

ESTUDI ESTRUCTURAL DEL PROCÉS DE REGENERACIÓ DE FERIDES EN *Hirudo medicinalis*

G. Huguet i Blanco i M. Molinas de Ferrer

Departament de Biologia Cel·lular i de Fisiologia. Estudi General de Girona (UAB).
Hospital, 6. 17071-Girona.

RESUM

La regeneració de ferides en *Hirudo medicinalis* comporta un conjunt de processos: contractura muscular, «coagulació» del moc i líquid hemocelòmic, formació d'un pseudoblastema, epitelització i formació d'un teixit cicatricial. El pseudoblastema es forma per migració de cèl·lules connectives. Aquestes cèl·lules es troben en el teixit connectiu formant agrupacions compactes i voltades parcialment per perllongacions citoplasmàtiques de cèl·lules pigmentades. L'epitelització es fa per elongació de les cèl·lules epitelials contigües a la ferida. El pseudoblastema dóna lloc a un teixit cicatricial compost per teixit connectiu molt poc diferenciat.

RESUMEN

La regeneración de las heridas en *Hirudo medicinalis* conlleva un conjunto de procesos: contracción muscular, «coagulación» del moco y líquido hemocelómico, formación de una pseudoblastema, epitelización y formación de un tejido cicatricial. El pseudoblastema se forma por migración de células conectivas. Estas células se encuentran en el tejido conectivo formando agrupaciones compactas envueltas parcialmente por prolongaciones de células pigmentadas. La epitelización se da por elongación de las células epiteliales contiguas a la herida. El pseudoblastema da lugar a un tejido cicatricial compuesto por tejido conectivo poco diferenciado.

ABSTRACT

The paper describes the wound healing of the body wall in *Hirudo medicinalis* (Linnaeus 1758) (Hirudinea, Hirudinidae). Mechanical trauma originate a serie of changes: muscular contraction to close the wound, mucus and haemocelomic fluid «coagulation», aggregation of amoeboid cells to form a pseudoblastema, epithelization and complete wound healing. Pseudoblastema is constituted amoeboid cells wich normally lie in the connective tissue in groups of ten to twenty cells partially surrounded by thin processes of pigmented cells. Epithelization occurs by elongation of epidermal cells of the edges of the wound. Pseudoblastema becomes a scar tissue constituted by poorly differentiate connective tissue without pigmentary cells. The scar epidermis consists in a simple epithelium which have recover the original columnar shape of the cells. No mucous glands develop in the regenerated epithelium.

Key words: epithelium, Hirudinidae, *Hirudo medicinalis*, pseudoblastema, wound healing.

INTRODUCCIÓ

La reparació de ferides és un tema d'interés renovat en biologia comparada. Una ferida activa un conjunt d'accions hemoestàtiques per tal d'evitar la pèrdua de fluids, restaurar les barreres d'aïllament amb l'exterior i eliminar restes de teixits i substàncies estranyes o agents infecciosos. La contractura muscular, l'agregació de amebòcits i diversos mecanismes de coagulació són mitjans de defensa emprats per tota l'escala animal.

L'estudi dels mecanismes de regeneració de ferides dels anèl·lids ha estat objecte de nombrosos estudis en oligoquets (Burke, 1974 a,b,c). Per contra, el grup dels hirudínids ha rebut poca atenció exceptuant els treballs sobre cicatrització d'amputacions de Cornec et al. (1980, 1984), de Le Gore & Sparks (1971, 1973) sobre reparació de ferides i cremades i de Muller & Nicholls (1981) sobre regeneració i plasticitat del sistema nerviós.

Aquests animals són uns models experimentals relativament simples, poden servir de guia com a mecanismes de reparació acentrals i poden presentar-ne de diferents dels vertebrats.

Els hirudínids responen a un trauma mecànic amb una sèrie de mecanismes cel·lulars de defensa a curt i llarg termini. En primer lloc es produeix una contracció de la musculatura, posteriorment, nombroses cèl·lules s'agreguen al lloc de la ferida per formar un pseudoblastema. Seguidament es forma un nou epiteli per migració de les cèl·lules epitelials dels marges de la ferida. El procés finalitza amb un teixit cicatricial compost principalment per teixit connectiu poc diferenciat (Le Gore & Sparks, 1971).

Al teixit cel·lular que es forma al nivell de la ferida l'hem anomenat pseudoblastema, tal com ho fan altres autors (Sawyer, 1986), a causa de la seva incapacitat d'originar teixits organitzats, a diferència dels veritables blastemes que trobem en altres anèl·lids, poliquets i oligoquets. Les sangoneres mantenen la capacitat de regenerar teixits organitzats durant l'estadi larvari (Cornec, 1980), però a l'estat adult aquesta capacitat queda limitada a certs casos com la regeneració de la ventosa anal (Cornec, 1984) i la recuperació de la ferida produïda per la implantació de l'espermatòfor en el procés de fecundació. (Sawyer, 1986). Muller & Nicholls (1981) han demostrat que en la regeneració de les ferides s'inclou el sistema nerviós, tot restablint-se les connexions nervioses lesionades.

Nosaltres estem interessats en l'estudi de les transformacions cel·lulars del pseudoblastema i el procés de reepitelització. En aquest article es fa una descripció a nivell estructural de la regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis* L. (Hirudinidae, Anelidae) amb tècniques de microscòpia òptica i electrònica de rastreig.

MATERIAL I MÈTODES

Hem utilitzat exemplars d'*Hirudo medicinalis* provinents dels estanys de l'Alt Empordà (Girona).

Després de l'anestèsia prèvia amb alcohol al 8 % durant 15', s'han realitzat ferides longitudinals amb un bisturí a la part dorso-lateral dels anells 65 a 85.

La recuperació dels animals s'ha fet en una solució de clorina (p-toluè sulfocloramida de sodi) per evitar la infecció de les ferides.

S'han sacrificat a diferents intervals de temps: 0h, 1h, 4h, 8h, 12h, 24h, 48h, 7 dies, 9 dies, 14 dies i 2 mesos.

Per a la microscòpia òptica les mostres es fixen en formol al 4 % en tampó fosfat pH 7,2 i s'inclouen en glicol metacrilat (Bonet & Molinas, 1983).

Per a la observació rutinària dels talls s'ha utilitzat la coloració hematoxilina-eritrosina (Bonet & Huguet, 1985) i la impregnació argèntica, descrita pels mateixos autors, per a l'observació de les fibres connectives.

Per a la microscòpia electrònica de rastreig les mostres fixades en formol al 4 % en tampó fosfat pH 7,2 i, després d'una prèvia, deshidratació en sèrie etílica prèvia, es dessequen sota punt crític utilitzant acetat d'amil com a líquid de transferència i anhídrid carbònic com a líquid de transició. Després del seu recobriment amb una capa d'or-paral·ladi s'observen amb un microscopi Cambridge Steroscan 120 del Servei de Microscòpia Electrònica de la UB.

OBSERVACIONS

Histologia normal

Per a l'estudi del procés de regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis* es fa necessària una breu descripció histològica de la paret corporal. Externament *H. medicinalis* presenta la segmentació característica dels anèl·lids. Els anells presenten uns petits solcs visibles en microscòpia electrònica de rastreig (fig. 1a). La paret corporal és constituïda pel tegument format per la cutícula, epidermis i dermis, les capes musculars, que, d'exterior a interior, són: circular, diagonal i longitudinal, i estan travessades per feixos musculars dorso ventrals, i el peritoneu parietal (fig. 2.2).

La cutícula cobreix l'epiteli format per una capa monostratificada de cèl·lules epitelials, entre les quals trobem dos tipus de cèl·lules glandulars mucoses: les piriforms i les tubulars. L'epiteli es caracteritza per una gran cohesió, tan interna com amb la cutícula i la dermis. Les cèl·lules epitelials són columnars, amb uns 20 µm de diàmetre, i estan unides entre elles únicament per la part apical. El nucli, oval, està situat en la porció basal (fig. 2.3). Un estudi més exhaustiu d'aquest epiteli ha estat publicat per les autores en un article referent a les unions cel·lulars de l'epidermis (Huguet & Molinas, 1987). La dermis està formada per un teixit ric en fibres de tipus reticular, amb cèl·lules connectives, els cossos cel·lulars de les cèl·lules pigmentàries i capil·lars subepidèrmics. Les capes musculars estan constituïdes per fibres, caracteritzades per tenir el material contràctil distribuït perifèricament, amb el nucli i el citoplasma centrals. La capa muscular circular està formada per tres o quatre fei-

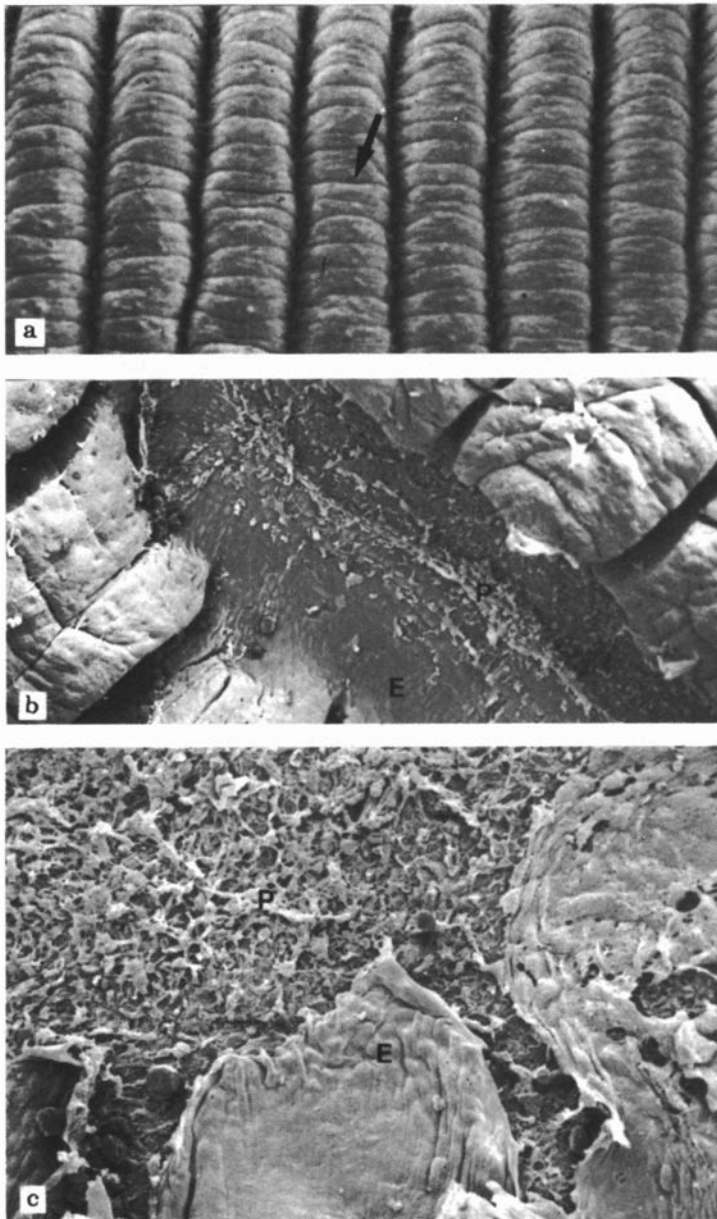


Figura 1. Micrografies al MES de la regeneració d'una ferida a la paret corporal d'una sangonera. a) Àrea control on s'aprecia la segmentació de la sangonera i els solcs transversals (↔) (X...). b) Aspecte de la ferida a les 12 hores. Es pot observar com l'epiteli (e) va recobrint el pseudoblastema (p) (X...). c) Detall del procés d'epitelització on es veuen les cèl·lules epitelials (e) que s'allarguen avançant per damunt de les cèl·lules que formen el pseudoblastema (p) (X...).

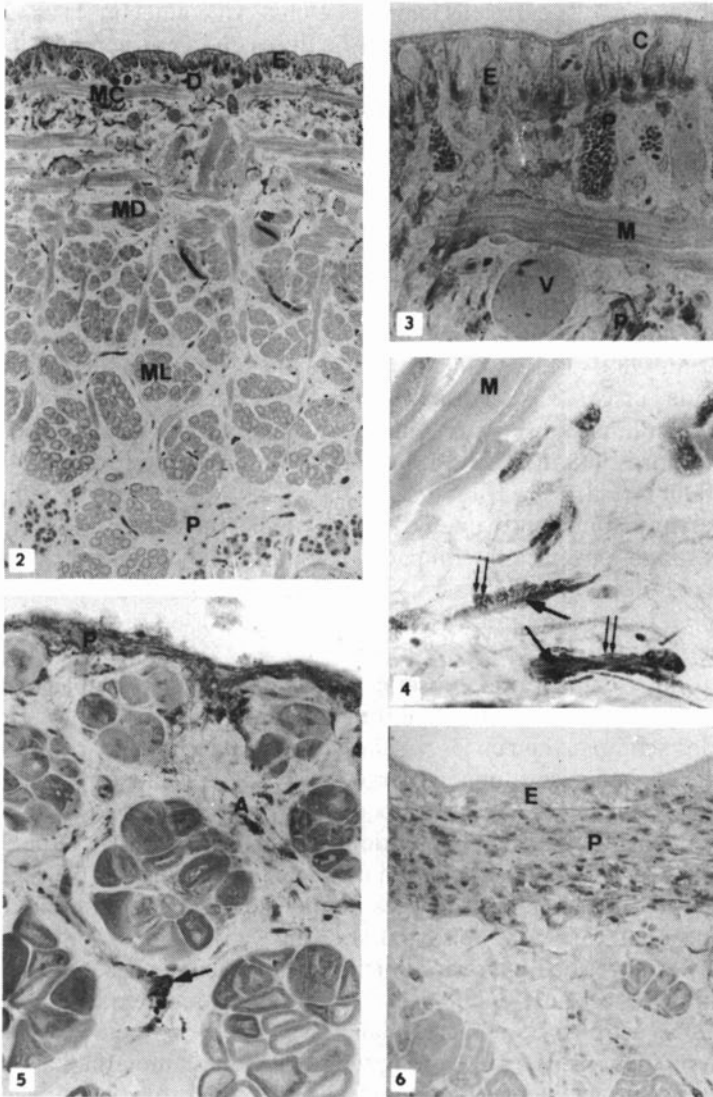


Figura 2. Paret del cos d'*Hirudo medicinalis*. (e) epidermis, (d) dermis, (mc) musculatura circular, (md) musculatura diagonal, (ml) musculatura longitudinal, (p) peritoneu parietal (X...). 3) Epidermis. (e) cèl·lula epitelial, (g) glàndula piriforme, (v) vas hemocelòmic, (c) capil·lar hemocelòmic, (cr) cromatòfor i (m) musculatura circular (X...). 4) Teixit connectiu on es poden observar agrupacions d'amebòcits envoltades de filopdis de cèl·lules vasofibroses (\rightleftharpoons), (\rightarrow) amebòcits, (m) fibres musculars (X...). 5) Ferida de 4 hores en què s'està formant el pseudoblastema (p) per addició de cèl·lules amebocítiques (a) algunes de les quals encara es troben associades a cèl·lules vasofibroses (\rightarrow) (X...) 6) Ferida de 24 hores totalment epitelitzada. (e) Nou epitelí que recobreix el pseudoblastema (p) (X...).

xos de fibres separats entre ells i immersos en teixit connectiu, la capa muscular obliqua està formada per dos feixos de fibres que s'entrecreuen entre ells i la capa muscular longitudinal està formada per diversos feixos de fibres agrupats dins seu. El peritoneu perietal està format per teixit connectiu ric en fibres col·làgenes.

Reparació de ferides

Les ferides produïdes a la paret corporal d'*Hirudo medicinalis* afecten el tegument i les tres capes musculars, arriben, en ocasions, fins el teixit connectiu del peritoneu.

En primer lloc s'observa una contracció muscular en els segments afectats per la ferida i un cert espessiment o «coagulació» del moc produït per l'animal. Als quinze minuts s'observa una migració d'amebòcits cap a la ferida, que a les quatre hores ja han constituït un pseudoblastema que recobreix pràcticament tota la ferida.

Aquests amebòcits provenen del teixit connectiu proper a la ferida on es troben formant agrupacions compactes, de l'ordre de deu a vint cèl·lules, envoltades per filopodis de cèl·lules pigmentades (fig. 2.4). Principalment es troben al teixit connectiu intermuscular i peritoneu parietal, encara que també se'n veuen a la dermis.

En produir-se una ferida s'observa una migració de les agrupacions d'amebòcits cap a la zona afectada. Aquestes se separen de les cèl·lules pigmentàries que les acompanyen i en les rodalies de la ferida les agrupacions es disgreguen i els amebòcits se situen al marge dels teixits afectats formant una capa de cèl·lules a tall de barrera que, a poc a poc, va engrossint-se per addició de nous amebòcits fins a formar el pseudoblastema (Fig. 2.5). Al voltant de la ferida, en capil·lars que han quedat en contacte amb aquesta, s'observen agrupacions de cèl·lules hemocelòmiques i també se'n poden veure en els teixits immediats a la ferida, fora dels capil·lars (Fig. 2.5).

A les vuit hores de l'operació s'inicia l'epitelització de la zona afectada. Es fa a partir de les cèl·lules epitelials no malmes que han quedat als marges de la ferida. Les cèl·lules epitelials s'aplanen, i passen de tenir 20 µm de longitud per 5 µm de diàmetre a 5 µm de longitud per 25 µm d'amplària, i avancen per recobrir el pseudoblastema. L'epitelització es completa al voltant de les vint-i-quatre hores (Fig. 1b i c, i Fig. 2.6).

Gradualment les cèl·lules epitelials recobren la seva forma columnar tot assolint, al cap de sis dies, les seves dimensions originals (Fig. 3.7).

Durant tot aquest procés d'epitelització no s'observen figures mitòtiques.

A partir dels sis dies les cèl·lules que formen el pseudoblastema inicien una retracció cap a l'interior de l'animal a través del teixit connectiu (Fig. 3.8). Al cap de dues setmanes aquestes cèl·lules es veuen força disgregades i al voltant del pseudoblastema es veuen cèl·lules amebocítiques de citoplasma lleugerament més basòfil que les que formen el pseudoblastema (Fig. 3.9).

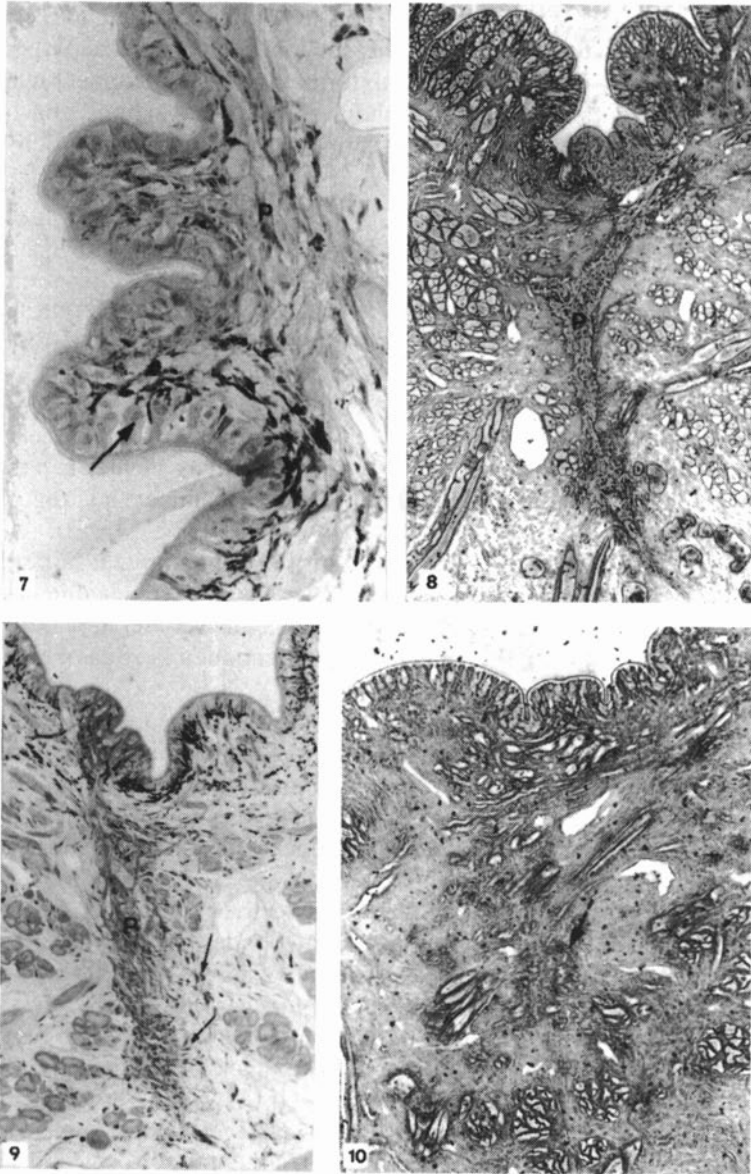


Figura 3. 7) Ferida d'una setmana on l'epiteli ja ha recuperat la seva forma columnar original (↔), (p) pseudoblastema (X...). 8) Impregnació argèntica d'una ferida d'una setmana on s'observa la retracció del pseudoblastema (p) cap a l'interior (X...). 9) Pseudoblastema a les dues setmanes. Es pot observar com els amebòcits (↔) es van separant del pseudoblastema (p). (X...). 10) Impregnació argèntica d'una ferida al cap de dos mesos on el teixit connectiu corresponent al lloc on hi havia hagut el pseudoblastema s'impregna diferencialment.

Al cap de dos mesos s'observa en la zona del tall una cicatriu més clara. La microscòpia òptica ens mostra que el pseudoblastema ha desaparegut i ha quedat substituït per teixit cicatricial format per teixit connectiu mancat de cèl·lules pigmentàries i cèl·lules glandulars mucoses. En impregnacions argentiques la diferència amb el teixit connectiu no cicatricial és ben palesa (Fig. 3.10).

DISCUSSIÓ

El procés de regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis* no difereix substancialment del patró típic que s'observa al llarg de l'escala animal: contracció muscular al voltant de la ferida, coagulació, acumulació d'amebòcits, epitelització i regeneració de la zona afectada.

Aquest conjunt de processos que intervenen en la cicatrització de la ferida es poden dividir en mecanismes a curt termini, destinats a evitar la pèrdua de fluids corporals, i en mecanismes a llarg termini, encaminats a la regeneració de la ferida.

Els mecanismes que intervenen en el procés de minimitzar la pèrdua de fluids corporals són la contracció muscular de la zona afectada que hi contribueix tancant els vasos que hi afluïxen, la «coagulació» del moc i del líquid hemocelòmic i l'acumulació d'amebòcits que tamponen la zona oberta per la ferida.

La «coagulació» a què ens referim no és tan complexa ni tan efectiva com la que es dona als nivells evolutius més alts de l'escala animal. En definitiva, però, tendeix a produir el mateix efecte: evitar la pèrdua de fluids corporals.

La regeneració de la ferida és duta a terme pels amebòcits que formen el pseudoblastema i les cèl·lules epitelials contigües a la zona afectada, que s'encarreguen de l'epitelització.

Els amebòcits provenen de cèl·lules connectives que resten en estat de repòs i en forma d'agrupacions compactes envoltades per cèl·lules pigmentades. Aquestes cèl·lules pigmentades associades a les cèl·lules en repòs són del tipus que Bradbury (1959) descriu com a cèl·lula vasofibrosa. El teixit vasofibrós està format per una xarxa de cèl·lules amb el citoplasma ple de grànuls pigmentaris que contenen serotonina. La seva funció es creu que és la de emmagatzemar molècules que no es poden excretar (Sawyer, 1986). Se sabia que la cèl·lula vasofibrosa envoltava parcialment un fibroblast, al qual no se li adjudicava cap funció (Sawyer, 1986). Nosaltres hem pogut constatar aquesta associació a *Hirudo medicinalis*, amb la particularitat que es tracta d'un cúmul de cèl·lules connectives i no d'un únic fibroblast. A més hem pogut relacionar aquestes cèl·lules amb els mecanismes de regeneració de ferides.

Les cèl·lules amebocítiques s'activen en produir-se una ferida i s'hi orienten per formar un tap cel·lular, el pseudoblastema, que serveix de suport a les cèl·lules epitelials i és capaç d'absorbir els teixits malmesos i dona lloc a un teixit connectiu cicatricial. Una vegada s'ha completat el procés, aquestes

cèl·lules amebocítiques retornen al teixit connectiu amb un augment de la basòfilia del seu citoplasma que podria ser degut a restes d'activitat fagocítica.

El fet de no observar figures mitòtiques durant el procés d'epitelització ja ens fa pensar que aquesta no és causada principalment per una proliferació cel·lular, sino que prové de cèl·lules ja existents.

La microscòpia electrònica de rastreig és una tècnica adequada per estudiar l'epitelització de la ferida i ens permet observar el procés d'elongació que sofreixen les cèl·lules epitelials dels marges de la ferida en direcció al centre del pseudoblastema.

En els primers estadis de l'epitelització aquestes cèl·lules mantenen la forma aplanada, però progressivament es van compactant i retornen a la seva forma original columnar. Aquest procés podria ser causat pel fet que la retracció del pseudoblastema ajunta els marges de la ferida, encara que no descartem que paral·lelament hi hagi una certa proliferació cel·lular que col·labori en el procés, i que per la poca abundància de divisions mitòtiques aquestes no hagin estat observades.

El resultat final és la formació d'un teixit cicatricial molt poc diferenciat que persisteix al cap d'uns quants mesos.

Aquesta escassa capacitat de regenerar teixits organitzats per part de la sangonera contrasta amb la que es dona en altres anèl·lids, poliquets i oligoquets, on la regeneració dels diferents teixits és pràcticament total.

Bibliografia

- BONET, S., & HUGUET, G. (1985). Tècniques habituals de coloracions semifines de material inclòs en glicol metacrilat (G.M.A.). *Scientia gerundensis*, 10: 23-32.
- BONET, S., & MOLINAS, M. (1983). Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a la histologia. *Ann. Sec. Cièn. Col. Univ. Girona (UAB)*, 9: 21-29.
- BRADBURY, S. (1959). The botryoidal and vaso-fibrous tissue of the leech *Hirudo medicinalis*. *Quart. J. micr. Sci.*, 99: 143-148.
- BURKE, H.C. (1974). Wound healing in *Eisenia foetida* (oligochaeta). I Histology and H³-thymidine radioautography of the epidermis. *Exp. Zool.*, 188: 49-63.
- BURKE, H.C. (1974). Wound healing in *Eisenia foetida* (oligochaeta). II A fine structural study of the role of the epidermis. *Cell. Tiss. Res.*, 154:61-83.
- BURKE, H.C. (1974). Wound healing in *Eisenia foetida* (oligochaeta). III A fine structural study of the role of the non-epidermal tissues. *Cell. Tiss. Res.*, 154:83-102.
- CORNEC, J.P. (1980). Régulation et régénération après amputation de la région postérieure de jeunes Hirudinees de l'espèce *Erpobdella octoculata*. *Arch. Zool. exp. gén.*, 121: 173-181.
- CORNEC, J.P. (1984). Modifications ultrastructurales après amputation dans le territoire de régénération postérieure de l'hirudine Rhynchobdelle *Helobdella stagnalis*. *rcgives d'Anatomie microscopique*, 73, núm. 4: 269-289.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1987). Especialitzacions per a l'unio cel·lular del tegument d'*Hirudo medicinalis* (Hirudinea). *Scientia gerundensis*, 13 (en premsa).
- LE GORE, R.S., & SPARKS, A.L. (1971). Repair of body incision in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *Journal of invertebrate pathology*, 18: 40-45.

- LE GORE, R.S., & SPARKS, A.L. (1973). Repair of body wall burns in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *Journal of invertebrate pathology*; 22: 289-299.
- MULLER, K.J., & NICHOLLS, J.G. (1981). Regeneration and Plasticity. K.J. Muller, J. G. Nicholls and G.S. Stent (ed.). *Neurobiology of the leech*. Cold Spring Harbor Laboratory. New York: 197-226.
- SAWYER, R.T. (1986). *Leech biology and behaviour*. Clarendon Press. Oxford.