

El procés de cicatrització durant la regeneració a planàries: seqüència temporal i possible paper en la determinació del patró.

M. Ribas i J. Baguñà.

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

Abstract

The process and role of wound healing in planarian regeneration.

Wound closure in planarians was examined by light and scanning electron microscopy. A wound epidermis, consisting of a thin (1-2 μ m), sheet-like layer of cells, rapidly forms from undamaged epidermal cells at the wound margin and covers the wound in less than 1 hour. This period occurs much earlier than most wound closure times published so far. In later stages, newly formed epidermal cells coming from the mesenchyme become inserted among the cells of the wound epidermis; thus, cells of both the blastema and of the wound epidermis contribute to the new epidermis.

Despite a careful search no evidence has been found to back the hypothesis of differential epidermal covering in anterior and posterior regeneration as suggested by Chandebois (1980) and Saló (1984).

The implications of these results and new approaches to study the hypothetical role of epidermal covering in pattern formation are also discussed.

Introducció

La cicatrització, o cobriment epidèrmic, és, a nivell estructural, un dels processos inicials, sinó el primer, de la regeneració.

Quin és però el paper real de la cicatrització en el procés de regeneració? És solament necessària per aïllar el regenerant del medi ambient i permetre el retorn de les constants vitals prèvies a l'amputació, o bé té un paper més actiu interactuant amb els teixits interns que recobreix i actuant com a agent actiu, en la formació del patró d'estructures i en el manteniment de la polaritat?

Hores d'ara, i en sentit global, no hi ha consens clar sobre el paper real de l'epidermis. Per a certs autors (Carlson, 1975, 1982) té un paper neutral, inespecífic; per a d'altres (Maden, 1977; Stocum, 1978, 1984), l'epidermis té un paper actiu en el manteniment de la polaritat i en la reformació del patró.

Segons models proposats per aquests darrers autors, l'epidermis presentaria un valor posicional únic, estable i límit dins del continuum creixent (o decreixent) de valors posicionals proximo-distals (o antero-posteriors) propis dels teixits interns (mesènquima). En interactuar ambdós

teixits (interacció epiteli-mesènquima) durant la cicatrització, i d'acord al principi general de intercalació dels valors posicionals intermitjos, s'assolirien, en el mesènquima de les regions sota de la ferida, els valors intermitjos que restaurarien el patró perdut d'estructures (veure Bauguñà i col, 1985, per a una discussió general dels models).

A planàries, la cicatrització ha estat malauradament poc estudiada. D'ací que no hi hagi encara consens sobre la seqüència temporal del procés ni sobre la seva importància real. Les xifres de cicatrització total obtingudes emprant microscòpia òptica i electrònica van des de les 6 hores fins als 2-3 dies (Morita i Best, 1969,1974; Pascolini i col, 1984; Pedersen, 1976; Spiegelman i Dudley, 1974). Per contra, Chandebois (1980), i més tard Saló (1984), troben que la cicatrització és un procés molt ràpid succeint entre 15 i 45 minuts després de l'amputació. Segons aquests autors, la contracció de la musculatura circular i longitudinal a l'entor de la ferida permet que l'epiteli pugui recobrir, ràpidament, per estirament de les seves cèl.lules, la zona, ara força reduïda, de la ferida.

L'epiteli passa doncs d'una estructura columnar a una d'escamosa. Més tard les cèl.lules del blastema en procés de diferenciació cap a cèl.lules epidermiques, s'anirien intercalant entre les cèl.lules de l'epiteli de cicatrització fins que aquest assoleix als 4-5 dies una estructura columnar gaire bé normal. Aquest procés, rèplica del procés normal de recanvi epidermic que s'acut en un organisme intacte (Skaer, 1965), ha estat criticat per Chandebois (1985) en considerar que el recanvi es faria mitjançant cèl.lules-soca presents a la mateixa epidermis que per proliferació i diferenciació accelerada transformarien l'epiteli escamós de recobriment en epiteli columnar.

Més incert encare és el possible paper, actiu o passiu, que l'epidermis pot jugar en el procés de restauració del patró d'estructures. Donat que tècnicament no ha estat possible encara separar l'epiteli de la resta de la planària, ni fer organismes doble dorsal o doble ventral, els únics experiments sobre el particular han estat els de sotmetre als organismes tallats a solucions hipertòniques que impedeixen la cicatrització. En aquest cas, s'observa manca de regeneració (veure Chandebois, 1976, per a informació general), si bé no és possible saber si aquest efecte es deu a la manca d'epiteli de cicatrització (i d'ací, de interaccions cel.lulars) o als efectes deleteris de la hipertonia o de l'exposició de la ferida a l'ambient extern.

L'única dada existent sobre un possible paper actiu de l'epidermis a la regeneració és el suggeriment de Chandebois (1979, 1980) que la cicatrització a planàries és diferencial; és a dir, a la regeneració anterior (cefàlica) és l'epidermis dorsal la que recobreix la ferida mentre que a la regeneració posterior (caudal) és l'epidermis ventral la que recobreix i interactua amb el mesènquima. Aquest suggeriment pot explicar endemés el manteniment de la polaritat, que assignant a l'epidermis dorsal i ventral els valors posicionals màxims i mínims, la interacció respectiva amb el mesènquima donaria, per intercalació, els valors posicionals que manquen (Figura 1)

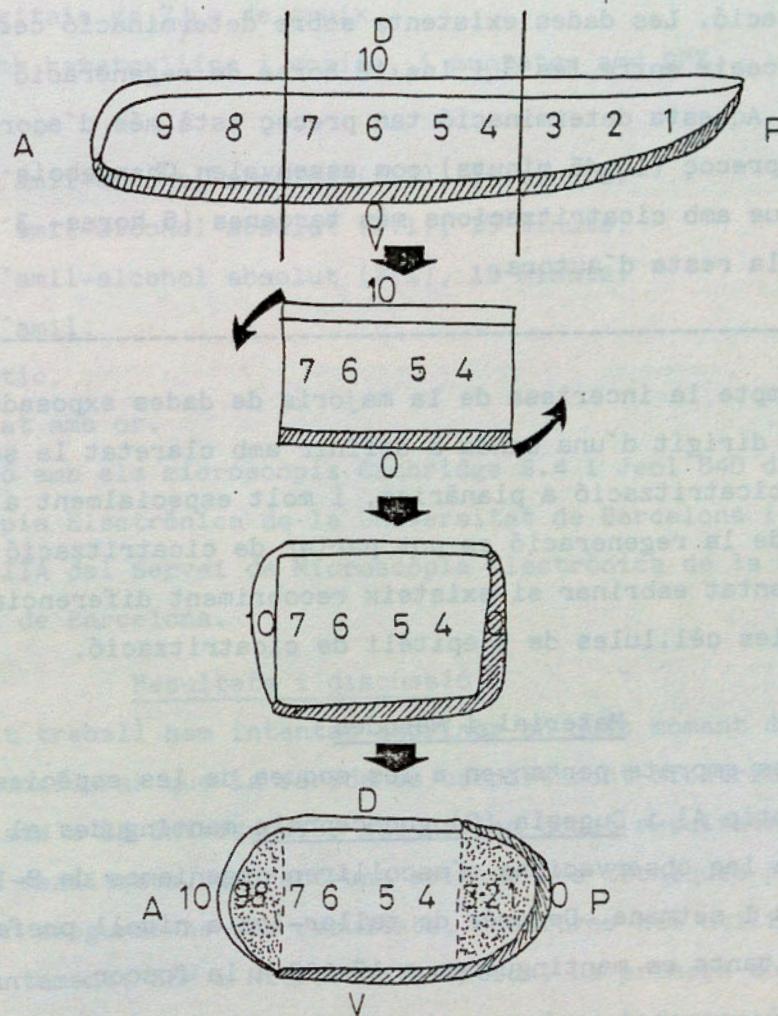


Figura 1.- Hipotètic paper del recobriment epidèrmic diferencial en el manteniment de la polaritat i en la formació del patró (adaptat de Saló 1984). A: anterior, P: posterior, D: dorsal, V: ventral; 10,9,8,...0: valors posicionals antero-posteriors.

La hipòtesi de Chandebois es basava en observacions de microscòpia òptica i electrònica; mancava però un estudi que demostrés la certesa del recubriments diferencial. Una aproximació en aquest sentit fou realitzada per Saló (1984) emprant colorants vitals (sulfat de blau del Nil) aplicats diferencialment a l'epidermis dorsal o ventral. Els resultats, preliminars encara, semblaven recolzar la hipòtesi de Chandebois.

Un darrer aspecte d'interès sobre el paper de la cicatrització en la reformació del patró d'estructures és que si l'epidermis té un paper important en la determinació de la polaritat i del patró, hauriem d'esperar que el període de determinació del patró fos posterior al període de cicatrització. Les dades existents sobre determinació cefàlica indiquen que succeeix entre les 3 i les 12 hores de regeneració (Saló i Bagnà, 1984). Aquesta determinació tan precoç està més d'acord amb una cicatrització precoç (15-45 minuts) com assenyalen Chandebois (1980) i Saló (1984), que amb cicatritzacions més tardanes (6 hores- 3 dies) com suggereixen la resta d'autors.

Tenint en compte la incertesa de la majoria de dades exposades, el nostre treball s'ha dirigit d'una banda a definir amb claretat la seqüència temporal de la cicatrització a planàries, i molt especialment a definir en quin moment de la regeneració es pot parlar de cicatrització completa. A més, hem intentat esbrinar si existeix recobriment diferencial i quin és l'origen de les cèl.lules de l'epiteli de cicatrització.

Material i Mètodes

Els organismes emprats pertanyen a les soques de les espècies Dugesia (S) polychroa (biotip A) i Dugesia (D) gonocephala mantingudes al nostre laboratori. Per a les observacions s'escolliren organismes de 8-10 mm de llargada dejunats 1 setmana. Després de tallar-los a nivell prefaringe les dues regions resultants es mantingueren a 17 °C a la foscor.

Als 10, 20 i 30 minuts, i 1,2,4,6 i 12 hores de regeneració, alguns exemplars es fixen curosament per observar-los seguidament en microscòpia òptica i microscòpia electrònica de "scanning". El procés de fixació ha de realitzar-se amb cura extremada ja que la primor de l'epiteli de cicatrització ($\approx 1-2 \mu\text{m}$) i la seva gran fragilitat el fa molt propens al trencament i, conseqüentment, a considerar com a no cicatritzat un organisme que ja ho era. Per aconseguir-ho, els organismes es col·loquen moments abans de la

fixació en un porta sobre gel per tal de reduir al màxim els moviments. La fixació es realitzà en glutaraldehyd (Merck) al 4% en tampó cacodilat (Sigma) 0.1M (pH=7.4) durant 2 hores a 4°C. Després de rentar tres cops amb el tampó, es deshidratà en una sèrie d'alcohols a 4°C fins arribar a alcohol absolut. A partir d'ací, es processaren diferentment segons es volgués fer microscòpia òptica (MO) o microscòpia electrònica de "scanning" (SEM).

a) MO.

- 2 hores en metilbenzoat.
- Inclusió en parafina (Merk; punt de fusió 51-53°C)
- Talls sagitals de 7 μ m de gruix.
- Tinció amb hematoxilina i eosina, i muntatge amd DPX.

b) SEM.

- Acetat d'amil-alcohol absolut (1:3), 15 minuts.
- Acetat d'amil-alcohol absolut (1:1), 15 minuts.
- Acetat d'amil-alcohol absolut (3:1), 15 minuts.
- Acetat d'amil.
- Punt crític.
- Metalitzat amb or.
- Observació amb els microscopis Cambridge S.4 i Jeol 840 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona i el microscopi ISI IIIA del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Resultats i discussió

En el present treball hem intentat esbrinar en quin moment de la regeneració es pot considerar que la ferida és completament cicatritzada. Els treballs esmentats a la Introducció, que havien donat resultats tan diferents, havien estat realitzats, emprant una sola de les tècniques possibles d'observació. Per assegurar-ne els resultats, nosaltres hem utilitzat dues tècniques conjuntament: SEM i Microscòpia òptica. La primera dona una visió de conjunt, externa, de la ferida; la segona ens dona informació de l'estat de l'epiteli de cicatrització en un punt concret i de la seva relació amb els teixits interns.

Els resultats obtinguts demostren clarament que, tal com indicaven Chandebois (1980) i Saló (1984), la cicatrització es dona dins de la primera hora de regeneració. A la Figura 2 s'observa una cicatrització completa als 30 minuts. La ferida està altament contreta, i grups cel.lulars d'ambdues

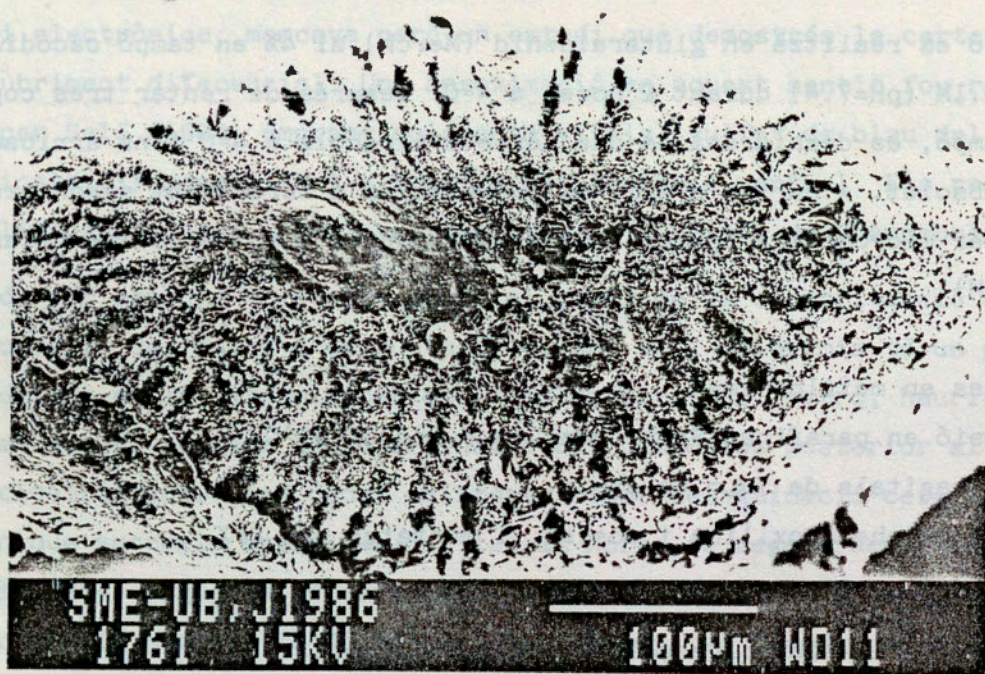


Figura 2.- Cicatrització caudal a Dugesia (D) gonocephala als 30 minuts de regeneració.

epidermis s'han estirat considerablement per recubrir-la. En períodes posteriors, i en alguns exemplars, pot observar-se però petites zones, més o menys arrodonides, no cicatritzades (Figura 3). Això podria ésser degut a un trencament puntual de l'epiteli de cicatrització durant la fixació o a una cicatrització incompleta puntual. El fet que la zona no cicatritzada aparegui a gran augment molt ben delimitada per l'epiteli (Figura 4) fa pensar més aviat en la segona alternativa. Un fet addicional que també sembla indicar-ho així és l'observació a les 12 hores de regeneració d'orificis que han estat cicatritzats a posteriori (Figures 5 i 6).

Aquest darrer fet connecta amb el problema de l'origen de les cèl.lules de l'epiteli de cicatrització. Tots els autors, llevat de Chandebais (1985), estan d'acord que l'epiteli de cicatrització prové inicialment de l'epiteli antic, i que més tard reprèn la seva forma columnar típica per immigració de cèl.lules procedents del mesènquima intern prop de la ferida, en forma semblant, si bé accelerada, del que succeeix en el renovament normal de l'epidermis d'un organisme intacte. A favor d'això hi ha el fet, força cops assenyalat, de l'absència total de mitosi a l'epidermis.

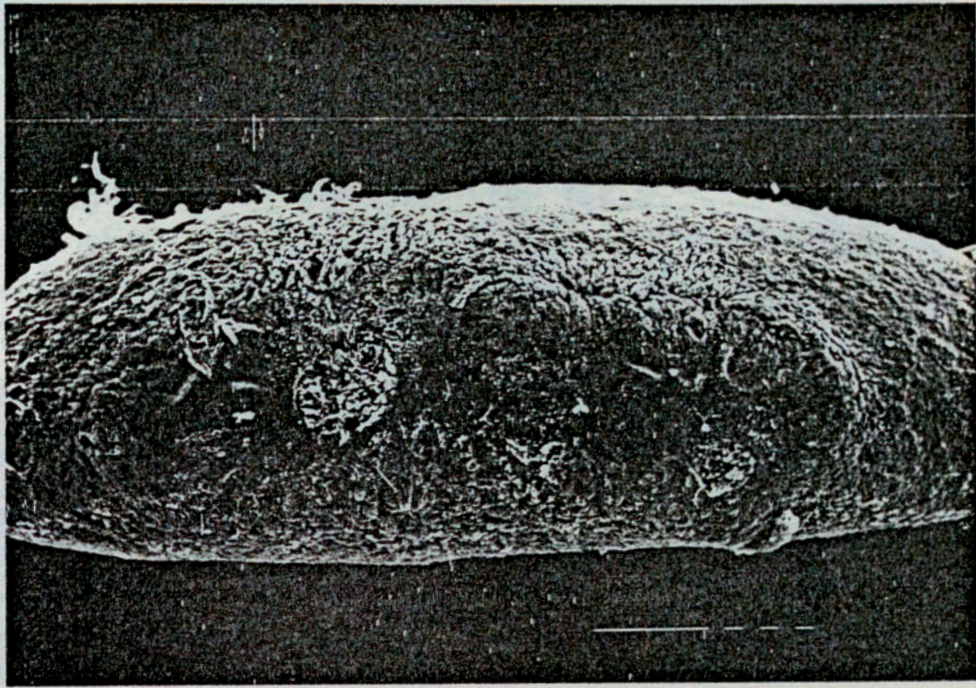


Figura 3.- Cicatrització caudal a Dugesia (S) polychroa a 1 hora de regeneració.

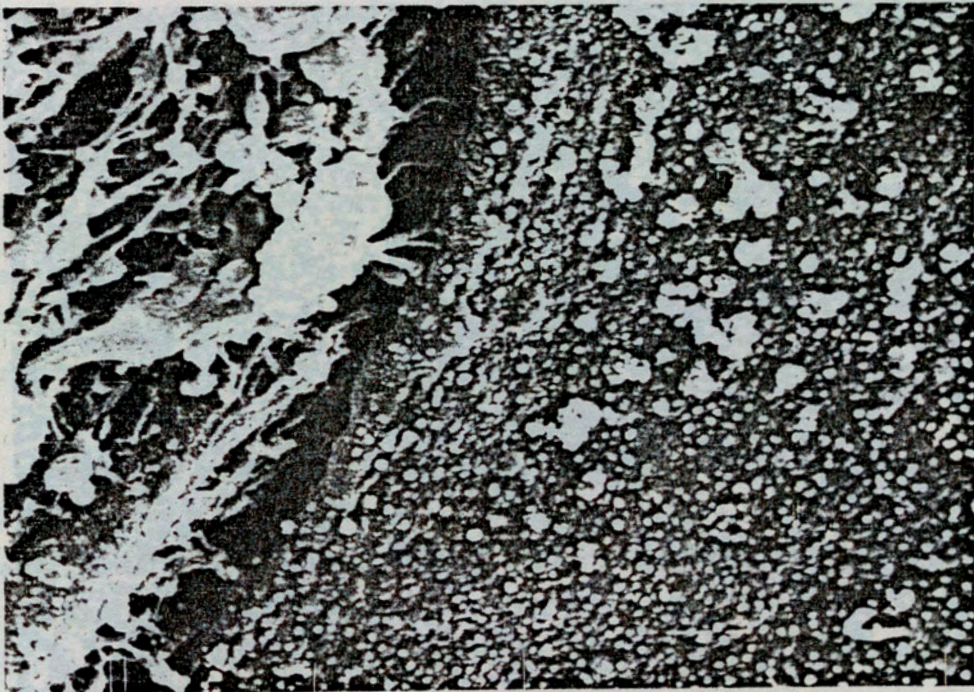


Figura 4.- Detall de la figura anterior on veiem l'intersecció de l'epiteli i la ferida no cicatritzada.

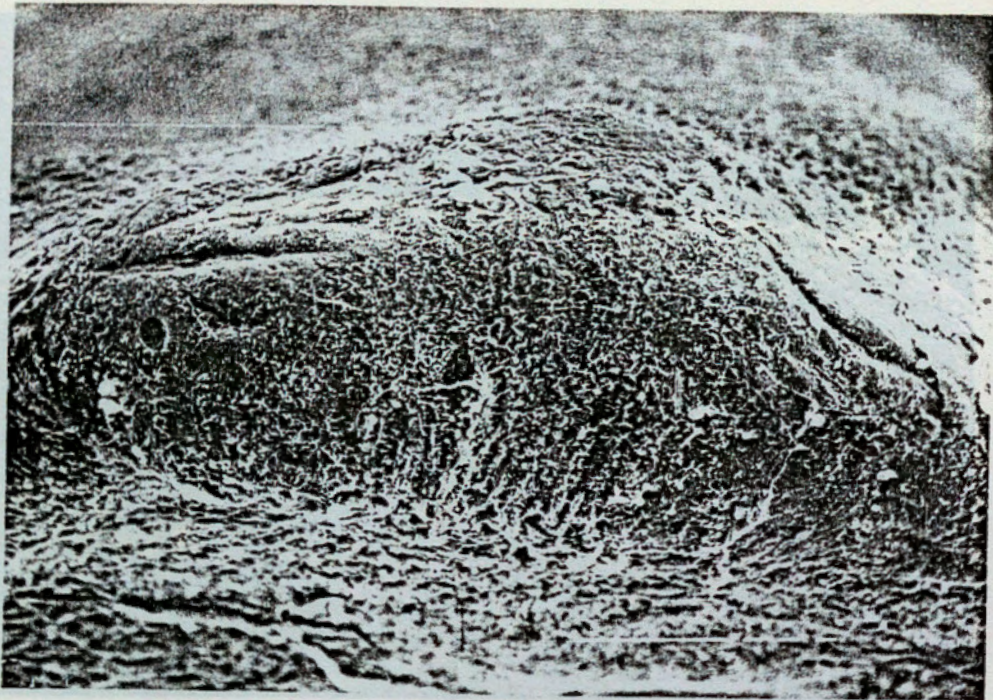


Figura 5.- Cicatrització cefàlica a Dugesia (S) polychroa a les 12 hores de regeneració.

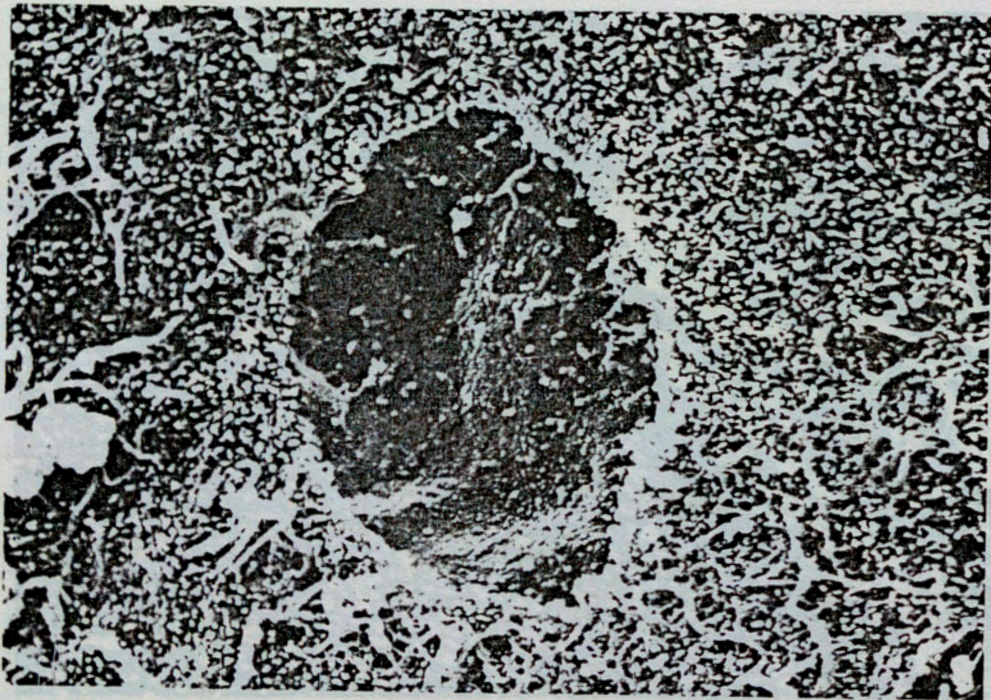


Figura 6.- Detall de la cicatrització a posteriori d'un orifici inicialment no cicatritzat.

Els resultats obtinguts reforcen clarament aquesta opinió generalitzada. En primer lloc, l'epiteli de cicatrització no presenta mai mitosi (Saló i Baguñà, observacions no publicades). En segon lloc, l'epiteli de cicatrització manté la seva forma estirada (1-2 m de gruix) fins a períodes superiors a les 6 hores (Figura 7). Més tard, s'anirien intercalant, especialment en els buits deixats per la cicatrització inicial, cèl.lules en procés de diferenciació cap a cèl.lules epidèrmiques.

Un darrer aspecte del procés de cicatrització, i sens dubte el més important, és saber si existeix recobriment diferencial. A l'espècie Dugesia (S) polycroa, les dues epidermis són clarament diferenciables: la ventral molt ciliada i la dorsal gairebé gens. D'aquesta manera, i per microscòpia de rastreig podem delimitar quina epidermis recobreix la ferida en cas de regeneració anterior o posterior.

Els resultats obtinguts són en termes generals, poc concluent. Mentre que en certs casos el recobriment diferencial es compleix, hi ha exemples clars que això no és sempre així (Figura 3). En aquest cas (regió cefàlica regenerant cúa), esperaríem que l'epiteli ventral (ciliat) fos el que recobris tota la ferida, cosa que no és. A més augment (Figures 8 i 9) es veu perfectament la intersecció d'ambdues epidermis, l'estirament de les cèl.lules de l'epidermis dorsal i, per contra, la manca d'estirament de les cèl.lules ventrals ciliades. En d'altres exemples hi ha també transgressions de les normes de recobriment diferencial.

Malgrat aquests exemples negatius qüestionen la hipòtesi de recobriment diferencial, hem de pendre aquest fet com a quelcom provisional. Això es deu primerament que amb microscopia de rastreig solament veiem la cara externa de la ferida i no la interacció entre cada una de les epidermis i el mesènquima subjacent. En d'altres paraules, fora possible que una imatge externa de recobriment no diferencial es correspongués amb un recobriment diferencial real a nivell intern. En segon lloc, les dades que es poden treure a nivell de talls sagitals en microscòpia òptica són incerts perquè és molt difícil establir el límit entre ambdós epitelis, al temps que es fa gairebé impossible saber si l'epiteli de cicatrització és ciliat o no a causa del gran estirament de les seves cèl.lules i a la mateixa primor dels talls.

Figura 3.- Estirament de les cèl.lules de l'epidermis dorsal. Detall de la

Figura 3

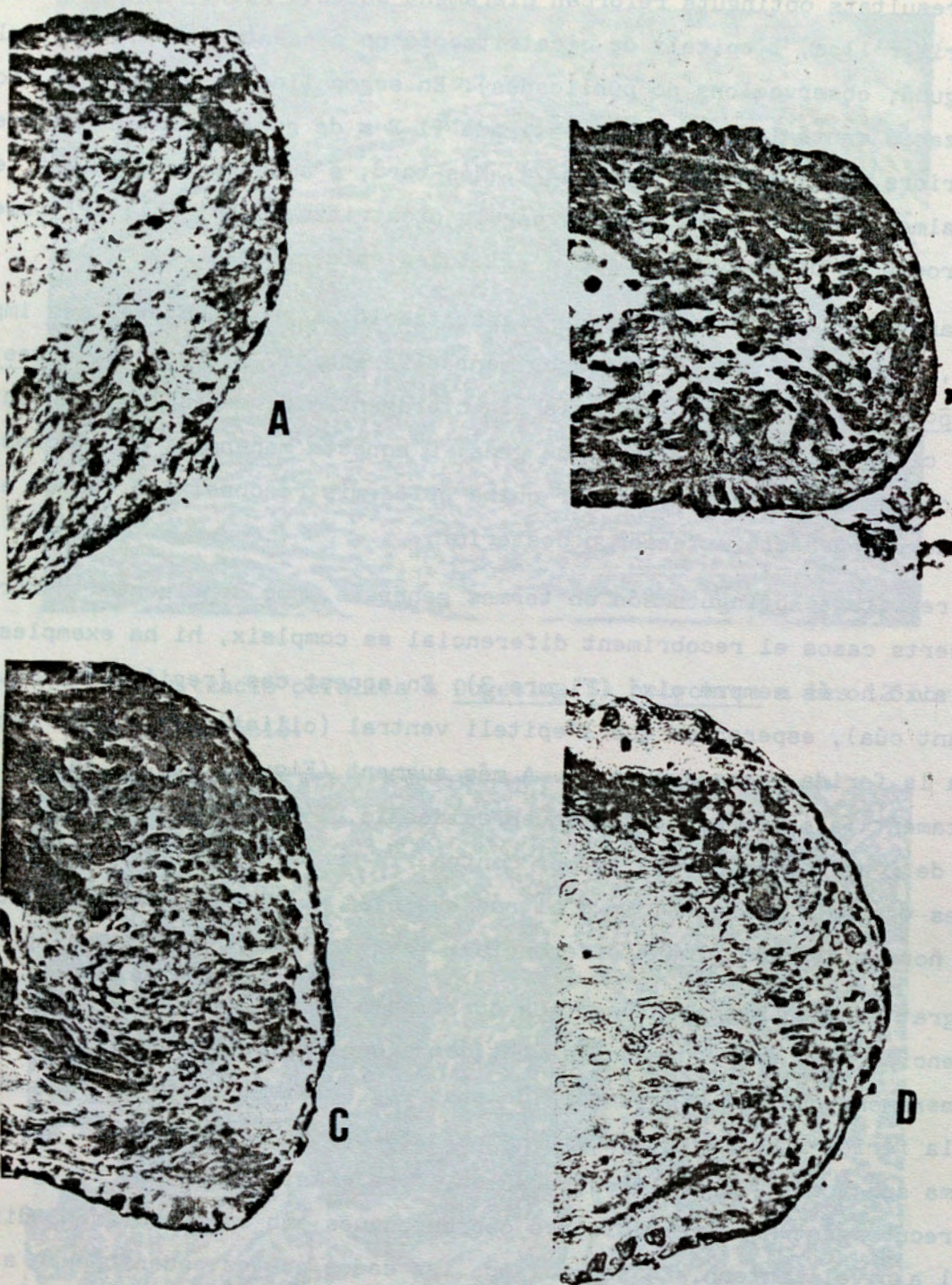


Figura 7.- Talls sagitals de l'epiteli cicatritzant a diferents temps de regeneració: A: 20 minuts; B: 1 hora; C: 2 hores; D: 6 hores.



Figura 8.- Detall de la figura 3 on es veu clarament l'intersecció de les dos epidermis.



Figura 9.- Estirament de les cèl.lules de l'epidermis dorsal. Detall de la Figura 3.

Conclusions i perspectives

De les tres qüestions que ens plantejavem a la Introducció, solament una ha quedat perfectament aclarida: la cicatrització a planàries és un fenomen molt inicial que s'acompleix dins de la primera hora de regeneració, tal com havien indicat previament Chandebois (1980) i Saló (1984). Així doncs, els temps de cicatrització donats per la resta d'autors (6 hores a 2-3 dies) són amb tota probabilitat incorrectes i deguts a imperfeccions del mètode de fixació emprat que amb tota seguretat trencava l'epiteli de cicatrització a les primeres hores de la regeneració.

Malgrat que el nostre treball no aporta cap dada essencial sobre l'origen de les cèl.lules de l'epiteli de cicatrització, els resultats obtinguts són plenament coherents amb la hipòtesi més extesa que suposa un origen inicial per estirament de l'epiteli antic i un creixement i retorn a l'estructura columnar inicial mitjançant l'entrada, per migració, de cèl.lules rabdíticas, diferenciades a partir dels neoblasts, des de les zones del mesènquima prop de la ferida.

Finalment, els resultats d'aquest treball no validen, en principi, el model de recobriment diferencial proposat inicialment per Chandebois (1980) i recolzat més tard per Saló (1984). Cal dir però que la validesa o no d'aquesta hipòtesi sols pot venir d'experiments de marcatge selectiu de les epidermis dorsal i ventral o mitjançant la construcció d'organismes doble dorsal i doble ventral. En el primer cas, i per millorar la metodologia emprada per Saló (1984), estem realitzant experiments de marcatge dels nuclis d'una o altre epidermis amb colorants fluorescents específics de DNA (DAPI, Hoetsch 33258 i 33243) i observació de talls sagitals amb epifluorescència. Per el segon cas, i malgrat les dificultats d'obtenir organismes doble ventral i doble dorsal creiem que, cas d'aconseguir-se, podrien validar o no de manera molt adequada la hipòtesi del recobriment diferencial.

Un darrer aspecte de la cicatrització a planàries rau en el fet que, independentment de si hi ha un recobriment diferencial, sigui necessària la seva interacció amb el mesènquima per a establir, per qualsevol tipus de mecanismes, la polaritat inicial i el patró d'estructures. L'estudi d'aquesta interacció i la importància per el procés de regeneració són també de cabdal importància. Això es podria realitzar aplicant lectines durant els primers estadis de la cicatrització (0-30 minuts) i observant si el bloqueig de determinades glicoproteïnes de membrana de les cèl.lules del mesènquima interfereix el procés de regeneració.

Agraïments

Aquest treball ha estat finançat per un ajut de la CAICYT (1108/81) a J.B.

Bibliografia

- BAGUÑA, J., SALÓ, E., ROMERO, R., COLLET, J., AULADELL, M.C., RIBAS, M., RIUTORT, M. i PRATS, J. (1985). La formació del patró durant la regeneració animal: cap a un model unitari?. Biologia del Desenvolupament 3, 321-336.
- CARLSON, B.M. (1975). The effects of rotation and positional change of stump tissues upon morphogenesis of the regenerating axolotl limbs. Devel. Biol. 47, 269-291.
- CARLSON, B.M. (1982). The regeneration of axolotl limbs covered by frog skin. Devel. Biol. 90, 435-440.
- CHANDEBOIS, R. (1976). Monographs in Development Biology t. II S. Karger, Basel. (A. Wolsky, Ed.)
- CHANDEBOIS, R. (1980). The Dynamics of closure and its role in the programming of Planarian regeneration. II. Distalization. Develop. Growth and Differentiation, 22, 693-704.
- CHANDEBOIS, R. (1985). Differentiated Epidermal Out Growths in the planarian Dugesia gonocephala: a model for studying cell renewal and patterning in single layered epithelial tissue. Exp. Cell Biol. 53, 46-58.
- MADEN, M. (1977). The regeneration of positional information in the amphibian limb. J. Theor. Biol., 69, 735-753.
- MORITA, M. & BEST, J.B. (1969). Electron microscop studies of planarian regeneration. II. Changes in epidermis during regeneration. J. Ultrastructural Res., 345-352.
- MORITA, M. & BEST, J.B. (1974). Electron microscop studies of planarian regeneration. II. Changes in epidermis during regeneration. J. Exp. Zool. 107, 345-373.
- PASCOLINI, R.; TEI, S.; VAGNETTI, D. & BONDI, C. (1984). Epidermal cell migration during wound healing in Dugesia lugubris. Cell Tissue Res. 236, 345-349.
- PEDERSEN, K.J. (1976). Scanning electron microscopical observations on epidermal wound healing planarian Dugesia tigrina. Wilhem Roux Archiv, 179, 251-273.
- 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. Morph. 83, 63-80.
- 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 morfològica, cel·lular i bioquímica. Tesi doctoral, Universitat de Barcelona.

SKAER, R.J. (1965). The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian Polycelis tenuis. J. Embryol. exp. Morph. 13, 129-139.

SPIEGELMAN, M. & DUDLEY, P.L. (1973). Morphological stages of regeneration in the planarian Dugesia tigrina: a light and electron microscopic study. J. Morph. 139, 155-184.

STOCUM, D.L. (1978). Regeneration of symmetrical hind limbs in the larval salamanders. Science 200, 790-793.

STOCUM, D.L. (1984). The urodele limb regeneration blastema. Determination and organization of the morphogenetic field. Differentiation 27, 13-28.