possible paper en la regeneració i en el recanvi cel·lular d'organismes intactes.

La IR contra SP està restringida gairebé de forma exclusiva al Sistema Nerviós Central, i la seva presència als plexos és excepcionalment baixa; això estaria d'acord amb l'intens efecte biològic detectat al nostre laboratori: la SP humana induïx mitosis a planària a nivells excepcionalment baixos: 0.1 nM (Saló i Baguñà, 1986). Malgrat que als vertebrats la SP té principalment una

funció de transmissor dels impulsos sensorials, relacionats sovint amb el dolor, a planàries la seva funció podria estar més relacionada amb l'estimulació de la proliferació cel·lular, fenòmen també descrit als mamífers i als amfibis (Nilsson et al, 1985; Globus et al, 1983).

El fet que la IR amb la Leu-Enk es detecti en cèl·lules i fibres relacionades amb la gastrodermis no contradiu dades prèvies de diferents grups (Reuter et al., 1988; Venturini et al., 1983), però són difícils de relacionar amb resultats previs (Baguñà, 1986) on la Leu-Enk inhibia la proliferació cel·lular induïda per taquiquinines. És evident doncs que són necessaris més estudis, tant fisiològics com immunocitoquímics per tal d'esbrinar el paper d'aquestes substàncies a planàries.

A planàries, la situació actual es pot resumir en el diagrama de la figura 5. Encara que determinades relacions són altament hipotètiques i especulatives, hi ha dos aspectes que mereixen considerar-se més a fons. En primer lloc, és evident que organismes simples com planàries presenten immunoreactivitat cap a anticossos contra una munió de neuropèptids i factors de creixement detectats i aïllats per primer cop a vertebrats superiors. Això duu a suposar la presència d'aquests factors a planàries, la qual cosa fa de gran interès l'estudiar-ne la distribució (tal com hem fet en aquest treball per a quatre d'ells) i els canvis d'expressió durant el creixement/decreixement i la regeneració emprant anticossos i sondes específiques.

En segon lloc, els neoblasts de planàries semblen clarament la cèl·lula diana de la majoria d'aquests neuropèptids i factors de creixement. D'ésser així, aquestes cèl·lules serien sistemes cel·lulars ideals per a estudiar, tant *in vivo* com *in vitro*, l'acció simple o combinada d'aquests factors. Endemés, la provada heterogeneïtat funcional dels neoblasts (Saló i Baguñà, 1984; Auladell i Baguñà, treball en curs) fa pensar que diferents subconjunts de neoblasts presentin combinatòries diferents de receptors característics de determinats estats de determinació al llarg dels llinatges. D'ací que sigui extremadament interessant el caracteritzar aquests pressumptes receptors i estudiar-ne, emprant sondes d'oligonucleòtids, els canvis en la seva expressió al llarg de la regeneració i del procés de creixement/decreixement.

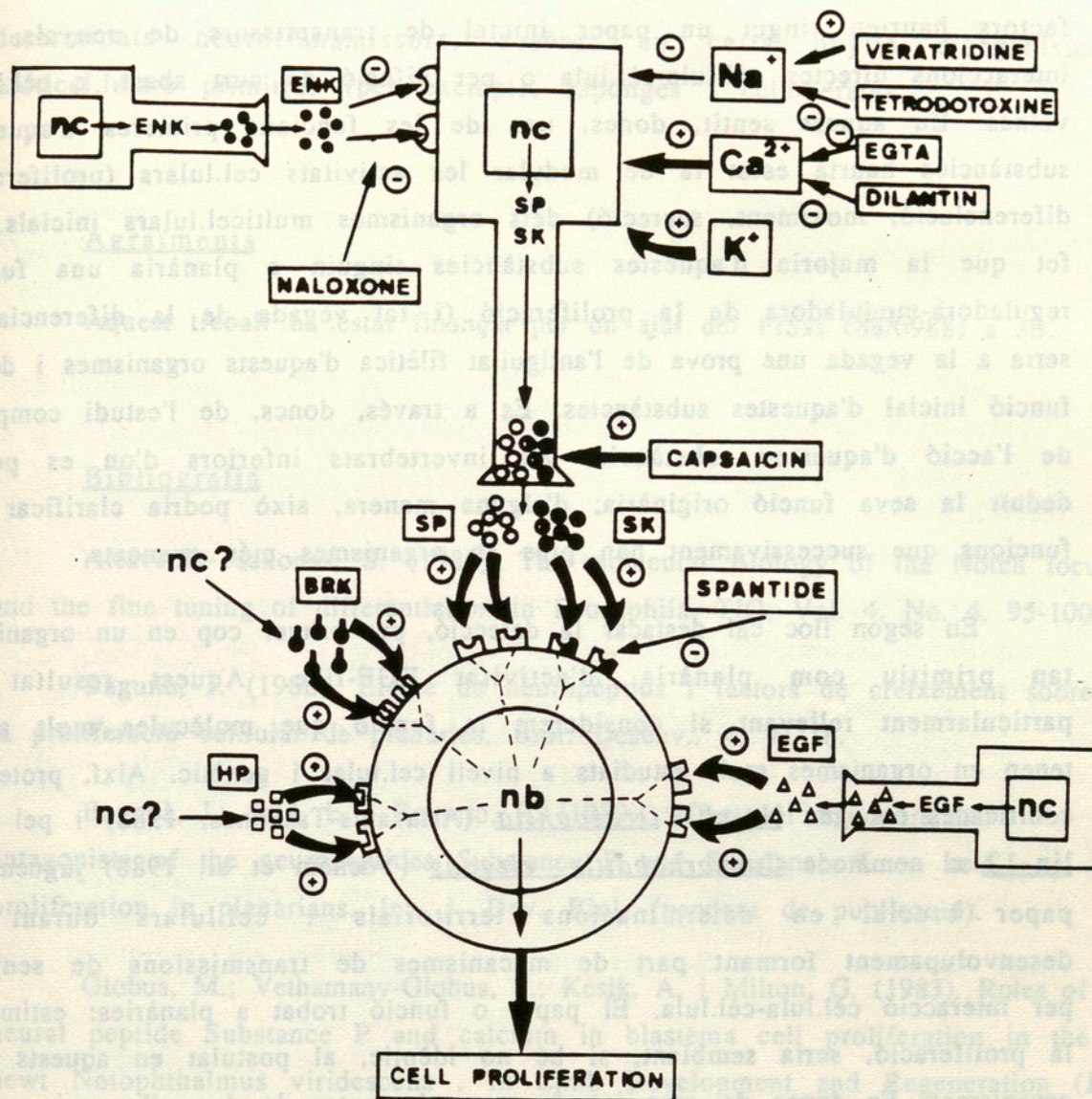


FIGURA 5: Model hipotètic del control de la proliferació a planària on es mostren les presumpptes interaccions entre neuropèptids, factors de creixement i altres substàncies amb les cèl·lules diana (neoblasts). (Baguña i col., 1989). nb: neoblast; nc: cèl·lula nerviosa; BRK; bradiquinina; EGF: factor de creixement epidèrmic; HP: pèptid de Hydra; SK: substància K; SP: substància P. Les sagetes fines representen els efectes inhibidors i les sagetes gruixudes representen els activadors.

En termes generals del conjunt d'aquests resultats podem destacar dos o tres punts d'interès, en especial en l'aspecte comparatiu. En primer lloc, la presència a planàries de nombrosos neuropèptids i factors de creixement detectats i caracteritzats inicialment a Vertebrats superiors confirma, un cop més, la funció que aquestes substàncies han tingut des de l'aparició i evolució inicial dels organismes multicel·lulars. Presentes algunes d'elles a unicel·lulars (per exemple insulina, endorfines...) hom considera que aquests

factors haurien tingut un paper inicial de transmissors de senyals, per interaccions directes cèl.lula-cèl.lula o per difusió de curt abast, a cèl.lules veïnes. En aquest sentit, doncs, una de les funcions primeres d'aquestes substàncies hauria estat la de modular les activitats cel.lulars (proliferació, diferenciació, moviment, secreció) dels organismes multicel.lulars inicials. El fet que la majoria d'aquestes substàncies tinguin a planària una funció reguladora-moduladora de la proliferació (i tal vegada de la diferenciació) seria a la vegada una prova de l'antiguitat filètica d'aquests organismes i de la funció inicial d'aquestes substàncies. És a través, doncs, de l'estudi comparat de l'acció d'aquestes substàncies als invertebrats inferiors d'on es podrà deduir la seva funció originària; d'alguna manera, això podria clarificar les funcions que successivament han pres en organismes més avançats.

En segon lloc cal destacar la detecció, per primer cop en un organisme tan primitiu com planària, d'activitat EGF-like. Aquest resultat és particularment rellevant si considerem la funció que molècules molt afins tenen en organismes molt estudiats a nivell cel.lular i genètic. Així, proteïnes codificades pel gen Notch a Drosophila (Artavanis-Tsakonas, 1988) i pel gen lin-12 al nemàtode Caenorhabditis elegans (Yochem et al, 1988) juguen un paper crucial en determinacions territorials i cel.lulars durant el desenvolupament formant part de mecanismes de transmissions de senyals per interacció cèl.lula-cèl.lula. El paper o funció trobat a planàries: estimular la proliferació, seria semblant, si bé no idèntic, al postulat en aquests dos organismes. És doncs de gran interès, ara, el tractar de desvetllar qui rep el senyal estimulador de l'EGF-like i veure com l'expressió d'aquest hipotètic receptor d'EGF varia (si és que ho fa) al llarg del procés de regeneració.

En darrer lloc, és interessant remarcar com les funcions que als organismes més evolucionats han quedat restringides a zones del sistema nerviós central o a determinats òrgans o glàndules, semblen distribuïdes a planàries d'una manera si més no difusa a tot el sistema nerviós. És en aquest sentit on pren amb més força la idea d'una funció endocrina inicial per al sistema nerviós, on neuropèptids i factors de creixement per ell produïts podrien tenir el paper de senyals de comunicació afectant a cèl.lules veïnes i modificant-ne, de manera variada, el seu comportament. Més tard, i al damunt d'aquesta funció primigènia, hauria aparegut la funció més coneguda de transmissió ràpida de senyals mitjançant neurotransmissors. És pertinent resaltar ací que si bé determinats neuropèptids i factors de creixement es troben ja a unicel.lulars o multicel.lulars molt primitius, no passa així per a

determinats neurotransmissors, absents en certs phylla d'organismes pluricel·lulars primitius (per exemple, esponges i celenterats).

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per un ajut del FISss (88/0988) a JB.

Bibliografia

Artavanis-Tsakonas, S. (1989). The molecular Biology of the Notch locus and the fine tuning of differentiation in *Drosophila*. TIG, Vol. 4, No. 4, 95-100.

Baguñà, J. (1986). Efecte de neuropèptids i factors de creixement sobre la proliferació cel·lular de planàries. Biol. Desenv., 4; 71-78.

Baguñà, J.; Saló, E. i Romero, R. (1989). ;effects of activators and antagonists of the neuropeptides Substance P and Substance K on cell proliferation in planarians. Int. J. Dev. Biol. (pendent de publicació).

Globus, M.; Vethamany-Globus, S.; Kesik, A. i Milton, G. (1983). Roles of neural peptide Substance P and calcium in blastema cell proliferation in the newt *Notophthalmus viridescens*. In Limb Development and Regeneration (J. F. Fallon and A. I. Caplan, eds.), Alan R. Liss, New York, pp. 513-524.

Keller, R.; Price, D. A.; Jaros, P. P.; Martin, R.; Rao, K. R. i Stangier, J. (1989). Invertebrate cardiovascular regulators. Col.loqui de l'XIth Int. Symp. Comp. Endocrinology.

Nilsson, J.; Von Euler, A. M. i Dalsgaard, C. J. (1985). Stimulation of connective tissue cell growth by Substance P and Substance K. Nature, 315; 61-63.

Price, D. A. i Greenberg, M. J. (1977). Structure of a molluscan cardioexcitatory neuropeptide. Science, Wash. 197; 670-671.

Reuter, M.; Karhi, T. i Schot, L. P. C. (1984). Immunocytochemical demonstration of peptidergic neurons in the central and peripheral nervous system of the flatworm *Microstomum lineare* with antiserum to FMRF-amide. Cell Tissue Res., 238; 431-436.

Reuter, M.; Lehtonen, M. i Wikgren, M. (1988). Immunocytochemical evidence for neuroactive substances in flatworms of different taxa - a comparison. Acta Zool., Vol 69, No 1; 29-37.

Saló, E. i Baguñà, J. (1985). El control de la proliferació a planàries: acció de neuropèptids mitògens (Substància P) i factors dependents de densitat cel.lular. Biol. Desenv., 3; 1-18.

Saló, E. i Baguñà, J. (1986). Stimulation of cellular proliferation and differentiation in the intact and regenerating planarian *Dugesia(G)tigrina* by the neuropeptide Substance P. Journ. Exp. Zool., 237; 129-135.

Venturini, G.; Carolei, A.; Palladini, G.; Margotta, V. i Lauro, M. G. (1983). Radioimmunological and immunocytochemical demonstration of Met-enkephalin in planaria. Comp. Biochem. Physiol., Vol 74C No 1; 23-25.

Yochem, J.; Weston, K. i Greenwald, I. (1988). The *Caenorhabditis elegans* lin-12 gene encodes a transmembrane protein with overall similarity to *Drosophila* Notch. Nature, 335; 547-550.