

## Canvis morfològics de les cèl·lules epitelials durant el procés de re-epitelització de ferides a *Hirudo medicinalis*

G. Huguet i M. Molinas.

Departament de Biologia cel·lular, Col·legi Universitari de Girona. Pl. Hospital nº 6, 17071 Girona.

### Abstract

#### Epithelial cell morfological changes during wound re-epithelization in *Hirudo medicinalis*

*Hirudo medicinalis* (Hirudinea, Arhynchobdellida) re-epithelization proceses during wound healing is an early event that takes place imediatly after the formation of the pseudoblastema, 8 h. post-injury. Epithelial cells of the wound margins move into the wound changing their morfological characters. Cells loose their columnar shape and become elongated. The nucleus migrates to the apical portion of the cell. The dermal junctons disrupt and the tonofilaments reagrupate around the nucleus. Epithelial cell sheet moves over the new formed pseudoblastema by means of the filopodia that form in the edge cells, following the so called "sliding model". When de wound is fully covered by the new epithelium, about 24 h following injury, citoskeleton reorganizes and basal dermal junctons are reconstructed. Six days pot-injury, the epithelial cells return to their normal columnar shape.

### Introducció

La re-epitelització és un fet crucial en la regeneració de ferides. Al produir-se una ferida desapareix la barrera protectora que aïlla a l'organisme del seu entorn. En l'organisme lesionat s'activen un conjunt d'accions homeostàtiques destinades a evitar la pèrdua de fluids, restaurar les barreres d'aïllament amb l'exterior i eliminar restes de teixits i substàncies estranyes o agents infecciosos.

Primer intervenen mecanismes ràpids de tancament de la ferida, com la formació de taps de naturalesa proteica o cel·lular. En según lloc es produeix un moviment de l'epiteli adjacent per recobrir la ferida, inclús abans de que s'hagin regenerat totalment els teixits subjacents.

La investigació de la re-epitelització de ferides ha estat centrada en vertebrats, especialment en mamífers (Stem i DePalma, 1988).

Dels estudis realitzats en anèlids, generalment restringits al tancament de ferides com a prelude per el principi de la regeneració epimòrfica, destaquem els treballs de Burke (1974, a i b), on es descriu el paper de l'epidermis en la cicatrització a nivell ultraestructural.

En el grup del hirudínids els treballs referents a la cicatrització es limiten a les breus descripcions fetes per LeGore i Sparks (1971 i 1973), als treballs de Cornec, (1980) sobre la regeneració d'amputacions y les descripcions de les autores del procés de cicatrització a *Hirudo medicinalis* (Huguet i Molinas, 1988).

En el present treball s'estudia el comportament de l'epiteli en la cicatrització de ferides d'*Hirudo medicinalis* a nivell dels canvis ultraestructurals de les cèl.lules columnars de l'epidermis. L'epidermis del tegument dels hirudínids està formada per un epiteli columnar monoestratificat amb nombroses glàndules unicel.lulars mucoses. La morfologia de les cel.lules epitelials ha estat descrita en treballs anteriors per les autores (Huguet i Molinas, 1986, 1987, 1988). Les cèlules columnars d'*Hirudo medicinalis* presenten una banda d'unió apical amb *zónula adherens*, unió septada i interdigitacions, i nombrosos hemidesmosomes amb la cutícula i la membrana basal connectats entre si per un poderós citoesquelet (Huguet i Molinas, 1988).

En el procés de regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis* observem primer una contracció muscular en la zona adjacent al tall i al cap de poc temps una afluença de cèl.lules provinents del teixit connectiu que taponen la ferida i formen un pseudoblastema. Un cop constituït el pseudoblastema s'inicia la re-epitelització a partir de les cèl.lules epitelials dels marges de la ferida. Al cap del temps s'observa en la zona de la cicatriu una epidermis amb les cèl.lules epitelials normals, però sense els dos tipus de glàndules mucoses que es troben a l'epidermis, i un teixit connectiu sense cèl.lules pigmentàries (Huguet i Molinas 1988).

### Material i mètodes

Per a la realització d'aquest treball s'han utilitzat espècimens d'*Hirudo medicinalis* procedents de llacunes de l'Alt Empordà (Girona), aclimatats a les condicions de laboratori abans de sotmetre'ls a experimentació.

Els animals són anestesiats amb etanol al 8% durant 15 min i posteriorment desinfectats superficialment amb alcohol etílic. A continuació es practica una incisió en la part ventral del tegument entre els anells 65 a 85. Aquestes ferides afecten varies capes de la pared corporal: cutícula, epidermis, dermis i les capes musculars. La recuperació es fa en una solució de clorina (p-toluè sulfocloramida) al 2 % per evitar infeccions. Els animals són sacrificats a diferents intervals: 0, 1, 4, 8, 12, 24, y 48 hores ; 6 dies, 14 dies; 2 mesos i 7 mesos respectivament. Per al sacrifici es procedeix a una relaxació profunda dels exemplars amb anestèsia perllongada i a continuació es procedeix a la fixació.

Per a la microscòpia òptica els exemplars es fixen en formol al 4% en tampó fosfat pH 7,2. Les inclusions es fan amb glicol metacrilat (GMA) i es tenyeixen amb hematoxilina-eritrosina.

Per a la microscòpia electrònica de rastreig s'utilitza també el formol tamponat i a continuació les mostres es processen sota punt crític previa deshidratació en sèrie alcohòlica, 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-pal·ladi, les mostres s'observen amb un Cambridge Stereoscan del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

Les mostres que han de ser objecte d'estudi amb la microscòpia electrònica de transmissió es sotmeten a la doble fixació en líquid de Karnovsky - tetraòxid d'osmi i s'inclouen en resina Spurr. Els talls són contrastats del modus habitual amb acetat d'uranil i citrat de plom abans de la seva observació en un microscopi Hitachi Hu 12A i un Hitachi H 7.000 del Servei de Microscòpia Electrònica de la U.A.B.

### Resultats

La re-epitelització s'inicia a les 8 h. de la realització de la ferida. Les cèl.lules epitelials dels marges de la ferida perden el seu aspecte columnar, amb uns 20  $\mu\text{m}$ . d'alçària per 4  $\mu\text{m}$ . d'amplària, per adoptar una forma aplatada d'aproximadament 5  $\mu\text{m}$  d'alçària per 25  $\mu\text{m}$ . d'amplària, i migren per sobre el pseudoblastema fins a recobrir tota la ferida. Observem que les cèl.lules epitelials migren o bé per sobre el teixit connectiu no malmès dels marges de la ferida o bé per sobre el pseudoblastema, però no per sobre els teixits necròtics. Aquest procés s'inicia en les cèl.lules més pròximes al

marge de la ferida i posteriorment es propaga a les cèl.lules submarginals. L'epitelització es completa al voltant de les 24h. Paulatinament les cèl.lules epitelials recobren la seva forma columnar, assolint als sis dies les seves dimensions originals (fig. 1).

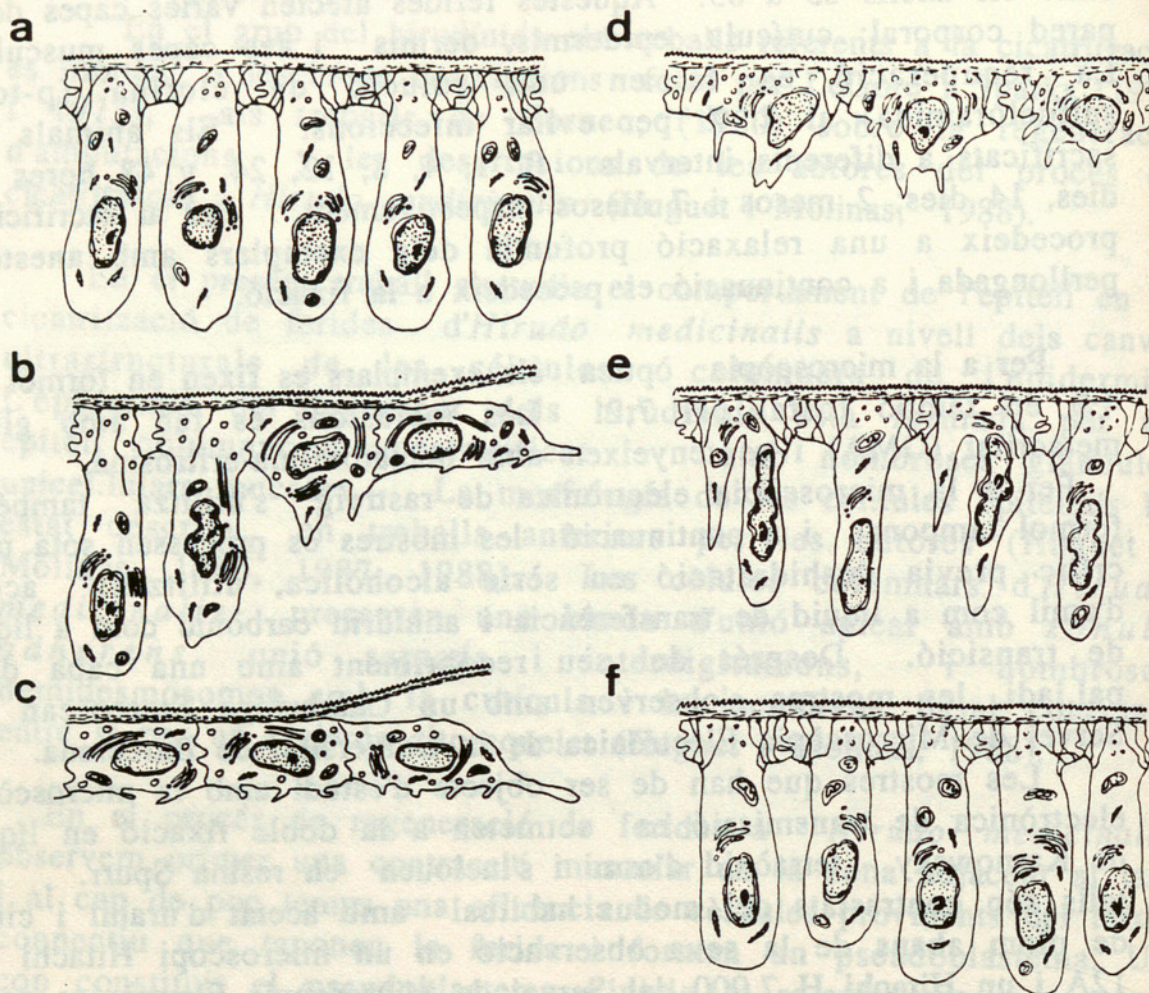


Figura 1. Esquema de les transformacions morfològiques que sofreixen les cèl.lules epitelials durant el procés migratori. A) Epiteli normal. B) Adquisició de la forma aplatada, amb migració del nucli a la part apical, pèrdua de les unions amb la dermis i desorganització i reagrupament del citoesquelet de tonofilaments entorn el nucli. C) Migració sobre el substrate, mitjançant l'emissió de filopodis, de tota la capa epitelial. D) Assentament de l'epidermis sobre el substrate, amb restauració de les unions basals i del citoesquelet. E) Elongació de les cèl.lules epitelials, amb migració del nucli cap a la part basal. F) Epiteli cicatricial.

L'epiteli avança per sobre el pseudoblastema a modus d'una capa unificada (fig. 2). Les cèl.lules epitelials mantenen la seva cohesió al llarg de tot el procés migratori, conservant la zonula adherens i l'unió septada, encara que es pot apreciar un desdoblament de les interdigitacions.



Figura 2. Imatge de microscòpia electrònica de rastreig on es veu l'epiteli (e) avançant per sobre el pseudoblastema (p).

Durant el procés migratori les cèl.lules registren importants canvis morfològics (fig. 2):

La pèrdua de la forma columnar s'inicia amb la translocació del nucli de la part basal a l'apical, durant la qual adquireix una forma lobulada i apareixen petites masses d'heterocromatina (fig. 3). Un cop la cèl.lula epitelial ha adquirit la forma aplatada el nucli recupera el seu aspecte ovalat.

La característica distribució zonal d'els orgànuls, amb els dictiosomes perinuclears i major abundància de vesícules a la part apical, es perd, i els feixos de tonofilaments s'agrupen al voltant del nucli, deixant de connectar els hemidesmosomes cuticulars amb els dèrmics (fig. 4). Els hemidesmosomes dèrmics desapareixen i no tornen a aparèixer fins completada l'epitelització.

Les cèl.lules epitelials emeten petits filopodis en el seu citoplasma basal al mateix temps que avancen per sobre el teixit connectiu o sobre el pseudoblastema. Les cèl.lules capdavanteres al marge d'avanç emiteixen filopodis en direcció al centre de la ferida que poden assolir els 25  $\mu\text{m}$ .



Figura 3. Cèl.lules epitelials del costat de la ferida a les 6 h. d'haver-se realitzat. S'observa la migració del nucli (n) cap a la part apical.

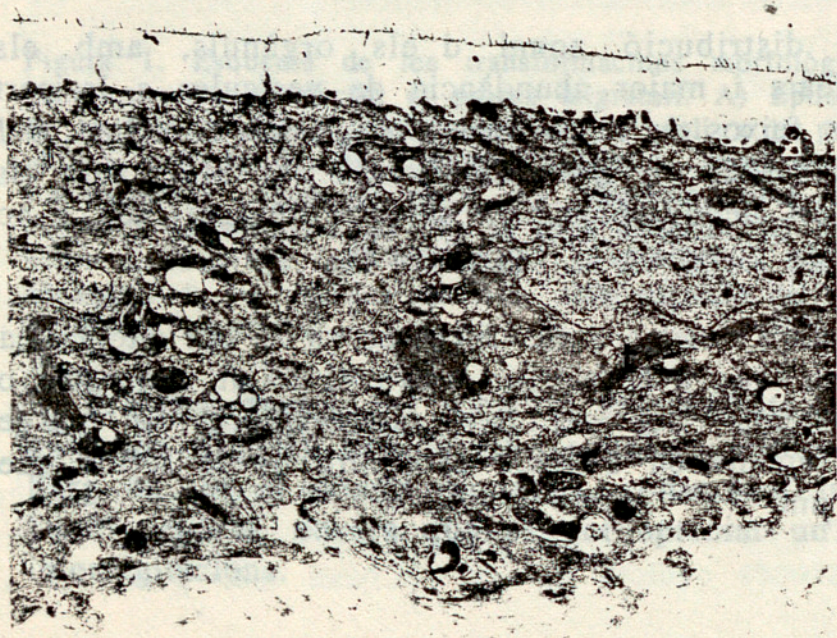


Figura 4. Epiteli aplatat al marge d'una ferida de 12 h. S'observen feixos de tonofilaments (t) perinuclears.

Un cop recobert el pseudoblastema es poden observar unions de tipus dens entre la membrana basal de les cèl.lules epitelials i les cèl.lules del pseudoblastema.

Entre el tercer i nové dia es don el desplaçament de la porció basal de les cèl.lules epitelials cap a l'interior de la dermis, per adoptar novament la forma columnar. El nucli descendeix per recobrar la seva posició basal primitiva, adoptant per el descens la forma lobulada, per recuperar la forma ovalada un cop completat el procés. Durant aquest període reapareixen els hemidesmosomes dèrmics i els feixos de tonofilaments recuperen paulatinament la seva distribució original per unir els hemidesmosomes cuticulars amb els hemidesmosomes dèrmics.

### Discussió

S'han proposat dos model per a explicar el mecanisme cel.lular d'avanç de la capa epitelial: són els anomenats el model de rodament i el model de lliscament (Stenn i DePalma, 1988). Segons el model de rodament, propi d'epitelis pluriestratificats, les cèl.lules del marge d'avanç roden unes sobre les altres lligant-se successivament al substrat i fent avançar el marge de l'epiteli. Els hemidesmosomes basals es regeneren ràpidament en les cèl.lules que successivament van assolint el marge. Per contra, en el model de lliscament, considerat més propi d'epitelis simples, és tota la capa epitelial que avança i els hemidesmosomes no es formen fins acabada la migració. Aquest últim model té petites variacions segons l'organisme estudiat. Vaughan i Trinkaus (1966) descriuen la migració de cultius de cèl.lules epitelials d'embrions de pollastre en la que només les cèl.lules del marge d'avanç són adherents al substrat i responsables del moviment. Mahan i Donaldson (1986) descriuen la migració de l'epiteli estratificat aplatat a la salamandra que es realitza segons el model de lliscament, amb la particularitat de que totes les cèl.lules de la capa i no tan sols les marginals, són adherents al substrate i contribueixen al moviment, sovint intercanviant posicions entre si.

En el nostre cas l'avanç de la capa epitelial es fa segons el model de lliscament. Tota la capa avança unificadament i els hemidesmosomes no es restableixen fins acabada la migració. A *Hirudo medicinalis* totes les cèl.lules són adherents al substrate i la presència de petits filopodis en el citoplasma basal de totes les cèl.lules migratòries fa pensar que totes elles podrien col.laborar en el moviment. El manteniment del complex d'unió entre les cèl.lules

epitelials i de les unions amb la cutícula descarta qualsevol possible intercanvi de posicions entre elles.

El procés de re-epitelització descrit a *Hirudo medicinalis* presenta algunes diferències als processos de re-epitelització descrits a altres hirudínids. Segons LeGore i Sparks, en *Piscicola geometra* (Rhynchobdellida), l'epitelització no s'inicia fins a les 96 h., mentre que en el nostre cas és molt més ràpida, ja que a les 8 h. ja s'ha iniciat el procés, per acabar de recobrir la ferida a les 24 h. En *Helobdella stagnalis* (Rhynchobdellida), els temps s'ajusten més als observats en *Hirudo medicinalis*, encara que són lleugerament inferiors, amb l'inici situat entre les 2 i les 6 h., per constituir a les 12 h. un epiteli cicatricial (Cornec, 1984). Segons aquest autor, però, no s'observen canvis en els orgànuls ni en els tonofilaments, canvis que en *Hirudo medicinalis* són força aparents, amb una desconexió de les unions basals, que considerem necessaria perquè es pugui donar el procés de migració.

La presència de lamel·lipodis i filopodis ha estat observada per diferents autors tan en model de rodament (Walter, 1971) com en el model de lliscament (Andersen i Fejerskov, 1974 i Mahan i Donaldson, 1986).

Nosaltres observem dos tipus de filopodis: un de més conspicu en el marge d'avanç i en direcció al centre de la ferida, i després tot un conjunt de petits filopodis que connecten la superfície basal de les cèl·lules epitelials migratòries amb els teixits subjacents.

La distribució dels tonofilaments, agrupats al voltant del nucli durant el procés migratori, els descarta com a responsables de la locomoció. Bereiter-Hahn et al (1981), en l'estudi de la locomoció de cèl·lules epitelials aïllades en cap-grossos, han observat la presència d'actina i  $\alpha$ -actinina al front del lamel·lipodi que emiteixen aquestes cèl·lules en la direcció d'avanç, i segons aquests autors l'actina podria ser responsable de la locomoció de les cèl·lules epitelials.

Els treballs realitzats en mamífers sobre aquest tema mostren que en les primeres fases la migració depèn de l'estat del teixit connectiu subjacent (Stenn i DePalma, 1988). Els epitelis estudiats en els esmentats treballs migren sobre la matriu extracel·lular del teixit connectiu, però en el nostre cas veiem també com migren sobre un substrate cel·lular, el pseudoblastema, i com són capaces d'establir unions no tan sols amb el teixit connectiu dèrmic sino també amb les cèl·lules del pseudoblastema.



## Bibliografia

- ANDERSEN, L. i FEJERSKOV, O. 1974. Ultrastructure of Initial Cell Migration in Palatal Wounds of Guinea Pigs. J. Ultrastructure Research, 48: 313-324
- BEREITER-HAHN, J., STROHMEIER, R., KUNZENBACHER, I., BECK, K. i VÖTH, M. 1981. Locomotion of *Xenopus* epidermis cells in primary culture. J. Cell Sci. 52: 289-311
- BURKE H.C. 1974. Wound healing in *Eisenia foetida* (oligochaeta). I Histology and H3-thymidine radioautography of the epidermis. Cell. Tiss. Res. 154: 61-83
- 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: 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. Modificacions ultraestructurales après amputation dans le territoire de régénération postérieure de l'hirudine Rhynchobdelle *Helobdella stagnalis*. Archives d'Anatomie microscopique 73, n° 4: 269-289
- HUGUET, G. i MOLINAS, M. 1986. Estructura i ultraestructura de les cèl·lules epitelials de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774) (Hirudinea). Scientia gerundensis, 12: 5-13
- HUGUET, G. i MOLINAS, M. 1987. Especialitzacions per l'unió cel·lular del tegument d'*Hirudo medicinalis* (Hirudinea). Scientia gerundensis 13: 5-14
- HUGUET, G. i MOLINAS, M. 1988. Estudi estructural del procés de regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis*. Scientia gerundensis 14 (en premsa)
- KRAWCZYK, W.S. 1971. A pattern of epidermal cell migration during wound healing. The Journal of Cell Biology, 49: 247-263
- LEGORE, R.S. i SPARKS, A.L. 1971. Repair of body incision in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. Journal of invertebrate pathology 18: 40-45
- LEGORE R. S. i SPARKS A.L. 1973. Repair of body wall burns in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. Journal of invertebrate pathology 22: 298-299
- MAHAN, J.T. i DONALDSON, D.J. 1986. Events in the Movement of Newt Epidermal Cells Across Implanted Substrates. The Journal of Experimental Zoology. 237: 35-44
- SAWYER, R.T. 1986. Leech biology and behavior. Clarendon Press. Oxford.

STENN, K.S. i DEPALMA, L. 1988. Re-epithelialization. R.A.F. Clark i P.M. Henson ed. The molecular and cellular biology of wound repair. Plenum Press. New York . 321-335

VAUGHAN, R.B. i TRINKAUS, J.P. 1966. Movements of epithelial cell sheets in vitro. J. Cell Sci. 1: 407-413