



Universitat de Girona

# MECANISMES CEL·LULARS EN LA CURACIÓ DE FERIDES A *Hirudo medicinalis*

**Gemma HUGUET i BLANCO**

**ISBN: 978-84-690-5677-3**

**Dipòsit legal: GI-I 107-2008**

<http://hdl.handle.net/10803/7631>

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi doctoral i la seva utilització ha de respectar els drets de la persona autora. Pot ser utilitzada per a consulta o estudi personal, així com en activitats o materials d'investigació i docència en els termes establerts a l'art. 32 del Text Refós de la Llei de Propietat Intel·lectual (RDL 1/1996). Per altres utilitzacions es requereix l'autorització prèvia i expressa de la persona autora. En qualsevol cas, en la utilització dels seus continguts caldrà indicar de forma clara el nom i cognoms de la persona autora i el títol de la tesi doctoral. No s'autoritza la seva reproducció o altres formes d'explotació efectuades amb finalitats de lucre ni la seva comunicació pública des d'un lloc aliè al servei TDX. Tampoc s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant als continguts de la tesi com als seus resums i índexs.

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis doctoral y su utilización debe respetar los derechos de la persona autora. Puede ser utilizada para consulta o estudio personal, así como en actividades o materiales de investigación y docencia en los términos establecidos en el art. 32 del Texto Refundido de la Ley de Propiedad Intelectual (RDL 1/1996). Para otros usos se requiere la autorización previa y expresa de la persona autora. En cualquier caso, en la utilización de sus contenidos se deberá indicar de forma clara el nombre y apellidos de la persona autora y el título de la tesis doctoral. No se autoriza su reproducción u otras formas de explotación efectuadas con fines lucrativos ni su comunicación pública desde un sitio ajeno al servicio TDR. Tampoco se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al contenido de la tesis como a sus resúmenes e índices.

**WARNING.** Access to the contents of this doctoral thesis and its use must respect the rights of the author. It can be used for reference or private study, as well as research and learning activities or materials in the terms established by the 32nd article of the Spanish Consolidated Copyright Act (RDL 1/1996). Express and previous authorization of the author is required for any other uses. In any case, when using its content, full name of the author and title of the thesis must be clearly indicated. Reproduction or other forms of for profit use or public communication from outside TDX service is not allowed. Presentation of its content in a window or frame external to TDX (framing) is not authorized either. These rights affect both the content of the thesis and its abstracts and indexes.

TESI DOCTORAL

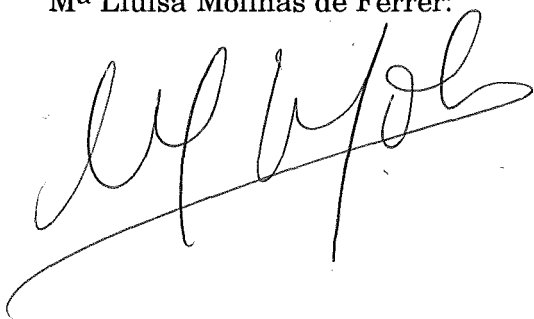
**MECANISMES CEL·LULARS EN LA CURACIÓ  
DE FERIDES A *HIRUDO MEDICINALIS***

Memòria presentada per Gemma Huguet  
i Blanco per optar al grau de Doctor en  
Ciències Biològiques

Girona, 1994

G. HUGUET

Vist i plau de la directora Dra.  
M<sup>a</sup> Lluïsa Molinas de Ferrer:



103388



Universitat de Girona  
Biblioteca

Departament de Biologia  
UNIVERSITAT DE GIRONA



A en Miquel, l'Helena i l'Ariadna

## AGRAÏMENTS

Voldria manifestar la meua gratitud a totes les persones que m'han animat i ajudat al llarg d'aquests darrers anys, col.laborant a fer possible aquest treball. Desitjaria esmentar expressament:

La Dra. M<sup>a</sup> Lluïsa Molinas, per la direcció, recolzament i llibertat que m'ha donat durant el desenvolupament d'aquest treball, així com per la revisió i la discussió crítiques del manuscrit.

Els meus companys de laboratori, Dolors Verdaguer, Mercè Figueras i Pere Vázquez, per la seva col.laboració espontània i desinteressada al llarg de tot el treball i per haver suportat amb paciència i bon humor el meu "sprint" final.

La Cristina Verdaguer i en Jordi Dalmau per la seva col.laboració en els treballs de regeneració de cremades.

El Dr. Jean-Pierre Cornec per haver-me convidat al seu laboratori a la Universitat de Provence I, per les discussions tan profitoses i el tracte tan amical.

El Dr. Josep Esquerda, el Dr. Joan Ribera i en general tota la gent del Departament de Ciències Mèdiques de la Facultat de Medicina de la Universitat de Lleida, per haver-me ofert la possibilitat d'aprendre en el seu laboratori les tècniques de marcatge amb lectines.

El Dr. Sergi Bonet que m'ha donat ajut, suport i bons consells desde el principi d'aquest treball.

El Servei de Microscòpia Electrònica de la U.A.B., en especial en Francesc Bohils i l'Onofre Castell per la seva col.laboració i els seus consells.

En Miquel Campos, en Pere Puigdomenec i en Lolo Abós que m'han ajudat en la recolecció dels exemplars.

La Margarida Casadevall i en Miquel Grau pel seu ajut en la correcció del manuscrit.

Tots els que han estat o són encara col.laboradors del laboratori, entre els quals no he citat abans: Montse, Toni, Lluís i Oriol.

El meu marit, Miquel Grau, i les meves filles, Helena i Ariadna, per la seva paciència amb el meu treball, moltes vegades incomprendible per a ells.

A tots moltes gracies.

## ÍNDIX DETALLAT

<b>INTRODUCCIÓ</b> .....	1
Antecedents .....	2
Objectius.....	3
Organització de la memòria .....	4
<b>DESCRIPCIÓ DEL MODEL <i>HIRUDO MEDICINALIS</i></b> .....	7
Sistemàtica i classificació.....	7
Hàbitat i distribució.....	9
Anatomia externa i interna.....	9
Comportament i cicle biològic .....	15
<b>MATERIAL I MÈTODES</b> .....	19
<b>Material biològic</b> .....	20
Obtenció dels exemplars .....	20
Manteniment i cultiu al laboratori .....	21
Solucions fisiològiques per hirudinis .....	22
<b>Manipulació experimental</b> .....	23
Anestèsia, recuperació i sacrifici.....	23
Higiene i desinfecció.....	23
Realització de les ferides .....	23
Tractament amb colquicina.....	27
Estudi de l'activitat fagocitària dels amebòcits .....	27
<b>Microscòpia òptica</b> .....	29
Fixació .....	29
Mètode de la parafina.....	30
Mètode del glicol-metacrilat (GMA).....	30
Mètode de la congelació.....	31
Extensions .....	32
Mètode de squash.....	32
Coloració i muntatge .....	33
<b>Microscòpia electrònica</b> .....	36
Microscòpia electrònica d'escànnig.....	36
Microscòpia electrònica de transmissió.....	36
<b>Marcatge amb lectines</b> .....	38
Obtenció de les mostres i processat histològic .....	38
Marcatge.....	39
Microscòpia de fluorescència .....	40
<b>Marcatge d'actina amb fal·loïdina fluoresceïnada</b> .....	41
Obtenció de les mostres i processat histològic .....	41
Marcatge.....	41
Microscòpia de fluorescència.....	42
<b>Detecció de proliferació cel·lular per incorporació de BrdU</b> .....	43
Incubació amb BrdU .....	44
Detecció immunohistològica.....	48

<b>HISTOLOGIA NORMAL</b> .....	53
INTRODUCCIÓ.....	53
RESULTATS I DISCUSSIONS .....	56
<b>Epidermis</b> .....	56
Cutícula.....	56
Discussió.....	58
Cèl.lules epitelials columnars.....	58
Discussió.....	65
<b>Glàndules mucoses del tegument</b> .....	69
Glàndules tubulars.....	71
Glàndules piriformes.....	75
Discussió.....	83
<b>Musculatura</b> .....	88
Musculatura de la paret corporal.....	88
Fibres musculars de la paret del cos.....	90
Discussió.....	94
<b>Teixit connectiu</b> .....	96
Matriu extracel.lular.....	96
Discussió.....	102
Fibròcits.....	104
Discussió.....	107
Cromatòfors.....	110
Discussió.....	113
Teixit vasofibrós.....	115
Discussió.....	123
Amebòcits.....	126
Discussió.....	129
<b>CURACIÓ DE FERIDES</b> .....	133
RESULTATS .....	133
<b>Ferides per incisió</b> .....	134
Pseudoblastema.....	137
Reepitelització.....	164
Regeneració de les glàndules epitelials mucoses.....	177
Regeneració del teixit cicatricial.....	181
<b>Ferides per cauterització del tegument</b> .....	189
Dany als teixits.....	189
Pseudoblastema.....	189
Reepitelització.....	195
Regeneració del teixit cicatricial.....	196
<b>Cremades per nitrats de plata</b> .....	199
Dany als teixits.....	199
Pseudoblastema.....	199
Reepitelització.....	214
Regeneració de les glàndules epitelials mucoses.....	220
Regeneració del teixit cicatricial.....	225
<b>Estudi de l'activitat mitòtica en el procés de regeneració</b> .....	227
Detecció de figures mitòtiques.....	227
Detecció de proliferació cel.lular per incorporació de BrdU.....	227
<b>Activitat fagocítica dels amebòcits</b> .....	231

<b>DISCUSSIÓ</b> .....	233
<b>Pseudoblastema</b> .....	234
Composició cel.lular.....	234
Estudi del creixement del pseudoblastema .....	236
Evolució del pseudoblastema .....	238
Unions cel.lulars durant l'evolució del pseudoblastema.....	238
Contracció de la ferida.....	240
<b>Reepitelització</b> .....	244
Procés de reepitelització .....	244
Migració epitelial i substrat .....	247
Activitat mitòtica en l'epidermis.....	248
<b>Regeneració de glàndules mucoses del tegument</b> .....	250
Origen de les glàndules mucoses en la zona cicatricial .....	250
Diferenciació dels dos tipus glandulars: piriformes i tubulars .....	250
<b>Regeneració de la zona cicatricial</b> .....	253
Regeneració de la matriu connectiva.....	253
Teixit cicatricial.....	253
<b>Característiques dels diferents tipus de ferides</b> .....	255
Ferides per incisió .....	256
Ferides per cauterització .....	256
Cremades amb nitrat de plata.....	260
<b>CONCLUSIONS</b> .....	263
<b>BIBLIOGRAFIA</b> .....	269
<b>ANNEX 1, reactius</b> .....	277
Tampons.....	277
Fixadors.....	278
Solucions fisiològiques.....	279
Reactius per a microscòpia electrònica.....	279
<b>ANNEX 2, coloracions</b> .....	281

## INTRODUCCIÓ

La curació de ferides és un tema d'interès renovat en biologia comparada. Una ferida activa un conjunt d'accions per evitar la pèrdua de fluids, per eliminar restes de teixits, substàncies estranyes o agents infecciosos i per regenerar la zona afectada. L'agregació cel·lular i/o diversos mecanismes de coagulació, l'acció fagocitària, la proliferació de certs tipus cel·lulars i la remodelació dels teixits són mitjans emprats per tota l'escala animal.

S'han utilitzat una gran varietat de models per estudiar el procés de curació de ferides, però l'investigació ha estat centrada en vertebrats, principalment mamífers (Clark i Henson, 1988).

Els invertebrats són uns models experimentals relativament simples. Permeten l'estudi de mecanismes de reparació ancestrals que s'han conservat a través de les diferents etapes evolutives, i poden presentar-ne d'alternatius als dels vertebrats. En aquest treball s'ha escollit el grup dels anèl·lids per posseir l'organització més simple dels celomats i dins aquest grup s'ha escollit la classe *Hirudinea*.

L'estudi dels mecanismes de reparació de ferides dels anèl·lids ha estat objecte de nombrosos estudis en oligoquets pel seu interès com a preludi del procés de regeneració (Chapron, 1964; Chapron, 1970; Burke 1974 a, b i c; Jamieson, 1981; Cornec et al, 1987). Contràriament, el grup dels hirudinis ha rebut poca atenció, exceptuant els treballs sobre regeneració de parts amputades de Cornec (1971, 1980, 1981, 1984, 1990) i Cornec i Coulomb-Gay (1975, 1982), uns breus estudis de LeGore i Sparks sobre reparació de ferides (1971) i de cremades (1973), la descripció del procés de reparació de la ferida produïda per la fecundació hipodèrmica de Myers (1935) i l'estudi de Muller i Nicholls (1981) sobre regeneració i plasticitat del sistema nerviós.

En general, aquests treballs han estat centrats més en l'aspecte de la regeneració que no pas en la l'estudi detallat de tot el procés de curació. A més, tots els estudis realitzats s'han fet en espècies pertanyents a l'ordre *Rhynchobdellida*, un dels dos ordres més importants dels hirudinis, juntament amb *Arhynchobdellida*. A l'ordre dels *Arhynchobdellida*, al qual pertany *Hirudo medicinalis*, no hi ha cap treball sobre el tema. Donades les diferències histològiques entre els dos ordres creiem que els processos, a nivell cel·lular, poden diferir substancialment.

*Hirudo medicinalis* és una espècie que ha estat emprada com a animal d'experimentació en diferents estudis, especialment en neurobiologia (Henderson et al, 1983; Vyklyky i Nicholls, 1988; Singhal et al, 1989; Masuda-Nakagawa et al, 1990). La relativa facilitat de manteniment a laboratori, la fàcil manipulació i l'escassa mortalitat, la fan idònia com a animal d'experimentació en regeneració de ferides. Té una paret corporal suficientment gruixuda per permetre la realització de ferides amb relativa facilitat.

## Antecedents

La diferència fonamental entre el procés de curació de ferides dels hirudinis i dels altres anèl·lids, és la incapacitat d'aquest primer grup per regenerar segments corporals. Les explicacions més plausibles per aquesta diferència serien l'absència o potència limitada en les sangoneres de cèl·lules blastodèrmiques no compromeses, la manca d'efectes tròfics del sistema nerviós i la poca capacitat de diferenciació cel·lular (Sawyer, 1986). Els oligoquets, durant la seva vida, continuen afegint segments per la part posterior. En contrast, els grups principals d'hirudinis: *Branchiobdellidea*, *Acanthobdellidea* i *Euhirudinea*, fixen el nombre de segments en els primers estadis del desenvolupament embrionari. Aquests hirudinis es caracteritzen per la presència de ventosa caudal, estructura incompatible amb el creixement per la part posterior (Sawyer, 1986).

Hi han estudis que demostren que les sangoneres mantenen una capacitat de regenerar teixits organitzats durant l'estadi larvari (Cornec, 1980). En canvi, en exemplars adults aquesta capacitat queda limitada a certs casos, com la regeneració de la ventosa anal a *Helobdella stagnalis*, sempre i quan l'amputació només elimini la base de fixació i no danyi el gangli nerviós terminal (Cornec i Coulomb-Gay 1982; Cornec, 1984). Muller i Nicholls (1981) han demostrat que en la regeneració de les ferides s'inclou el sistema nerviós, tot restablint-se les connexions nervioses lesionades.

Els hirudinis, si bé no tenen capacitat de regenerar segments corporals, sí que poden cicatritzar efectivament diferents tipus de ferides. Responen a una ferida amb una sèrie de mecanismes de defensa a curt i a llarg termini. En primer lloc es produeix una contracció de la musculatura i posteriorment nombroses cèl·lules s'agreguen al lloc de la ferida per formar un tap cel·lular, anomenat pseudoblastema a causa de la seva incapacitat d'originar teixits organitzats, a diferència dels veritables blastemes que es troben en altres anèl·lids. Seguidament es forma un nou epiteli per migració de les cèl·lules epitelials dels marges de la ferida. El procés finalitza amb la formació d'un teixit cicatricial compost principalment per teixit connectiu poc diferenciat (Myers, 1935, Le Gore i Sparks, 1971; Cornec, 1984, 1990).

L'origen i el paper de les cèl·lules que formen el pseudoblastema semblen estar poc clars, i són diferents en les diferents espècies estudiades. A *Placobdella parasitica* (*Rynchobdellida*), s'han descrit quatre tipus cel·lulars, que per ordre d'aparició són: un tipus cel·lular d'origen poc clar i que podria ser connectiu, amebòcits, fagòcits i cèl·lules connectives capaces de regenerar la matriu extracel·lular (Myers, 1935). A *Piscicola salmositica* (*Rynchobdellida*), les cèl·lules involucrades són cèl·lules connectives anomenades opleòcits i celomòcits, els quals només apareixen si es trenca el canal celòmic (LeGore i Sparks, 1971; Sparks 1972). A *Helobdella stagnalis* (*Rynchobdellida*) s'hi han descrit diferents

tipus cel·lulars: amebòcits, celomòcits, cèl·lules fagocitàries del teixit connectiu i fibròcits (Cornec, 1984).

El procés de reepitelització ha estat descrit breument a *Piscicola salmositica* (*Rhynchobdellida*) (LeGore i Sparks, 1971), i més detalladament a *Helobdella stagnalis* (*Rhynchobdellida*) (Cornec, 1984). Aquests estudis mostren que l'epitelització es dona per migració de l'epiteli dels marges de la ferida i que el procés s'acompanya d'alguns canvis en les cèl·lules epitelials, com el pas d'una morfologia columnar a una d'aplatada (LeGore i Sparks, 1971; Cornec, 1984) i l'aparició d'autofagosomes en el citoplasma (Cornec, 1984). No hi ha referències, però, dels canvis en el citosquelet de les cèl·lules epitelials i en els contactes d'aquestes amb el substrat durant el procés de reepitelització. Un cop finalitzat el procés de reepitelització, a *Helobdella stagnalis* (Cornec, 1990), s'ha vist que les glàndules mucoses del tegument es regeneren a partir de les cèl·lules epitelials normals.

La descripció del teixit cicatricial varia en les diferents espècies estudiades. A *Helobdella stagnalis* (Cornec, 1984) s'observa una matriu connectiva amb les fibres disposades de forma menys ordenada que al teixit normal i que a poc a poc es va colonitzant per cèl·lules connectives i paquets de fibres nervioses de petit diàmetre. En canvi a *Piscicola salmositica* (LeGore i Sparks, 1971) no s'observa colonització cel·lular. A *Placobdella parasitica*, en la regeneració de la ferida produïda per la fecundació hipodèrmica, no s'observa cicatriu evident en la zona afectada (Myers, 1935).

## Objectius

El treball que ha motivat la redacció d'aquesta memòria, és l'estudi dels mecanismes cel·lulars implicats en la curació de ferides de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis* L. (*Hirudinidae*, *Anelidae*). El principal propòsit ha estat l'estudi d'un model de regeneració de ferides *in vivo*.

Els objectius concrets proposats són:

- 1- Estudi detallat de l'histologia normal dels teixits de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis*.
- 2- Descriure les diferents etapes que tenen lloc després de la producció de la ferida: el tancament de la ferida, el procés de reepitelització i la regeneració dels teixits.
  - 2-1 Estudi de l'origen cel·lular del pseudoblastema d'*Hirudo medicinalis*.
  - 2-2 Estudi del paper que juguen les cèl·lules del pseudoblastema en el procés de reparació.
  - 2-3 Estudi del procés de contracció de la ferida.



2-4 Estudi del procés de reepitelització, amb especial èmfasi en els canvis ultraestructurals, l'estudi de la làmina basal i la regeneració glandular.

2-5 Estudi de la regeneració dels teixits.

3- Establir un patró comú del procés de curació de ferides amb les altres espècies d'hirudinis estudiades i ressaltar les diferències que s'hi puguin donar.

4- Comparar els diferents fenòmens que es donen en el procés de curació de ferides a *Hirudo medicinalis* amb el procés de curació de ferides a mamífers.

Les estratègies seguides per a la realització d'aquests objectius han estat:

1- Producció de diferents tipus de ferides que permetin observar aspectes diferents del procés de regeneració.

2- Estudi histològic amb tècniques de MO i de ME de ferides en diferents etapes del procés.

3- Estudi de la proliferació cel·lular al llarg del procés per detecció de mitosis i mitjançant tècniques d'incorporació de BrdU.

4- Estudi del citosquelet en els fenòmens de migració cel·lular i de contracció de la ferida mitjançant tècniques de ME i de marcatge amb fal·loïdina.

5- Estudi de la làmina basal mitjançant tècniques d'impregnació argèntica i de marcatge amb lectines.

## **Organització de la memòria**

El cos principal del treball s'estructura en uns resultats separats en dos capítols principals, corresponents als punts 1 i 2 dels objectius: l'estudi de la histologia normal i l'estudi de la curació de les ferides, i en una discussió general.

El capítol corresponent a l'estudi de l'histologia normal s'organitza en diferents apartats en què es descriuen els diferents elements de la paret corporal, cada un dels quals va acompanyat d'una breu discussió per tal de ressaltar les aportacions noves i caracteritzar el nostre model. La utilització de les dades obtingudes en aquest estudi com a base per a la identificació de tipus cel·lulars que intervenen en el procés de curació o la comparació dels teixits normals amb etapes intermedies o finals del procés es fa en la discussió general.

En el capítol corresponent als resultats de la curació de ferides, s'estudien per separat cada un dels processos de curació dels diferents tipus de ferides: ferides per incisió, cremades per cauterització i cremades per nitrat de plata.

En la discussió general cada apartat correspon a una etapa del procés de curació. S'integren els resultats obtinguts en els diferents tipus de ferides, de forma que informacions complementàries ajudin a entendre més a fons les diferents etapes del procés. La comparació del procés amb els que es donen en

grups afins i amb mamífers es va fent per a cada una de les etapes. A nivell de la pauta general del procés de curació, la discussió es basa principalment en les ferides per incisió, utilitzant els resultats obtinguts de l'estudi dels diferents tipus de cremades per a completar la comprensió del procés. Per aquest motiu, en un apartat separat, es discuteixen les característiques diferencials de les pautes generals dels processos de curació dels diferents tipus de ferides.

El treball va precedit de la descripció dels materials i mètodes emprats. Per tal d'agilitar la lectura d'aquest apartat, les dades per a la preparació dels diferents reactius emprats i la descripció de les diferents coloracions realitzades es detallen en els annexos 1 i 2 que es troben al final d'aquest volum.

La biologia d'*Hirudo medicinalis* es col·loca en un capítol apart de material i mètodes. El grau de desenvolupament d'aquest capítol i la facilitat del seu accés per a la discussió justifiquen aquesta separació.

## DESCRIPCIÓ DEL MODEL *HIRUDO MEDICINALIS*

### SISTEMÀTICA I CLASSIFICACIÓ

Les sangoneres pertanyen al fílum *Annelida* -celomats vermiforms segmentats, protostomis i sense exoesquelet- format per tres classes: *Polichaeta*, *Oligochaeta* i *Hirudinea*. Els hirudinis i els oligoquets s'agrupen en el subfílum *Clitellata*. Els clitel.lats tenen desenvolupament directe, són hermafrodites i dipositen els ous enbolcallats amb capolls secretats pel clitel.

Els hirudinis són clitel.lats carnívors amb un modus característic de locomoció per ventoses. Actualment es coneixen aproximadament 650 espècies de sangoneres que es troben repartides en una gran diversitat d'hàbitats.

Elliot i Man (1979) van proposar una classificació dels hirudinis amb quatre ordres: *Acanthobdellida*, *Rhynchobdellida*, *Gnathobdellida* i *Pharyngobdellida*. Sawyer (1986) proposa una classificació que subdivideix la classe *Hirudinea* en quatre subclasses: *Agriodrilidea*, *Branchiobdellidea*, *Acanthobdellidea* i *Euhirudinea* (taula I). Les tres primeres subclasses estan constituïdes per espècies que ocupen diferents posicions entre els dos grups principals de clitel.lats, els oligoquets i els hirudinis típics.

La sangonera medicinal, *Hirudo medicinalis* (Linnaeus, 1758) és un hirudini de l'ordre *Arhynchobdellida* -sangoneres caracteritzades per un nombre constant de segments (32 post-orals, amb la ventosa caudal formada per 7 segments), per tenir faringe, per l'absència de sistema vascular vertader separat del celoma i per la presència de teixit botridial- família *Hirudinidae*, constituïda per espècies hematofagues, acuàtiques o amfibies amb mandíbules.

El gènere *Hirudo* es caracteritza per tenir la vagina amb petits cecs, sense conducte vaginal, per tenir cap o poques papil.les salivars, i per no tenir solc longitudinal en la superfície ventral del llavi superior. Es troba a les regions Europeo-Paleàrtica i Sino-Japonesa.

*Hirudo medicinalis* té la ventosa caudal d'un diàmetre de 2/3 a 3/4 de la mida del cos. Es caracteritza per tenir a cada mandíbula de 60 a 100 dents. És una sangonera de dors marró fosc i ventre grisós. En el dors mostra unes ratlles més o menys irregulars amb ornaments de caràcter metamèric, de color groc-vermell, si bé els patrons de pigmentació varien segons els orígens de les diferents poblacions. Es coneix un únic sinònim d'*H. medicinalis*, *Hirudo officinalis* Savigny 1820.

## CL. HIRUDINEA

**S.CL. Agriodrilidea** n<sup>o</sup> de segments variable, amb quetes.  
Una sola espècie: *Agriodrilus vermivorous*.

**S.CL. Branchiobdellidea** 15 segments post orals, sense quetes, ventosa posterior en 3 segments.

### F. Branchiobdellidae

**S.CL. Acanthobdellidea** 29 segments post orals, quetes a 5 segments del cap, ventosa posterior en 4 segments.  
Un sol gènere: *Acanthobdella*.

**S.CL. Euhirudinea** 32 segments post orals, ventosa posterior en 7 segments.

**O. Rhynchobdellida** proboscide evaginable, sistema vascular vertader separat del celoma.

### F. Glossiphoniidae

### F. Ozobrachidae

### F. Piscicolidae

**O. Arhynchobdellida** sense sistema vascular vertader, amb teixit botridial, cocons amb embrions albuminotròfics.

**S.O. Erpobdelliformes** (faringobdel.lids)  
faringe sense trompa ni mandíbules.

### F. Erpobdellidae

### F. Salifidae

**S.O. Hirudiniformes** (gnatobdel.lids) faringe amb trompa o amb mandíbules.

Families predadores:

### F. Cylicobdellidae

### F. Americobdellidae

### F. Haemopidae

Families hematòfagues:

### F. Hirudinidae

### F. Haemadipsidae

TAULA I- Classificació dels hirudinis segons Sawyer (1986).

La posició sistemàtica d'*Hirudo medicinalis* és la següent:

Fílum: *Annelida*

Subfílum: *Clitellata*

Classe: *Hirudinea*

Subclasse: *Euhirudinea*

Ordre: *Arhynchobdellida*

Subordre: *Hirudiniformes*

Família: *Hirudinidae*

Subfamília: *Hirudininae*

Gènere: *Hirudo*

Espècie: *Hirudo medicinalis* Linnaeus, 1758

## HÀBITAT I DISTRIBUCIÓ

La distribució original d'*Hirudo medicinalis* s'extén pel sud-oest d'Europa fins als Urals i els països del nord-est del Mediterrani. Fins al segle XIX la sangonera medicinal era molt abundant per tota aquesta regió. Avui està pràcticament extingida o en perill d'extinció a quasi tot el seu territori degut a la intensa explotació de la qual va ser objecte en el segle passat, a les alteracions del hàbitat i a la mengua de les poblacions de granotes i mamífers de pastura que formen part important de la seva alimentació (Sawyer, 1986). Actualment, però, encara es poden trobar algunes poblacions d'*Hirudo medicinalis* a les maresmes de la Península Ibèrica i d'alguns països de l'Est (Molinas et al., 1989).

L'hàbitat característic d'*Hirudo medicinalis* és un estany d'aigües poc profundes, amb un substrat fangós voltat de vegetació litoral, especialment joncs (*Typha*). Aquests estanys poden secar-se alguns mesos de l'any, durant els quals els animals sobreviuen enterrats. Les granotes han de ser abundants, però els ramats de pastura o els cavalls no són necessaris durant totes les estacions.

## ANATOMIA EXTERNA I INTERNA

L'anatomia dels hirudinis ha estat estudiada per diversos autors. Es troba descrita en els tractats de Grassé et al (1959), Metglitsch (1978), Mann (1962), Paniagua i Nistral (1983) i en especial en l'obra de Sawyer (1986) "Leech biology and behavior". Seguidament es fa una breu introducció a l'anatomia dels hirudinis amb

especial referència al nostre model *Hirudo medicinalis*, basant-nos, si no s'indica el contrari, en la revisió de Sawyer (1986).

## Segmentació i anellació

Tots els clitel·lats estan dividits en unitats repetitives de segments que són més o menys iguals.

*Hirudo medicinalis*, com tots els Euhirudinis, té 34 segments que s'enumeren per convenció del I al XXIV.

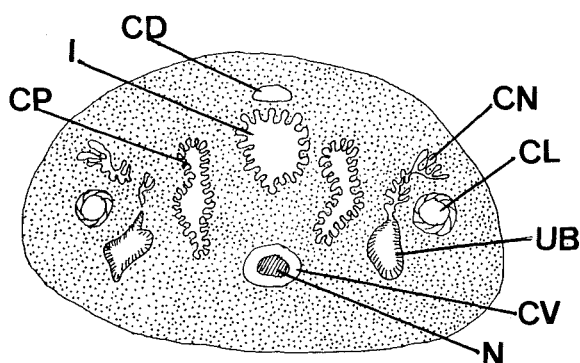
Els hirudinis es diferencien dels oligoquets per tenir diferents regions del cos reconeixibles externament, coincidint amb la segmentació constant. Les dos principals regions resulten de la cefalització i la caudalització. Són el cap i la ventosa caudal, que ocupen, en els Euhirudinis, 6 segments (I-VI) i 7 segments (XXVIII-XXXIV) respectivament. La regió mitja del cos està formada per 21 segments i s'hi pot distingir la regió clitel·lar (X-XII).

Els hirudinis es caracteritzen per presentar els segments subdividits en anells o ànuls, que no es corresponen amb la segmentació interior. L'anellació primària és de tres ànuls per segment, anomenats d'anterior a posterior a1, a2 i a3. L'ànul a2 s'anomena també ànul neural ja que s'hi troba el gangli i porta pèls sensitius.

L'ànul a1 pot estar subdividit en ànuls secundaris, b1 i b2, el a2 en b3 i b4 i el a3 en b5 i b6.

A *H. medicinalis*, que té l'anellació de cinc ànuls per segment en la major part del cos, a mesura que ens apropem als extrems cefàlic i caudal disminueix progressivament el nombre d'ànuls per segment. El patró d'anellació és el següent:

<u>segments</u>	<u>ànuls per segment</u>	<u>ànuls</u>
I-III	1	
IV-V	2	
VI-VII	3	a1-a2-a3
VIII	4	a1-a2-b5-b6
IX-XXIII	5	b1-b2-a2-b5-b6
XXIV	4	b1-b2-a2-a3
XXV	3	a1-a2-a3
XXVI	2	
XXVII	1	
XXVIII-XXXIV	fusionats formant la ventosa caudal	



**Fig. 1.** Esquema d'un tall histològic transversal fet en la regió posterior del cos. UB: bufeta urinària. CD: canal hemocelòmic dorsal. CL: canal hemocelòmic lateral contractil. CN: canal nefridial. CP: cec intestinal posterior. CV: canal hemocelòmic ventral. I: intestí. N: cordó nerviós.

## Sistema circulatori

En els hirudinis existeixen dos sistemes circulatoris, l'anomenat sistema sanguini i el sistema celòmic.

Entre els diferents grups de sangoneres es pot traçar una tendència filogenètica cap a l'especialització del celoma. En un extrem tenim una condició tipus oligoquet, amb el celoma espaiós dividit per septes i un sistema sanguini separat, característica dels branquiòbdèl·lides i acantòbdèl·lides. En una posició intermitja, els rincòbdèl·lides mostren un increment de la complexitat del celoma però mantenen encara el sistema sanguini. En l'altre extrem es troben els arincohdèl·lides, amb un alt grau d'especialització. Els representants d'aquest grup han perdut completament els vasos sanguinis ventrals i dorsals i altres remanents del sistema sanguini vertader. El celoma ha pres el protagonisme com a sistema circulatori i se l'anomena hemoceloma. El fluïd hemocelòmic, circula per canals que deriven ontogènicament del celoma (Sawyer i Fitzgerald, 1981; Sawyer, 1986).

El sistema hemocel·lòmic d'*Hirudo medicinalis* és representatiu dels arincohdèl·lides en general. Està comprès per un canal dorsal i un ventral no contractils i un parell de canals laterals amb parets musculars que actuen com a cors (fig. 1).

**Teixit botridial.** És característic dels arincohdèl·lids, deriba del sistema hemocelòmic i està en comunicació amb el canal ventral i els laterals. Està format per un sistema de canals revestits per de cèl·lules que contenen grànuls de pigment marró i es troba en el parènquima perivisceral. Funciona com un fetja

primitiu i està relacionat amb una gran varietat de processos metabòlics incloent: metabolisme lipídic, catabolisme dels carbohidrats, oxidació i detoxificació. A més serveix com a un reservori de deixalles. En les espècies hematòfuges magatzema el ferro resultant de la degradació de l'hemoglobina exògena durant tota la vida de l'animal. A *Hirudo medicinalis* ontogenèticament es pot veure com les cèl·lules botrials deriven de l'endoteli cel·lular. Les cèl·lules botrials són homòlogues de les cèl·lules cloragèniques dels branchiobdellids i acantobdellids i a les cèl·lules àcides dels rinchobdellids.

## Aparell digestiu

L'aparell digestiu dels hirudinis està constituït per una regió anterior ectodèrmica i una regió mitjana i posterior endodèrmiques (fig. 2). En les espècies hematòfuges, en la regió anterior, hi desenvolupen nombroses glàndules unicel·lulars encarregades de la formació de l'hirudina, una substància anticoagulant.

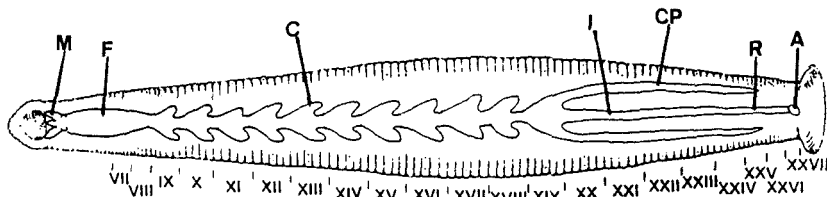


Fig. 2. Esquema de l'aparell digestiu. A: anus. C: cec digestiu. CP: cec posterior. F: faringe. I: intestí. M: mandíbules. R: recte.

El tub digestiu anterior d'*Hirudo medicinalis* consisteix en una cavitat bucal, una faringe muscular, tres mandíbules, cada una amb les seves dents i glàndules salivars associades. Tot el tub digestiu anterior està revestit per la cutícula.

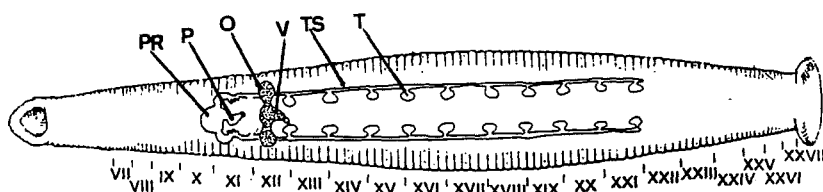
En la part mitja, el tub digestiu forma 10 parells de cecs, un per cada segment del IX al XIX. L'últim parell s'extén ventralment i posteriorment fins al segment XXV. La presència de nombrosos cecs és característica de les espècies hematòfuges.

La porció posterior del tub digestiu consisteix en un intestí curt que s'uneix al recte, la part final del qual està revestida de cutícula. El recte s'obre a l'exterior per un petit anus localitzat dorsalment en el segment XXVII.



## Aparell reproductor

Les sangoneres, com la resta de clitel·lats, són hermafrodites proteràndrics. Tant en l'oogènesi com en l'espermatogènesi, els gàmetes es produeixen a partir d'un epiteli germinal originat en les parets dels sacs celòmics dels segments XI i XII, que respectivament s'han especialitzat en testisacs i ovisacs (fig. 3).



**Fig. 3.** Esquema dels sistema reproductor. O: ovisac. P: penis. PR: prostata. T: pseudotestis. TS: testisac. V: vagina.

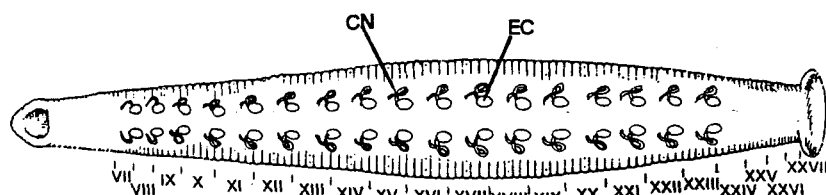
A *Hirudo medicinalis* el parell de sacs celòmics del segment XI s'expandeix cap enrera fins el segment XXII, donant lloc a dos testisacs allargats els quals formen sàculs a modus de pseudo-testis a nivell de cada intersegment. Abans de sortir a l'exterior, els dos testisacs s'uneixen en una pròstata que desemboca en un penis evaginable que s'obre a l'exterior ventralment per un gonòpor al segment XI.

El parell d'ovisacs es localitzen retroperitonealment a nivell de l'intersegment XI/XII. Aquests dos ovisacs s'uneixen en una vagina que s'obre a l'exterior ventralment pel gonòpor femení al segment XII.

El clitel està format per 15 anuls, del X b<sub>2</sub>/a<sub>2</sub> al XIII b<sub>2</sub>/a<sub>2</sub> inclosos. En l'estadi no reproductiu les cèl·lules clitel·lars no es distingeixen de la resta de les cèl·lules epitelials. En l'estadi reproductiu, aquestes cèl·lules augmenten de mida i contingut, donant lloc a un epiteli més gruixut. A més, el clitel es caracteritza per l'abundància de glàndules especialitzades.

## Aparell excretor

Els nefridis són estructures metamèriques que es donen a certs segments. Als hirudinis el major nombre de nefridis (17 parells) es dona als Hirudiniforms. Els seus nefròpors es localitzen del segment VIII al XXIV, i pertanyen a nefridis derivats de les posicions intersegmentals VII/VIII a XXIII/XXIV (fig. 4).



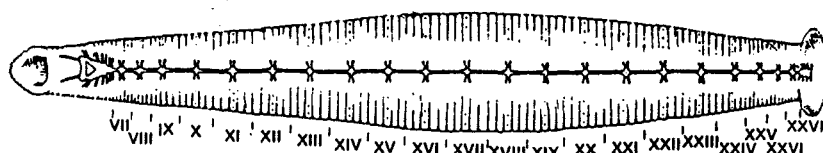
**Fig. 4.** Esquema de l'aparell excretor. CN: canal nefridial. EC: estructura ciliofagòtica.

El nefridi està format per dos parts: l'estructura ciliofagòtica i el canal nefridial, el lumen del qual s'obre o bé directament a l'exterior o bé, en el cas dels arincobdèl·lides, en una ampla bufeta urinària d'origen ectodèrmic.

Dins la bufeta, tocant les parets, s'hi troben bacteris que durant molt de temps han estat confosos per cilis. A *Hirudo medicinalis* s'hi han trobat dos espècies de bacteris: *Corynebacterium vesiculare* i *Corynebacterium nephridii*. Aquests bacteris tenen una funció poc clara en el procés de degradació de residus nitrogenats a amoníac.

## Sistema nerviós i sensorial

El sistema nerviós central dels hirudinis està format per 34 ganglis. Els 6 primers, associats als segments del cap (I-VI), estan fusionats, els 7 últims, associats amb els segments de la ventosa caudal (XXVIII-XXXIV), també estan fusionats i els 21 restants es troben en els segments VII-XXVII (fig. 5). El cordó nerviós ventral discorre lliurement per el canal hemocelòmic ventral.



**Fig. 5.** Esquema del sistema nerviós.

En comparació amb el sistema nerviós d'oligoquets, i de fet amb la majoria d'altres animals, el sistema nerviós de les sangoneres es destaca per no estar en absolut vascularitzat (escepte a branquiobdèl·lides). El transport de metabolits es

veu facilitat per la presència de grans espais intercel·lulars en conjunció amb un endoteli metabòlicament molt actiu i grans cèl·lules glials.

Hi ha tres classes de substàncies químiques que actuen de neurotransmissors en sistema nerviós central de les sangoneres: acetilcolina, monoamines biogèniques i aminoàcids. Les monoamines estan representades en les sangoneres per la 5HT (5-hidroxitriptamina o serotonina), la dopamina i l'octopamina. Entre els aminoàcids els possibles candidats són el GABA, l'àcid glutàmic i la glicina.

Hi ha dos tipus de receptors externs en els hirudinis: òrgans sensorials tegumentaris i mecanorreceptors. Els òrgans sensorials tegumentaris (ulls, sensilies i quimiorreceptors) estan formats per cèl·lules epitelials especialitzades. Els mecanorreceptors són neurones especialitzades, amb el soma en els ganglis segmentaris i terminacions a nivell subepidèrmic. Tenen diferents modalitats específiques que depenen dels tipus de deformació de la paret del cos: tacte, pressió i dolor (Blackshaw, 1981; Sawyer, 1986).

## COMPORTAMENT I CICLE BIOLÒGIC

### Hàbits alimentaris

En el grup dels hirudinis trobem espècies amb alimentació hematòfaga i altres amb hàbits depredadors.

*Hirudo medicinalis* té un tipus d'alimentació típicament hematòfag. Els individus en estat de repòs descansen en el fons de l'estany, enterrats en el fang o sota objectes submergits. Els individus actius responen intensament a les pertorbacions de l'aigua causades per un hoste potencial, inclús a varis metres de distància. La sangonera es mou ràpidament cap a la font de pertorbació per mitjà de la natació. Quan està pròxima a un hoste, la sangonera el reconeix per l'escalfor, amb una resposta òptima entre 33-40<sup>o</sup> C. i per quimiorreceptió. Els quimiorreceptors són especialment sensibles a la sang i al dolç (Sawyer, 1986). La sangonera mossega la pell per mitjà de les tres mandíbules i inicia la succió faríngea. S'alimenta uns 20 minuts durant els quals pot ingerir de 6 a 9 vegades el seu pes corporal en sang. Els individus saciats permaneixen quiescents mentre digereixen la sang per períodes de varies setmanes (Sawyer, 1986).

Els hostes naturals d'*Hirudo medicinalis* són principalment les granotes i els gripaus (*Rana esculenta*, *R. ridibunda*, *Bufo bufo*), mamífers (vaques, caballs i humans) i aus aquàtiques (*Anas platyrhynchos* i *Egretta garzetta*). Aparentment *Hirudo medicinalis* s'alimenta en primavera principalment de granotes i gripaus i

a l'estiu principalment de mamífers. A més, l'alimentació a partir d'amfibis pot ser obligada per les joves *Hirudos* que tenen dificultats per perforar la pell dels mamífers (Sawyer, 1986).

Les cries poden sobreviure períodes molt llargs sense alimentar-se, fins a uns 125 dies. Encara que algunes cries acabades de sortir del capoll ja s'alimenten d'alguna granota, la seva primera menjada no sol donar-se fins al cap de 10-20 dies, la segona 1-1,5 mesos després i la tercera uns 1,5-2 mesos després. Algunes sangoneres que no aconseguen menjar en aquests períodes poden atacar altres individus de la pròpia espècie plens de sang.

Un règim òptim a laboratori és, pels dos primers àpats, granotes, i pels següents, mamífers. Perquè les sangoneres es reproduïxin amb èxit al laboratori, és necessari un règim alimentari òptim amb uns 6 àpats en 12-18 mesos (Sawyer, 1986).

## **Reproducció i desenvolupament**

### **Reproducció**

Les sangoneres, com tots els clitel·lats, són hermafrodites proteràndrics i es reproduïxen per mitjà de capolls (Sawyer, 1986). La fertilització és interna. A rincobdèl·lides i erpobdeliforms la fecundació és traumàtica i hipodèrmica per injecció d'espermatozòfors. En canvi, els hirudiniforms han desenvolupat penis i vagina i es fecunden per copulació (Mann 1962).

Després de la fertilització les glàndules clitel·lars secreten un moc que embolcalla els ous, llisca cap a l'exterior i es tanca pels extrems formant el capoll (Mann 1962).

Els capolls d'*Hirudo medicinalis*, d'uns 13 X 20 mm, esponjosos i flotants, són dipositats fora de l'aigua, en el terra humit, especialment entre les arrels de les plantes. En un període de 1-12 dies, una sangonera diposita uns 4 o 5 capolls (amb una oscil·lació màxima de 1 a 8 capolls). Cada capoll conté de 12 a 16 (3-36) ous, alguns dels quals no són fèrtils (Sawyer, 1986).

L'historial alimentari i l'estat nutricional són factors molt importants per a la biologia reproductora d'*Hirudo medicinalis*. Per una reproducció exitosa és necessària una adequada alimentació durant els mesos de maig a juliol. Després d'una ingesta de sang s'estimula l'aparellament i, cap al quart dia després de la ingestió, es dona la maduració dels ovaris en els individus madurs. El temps entre l'alimentació i la deposició dels capolls és d'uns 30-60 dies. La deposició dels capolls té lloc principalment entre juliol i agost, però pot continuar fins al novembre en les regions més càlides.

A diferència d'altres espècies, *Hirudo medicinalis*, pot criar repetidament per un període de varis anys, a l'estació apropiada (Sawyer, 1986).

## **Desenvolupament**

La majoria dels hirudinis tenen ous vitel·lins i un desenvolupament directe, sense estadi larvari; excepte una adaptació embriològica secundària a un comportament albuminotròfic en algunes espècies, *Hirudo medicinalis* entre En les espècies albuminotròfiques el fluid que omplena el capoll és una font d'albumina per l'alimentació. Hi ha una pèrdua secundària de vitel i una reducció de la mida de l'ou. A l'embrió albuminotròfic se l'anomena criptolarva i no s'ha de confondre amb les larves de vida lliure dels poliquets (Sawyer, 1986).

El temps de desenvolupament està molt influenciat per la temperatura ambient. En el cas de les criptolarves dels arincobdèl·lides és de 28-29 dies a 24-26° C i de 35-45 dies a 18-20° C.

Les cries obren el capoll per un dels dos extrems, pesen uns 24 (16-39) mg amb una llargària d'uns 1,7 (0,7-3,5) cm. La mida depèn de la competició per l'albumina del capoll, per tant dels capolls amb menys embrions surten cries més grans (Sawyer, 1986).

## **Creixement**

El creixement pot ser de dos tipus: continu o saltatori. En les espècies amb creixement continu, l'increment de pes corporal després de menjar és menor que un mig del pes abans de menjar. La digestió és ràpida i l'alimentació freqüent. El creixement continu és el més generalitzat i és característic d'espècies amb hàbits hematòfags rudimentaris, com *Piscicola geometra*, i d'espècies depredadores. En contrast, les espècies amb creixement saltatori, després de menjar incrementen quatre vegades o més el seu pes corporal. La digestió és lenta i l'alimentació poc freqüent, podent passar setmanes o fins i tot mesos sense menjar. El creixement saltatori és propi de les grans espècies hematòfagues com *Haementeria ghilianii* i *Hirudo medicinalis* (Sawyer, 1986).

## MATERIAL I MÈTODES

La metodologia seguida en aquest treball consisteix en la pràctica experimental de ferides a *Hirudo medicinalis* i en l'estudi seqüencial dels processos de regeneració a través de la microscòpia òptica i de la microscòpia electrònica d'escànnig i tranmissió.

En aquest capítol es descriuen, d'una part, un conjunt de mètodes emprats per a l'obtenció, cultiu al laboratori i manipulació experimental dels exemplars i, d'altra part, les diverses tècniques histològiques utilitzades. Dins d'aquestes s'inclouen els mètodes generals, tant de microscòpia òptica com electrònica, i les tècniques histoquímiques i d'altres mètodes específics, com el marcatge amb lectines per a la identificació de la làmina basal, el marcatge dels filaments d'actina amb fal.loïdina, la utilització d'anticossos monoclonals per a l'estudi de la proliferació cel.lular i el marcatge amb prolina tritiada per a l'estudi de la regeneració de la matriu connectiva.

## MATERIAL BIOLÒGIC

### Obtenció dels exemplars

#### Procedència dels exemplars

Els exemplars d'*Hirudo medicinalis* utilitzats en aquest estudi bé procedeixen de diversos estanys pròxims a Cantallops, a l'Albera (fig. 6), o bé han estat suministrats per Biopharm (UK).



**Fig. 6.** Juny 1991. Estanys de l'Albera, Cantallops.

Situada en la Mediterrània nord-occidental, l'Albera gaudeix d'un clima càlid i sec a l'estiu i suau i humit a l'hivern. En les abundants depressions que forma el terreny, l'aigua dolça s'embassa en l'època plujosa per evaporar-se lentament en el període d'estiatge donant lloc a la formació de llacunes semipermanents o estanys intermitents de règim vernal.

La sangonera medicinal, avui pràcticament desapareguda, presenta en aquesta zona una important població. Població que es manté gràcies a les excel·lents condicions de l'hàbitat per l'abundància de vertebrats i especialment de mamífers de pastura, juntament amb un baix grau de contaminació ambiental.

La colònia més abundant és a l'Albera, als estanys de can Nadal, en el municipi de Cantallops. Una colònia amb exemplars vigorosos de totes les edats, ben nodrits i que disposen de sang de mamífers - el ramat de vaques de pastura.

### **Captura dels exemplars**

Per atreure els exemplars és suficient moure's per l'interior de l'estany, provocant moviments ondulatoris que els serveixin d'orientació envers una possible presa.

Les sangoneres es poden recollir amb les mans o amb un salabret metàl·lic mentre neden, o bé es pot esperar a que s'enganchin a les botes d'aigua, que confonen amb el possible hoste, i recollir-les amb els dits o unes pinces.

S'ha comprovat que la millor manera de recollir-les sense malmetre-les és amb els dits. La sangonera medicinal tarda uns segons des que entra en contacte amb l'hoste fins que li clava les mandíbules, el suficient per donar temps a agafar-les i dipositar-les en un flascó. Amb tot, es poden fer servir guants de goma per protegir-se.

Per al seu transport al laboratori es posen en pots de boca ampla ben tapats amb una mica d'aigua de l'estany al fons.

Per al transport a distàncies llargues es dipositen a sobre d'una capa de molsa ben humida amb un paper secant com a suport, s'enrotlla i es posa dins un flascó amb petits orificis a la tapa. Empaquetades d'aquesta manera poden aguantar alguns dies i fins i tot es poden enviar per correu com a paquet postal.

El rendiment de les captures és variable. El que sigui més o menys abundant depèn de molts factors: de l'estat nutricional, ja que els exemplars saciats passen llargs períodes quiescents; del nivell de dessecament dels estanys, ja que amb els estanys pràcticament secs no s'ha aconseguit trobar cap sangonera; i de la temperatura, ja que amb el fred hivernen al fang. També s'ha observat que en dies ventosos és difícil la recollecció. Les ones de vibració constants ocasionades pel vent, fan que els exemplars no responguin a la pertorbació ocasionada per la presència d'un possible hoste.

### **Manteniment i cultiu al laboratori**

Es poden mantenir al laboratori en aquaris o simplement en recipients de boca ampla ben tapats amb petits orificis per a la ventilació i una mica de sorra al fons. No cal oxigenació forçada. Els aquaris han d'estar situats en un lloc fresc i fosc. Preferentment s'ha d'utilitzar aigua de pluja o de pou, encara que també es pot fer servir aigua de l'aixeta descloritzada per aireació durant 24 hores. La temperatura de l'aigua pot oscil·lar entre els 18 ° i els 25° C.



Per al treball s'han escollit animals adults ben nodrits que no necessiten alimentar-se fins al cap de varies setmanes. El ritme d'alimentació al laboratori ha estat d'una vegada cada tres mesos. Per a l'alimentació dels exemplars en captivitat s'ha utilitzat fetge de porc fresc o sang de porc o de vedella heparinitzada introduïda dins d'un budell de porc.

En aquestes condicions de laboratori els exemplars es mantenen sans i vigorosos, es produeix el procés de maduració sexual i fins i tot es poden obtenir capolls fèrtils.

La cria de sangoneres, però, requereix de condicions més acurades. La terra es posa en els aquaris de forma que faci un desnivell. En la part superior, en l'interfase aigua-aire, es diposita molsa a fi de que les sangoneres puguin dipositar els capolls. S'incorpora un sistema de circulació d'aigua i filtració i s'ha de controlar l'eutrofització.

Els exemplars nascuts en el laboratori han estat alimentats amb granotes a les tres setmanes de sortir del capoll.

## **Solucions fisiològiques per hirudinis**

### **Composició i osmolaritat del fluid hemocel.lòmic**

En *Hirudo medicinalis* els anions del fluid hemocel.lòmic inclouen nitrat, fosfat, sulfat i anions orgànics. Els cations majoritaris són sodi calci i potasi. El contingut en aminoàcids és baix. L'osmolaritat total és de 201 mOsm i el pH oscil.la entre 7,32 i 7,48 (Sawyer, 1986). Molinas (comunicació personal), utilitzant un osmòmetre Wescor Inc. 5100B de pressió de vapor, determinà un valor per l'*Hirudo medicinalis* comprès entre 210 i 215 mOsm/kg.

### **Solucions fisiològiques**

Les solucions fisiològiques utilitzades són:

- a) Solució salina 0,6% ClNa 205 mOsm (pàg. 279)
- b) Solució fisiològica de Nicholss i Kuffler per a sangoneres pH 7,4 (Sawyer i Fitzgerald, 1981) (pàg. 279)

## **MANIPULACIÓ EXPERIMENTAL**

### **Anestèsia, recuperació i sacrifici**

Per a l'anestèsia dels animals s'ha escollit un mètode que, amb una irritació mínima, produeixi la màxima relaxació i que permeti una bona recuperació. De les solucions anestèsies provades: aigua carbònica, solució al 2% d'hidrat de cloral i etanol al 8%, és aquesta última la que s'apropa més a les condicions abans esmentades. També s'han fet proves d'anestèsia mitjançant el fred, sense resultats satisfactoris.

Per l'anestèsia amb etanol es posa l'exemplar en un flascó amb aigua i lentament s'hi va afegint etanol fins arribar a una concentració del 8%. És imprescindible que l'etanol utilitzat sigui pur, sense agents desnaturalitzants, per a la bona recuperació dels exemplars. Deixant el flascó tapat els animals queden anestesiats al cap d'uns 10-15 minuts.

Per a l'observació és important que les sangoneres siguin fixades en un bon estat de relaxació. Si encara són vives, en posar-les en fixadors com l'alcohol al 70% o el formol al 4% es contrauen fortament. En canvi una excessiva relaxació en cloroform o clorur de magnesi causa la desaparició dels solcs entre els ànuls.

Un bon mètode per assegurar la mort dels exemplars en un estat de relaxació adequat és anestesiar els animals amb concentracions creixents d'alcohol etílic fins arribar al 10% i perllongar la narcosi uns 40 min. Llavors es retiren les sangoneres, es posen entre els dits per estirar-les i retirar l'excés de moc i a continuació es procedeix a la seva fixació.

### **Higiene i desinfecció**

Abans de practicar les manipulacions quirúrgiques és convenient retirar el moc que recobreix l'animal i netejar la zona amb un cotó moll d'alcohol al 8%. No es pot utilitzar un alcohol d'alta graduació perquè produeix cremades a les cèl·lules epidèrmiques. Acabada l'operació es neteja la ferida amb cotó moll d'alcohol al 8% i es deixa que l'animal es recuperi de l'anestèsia en una solució de clorina (p-toluè sulfocloramida de sodi) per evitar la infecció.

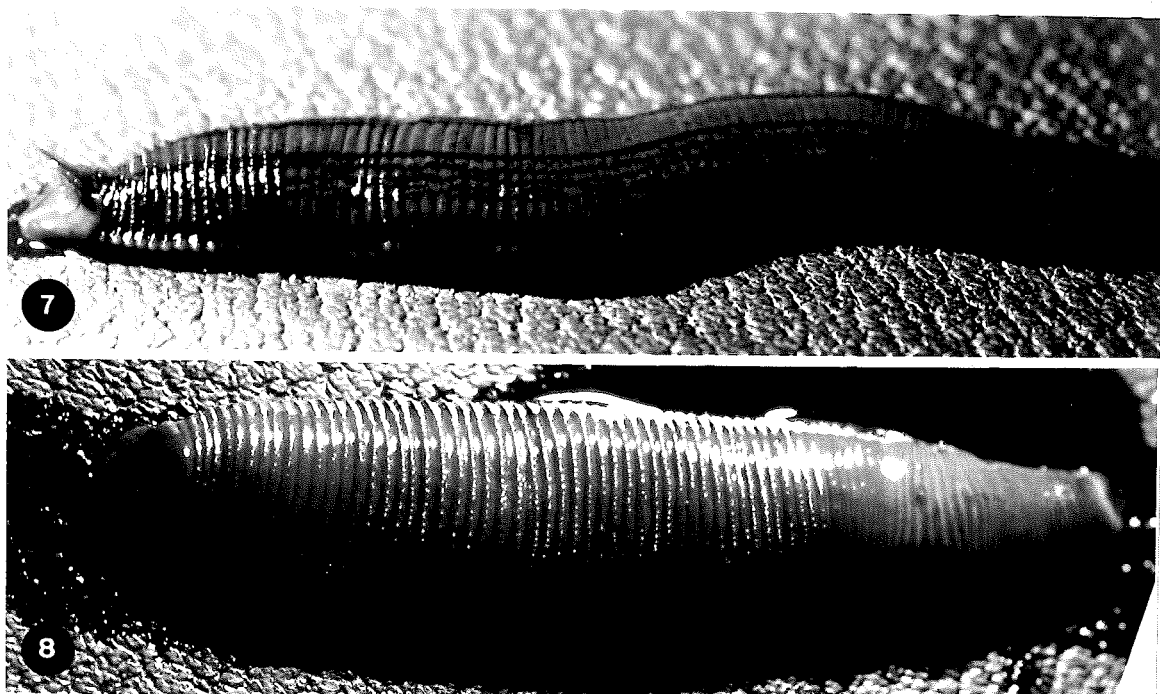
### **Realització de les ferides**

#### **Localització de les ferides**

Per realitzar les ferides s'ha escollit la zona del cos de l'animal que sembla més adequada per facilitar l'observació del procés de regeneració.

En el cos d'*Hirudo* es poden distingir 6 regions: cefàlica, preclitel.lar, clitel.lar, posterior, anal i caudal. Les regions cefàlica, clitel.lar, anal i caudal s'han descartat perquè presenten una gran complexitat anatòmica. La regió preclitel.lar té l'inconvenient de presentar la paret corporal amb una musculatura molt poderosa que volta la faringe i molt poc teixit connectiu i a més és una zona relativament curta que no permet realitzar ferides gaire extenses.

La zona que anomenada posterior es troba per sota de la regió clitel.lar i per sobre de l'anús, i a més és relativament llarga, la qual cosa permet la realització de ferides força extenses, facilitant-ne el seu estudi. Les ferides s'han realitzat a la zona posterior, aproximadament entre els anells 60 i 85, d'uns 5 mm de longitud.



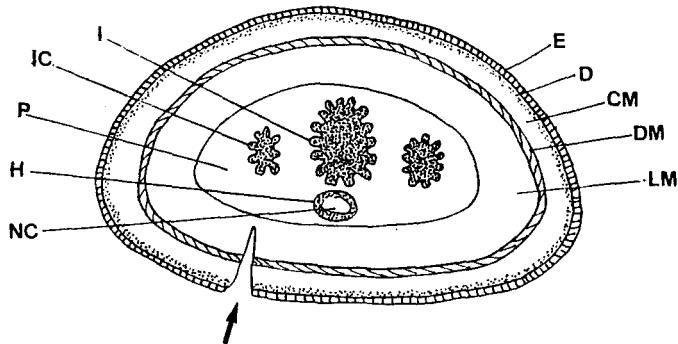
**Fig. 7.** Visió dorsal d'un exemplar d'*Hirudo medicinalis*. **Fig. 8.** Visió ventral.

S'ha escollit la part ventral de l'animal perquè és la menys pigmentada (figs. 7 i 8). El pigment del tegument de la sangonera interfereix en l'observació tant en la microscòpia òptica, on apareix com una granulació marró, com en l'electrònica de transmissió, on apareix en forma de grànuls electrodensos. En la part dorsal, els espais intercel.lulars del tegument estan envaïts per les perllongacions citoplasmàtiques de les cèl.lules pigmentàries. En canvi a la part ventral, encara que també s'hi troben cèl.lules pigmentàries, són molt més escasses.

Les ferides s'han realitzat en direcció dorso-ventral, en una situació mèdio-lateral per a no malmetre el cordó nerviós. S'ha de procurar no tallar els vasos hemolimfàtics laterals.

### Ferides per incisió

Per a la realització de les ferides s'ha utilitzat un bisturí estèril. Les ferides afecten les capes epidèrmica i dèrmica del tegument i les tres capes musculars: la circular, diagonal i longitudinal (figs. 9 i 10). S'ha intentat que la ferida no afectés, sempre que sigui possible, al parenquima perivisceral.



**Fig. 9.** Esquema d'una secció transversal d'un exemplar d'*Hirudo medicinalis*, amb una ferida ventral per incisió. La ferida afecta l'epidermis, dermis i musculatura circular, diagonal i part de la longitudinal (fletxa). CM: musculatura circular, D: dermis, DM: musculatura diagonal, E: epiteli, H: canal hemocel·lòmic ventral, I: intestí, IC: cec intestinal, LM: musculatura longitudinal, NC: cordó nerviós, P: parenquima perivisceral.



**Fig. 10.** Esquema de la situació, a la part ventral, d'una ferida (fletxa).

S'han realitzat sèries de ferides en les que els animals se sacrifiquen a diferents temps després de la realització de la incisió. S'han realitzat:

- 2 sèries per al seu processat en MET de: 10', 4 h, 8 h, 12 h, 24 h, 48 h, 3 dies, 7 dies, 9 dies, 14 dies, 15 dies i 7 mesos.
- 2 sèries per a MO amb els mateixos temps que els realitzats en les de MET i a més: 1 h, 33 dies i 57 dies.
- 1 sèrie per a MES de 1 h, 12 h i 48 h.

A més, en els diferents estudis de marcatge s'han realitzat altres sèries, que es detallaran als seus apartats corresponents, en les que s'han inclòs altres períodes.

En total, els períodes observats han estat:

10', 1 h, 2,5 h, 4 h, 5 h, 6h, 8 h, 12 h, 19 h, 20 h, 24 h, 32 h, 48 h, 52 h, 3 dies, 4 dies, 5 dies, 6 dies, 7 dies, 8 dies, 9 dies, 10 dies, 11 dies, 12 dies, 13 dies, 14 dies, 15 dies, 16 dies, 17 dies, 19 dies, 21 dies, 25 dies, 28 dies, 33 dies, 57 dies, 60 dies, 7 mesos i 8 mesos.

### **Ferides per cauterització**

La cauterització es realitza amb l'aplicació durant un segon d'un filament de platí incandescent sobre la superfície ventral de l'animal. S'obté una banda cremada superficial d'aproximadament 1 cm de llargària per 2,5 mm d'amplària.

S'han realitzat sèries de cremades amb 2 exemplars per cada temps de:

- 1 sèrie per a MO de: 1 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 3 dies, 7 dies, 1 mes i 3 mesos.
- 1 sèrie per a MES de 1 h, 12 h, 24 h i 48 h.

### **Cremades per nitrat de plata**

Les cremades per nitrat de plata s'han realitzat mitjançant l'aplicació d'un cotó impregnat amb una solució concentrada de nitrat de plata. S'envolca una quantitat molt petita de cotó en la punta d'una agulla enmanegada, es sumergeix en la solució de nitrat de plata i s'asseca una mica amb paper de filtre. Seguidament es passa la punta de l'agulla per la superfície de l'animal sense presionar massa, obtenint-se una cremada d'aproximadament 1 cm de llargària.

S'han realitzat sèries de cremades amb 2 exemplars per cada temps de:

- 1 sèrie per a MO de: 10', 4 h, 24 h, 48 h, 6 dies, 8 dies, 15 dies, 30 dies, 36 dies i 63 dies.
- 1 sèrie per a MES de: 10', 12 h, 24 h, 48 h, 3 dies, 5 dies, 7 dies, 22 dies i 30 dies.

## **Tractament amb colquicina**

Per augmentar la provabilitat d'observar mitosis en el procés de regeneració s'ha fet un tractament amb colquicina, que té la propietat de bloquejar les cèl.lules en mitosi.

La dosi recomanada per Salò et al (1984) en planàries és de 0,05%.

En una sèrie de sangoneres amb ferides per incisió de 15 dies, 6 dies, 3 dies, 24 h i 1 h i una de control sense ferida, se'ls han injectat 0,05 ml de colquicina 0,05% en la part ventral prop de la ferida. Al cap de 4 h se sacrifiquen els exemplars prèvia anestèsia i es processen per a la seva inclusió en glicol metacrilat o per a la realització d'"squashos".

## **Estudi de l'activitat fagocitària dels amebòcits**

Per poder estudiar les cèl.lules lliures de l'hemolimfa, els amebòcits, i la seva capacitat fagocitària *in vitro*, s'han preparat monocapes d'amebòcits i s'han incubat amb diferents agents.

### **Obtenció d'amebòcits**

L'obtenció d'hemolimfa s'ha fet a partir del vas ventral. Amb l'animal anestesiàt, es practica un petit tall en la part ventral, just per darrere de l'anús. D'aquesta manera s'evita que juntament amb el líquid hemocel.lòmic es recullin restes del contingut del tub digestiu. Es deixen sortir unes gotes de líquid hemocel.lòmic i es recullen amb una micropipeta. Per accelerar la sortida del líquid hemocel.lòmic es pot posar la sangonera vertical, però s'ha de tenir cura de no premer l'animal, ja que es podria afavorir la sortida d'altres tipus cel.lulars dels teixits que han quedat exposats per la ferida.

### **Obtenció de monocapes**

L'hemolimfa es diposita sobre un portaobjectes que ha d'estar esterilitzat previament durant 4h a 180° C per assegurar que no hi hagi cap endotoxina. A sobre s'hi diposita una gota de solució fisiològica de Nicholls i es deixa que les cèl.lules sedimentin i s'adhereixin al substrat durant 10-15 minuts en cambra humida.

Seguidament es renta amb solució fisiològica per retirar les cèl.lules no adherides.

També s'han utilitzat portaobjectes d'adhesió (Superior 17 I 512) que porten un tractament que facilita l'adherència de les cèl.lules al substrat i eviten la seva pèrdua durant la manipulació posterior.

## **Incubació**

L'estudi de l'activitat fagocitària *in-vitro* dels amebòcits s'ha fet incubant-los amb diferents agents: carbó coloidal (Taab) en una suspensió diluïda a unes  $30 \times 10^4$  partícules/ml, una suspensió de bacteris *Escherichia coli* de l'ordre de  $10^4$ /ml, una suspensió de *E. coli* com l'anterior tenyida amb taronja d'acridina al 0,01%, una suspensió *Saccharomyces cerevisiae* de l'ordre de  $10^4$ /ml, i una dilució 1:10 de sang de vaca heparinitzada.

Les partícules: carbó, bacteris, llevats o eritròcits, s'han centrifugat a 1500 rpm i resuspès en solució fisiològica de Nicholls, i s'ha repetit l'operació tres vegades.

La incubació dels amebòcits amb els diferents agents s'ha fet o bé en monocapa o bé en suspensió.

La incubació en monocapa s'ha fet afegint a una gota d'hemolimfa una gota de la suspensió de partícules corresponent i deixant-les incubar durant 45 min sobre un portaobjectes d'adhesió.

Per a la incubació en suspensió s'han recobert els portaobjectes amb una capa de parafina a fi d'evitar l'adhesió dels amebòcits. S'hi han dipositat una gota d'hemolimfa i una gota de la suspensió i s'ha deixat incubar durant 1 h. Seguidament s'ha depositat aquesta suspensió en un portaobjectes d'adhesió i s'ha deixat incubar 10 min més perquè s'hi adhereixin els amebòcits.

Acabada la incubació es renta amb solució fisiològica de Nicholls.

## **Microscòpia òptica**

Les preparacions es poden conservar submergides en alcohol de 70° o bé fixades amb vapors de formol durant 30 min.

L'observació en MO es fa amb contrast de fase amb un microscopi Docuval Zeiss o bé, en el cas de la incubació amb *Escherichia coli* tenyida amb taronja d'acridina, en un microscopi Olympus Vanox equipat amb epifluorescència.

## **Microscòpia electrònica d'escànnig**

Per al seu estudi en MES, es fixen en formaldehid-glutaraldehyd (pàg. 279) i es deshidraten en la sèrie alcohòlica: alcohol 30°, alcohol 50°, alcohol 70°, alcohol 96°, alcohol absolut 1 i alcohol absolut 2, amb passos de 5 min. cadascun. Es poden guardar a la nevera en alcohol absolut durant un cert període per ser posteriorment processats.

Per a la MES s'ha utilitzat un Cambridge S4 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

## MICROSCÒPIA ÒPTICA

S'han emprat diferents tècniques de preparació del material per a l'observació de les mostres en microscòpia òptica. Les observacions s'han fet en un fotomicroscopi Vanox (Olimpus) equipat amb epifluorescència i amb filtres d'interferència de Normanski. Les observacions fetes amb contrast de fase s'han realitzat en un fotomicroscopi Docuval (Zeiss).

Per la seva importància metodològica, les tècniques de marcatge amb lectines i de detecció de proliferació cel.lular mitjançant anticossos monoclonals es decriuen en un apartat diferent .

Per a la fotografia, s'ha utilitzat un filtre LBD i pel.lícula Ektacrome 100 ASA per a les diapositives en color i un filtre verd IF 550 i pel.lícula Kodak T MAX 100 ASA per a la fotografia en blanc i negre.

Per a la observació rutinaria dels talls s'ha emprat la tècnica d'inclusió en glicol metacrilat. El glicol metacrilat és un material que permet obtenir seccions semifines de peces relativament grans, sense necessitat d'emprar mitjans molt sofisticats. Per a la realització de proves de tipus histoquímic, com el marcatge amb lectines o la detecció de mitosis per anticossos monoclonals, s'han utilitzat les tècniques d'inclusió en parafina o de congelació. També s'han utilitzat altres tècniques per a l'obtenció de preparacions: les extensions d'hemolimfa o moc i la tècnica d'aplatament o "squash" de seccions transversals de la sangonera.

## Fixació

Com a fixador universal s'ha emprat el formol al 10% en tampó fosfat de Sørensen pH 7,2 0,05 M (pàg. 277). El temps de fixació varia segons la mostra, oscil.lant entre dues i quatre hores. Després de la fixació es renten les mostres acuradament amb el mateix tampó.

En algunes de les tècniques s'han utilitzat altres fixadors:

Per a la fixació dels exemplars destinats a l'observació de mitosis per la tècnica d'"squash", s'ha utilitzat el líquid de Carnoy (pàg. 279) amb un temps de fixació de 15 min.

En l'estudi de la capacitat fagocitària dels amebòcits, les monocapes han estat fixades amb vapors de formol durant 30 min.

En l'estudi de detecció de proliferació cel.lular per anticossos monoclonals, en mostres processades amb parafina, s'ha fet servir el formol al 10% en tampó fosfat de Sørensen pH 7,2 0,05 abans esmentat, però també s'ha provat el fixador recomanat en el protocol Amersham: formol al 10% en PBS 0,1 M pH7,4 (pàg. 278). El temps de fixació ha estat d'entre 3 i 4 hores. En mostres processades per



criotomia els talls es fixen per immersió en acetona absoluta durant 20 minuts i en alcohol àcid (pàg. 278) durant 30 minuts.

## **Mètode de la parafina**

Es deshidraten les mostres en una sèrie etílica fins arribar a alcohol absolut. S'aclareixen amb dos banys de toluol i s'inclouen en parafina pF 56-58° C PANREAC, medi d'inclusió de teixits MEDIM-Plast pF 52 °C (DDM) o medi d'inclusió de teixits Para-Clean pF 54-56 °C (Kliniphath).

Per a l'obtenció dels talls es fa servir un micròtom Reichert tipus Minot. Les seccions obtingudes són de 5 a 7 µm.

## **Mètode del glicol-metacrilat (GMA)**

La utilització histològica del GMA requereix la imbibició dels teixits pel monòmer 2-hidroxietil metacrilat o glicol metacrilat i la posterior polimerització per formar els blocs.

Previa deshidratació en sèrie etílica, les mostres han estat incloses en GMA pel mètode d'inclusió per polimeració en fred (Bonet, S. i Molinas, M. 1983). La inclusió en GMA es pot fer per polimerització dels plàstics a l'estufa a 60° C o bé per polimerització en fred. La primera proporciona resultats excelents per a teixits vegetals, la segona és molt més ràpida i permet aplicar el mètode per a estudis histoquímics.

### **Inclusió per polimerització en fred:**

Solucions:

Solució infiltradora

2-hidroxietil metacrilat (monomer)	80,0 ml
2-butoxietanol (regulador)	8,0 ml
benzoil peròxid (polimeritzador)	0,5 g

Solució promotora

polietilen glicol (pastificant)	8,0 ml
N-N dimetil anilina (accelerador)	1,0 ml

(Amdues solucions poden conservar-se durant uns mesos a la nevera).

Procediment:

1-Transferir les peces a la solució infiltradora. Dos canvis de 12h seran suficients

2-Barrejar acuradament la solució infiltradora amb la promotora en proporció 42:1, realitzant l'operació en un bany de gel, de tal manera que, encara que la reacció sigui fortament exotèrmica, no se sobrepassin els 20°C. Aquesta proporció pot oscil·lar entre 50:1 (blocs més durs i polimerització més lenta) i 50:1,5 (blocs més tous i polimerització més ràpida).

Transferir les mostres a aquesta solució per a la realització dels blocs.

Convé evitar el contacte de l'oxigen que inhibeix la correcta polimerització, per la qual cosa s'utilitzen càpsules tipus "Ependorf" tapades.

3-Col·locar els motlles al refrigerador (4°C). La polimerització comença al cap de dues hores i pot donar-se per acabada tres hores més tard.

S'han obtingut talls de 3 a 5 µm amb un micròtom 1150- Autocut Reichert-Jung.

## **Mètode de la congelació**

Per a l'obtenció dels talls per criotomia s'han utilitzat dues tècniques de congelació de les mostres: per immersió en nitrogen líquid i per congelació directa en el micròtom de congelació. La utilització de nitrogen líquid permet refredar la mostra molt ràpidament a temperatures molt baixes per la qual cosa s'afavoreix l'obtenció de talls molt primers amb l'estructura molt ben conservada. En la tècnica de la congelació directa ni la rapidesa ni el grau de congelació són tan efectius, però és més apropiada per a l'aplicació rutinària, amb resultats suficientment bons.

Per a la congelació en nitrogen líquid, les mostres, sense fixar, es col·loquen en un suport de suro i s'envolten de medi d'inclusió per criotomia de la casa Reichert-Jung, es submergeixen durant 30 segons en un líquid de transferència, l'isobutil-pentà, prèviament refredat en nitrogen líquid, i després es transfereixen a nitrogen líquid. Un cop congelades es tallen en un criòtom Bright o un criòtom Criocut-1800 Reichert-Jung, a una temperatura de -35° C. Les seccions, d'uns 8 µm, es recullen en portes gelatinats i es deixen assecar a l'aire durant 15 minuts.

En la tècnica de congelació directa es processa una secció transversal de l'exemplar d'uns 5 mm. Aquestes seccions es col·loquen sobre el portamostres, s'envolten de medi d'inclusió per criotomia Reichert-Jung i es deixen en l'àrea del criòtom destinada a la congelació de les mostres. Un cop congelades es tallen amb un micròtom Criocut-1800 Reichert-Jung a una temperatura de -30° C. Les

seccions, d'uns 10 µm, es recullen en portes gelatinats i es deixen assecar a l'aire com en el cas anterior.

## **Extensions**

S'han realitzat extensions de líquid hemocel·lòmic i de moc per a la seva observació en microscòpia òptica.

### **Extensions de líquid hemocel·lòmic**

Per a la realització d'extensions s'ha obtingut el líquid hemocel·lòmic de la forma descrita anteriorment. S'ha col·locat una gota de líquid hemocel·lòmic en un portaobjectes, s'ha realitzat l'extensió i s'ha deixat secar a l'aire abans de realitzar les diferents coloracions.

### **Extensions de moc tegumentari**

L'alcohol al 8% utilitzat per a l'anestèsia provoca en la sangonera la secreció de moc per part del tegument. Aquest moc es pot recollir fàcilment amb una pipeta, posar una gota a sobre d'un portaobjectes i realitzar l'extensió de la manera habitual. Un cop realitzades les extensions de moc s'han deixat assecar a l'aire abans de la seva coloració.

## **Mètode de squash**

L'observació de mitosis pel mètode d'"squash" o aplatament s'ha fet en una sèrie de sangoneres sacrificades en diferents temps després de la realització d'una ferida per incisió: 15 dies, 6 dies, 3 dies, 24 h i 1 h i una control sense ferida.

Els exemplars enters s'han fixat amb líquid de Carnoy (pàg. 279) durant 15 min. Seguidament s'han obtingut seccions transversals d'uns 2 mm de gruix amb un bisturí.

Les seccions es tenyeixen amb orceïna aceto-làctica, orceïna acètica (pàg. 286) o carmí boràcic (pàg. 283), en un vidre de rellotge.

També s'han processat seccions en les quals s'havia fet una digestió, previa a la tinció, amb CIH 20% a temperatura ambient durant 5-7 minuts

Seguidament s'ha procedit a la realització dels "squashos" col·locant cada secció amb una gota de glicerina entre un portaobjectes i un cobreobjectes i fent una petita pressió amb el dit. Les preparacions s'han segellat amb laca d'ungles abans de la seva observació.

## Coloració i muntatge

A més de les coloracions generals per a l'observació rutinària dels talls s'han realitzat diverses coloracions histoquímiques. La descripció detallada dels diferents protocols es descriu en l'annex 2.

### Talls en parafina

Les seccions procedents de blocs de parafina s'han desparafinat amb toluol i rehidrat amb una sèrie etílica abans de procedir a la coloració. En les seccions procedents de la criotomia s'aplica la coloració directament.

#### Generals:

-**Hematoxilina de Delafield-eosina.** (pàg. 284).

#### Metacromàtiques:

-**Blau de toluídina.** Amb aquesta coloració els mucopolisacàrids àcids presenten metacromasia de tipus beta (color violeta no persistent després d'un tractament amb alcohol), i els mucopolisacàrids sulfatats metacromasia de tipus gamma (color vermell que suporta el tractament amb alcohol). En aquestes preparacions la deshidratació s'ha fet amb una sèrie d'acetones (pàg. 282).

#### Impregnacions:

- **Impregnació argèntica de Gomori.** Posa de manifest les fibres connectives; les fibres reticulars queden negres i les col.làgenes d'un to ataronjat (pàg. 285).

#### Histoquímiques:

-**Blau de coomasie.** El blau de coomasie s'utilitza normalment per a la detecció quantitativa de proteïnes en espectrofotometria (Bradford, 1976). Com que és un mètode molt sensible i presenta poques interferències l'hem adaptat per a ús histoquímic (pàg. 281).

-**Reacció del blau de Prússia** segons el mètode de Perls, 1867. Per a la detecció de ferro en estat fèrric. Hi ha un pigment marró-daurat anomenat hemosiderina que conté ió fèrric que es pot demostrar amb aquesta reacció. També es troba ferro associat a l'hemoglobina, però està lligat a la proteïna molt fortament i en aquesta forma no és susceptible de demostració. Un tractament curt amb peròxid d'hidrogen a 100 volums pot alliberar suficient ferro per demostrar-lo amb la reacció del blau de Prússia (pàg. 282).

Les preparacions procedents de blocs de parafina s'han muntat en medi hidròfob Entellan (Merk) previa deshidratació i aclariment amb toluol o bé en medi hidròfil Acuvitrex (Analiticals).

## **Talls en GMA**

En les seccions procedents de blocs de GMA no s'ha de retirar el plàstic ja que la seva hidrofília permet aplicar la coloració directament sense necessitat de desplastificar ni rehidratar. El plàstic pot quedar tenyit dèbilment amb algun dels colorants, però aquest fet no interfereix en l'observació. L'aplicació de les tècniques de coloració requereix una adaptació per aquest medi d'inclusió.

Generals:

-**Hematoxilina de Harris-eritrosina** (pàg. 284).

Metacromàtiques:

-**Blau de toluïdina** (pàg. 282).

Impregnacions:

- **Impregnació argèntica de Gomori** (pàg. 285).

Histoquímiques:

-**Blau d'alcià-PAS**. Aquest mètode permet diferenciar els mucopolisacàrids neutres, PAS positius, dels mucopolisacàrids àcids, positius en la coloració amb blau d'alcià (pàg. 281).

-**Blau de coomasie** (pàg. 281).

Les preparacions procedents de blocs de GMA, una vegada acabada la coloració i després de rentar-les acuradament amb aigua destil·lada, s'assequen a l'aire o sobre una placa calefactora i es munten amb Entellan.

## **Talls per congelació**

Generals:

-**Hematoxilina de Delafield-eosina**. (pàg. 284).

Específiques:

-**Sudan per grasses i fosfolípids**. Els colorants de Sudà tenyeixen els greixos (pàg. 286).

-**Sudan per lípids**. Es pot fer un pre-tractament amb brom per evitar l'extracció de lecitina i àcids grassos durant els passos amb alcohol i, a més, converteix el colesterol en bromo-derivats que són sudanofílics (pàg. 287).

El muntatge de les preparacions s'ha fet com en el cas de les preparacions de parafina o amb glicerina.

## **Extensions**

Extensions de líquid hemocel·lòmic:

- **Wright**. Coloració hematològica (pàg. 287).
- **Giems**a. Coloració hematològica (pàg. 283).

Extensions de moc:

- Blau de coomasie** (pàg. 281).

## **Tècniques de squash**

Coloracions nuclears:

- Orceïna acètica**. Coloració nuclear que permet un excel·lent estudi del cariotip (pàg. 286).
- Carmí boràcic** Coloració nuclear molt apropiada per als muntatges totals. (pàg. 283).

Un cop feta la coloració es posa la secció en un portaobjectes amb una gota de glicerina, es realitza el "squash" i se segella el cubreobjectes amb esmalt d'angles.

## MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA

### Microscòpia electrònica d'escànnig

Per a la seva observació en microscòpia electrònica d'escànnig (MES), les mostres s'han rentat amb solució fisiològica i s'han fixat amb formol al 10% en tampó fosfat de Sörensen pH 7,2 0,05 M (pàg. 278) durant 60 min.

Després de rentar acuradament amb tampó s'ha procedit a la deshidratació per mitjà d'una sèrie etílica i s'ha portat a acetat d'amil.

#### Procediment:

- 1- Etanol 50%, 1 h.
- 2- Etanol 70%, 1 h.
- 3- Etanol 90%, 30 min.
- 4- Etanol 96%, 15 min.
- 5- Etanol absolut, 3 canvis en 15 min.
- 6- Etanol absolut-acetat d'amil (3:1), 10 min.
- 7- Etanol absolut-acetat d'amil (1:1), 10 min.
- 8- Etanol absolut-acetat d'amil (1:3), 10 min.
- 9- Acetat d'amil, 3 canvis en 15 min.

Les mostres s'han dessecat en un dessecador de punt crític Polaron E-3000 utilitzant acetat d'amil com a líquid de transferència i anhídrid carbònic com a líquid de transmissió. S'han metal·litzat amb un diode d'"sputtering" Polaron E-5000 formant un recobriment de ca. 400 Å de gruix.

Les observacions s'han fet en un microscopi Super III-A ICI i un Cambridge Instruments Stereoscan 120 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona i un Cambridge S4 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona .

### Microscòpia electrònica de transmissió

#### Fixació i inclusió

Els exemplars destinats a l'observació per microscòpia electrònica de transmissió (MET), han estat fixats amb formaldehid-glutaraldehyd en tampó cacodilat pH 7,2 0,05 M (pàg. 279) durant 2,5 hores a 4<sup>o</sup> C i rentats en tampó cacodilat pH 7,2 0,1 M (pàg. 277) durant 3 o 4 hores, efectuant de dos a tres canvis.

Seguidament es fa una postfixació amb tetraòxid d'osmi 1% (pàg. 279) en tampó cacodilat 0,1 M durant 1 hora a 4<sup>o</sup> C.

Després de rentar-les amb tres canvis de 5 minuts cadascun amb tampó i tres canvis més de 10 minuts cadascun amb aigua bidestil·lada, es procedeix a la inclusió de les mostres en resina Spurr (Polaron). Es fa una deshidratació convencional en acetona i un aclariment en òxid de propilè.

**Procediment:**

- 1- Acetona al 50%, 10 minuts.
- 2- Acetona al 70%, 10 minuts-12 hores a la nevera.
- 3- Acetona al 95%, 10 a 15 minuts.
- 4- Acetona absoluta, 3 canvis en 10 minuts.
- 5- Acetona- òxid de propilè (1:1), 2 canvis en 15 minuts.
- 6- Oxid de propilè- Spurr (2:1), 30 minuts.
- 7- Oxid de propilè- Spurr (1:1), 60 minuts.
- 8- Spurr, 12 hores a 4° C.
- 9- Spurr, 2 hores a 4° C.
- 10- Spurr, 24 hores a 55° C.

Dels blocs s'han obtingut talls semifins i ultrafins de 600 a 700 Å de gruix amb un ultramicròtom LKB III del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.

### **Contrastat dels talls ultrafins**

Els talls ultrafins han estat contrastats amb el mètode convencional: acetat d'uranil- citrat de plom.

**Procediment:**

- 1- Contrastat amb acetat d'uranil (pàg. 279) durant 7 o 8 minuts.
- 2- Rentatge acurat amb aigua bidestil·lada.
- 3- Eixugada de la reixeta amb paper de filtre.
- 4- Citrat de plom (pàg. 280) durant 15 minuts.
- 5- Rentatge acurat amb aigua bidestil·lada.
- 6- Eixugada amb paper de filtre

Per a la tinció es depositen gotes de la solució colorant, ja sigui acetat d'uranil o citrat de plom, en una superfície parafinada (Parafilm) en una placa de Petri. En la tinció amb citrat de plom, per evitar la formació de precipitats de carbonat de plom, s'ha de resguardar la solució del CO<sub>2</sub> atmosfèric, per això es dipositen llànties de KOH al voltant que captin el CO<sub>2</sub>. Es col·loca una reixeta sobre cada gota i posteriorment es renten per immersió repetida en una sèrie d'almenys 5 cubilets d'H<sub>2</sub>O bidestil·lada.

Les observacions s'han fet amb un microscopi electrònic de transmissió Hitachi HU 12 i un Hitachi H 7000 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat Autònoma de Barcelona.



## **MARCATGE AMB LECTINES**

L'estudi de la làmina basal durant el procés d'epitelització s'ha fet utilitzant les tècniques de marcatge amb lectines.

El lligament de la lectina al teixit es mostra per coloració directa, amb la conjugació de la lectina amb un marcador, la isotiocianat de fluoresceïna (FITC)

Per a trobar les lectines amb afinitat específica pels carbohidrats de la làmina basal, es va fer un estudi previ amb una bateria de lectines: PNA, Con A, DBA, SBA, WGA i VVA (taula II), els resultats del qual van indicar com a més apropiades la PNA i la Con A. Les altres lectines marcaven altres estructures: la DBA i la SBA les cèl.lules pigmentàries, la VVA la cutícula i la DBA les cèl.lules del pseudoblastema dèbilment. Entre la Con A i la PNA s'ha treballat preferentment amb aquesta última, perquè el marcatge per a la membrana basal és més específic. Adues marquen, a més de la membrana basal, les fibres del teixit connectiu, si bé la PNA ho fa molt més dèbilment.

S'ha realitzat el marcatge amb PNA i Con A en mostres procedents de sangoneres sacrificades a diferents temps a partir de la realització de les ferides per incisió.

## **Obtenció de les mostres i processat histològic**

Per a l'estudi previ amb la bateria de lectines, s'han utilitzat sangoneres amb una ferida de 48 h. S'han obtingut seccions, d'uns 4  $\mu\text{m}$  de gruix, amb un criòtom Bright, de la Facultat de Medicina de Lleida, pel mètode de la congelació per immersió en nitrogen líquid. També s'han obtingut seccions d'uns 7  $\mu\text{m}$  de gruix pel mètode d'inclusió en parafina pF 56-58<sup>o</sup> C

Per al marcatge amb PNA i Con A s'han realitzat tres sèries de ferides. En cada sèrie s'han processat dos exemplars de cada temps i un de control sense ferida. Els teixits processats per parafina han estat fixats de la manera habitual amb formol al 10% en tampó fosfat de Sørensen pH 7,2 0,05 M (pàg. 277). Els teixits processats per criotomia no han estat fixats. Com a teixit control s'han processat seccions de ronyó de *Rattus norvegicus*.

De la primera sèrie, de 6 h, 24 h, 9 d i 17 d a partir de la realització de la ferida, s'han obtingut seccions d'uns 7  $\mu\text{m}$  de gruix pel mètode de la inclusió en parafina pF 56-58<sup>o</sup> C.

De la segona, de 6 h, 32 h, 52 h, 5 dies, 9 dies, 14 dies i 19 dies, s'han obtingut seccions d'uns 7  $\mu\text{m}$  de gruix pel mètode d'inclusió en Medium-Plast pF 52<sup>o</sup> C.

De la tercera, de 5 h, 20 h, 48 h, 7 dies, 14 dies i 21 dies, s'han obtingut seccions d'uns 8  $\mu\text{m}$  de gruix pel mètode de la congelació directa.

De la quarta, de 2,5 h, 19 h, 23 h, 48 h, 4 dies, 13 dies, 28 dies, 48 dies i 8 mesos s'han obtingut seccions d'uns 8  $\mu\text{m}$  de gruix pel mètode de la congelació en nitrògen líquit. Durant la incubació es desenganchen molt els talls, provocant que molts es perdin o s'arruguin. Per evitar aquest fet, immediatament després de la microtomia s'han sumergit els portes en Colodió (Merck) durant 5 minuts i després s'han deixat assecar a l'aire. La incubació s'ha realitzat amb i sense Colodió i s'ha pogut observar que aquest no impedeix el marcatge, si bé que és meys fort.

Immediatament abans d'utilitzar, els talls de parafina han de ser desparafinats amb xilol molt acuradament per assegurar un bon marcatge. Seguidament es rehidraten i es porten a tampó fosfat salí (PBS) 0,05 M pH 7,4 (pàg. 278).

Les seccions procedents de la criotomia es processen directament, després de deixar-les secar a l'aire durant 20 min.

## **Marcatge**

### **Preparació de les solucions**

Per al marcatge s'ha utilitzat una solució de 2 mg de lectina/10 ml de PBS. La lectina se suministra sense diluir i, un cop oberta, es pot guardar en el congelador durant un cert temps en forma de una solució mare de 2 mg de lectina/1 mg de PBS.

Les solucions de sucres inhibidors són 0,2 M en PBS.

Els derivats fluorescinats de les lectines i els sucres inhibidors corresponents han estat suministrats per la casa Sigma.

### **Incubació**

- 1- Netejar l'exés de PBS al voltant del teixit, anant amb compte de que no s'assequin els talls.
- 2- Incubar amb la solució de treball de la lectina durant 45 min.
- 3- Rentar amb PBS. 4 canvis durant 15 min.
- 4- Muntar amb un medi hidrofílic per fluorescència (Fluoroprep, BioMerieux)

### **Controls**

S'han fet controls negatius incubant els teixits amb les diferents lectines juntament amb els seus sucres inhibidors corresponents (taula II). Primer s'ha deixat incubar durant 45 min. la solució 0,2 M del sucre corresponent amb la

solució de treball de lectina en una proporció 1:1. Seguidament s'ha procedit a la incubació dels talls de la forma descrita.

En el cas del marcatge amb PNA i Con A, també s'han fet controls incubant amb sucres inapropiats per demostrar l'especificitat. Si el lligament de la lectina als teixits és específic, s'inhibirà completament amb la presència d'una solució del sucre inhibidor apropiat, però no amb un sucre inapropiat (Leatherm i Atkins, 1983).

LECTINES	SUCRES INHIBIDORS
Arachis hypogaea (PNA)	NAcGal
Concavalina A (Con A)	Glu
Dolichus biflorus (DBA)	NAcGal
Glicina max (SBA)	NAcGal
Tritium vulgaris (WGA)	NAcGal
Vicia villosa (VVA)	NAcGal

**Taula II.** Lectines amb els sucres inhibidors corresponents utilitzats Glu= glucosa, NAcGal= N-acetil-galactosamina.

## Microscòpia de fluorescència

Per a l'observació s'ha utilitzat un microscopi Olympus Vanox equipat amb epifluorescència.

Per observar l'emissió de fluorescència produïda pel isotiocianat de fluoresceïna, s'ha fet servir un filtre d'excitació B BP490, (blau), que produeix una longitud d'ona d'excitació de 380 a 490 nm. El mirall dicroic i el filtre barrera han estat els DM 500 i el AFC + O 515 respectivament, produïnt-se una llum d'emissió per sobre dels 515 nm.

Quan s'utilitza el filtre d'excitació B, el filtre excitador supletori EY 455 dóna un millor contrast per reducció de l'autofluorescència dels propis teixits.

Es poden fer servir filtres de barrera suplementaris com el G 520, que bloqueja les longituds d'ona per sobre de 540 nm (vermell-taronja), o el B 460 que dóna una llum fluorescent més natural i bloqueja o redueix considerablement la llum fluorescent vermella i taronja.

Per a la fotografia s'ha utilitzat un film Kodak T MAX 100 ASA per B&N i un Ektachrome 100 ASA per diapositives color. Els temps d'exposició s'han reduït a aproximadament un quart del indicat pel fotometre.

## **MARCATGE D'ACTINA AMB FAL.LOÏDINA FLUORESCÈINADA**

Per a la detecció específica de l'actina s'ha utilitzat una fal.lotoxina fluoresceïnada. Les fal.lotoxines s'aïllen a partir del bolet *Amanita phalloides*. Es lliguen als filaments de F-actina i a la F-actina monomèrica, però no a la G-actina monomèrica. Les fal.lotoxines tenyeixen F-actina a concentracions nanomolars i són extremadament solubles en aigua.

La fal.lotoxina utilitzada ha estat la fal.loïdina F-424 (Molecular Probes, Or, USA).

### **Obtenció de les mostres i processat histològic**

S'ha efectuat una sèrie de ferides per incisió de 1 h, 6 h, 24 h, 48 h, 3 dies, 4 dies, 7 dies, 8 dies, 11 dies, 12 dies, 15 dies i 16 dies. Es fereixen dos exemplars per cada temps.

Com a controls s'han inclòs 2 exemplars sense ferir.

Les seccions, d'uns 10 µm, s'han obtingut per criotomia prèvia congelació amb nitrògen líquit.

Les seccions es processen sense fixar, immediatament després de la criotomia. Segons Garana et al (1992), les seccions no fixades es poden utilitzar després de ser guardades durant un cert temps a -80° C.

## **Marcatge**

### **Preparació de les solucions**

-Preparació de la solució mare:

- 1- El producte se suministra en forma d'un vial que conté 300 unitats de fal.lotoxina fluorescent (una unitat és la quantitat necessària per tenyir una preparació).
- 2- El contingut del vial es dissol en 1,5 ml de metanol (200 unitats/ml). Aquesta solució mare és aproximadament 6,6 micromolar.

-Preparació de la solució de treball:

- 1- S'hagafa la quantitat necessària (5µl/unitat) amb una pipeta i es deixa secar en els marges d'un pot tipus ependorf.
- 2- Un cop sec, es redissol en tampó fosfat salí (PBS). Aquesta solució s'ha de preparar just abans de la seva utilització.

## **Incubació**

### Procediment

- 1- Rentar amb 2 canvis de PBS.
- 2- Secar al voltant de l'especimen.
- 3- Afegir suficient solució de treball per cobrir l'especimen.
- 4- Incubar a temperatura ambient durant 45 min.
- 5- Rentar rapidament amb 2 canvis de PBS.
- 6- Muntar amb medi hidròfil per fluorescència (Fluoroprep, BioMerieux).

## **Controls**

A cada portaobjectes s'han incubat quatre talls amb el marcador i dos talls amb PBS sense fal.loïdina, per a utilitzar-los com a control negatiu.

## **Microscòpia de fluorescència**

La fal.lotoxina utilitzada, fal.loïdina F-424 (Molecular Probes, Or, USA), està conjugada amb fluoresceïna, que té un màxim d'excitació de 495 nm i un màxim d'emissió de 520.

Per a l'observació s'ha utilitzat un microscopi Olympus Vanox equipat amb epifluorescència.

S'ha fet servir un filtre d'excitació BP490, (blau), que produeix una longitud d'ona d'excitació de 380 a 490 nm. El mirall dicroic i el filtre barrera han estat el DM 500 i el AFC + O 515 respectivament, produïnt-se una llum d'emissió per sobre dels 515 nm.

S'ha utilitzat una conbinació de filtres supletoris per evitar la autofluorescència dels teixits: EY 455 com a filtre d'excitació supletori i O 530 com a filtre barrera supletori.

Per a la fotografia s'ha utilitzat un film Kodak T MAX 400 ASA per B&N i un Ektachrome 400 ASA per diapositives color. Els temps d'exposició s'han reduït a aproximadament un quart del indicat pel fotòmetre.

## **DETECCIÓ DE PROLIFERACIÓ CEL.LULAR PER INCORPORACIÓ DE BrdU**

Per a l'estudi de l'activitat mitòtica s'utilitza la tècnica de la detecció mitjançant anticossos monoclonals. Aquesta tècnica es basa en la incorporació d'un anàleg de la timidina, la 5-bromo 2'-deoxiuridina (BrdU), seguida d'una detecció per anticossos monoclonals.

S'han utilitzat dos mètodes lleugerament diferents, un basat en el kit "Cell Proliferation RPN-20" (Amersham) i l'altre en el "5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I" (Boehringer).

S'han realitzat diferents proves de l'experiment introduint algunes variants respecte el protocol indicat per les cases comercials (taula III).

### **Cell Proliferation RPN-20 (Amersham)**

Per incrementar la sensibilitat d'aquesta tècnica, les cèl.lules són exposades simultaneament a la BrdU i a la 5-fluoro-2'-deoxiuridina, un inhibidor de la timidilat sintetasa, que incrementa la incorporació de la BrdU reduint la competició amb la timidina endògena. En aquest procediment s'utilitza també una nucleasa que permet l'accés de l'anticòs anti BrdU al DNA sense fer necessari l'ús d'un pretractament químic àcid o alcalí massa dràstic. L'anticòs anti BrdU es detecta amb un anticòs anti Ig de ratolí marcat amb peroxidasa. Posteriorment la peroxidassa es fa polimeritzar amb diaminobencidina (DAB) en la presència de cobalt i níquel, donant una coloració negre-blavosa en els llocs on s'ha incorporat la BrdU.

Reactius i preparació de les solucions mare i de treball:

- 1- Marcador: Solució aquosa de 5-bromo-2'-deoxiuridina i 5-fluoro-2'-deoxiuridina (10:1). Se suministra en una solució concentrada de 3 mg de BrdU/ ml que es pot diluir segons els requeriments del material emprat.
- 2- Anticòs monoclonal anti BrdU i DNA nucleasa en tampó tris-salí pH 7,6 amb albumina de serum boví al 1%, clorur de magnesi i preservatiu. Solució a punt per el seu ús. En el kit utilitzat a la prova nº 5, l'anticòs i la nucleasa es troben en flascons separats i s'han de barrejar just abans de fer servir.
- 3- Anticòs anti Ig de ratolí conjugat amb peroxidassa en tampó fosfat salí pH 7,4 amb albumina de serum boví al 1% i preservatiu. Solució a punt pel seu ús.
- 4- Substrat / intensificador: Solució aquosa amb peròxid d'hidrogen, clorur de cobalt i clorur de níquel.
- 5- DAB: Tetraclorur de 3,3'-diaminobencidina que s'ha de diluir en 20 ml de tampó fosfat 0,05 M pH 7,4 (pàg. 277) i guardar en alicuotes de 1 ml a -20° C.

TAULA III Detecció de proliferació cel·lular mitjançant incorporació de BrdU

	INCORPORACIÓ DE BrdU ALS EXEMPLARS				PROCESSAT HISTOLÒGIC		DETECCIÓ IMMUNOHISTOQUÍMICA			
	[BrdU]/100g pes corporal	sol. mare BrdU/ ringer Nicholls	[BrdU]/100 ml medi incubació	temps incubació amb BrdU	fixador, temps de fixació	medi d'inclusió	temps tractament amb H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tractament amb CIH	temps incubació AC 1ari	temps incubació AC 2ari
Prova n° 1	6 mg	4%	-	1h 20min	formol 10% en PBS 0,1M 3h	parafina pF 56°	-	-	1h 30min	30min
							30min	-	1h 30min	30min
Prova n° 2	12 mg	8%	-	18h	formol 10% tampó fosfat Sörensen 4h	Medium plast pF 52°	1h	-	2h 30min	1h
								+	20h	1h
Prova n° 3	67,5 mg	30%	60 mg	24h	formol 10% tampó fosfat Sörensen 4h	Medium plast pF 52°	1h	-	21h	1h
								+	3h	1h
Prova n° 4	225 mg	100%	60 mg	20h	formol 10% t. f. Sörensen 4h	Medium plast pF 52°	1h	+	20h	1h
								+	20h	1h

(Continua)

TAULA III Detecció de proliferació cel·lular mitjançant incorporació de BrdU (continuació)

	INCORPORACIÓ DE BrdU ALS EXEMPLARS				PROCESSAT HISTOLÒGIC			DETECCIÓ IMMUNOHISTOQUÍMICA			
	[BrdU]/ 100g pes corporal	sol. mare BrdU/ ringer Nicholls	[BrdU]/ 100 ml medi incubació	temps incubació amb BrdU	fixador. temps de fixació	medi d'inclusió	temps tractament amb H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	tractament amb CIH	temps incubació AC 1ari	temps incubació AC 2ari	
Prova n° 5	225 mg	100%	60 mg	48h	acetona 20' alcohol àcid 30'	criotomia	1h	+	20h	1h	
Prova n° 6	225 mg	100%	60 mg	48h	acetona 20' alcohol àcid 30'	criotomia	1h	+	20h	1h	
Prova n° 7	-	-	60 mg	48h	acetona 20' alcohol àcid 30'	criotomia	1h	+	20h	1h	
Prova n° 8	225 mg	100%	60 mg	48h	acetona 20' alcohol àcid 30'	criotomia	-	+	20h	1h	
Prova n° 9	225 mg	100%	60 mg	48h	acetona 20' alcohol àcid 30'	criotomia	-	+	20h	1h	
Control 1 ratolí	6 mg	100%	-	24h	formol 10 % t. f. Sorensen 4h	Medium plast pF 52°	1h	-	3h	1h	
Control 2 embrió Q. suber	-	-	300 mg	24h	formol 10 % creta	Medium plast pF 52°	1h	-	3h	1h	

En les probes 1-7 i en els controls 1 i 2 s'ha utilitzat el kit Amersham, mentre que en les probes 8 i 9 s'ha utilitzat el kit Boehringer.



## 5-Bromo-2'-deoxy-uridine Labeling and Detection Kit I (Boehringer)

El medi de incubació conté únicament el marcador, BrdU, en PBS. L'anticòs primari va acompanyat, com en el kit anterior, d'una nucleasa. L'anticòs secundari està marcat amb fluoresceïna i el marcatge s'observa en microscopi de fluorescència.

Aquest test està basat en el mateix principi que l'anterior però evita la confusió de la coloració obtinguda pel mètode de la peroxidasa amb els pigments pròpis de la sangonera.

Reactius i preparació de les solucions mare i de treball:

- 1- Marcador: Solució de 5-bromo-2'-deoxiuridina i 5-fluoro-2'-deoxiuridina en PBS 10 mmol/l (3,07 mg/ml), que es pot diluir segons els requeriments del material emprat.
- 2- Tampó fosfat salí (PBS).
- 3- Tampó de incubació: tampó tris 66 mmol/l, Mg<sub>2</sub> 0,66 mmol/l, 2 mercaptoetanol 1 mmol/l.
- 4- Anticòs monoclonal anti BrdU i nucleasa en PBS/glicerina. La solució de treball es prepara just abans de fer servir diluint-la 1:10 amb el tampó d'incubació.
- 5- Anticòs anti Ig de ratolí fluoresceïnat liofilitzat. La solució mare es prepara dissolvent l'anticòs liofilitzat en 1 ml d'aigua bidestil·lada. És estable a 4° C. La solució de treball es prepara just abans de fer servir diluint la solució mare 1:10 amb PBS.

## Incubació amb BrdU

S'han fet proves inoculant diferents quantitats de la solució mare de BrdU sumministrada en el kit.

La concentració indicada per al marcatge *in vivo* per les cases comercials és la de 1-2 ml de marcador sense diluir per 100 gr de pes corporal, equivalent a 3-6 mg de BrdU/100 g de pes corporal. Atès el baix pes de les sangoneres, uns 0,5 g en les sangoneres de tamany mitjà que s'han utilitzat, s'ha optat per diluir el producte amb solució fisiològica de Nicholls i Kuffler (pp). Partint de la quantitat indicada s'ha augmentat progressivament la quantitat fins 225 mg/100 g pes corporal (taula III). Atès que la BrdU és fotolàbil, durant tot el processat s'evita una exposició excessiva a la llum.

Els temps d'incubació han oscil·lat entre el indicat en els protocols, de 1 hora, i 24 hores (taula III).

Previa anestèsia s'injecta als animals amb BrdU. S'han incubat exemplars a diferents temps després de la realització de les ferides.

En les proves 1-5 s'han utilitzat exemplars adults en els que s'els hi ha practicat una ferida per incisió, amb uns interals a partir de la realització de la ferida fins al

sacrifici de: 8 h, 24 h, 48 h, 3 dies, 4 dies, 5 dies, 7 dies, 10 dies, 14 dies, 25 dies i 60 dies. En les proves 6 i 7 s'han utilitzat exemplars immadurs nascuts en el laboratori, d'aproximadament un més d'edat, els quals havien realitzat un sol àpat a base de granotes, amb ferides per incisió de 5 dies. En les proves 7 i 8 s'han utilitzat exemplars immadurs, d'aproximadament un més d'edat, sumministrats per Biopharm, els quals havien estat alimentats amb sang de mamífers. En la prova 7 s'ha realitzat una sèrie de ferides de: 48 hores, 3 dies, 7 dies, 14 dies i 25 dies. En la prova 8 s'ha realitzat una sèrie de cremades per nitrat de plata de 7 dies i 14 dies. En cada una de les proves s'injecten 2 animals per cada temps.

S'ha de tenir amb compte el temps d'incubació de cada experiment (taula III) a l'hora d'interpretar una possible incorporació de la BrdU.

S'injecten entre 0,2 i 0,4 ml per exemplar depenent de la mida de la sangonera. La injecció es fa a dos punts diferents situats prop de la ferida.

També s'han fet proves afegint BrdU en el medi a més de la injectada als animals (taula III).

Després del període d'incubació se sacrifiquen els animals amb una anestèsia perllongada i es processen els teixits per a la inhibició en parafina o per a la criotomia amb congelació per nitrògen líquid.

## Controls

En les diferents proves s'inocula BrdU a un parell d'exemplars sense ferida i es fa un control negatiu amb un parell de sangoneres ferides injectant-l'hi solució fisiològica de Nicholls i Kuffler sense BrdU.

En les proves realitzades amb el kit de la casa Amersham, s'han realitzat controls amb un ratolí blanc, *Mus norvegicus*, i embrions d'alzina surera, *Quercus suber*. El ratolí s'injecta amb una concentració de 2 ml de marcador sense diluir per 100 g de pes corporal i s'ha deixat incubar durant 24 h. Es processen dos òrgans rics en teixits amb molta regeneració com són la llengua i l'intestí. De l'alzina surera, s'incuba la porció de l'aglà on es troba l'embrió. La solució marcadora es dilueix amb aigua de l'aixeta en una proporció de 0,3 mg BrdU/ml i s'incuben els embrions durant 24 h (taula III).

## Detecció immunohistològica

### Processat histològic

#### Mostres incloses en parafina:

Com a fixador s'ha utilitzat el formol al 4% en tampó fosfat de Sörensen 0,05 M pH 7,2 (pàg. 277), que és el que s'utilitza per hirudínids. També s'ha provat el fixador recomenat en el protocol Amersham: formol al 10% en tampó fosfat salí (PBS) 0,1 M pH 7,4 (pàg. 278). El temps de fixació ha estat entre 3 i 4 h (taula III).

Per a la fixació dels teixits de *Mus norvegicus* s'ha emprat el formol al 10% en tampó fosfat 0,05 M pH 7,4 (pàg. 277). Per a l'embrió de *Quercus suber* s'ha emprat formol creta al 10% pH 7 (pàg. 278).

Després de la fixació es procedeix a la deshidratació en sèrie etílica, aclariment i inclusió en parafina:

#### Procediment:

- 1- A 70% durant tota la nit.
- 2- A 96%, 2 canvis de 1/2 h cada un.
- 3- AA, 3 canvis de 1/4 h cada un.
- 4- Xilol, 3 canvis de 1/2 h cada un.
- 5- Xilol-parafina, de 1 h a 40° C.
- 6- Parafina, 2 canvis de 1 h a 58° C.
- 7- Realització dels blocs.

A l'hora de fer la inclusió en parafina s'ha de tenir en conte que per la preservació dels teixits i dels antigens no s'ha d'exedir de 58° C. S'ha utilitzat parafina plastificada pF 56-58° C Panreac o bé medi d'invisió de teixits pF 52° C DDM, Medim-Plast 52" (taula III).

A partir dels blocs obtinguts es realitzen talls de 7-8 µm de gruix, es deixen en un bany a 35° C, es recullen en portes gelatinats i es deixen assecar uns 20 min. a 35° C.

Abans de la detecció immunohistològica es procedeix a la desparafinació i rehidratació dels talls:

#### Procediment:

- 1- Submergir els portaobjectes en xilol de 2 a 3'
- 2- Realitzar 2 canvis de xilol fresc
- 3- Realitzar 2 canvis AA
- 4- Realitzar 1 canvi A 96%
- 5- Realitzar 1 canvi A 70%
- 6- Realitzar 3 canvis de PBS

### Mostres processades per criotomia

Es cogelen les mostres pel mètode el nitrogen líquid i es tallen en el criòtom.

Els talls es fixen per immersió en acetona absoluta durant 20 min. i en alcohol àcid (pàg. 278) durant 30 min.

Un cop fixats els talls es poden guardar per sota de 20° C o bé utilitzar directament.

### Incubació

Seguidament es porcedeix a la detecció immunohistològica. El protocol seguit per al kit de la casa Amersham és el següent:

- 1- Eixugar el PBS del voltant de l'especimen
- 2- Afegir suficient AC anti BrdU per cobrir l'especimen.
- 3- Incubar a temperatura ambient en cambra humida i a les fosques.
- 4- Rentar amb 3 canvis de PBS de 3' min. cada un
- 5- Eixugar al voltant de l'especimen.
- 6- Afegir suficient AC anti Ig marcat amb peroxidasa per cobrir l'especimen.
- 7- Incubar a temperatura ambient en cambra humida.
- 8- Preparar 1 ml de DAB en 50 ml de tampó fosfat pH 7,4 0,05 M (pàg.) per cada 10 portaobjectes.
- 9- Rentar amb 3 canvis de PBS de 3' min. cada un.
- 10- Afegir substrat/intensificador al DAB diluït fent servir 5 gotes per cada 50 ml i agitar durant l'adició.
- 11- Sumergir els porteobjectes en la solució colorant 5-10'.
- 12- Rentar amb tres canvis d'aigua destil·lada.
- 13- Contrastar amb eosina alcohòlica.
- 14- Deshidratar, aclarar i muntar amb Entellan.

Els temps d'incubació dels anticossos primari i secundari recomenats en el protocol Amersham són de 1 hora i 30 minuts respectivament. En les diferents proves, l'anticòs primari s'ha incubat durant períodes d'entre 1h 30' a 21 h i l'anticòs secundari de 30 min. a 1h (taula III).

El protocol seguit per al kit de la casa Boheringer és el següent:

- 1- Eixugar el PBS del voltant de l'especimen
- 2- Afegir suficient AC anti BrdU per cobrir l'especimen.
- 3- Incubar a temperatura ambient en cambra humida i a les fosques.
- 4- Rentar amb 3 canvis de PBS de 3 min. cada un
- 5- Eixugar al voltant de l'especimen.
- 6- Afegir suficient AC anti Ig fluoresceïnat per cobrir l'especimen.
- 7- Incubar a temperatura ambient en cambra humida.
- 8- Rentar amb 3 canvis de PBS de 3 min. cada un.
- 9- Muntar amb medi hidròfil per fluorescència (Fluoroprep, BioMerieux).

Per a l'observació s'ha utilitzat un microscopi Olympus Vanox equipat amb epifluorescència. S'ha utilitzat la mateixa combinació de filtres que en les proves amb lectines.

El temps d'incubació dels anticossos primari i secundari recomanat en el protocol de la casa Boehringer és de 30 minuts per a tots dos. En les diferents proves, l'anticòs primari s'ha incubat durant 20 h i l'anticòs secundari 1h (taula III).

## **Controls**

Per cada interval de ferides es fan controls sense anticòs primari, sense anticòs secundari i sense cap dels dos.

## **Modificacions del protocol**

Per reduir l'activitat peroxidasa endògena es pot fer, previ a la detecció immunohistològica, un tractament amb peròxid d'hidrogen al 2 % en metanol durant 30 min - 1 h rentant posteriorment amb PBS (taula III).

Una absència de marcatge de nuclis pot vindre donada per dos motius, que es poden intentar solucionar de diferents maneres:

- a) no incorporació de BrdU
  - augmentar la concentració
  - augmentar el temps d'incubació
  
- b) no lligament amb l'AC anti BrdU/ insuficient digestió del DNA
  - augmentar el temps d'incubació
  - fer una desparafinació més acurada
    - fer una desnaturalització complementària del DNA amb un agent químic.

Per intentar solventar una possible insuficient digestió del DNA es pot fer un tractament amb CIH, just abans de la incubació amb l'anticòs primari (Del Rio i Soriano, 1989).

Es submergeixen els portes en CIH 2 N durant 30 minuts a temperatura ambient. Per neutralitzar el CIH es renten acuradament per immersió en tampó borat 0,13 M, pH 8,5 i seguidament amb PBS (taula III).

## HISTOLOGIA NORMAL

Aquest capítol aporta un estudi de la histologia normal de la paret del cos i del teixit connectiu d'*Hirudo medicinalis*. Dels diferents components del teixit connectiu s'han estudiat amb especial èmfasi tots aquells que són afectats en la realització de la ferida, com la matriu extracel.lular, cromatòfors, cèl.lules vasofibroses i fibròcits, o els que poden estar relacionats en el procés de regeneració, com les cèl.lules vasocentrals i els amebòcits. L'estudi de la histologia normal és un pas previ necessari per interpretar correctament el procés de regeneració. Les observacions van seguides, en cada un dels apartats, d'una breu discussió, en la qual es destaquen les aportacions originals i es caracteritza el nostre model en relació amb altres espècies amb les que es compararan els processos de regeneració.

### INTRODUCCIÓ

La paret del cos dels anèl.lids està formada pel tegument, les capes musculars i el parenquima perivisceral, el qual està constituït pel teixit connectiu que envolta el celoma (Meglitsch, 1978). Als poliquets i oligoquets el celoma és espaiós i està dividit en compartiments pels septes intersegmentals. En canvi, als hirudinis, amb l'excepció d'*Acanthobdella*, el celoma queda reduït a una complicada xarxa de canals. La reducció del celoma, amb la conseqüent proliferació de teixit connectiu que forma part de la paret corporal, és un fet manifest a *Hirudo medicinalis*.

#### Tegument

El tegument dels anèl.lids està constituït per la cutícula, l'epidermis i la dermis (Meglitsch, 1978).

La cutícula és el revestiment del tegument dels anèl.lids. Es distingeixen dues zones principals: la cutícula propiament dita, formada per material fibrós tipus col.lagen i matriu amorfa mucopolisacàrida, i l'epicutícula, constituïda per unes estructures anomenades projeccions epicuticulars (Spearman, 1973; Berchtold et al., 1985).

L'epidermis està formada per una sola capa de cèl.lules epitelials, generalment columnars, entre les quals s'hi troben glàndules unicel.lulars disseminades. Als hirudinis, a diferència d'altres anèl.lids, no s'observen cèl.lules

basals (Meglitsch, 1978). És característic dels anèl·lids la escassetesa de figures mitòtiques (Meglitsch, 1978).

La dermis dels anèl·lids és més delicada en les espècies petites, i en poliquets i oligoquets més que a hirudinis (Meglitsch, 1978). A oligoquets hi han relativament poques cèl·lules a la dermis (Spearman, 1973) i està pràcticament ocupada per un plexe nerviós (Edwards i Lofty, 1977). A hirudinis conté una notable xarxa de capil·lars (Spearman, 1973).

El tegument dels hirudinis ha estat descrit de forma general per diversos autors (vegeu-ne la revisió de Sawyer, 1986). Berchtold et al. (1985), en l'estudi de la muda cuticular d'*Hirudo medicinalis*, fan una breu descripció del tegument. Malecha (1979) ha descrit el tegument de l'àrea copuladora de *Piscicola geometra* i Cornec (1984) ha descrit la paret corporal a nivell de la ventosa posterior d'*Helobdella stagnalis*. La ultraestructura del tegument de *Dina lineata*, una sangonera del mateix ordre que *Hirudo medicinalis*, ha estat l'objecte de la tesina previa a aquest treball (Huguet, 1985).

## **Musculatura**

La musculatura de la paret corporal dels anèl·lids, com a la majoria d'animals de cos tou, es disposa en dues capes d'orientació paral·lela: la musculatura circular i la musculatura longitudinal. Aquests músculs són antagonistes i serveixen per aplicar pressions a l'esquelet hidrostàtic. Els anèl·lids clitel·lats, a més, tenen un altre tipus de musculatura de la paret corporal, els músculs dorsoventrals, els quals tenen la funció d'aplatar el cos (Sawyer, 1986).

Els hirudinis es diferencien de la resta d'anèl·lids per tenir una tercera capa muscular, la musculatura diagonal, que se situa entre la musculatura circular i la musculatura longitudinal. El paper de la musculatura diagonal no està del tot clar, però sembla estar relacionat amb el modus de locomoció per ventoses i la disminució del celoma, ambdós característics dels hirudinis (Sawyer, 1986).

A més de la musculatura de la paret del cos, hi han altres músculs especialitzats. Els ànuls de la sangonera són capaços d'estar erectes mitjançant uns petits músculs paral·lels a la superfície (Sawyer, 1986). També es troba musculatura al voltant d'algunes viscères, com el tub digestiu i l'epidídim (García-Más, 1981 i Bonet i Molinas, 1985).

Les fibres musculars dels anèl·lids són mononucleades i d'estriació obliqua, la qual cosa els hi permet una contracció més intensa que en els músculs d'estriació transversal (Paniagua i Nistral, 1983). És característica dels hirudinis la disposició dels miofilaments en la perifèria cel·lular de les fibres musculars (Sawyer, 1986).

Rowlerson i Blackshaw (1991) han realitzat un estudi de les fibres musculars de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis*, García-Más (1981) ha

estudiat la musculatura associada al tub digestiu a *Dina lineata* i Bonet i Molinas (1985) han estudiat la musculatura associada a l'epidídim de la mateixa espècie.

### **Parenquima perivisceral**

En el teixit connectiu dels anèl·lids s'hi troben diferents tipus cel·lulars. D'una banda els elements retroperitoneals, que es troben fora del celoma, i d'altre banda els elements peritoneals, formats per l'endoteli del celoma o per especialitzacions d'aquest endoteli.

En els hirudinis, amb la reducció del celoma hi ha una gran proliferació d'elements connectius retroperitoneals que constitueixen el parenquima perivisceral.

Els elements retroperitoneals d'*Hirudo medicinalis* són: fibròcit, cèl·lula pigmentària, cèl·lula vasofibrosa i cèl·lula vasocentral, aquests dos últims associats en l'anomenat teixit vasofibrós. Els components peritoneals són: endoteli, cèl·lula botridial i amebòcit.

El teixit connectiu dels hirudinis ha estat estudiat per Bradbury (1956, 1957 a, 1957 b, 1958 a i 1959) i Bradbury i Meek (1958a, 1958b) a *Hirudo medicinalis* i a *Glossiphonia complanata*. Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974) han estudiat el teixit vasofibrós d'*Hirudo medicinalis* i Fischer et al (1976) el d'*Haemopsis sanguisuga*. Sawyer i Fitzgerald (1981) han estudiat les cèl·lules hemocelòmiques en els hirudinis en general.



## RESULTATS I DISCUSSIONS

### EPIDERMIS

L'epidermis està formada per una capa monostratificada de cèl·lules columnars revestides de cutícula entre les quals es troben els conductes secretors de nombroses cèl·lules glandulars mucoses. No s'observen cèl·lules basals.

### Cutícula

L'observació dels exemplars d'*Hirudo medicinalis* en MES mostra una superfície avellutada, formada per una capa compacte amb petites protuberàncies arrodonides d'uns 60-100 µm diàmetre (fig. 11). La cutícula s'interrompeix puntualment a nivell de les papil·les sensibles i orificis glandulars (fig. 11).

En MO, la cutícula s'observa clarament diferenciada i es tenyeix amb colorants acidòfils com el blau de toluidina, l'hematoxilina i la fuxina bàsica. És fortament PA-S positiva i en el seu límit exterior presenta una banda estreta que es tenyeix amb els reactius per mucopolisacàrids àcids, com el blau d'Alcià pH 2,5 (fig. 12). Les reaccions per proteïnes (coloració amb blau de Coomassie G) i fibres connectives (impregnació argèntica) donen resultats positius .

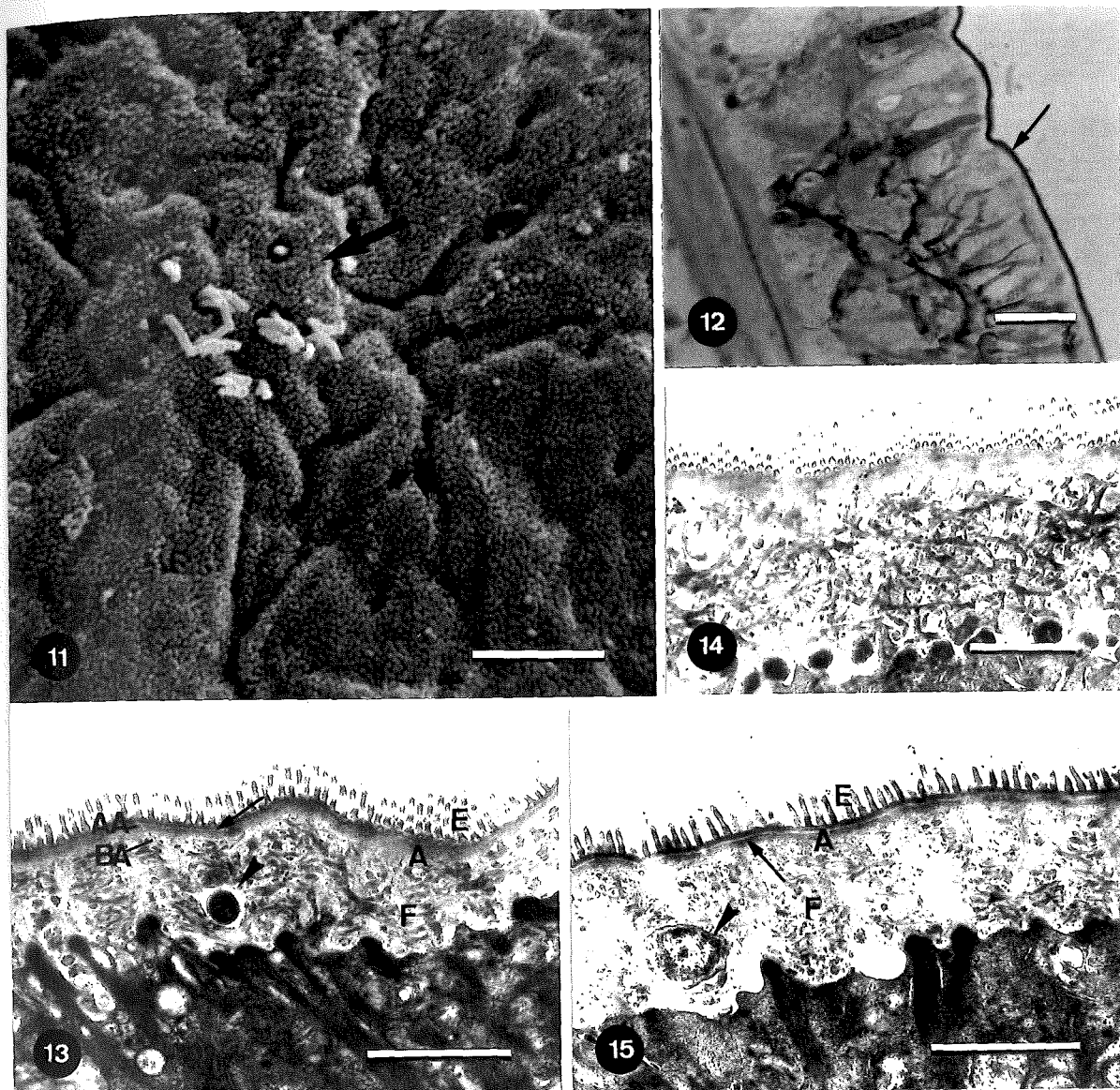
La MET permet constatar la complexitat estructural de la cutícula i els lligams que manté amb les cèl·lules de l'epidermis.

En l'epidermis de la paret corporal, la cutícula mesura entre 850 i 1800 nm de gruix i s'hi distingeixen tres estrats, que de dintre a fora són: fibrós, amorf i epicuticular (fig 13).

#### Estrat fibrós

L'estrat fibrós, situat en una posició basal, té un gruix mig de 900 nm (600-1250 nm). Està format per una matriu clara i homogènia en la qual queden immerses fibres electrodenses. Les fibres es disposen paral·lelament a la superfície epitelial, formant unes 10-16 capes obliqües entre sí, fet que s'aprecia en els talls esviats (fig. 14). El gruix de les fibres oscil·la entre 20 i 100 nm i es pot observar que estan formades per fibril·les. En microscòpia òptica no s'observa estriació de les fibres.

Ocasionalment, en talls transversals de la cutícula i immerses en l'estrat fibrós, s'observen estructures de secció circular d'uns 240 a 550 nm de diàmetre. Són portadores de doble membrana i el seu interior és heterogeni, amb material filamentós a la part central i estructures de secció arrodonida d'uns 8 nm de diàmetre a la part perifèrica (figs. 13 i 15).



**Fig. 11.** Vista del tegument dorsal. Es pot observar una papil·la sensitiva (fletxa) i els porus glandulars (punta de fletxa). Tota la superfície està recoberta de petites protuberàncies. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 12.** Coloració PA-S - blau d'Alcià. La cutícula és fortament PA-S positiva (rosa) i en el seu límit superior presenta una banda estreta que es tenyeix amb el blau d'Alcià (fletxa). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 13.** Secció transversal en la qual es pot veure la cutícula amb els diferents estrats: fibrós, amorf i epicuticular. A l'estrat fibrós es pot veure un cos estrany amb doble membrana i material filamentós i estructures de secció arrodonida a l'interior (punta de fletxa). A l'estrat amorf es distingeix la zona basal electrolúcida i la zona apical electrodensa. A la zona apical es veuen dues bandes electrodenses separades per una banda estreta més clara (fletxa). A: estrat amorf. AA: zona apical de l'estrat amorf. BA: zona basal de l'estrat amorf. E: epicutícula. F: estrat fibrós. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 14.** Secció lleugerament esbiaxada en la qual es pot apreciar la disposició en capes obliqües de les fibres de l'estrat fibrós. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 15.** Secció transversal de la cutícula en la qual es poden distingir els diferents estrats, així com les zones basal i apical de l'estrat amorf, aquesta última partida per una banda estreta més clara (fletxa). A l'estrat fibrós es pot veure un cos estrany amb estructures de secció arrodonida a la perifèria i material filamentós al centre (punta de fletxa). A: estrat amorf. E: epicutícula. F: estrat fibrós. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

### Estrat amorf

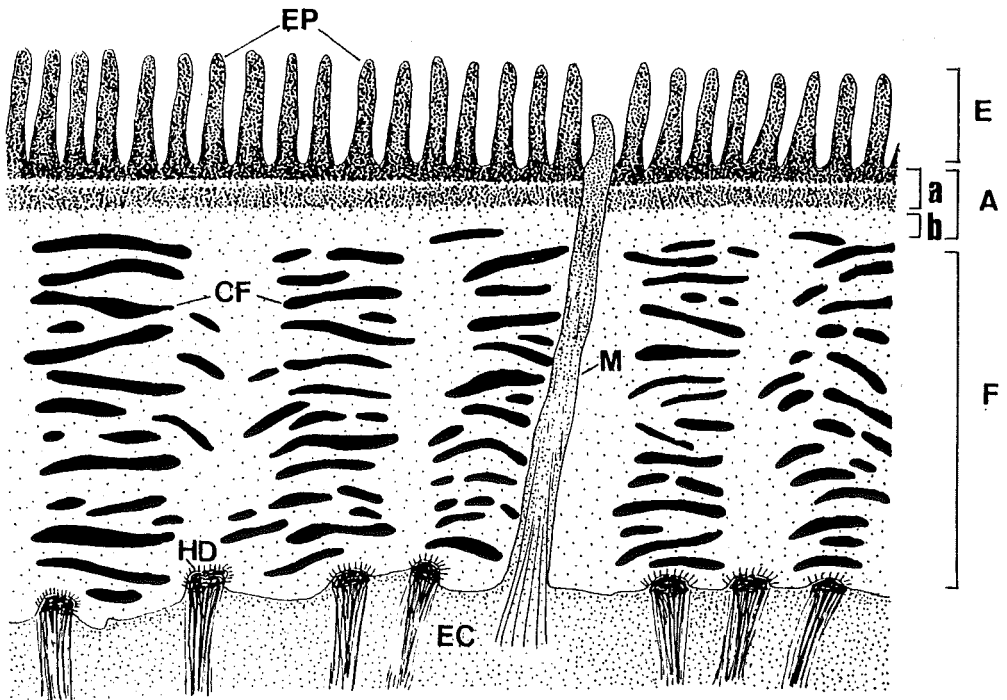
L'estrat amorf segueix a l'estrat fibrós sense solució de continuïtat. Consisteix en una capa d'uns 100-150 nm formada pel mateix material que envolta les fibres de l'estrat fibrós. Presenta una zona basal, d'uns 15 a 40 nm, i una zona apical en la qual es distingeixen dues bandes electrodenses separades per una banda estreta d'aspecte semblant a la zona basal (figs. 13 i 15). La banda densa inferior mesura de 25 a 35 nm, la banda intermitja mesura de 12 a 13 nm i la banda densa superior, que és més electrodensa que la inferior, mesura de 55 a 65 nm.

### Epicutícula

L'epicutícula està formada per les projeccions epicuticulars, implantades sobre l'estrat amorf. Les projeccions tenen una distribució uniforme d'uns 160 per  $\mu\text{m}^2$ , aproximadament fan uns 275 nm d'alçària i són lleugerament còniques a la part inferior, amb uns 65 nm de diàmetre a la base, una tija d'uns 33 nm de gruix i un cap a la punta d'uns 40 nm de diàmetre (fig. 15). Recobrint les projeccions epicuticulars es pot veure un revestiment filamentós amb aparença de glicocàlix.

## Discussió

Les observacions coincideixen amb les dades aportades per Berchtold et al. (1985). La presència dels tres estrats és també comuna a oligoquets, però a poliquets les projeccions epicuticulars o bé falten, o bé es troben molt disperses (Richards, 1984).



**Fig. 16.** Esquema de la cutícula en una secció transversal de l'animal. CF: fibres col·làgenes. a: zona apical de l'estrat amorf. b: zona basal de l'estrat amorf. A: estrat amorf. E: epicutícula. EP: projecció epicuticular. F: estrat fibrós. HD: hemidesmosoma. M: microvellositat epitelial.

Les petites protuberàncies de 60-100  $\mu\text{m}$  de diàmetre observades en MES, probablement corresponen a les projeccions epicuticulars, que tenen uns 40-65  $\mu\text{m}$  de diàmetre, juntament amb el seu revestiment filamentós.

La presència de mucopolisacàrids àcids i neutres a la cutícula és comuna a la major part d'anèl·lids (Richards, 1984). La naturalesa col·làgena de les fibres cuticulars a *Hirudo medicinalis* està corroborada pels resultats positius en les reaccions per proteïnes i per coloracions específiques per fibres connectives, i pel fet que en cucs de terra i poliquets ha estat determinada la presència de col·lagen cuticular per difracció de raig X (Richards, 1984).

És difícil determinar la naturalesa de les estructures de secció circular que s'observen a l'estrat fibrós de la cutícula. No sembla tractar-se de microvellositats de les cèl·lules epitelials, ja que aquestes solen tenir un diàmetre més petit, i contingut menys heterogeni. És possible que corresponguin a bacteris cuticulars, els quals ja han estat descrits a alguns poliquets i equinoderms com a cossos PA-S positius limitats per membrana amb grànuls a l'interior i que es localitzen a l'estrat basal de la cutícula (Richards, 1984).

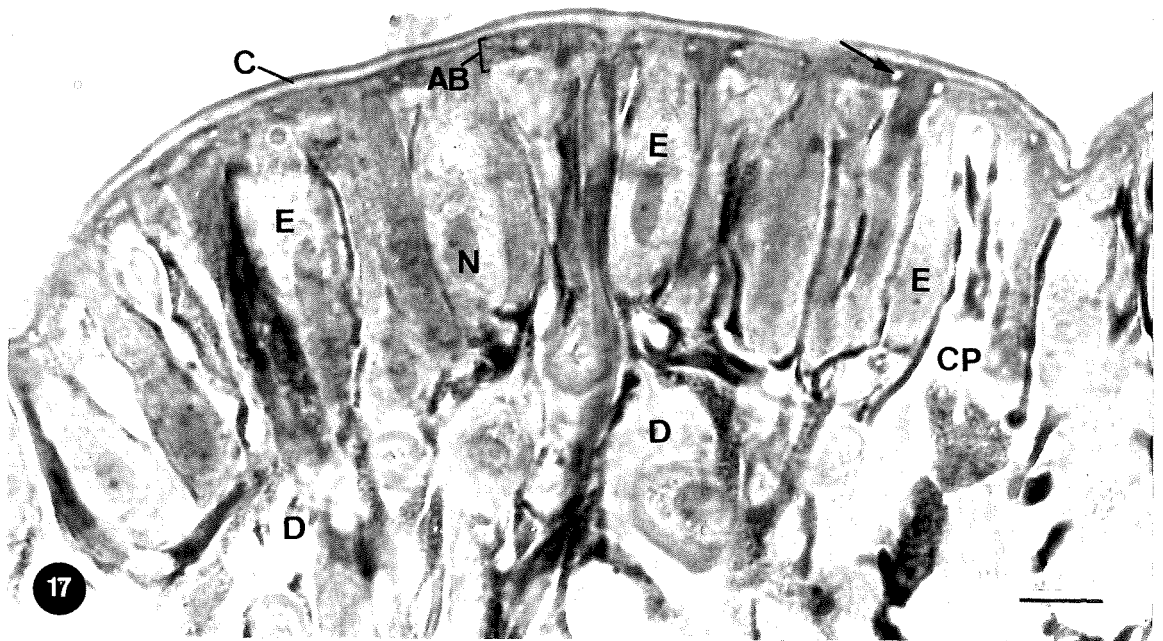
## Cèl·lules epitelials columnars

Les cèl·lules columnars són cilíndriques, d'uns 4,5-7  $\mu\text{m}$  de diàmetre per 20  $\mu\text{m}$  de llarg. Estan fortament unides entre si per les seves porcions apicals, formant una banda apical d'uns 3  $\mu\text{m}$  de profunditat, mentre que les porcions basals, limitades per una conspícua membrana basal, estan immerses en la dermis (figs. 17 i 18). Les porcions basals, que ocupen unes 9/10 parts de la llargària de la cèl·lula, resten separades i no presenten cap tipus d'unió.

La membrana basal, que és mes conspícua en la part que limita amb la banda apical, queda fortament impregnada amb els mètodes argèntics (fig. 19). Està formada per una làmina basal d'uns 20 a 100 nm de gruix on s'hi distingeixen una làmina rara electrolúcida i una làmina densa amorfa, i una làmina reticularis poc estructurada de gruix variable (fig. 20).

### Característiques del nucli i del citoplasma

El nucli està situat en la porció basal, és oval i medeix uns 8,5 X 3  $\mu\text{m}$ . S'hi pot veure un nucleol d'uns 0,7  $\mu\text{m}$  de diàmetre.



**Fig. 17.** Cèl.lules epitel·lials del tegument de la sangonera. Entre les cèl.lules epitel·lials penetren les projeccions citoplasmàtiques dels cromatòfors. En la part apical de l'epiteli s'aprecien les dilatacions de l'espai intercel·lular de les unions (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. AB: banda apical. C: cutícula. CP: projeccions citoplasmàtiques dels cromatòfors. D: teixit connectiu dèrmic. E: cèl.lules epitel·lials columnars. N: nuclis. Barra: 10 µm.

El citoplasma presenta una distribució zonal, amb vesícules de secreció d'uns 150 nm de diàmetre i algun mitocondri en la porció apical i l'aparell de Golgi i la majoria dels mitocondris situats perinuclearment. Hi ha abundància de reticle endoplasmàtic rugós, ribosomes lliures i grànuls de glicogen. Els mitocondris tenen crestes esparces però ben desenvolupades (fig. 22). Els dictiosomes són molt conspicus, mesurant uns 2 X 0,5 µm, i tenen de 4-7 sàculs (figs. 21 i 22). Es pot observar clarament l'associació del reticle endoplasmàtic a la cara cis de l'aparell de Golgi. S'observen vesícules que se separen del reticle endoplasmàtic rugós, perden els ribosomes i s'aplanen, formant sàculs de contingut electrolúcid (fig. 23). Els sàculs dels dictiosomes, a mesura que s'acosten a la cara trans, es tornen més electrodensos, especialment en els extrems, on s'hi observen vesícules golgianes de contingut també electrodens.

Mitjançant el marcatge amb fal·loïdina, s'observa la presència d'actina en les cèl.lules epitel·lials, encara que aquestes cèl.lules queden molt dèbilment tenyides en comparació amb d'altres més riques amb actina, com les fibres musculars o les cèl.lules vasocentrals del teixit connectiu (fig. 59).

### Unions cel·lulars i citoesquelet

La banda apical presenta un característic complexe d'unió, abundants hemidesmosomes i un citoesquelet ben desenvolupat.

#### a) Unions laterals: complexe d'unió

El complexe d'unió, responsable de la forta cohesió lateral de les cèl·lules epitelials, està format per una *zonula adherens* seguida d'una unió septada i de interdigitacions (figs. 20 i 24).

La *zonula adherens* té una longitud de 80 a 100 nm i l'espai intercel·lular al seu nivell és de 30 a 45 nm (figs. 24 i 25).

Per sota s'hi troba la unió septada, caracteritzada per la presència de material dens en forma de septes d'uns 5 nm d'ample a l'espai intercel·lular (figs. 24 i 25). La longitud d'aquesta unió septada és de 1 a 3  $\mu\text{m}$ . La peridiocitat dels septes és de 1 per cada 17 nm i l'espai intercel·lular és de 16 a 20 nm. Sovint la unió septada es veu interrompuda intermitentment per petites zones sense septes, d'una longitud de 100 a 700 nm.

A continuació de la unió septada les membranes de les cèl·lules veïnes s'interdigiten profundament. L'espai intercel·lular a nivell de les interdigitacions és de 16 a 25 nm (fig. 24).

Per sota de la *zonula adherens* s'observa sovint la presència de dilatacions en forma de sàcul de l'espai intercel·lular, el contingut dels quals es molt electrolúcid i es veu buit en MO (fig. 17 i 18). Les dilatacions poden ser úniques o múltiples. Segons els exemplars, les dilatacions són més o menys grosses (figs. 18 i 20). S'han observat dilatacions entre 0,3 i 2,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre. Les dilatacions s'insereixen en el complex d'unió d'uns 300 a 800 nm per sota de la *zonula adherents* i van seguides de la unió septada o de les interdigitacions.

#### b) Citoesquelet i unions apicals i basals: hemidesmosomes

En la superfície apical, nombrosos hemidesmosomes uneixen la cèl·lula a la cutícula, mentre nombrosos hemidesmosomes situats en les parets laterals, per sota del complexe d'unió, la uneixen amb la làmina basal. Els hemidesmosomes cuticulars i dèrmics estan interconnectats per feixos de tonofilaments formant un potent citoesquelet. Aquest citoesquelet ocupa la porció apical de les cèl·lules epitelials (figs. 18, 20 i 24).

Els hemidesmosomes cuticulars són força protuberants, tenen una alçària de 70 a 200 nm i un diàmetre de 110 a 250 nm (figs. 20, 24 i 26). De la seva

superfície exterior surten petites fibril·les d'uns 35-40 nm de llargària que ancoren les cèl·lules a la cutícula.

Els hemidesmosomes dèrmics són menys protuberants, amb només 20-80 nm d'alçària i un diàmetre de 120 a 300 nm. De la seva superfície externa també surten petites fibril·les que penetren en la dermis, encara que no tan ben definides com en els hemidesmosomes cuticulars (figs. 20 i 24).

### Microvellositats

Les microvellositats, molt esparces, travessen la cutícula perpendicular o obliquament i afloren a l'exterior entre les projeccions epicuticulars, amb un aspecte semblant al d'aquestes, però més curtes i gruixudes (fig. 27). Són de forma cònica i longitud variable segons el seu recorregut més o menys inclinat, aflorant

---

**Fig. 18.** Les cèl·lules epitel·lials columnars estan unides en la porció apical, formant la banda apical, mentre que les porcions basals queden separades i immerses en la dermis. Es pot apreciar el citosquelet de tonofilaments en la part apical i la presència de dilatacions de l'espai intercel·lular a nivell de les unions cel·lulars que es troben en la banda apical (fletxa). AB: banda apical. C: cutícula. CP: projeccions citoplasmàtiques dels cromotòfors. D: dermis. E: cèl·lules epitel·lials columnars. H: capil·lar hemocel·lòmic. G: glàndula mucosa. N: nucli. T: tonofilaments. Barra: 10 µm.

**Fig. 19.** La impregnació argèntica permet observar la làmina basal (fletxa) de l'epidermis. E: epidermis. Barra: 50 µm.

**Fig. 20.** Part apical de l'epiteli. Es pot apreciar un complexe d'unió amb una petita dilatació de l'espai intercel·lular (fletxa). També es veuen els hemidesmosomes cuticulars (punta de fletxa) i els hemidesmosomes dèrmics (punta de fletxa), connectats per feixos de tonofilaments. La superfície basal que contacta amb el teixit connectiu dèrmic es veu revestida d'una membrana basal. BM: membrana basal. D: teixit connectiu dèrmic. E: cèl·lula epitelial. T: feixos de tonofilaments. Barra: 1 µm.

**Fig. 21.** Citoplasma supranuclear d'una cèl·lula epitelial columnar. Els mitocondris són abundants i s'observen força dictiosomes. D: dictiosoma. Barra: 1 µm

**Fig. 22.** Detall de la zona perinuclear amb dos dictiosomes. D: dictiosoma. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 1 µm

**Fig. 23.** Detall d'un dictiosoma. Noti's la presència de vesícules intermediàries entre el reticle endoplasmàtic i el dictiosoma. D: dictiosoma. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 1 µm

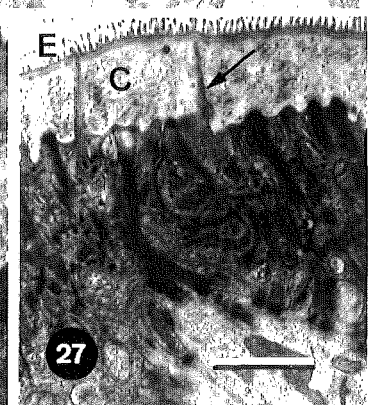
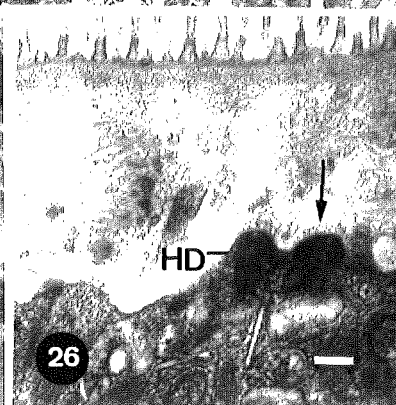
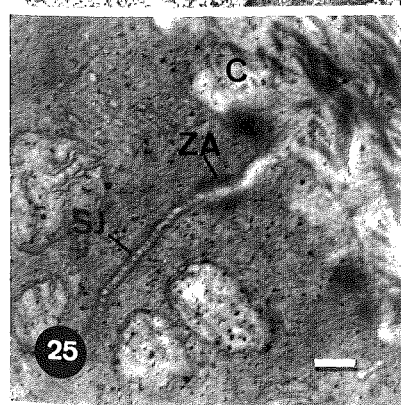
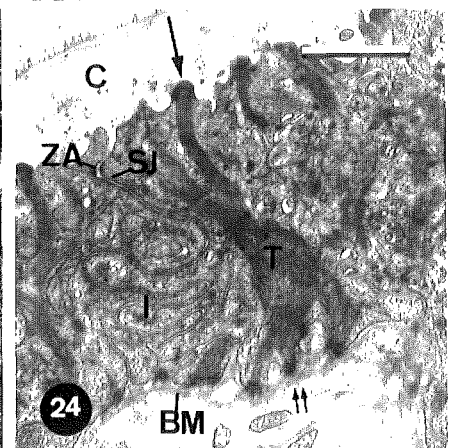
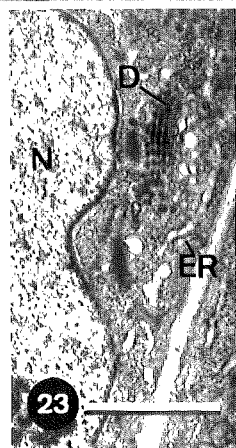
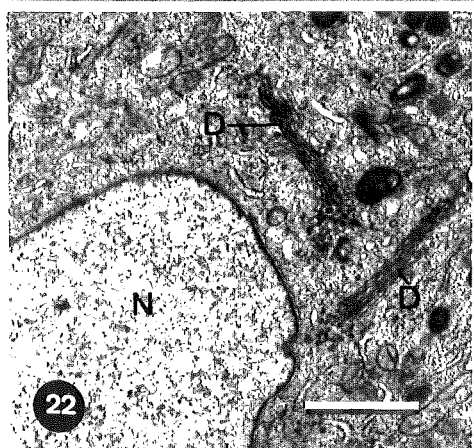
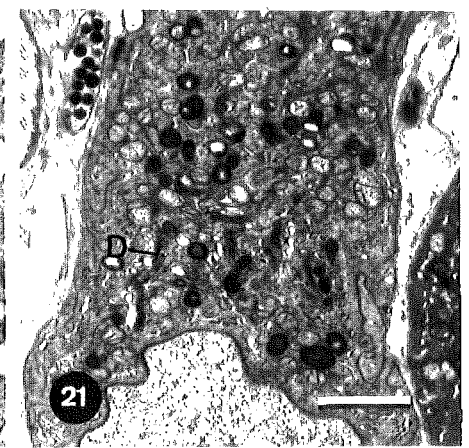
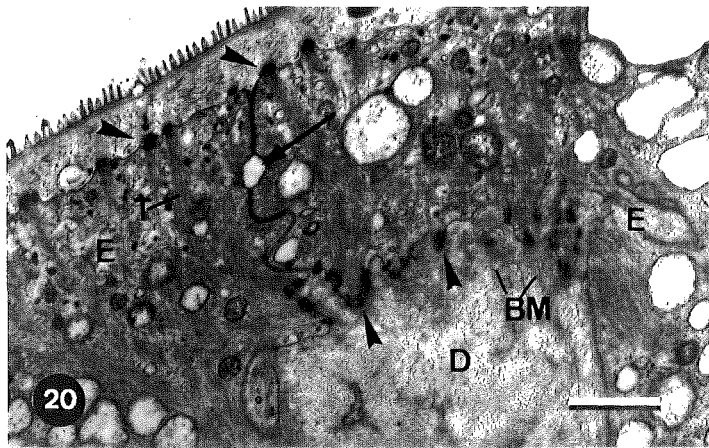
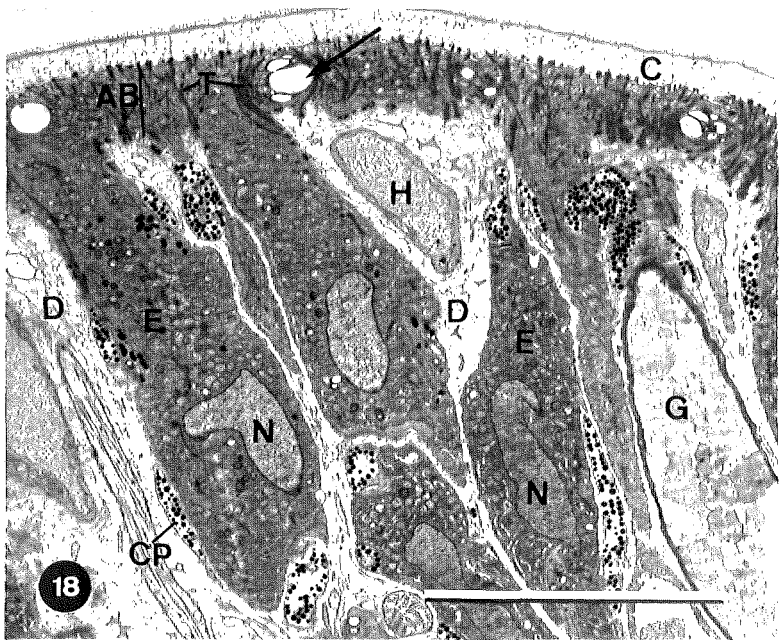
**Fig. 24.** Detall de la banda apical. Es pot observar un complexe d'unió en el qual s'hi distingeix la zònula adherens, la unió acceptada i les interdigitacions. També s'observen hemidesmosomes cuticulars (fletxa) i hemidesmosomes dèrmics (doble fletxa), connectats per feixos de tonofilaments. BM: membrana basal. C: cutícula. I: interdigitacions. T: tonofilaments. SJ: unió acceptada. ZA: *zonula adherens*. Barra: 1 µm.

**Fig. 25.** Detall d'un complexe d'unió. C: cutícula. SJ: unió septada. ZA: *zonula adherens*. Barra: 100 nm.

**Fig. 26.** Hemidesmosomes cuticulars. Observi's la presència de petites fibril·les (fletxa) que penetren en la cutícula. HD: hemidesmosoma. Barra: 100 nm.

**Fig. 27.** Microvellositats epitel·lials (fletxa) internant-se en la cutícula i aflorant entre les projeccions epicuticulars. C: cutícula. E: projeccions epicuticulars. Barra: 1 µm.







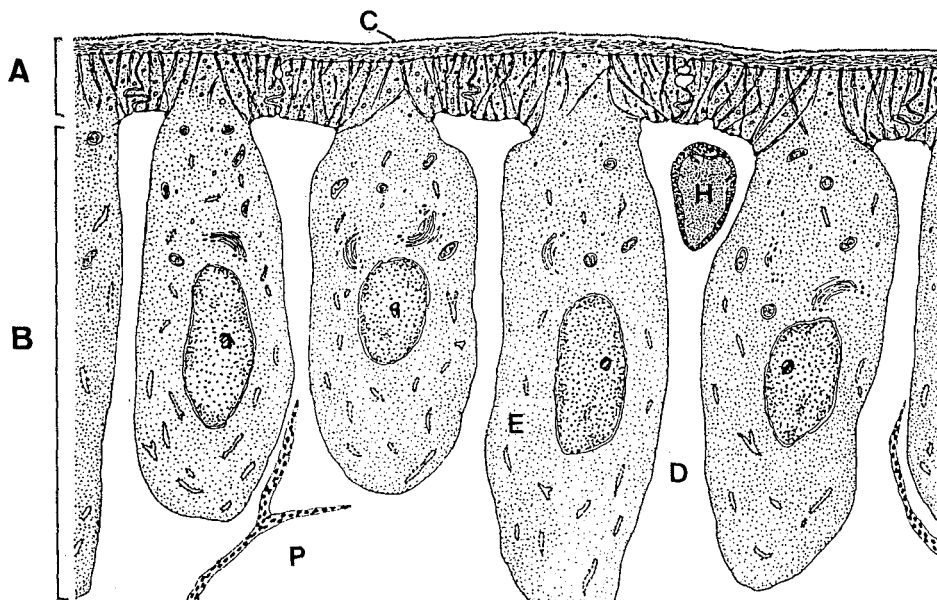
de 80 a 115 nm per sobre la cutícula. El diàmetre a la base és de 100 a 170 nm, a l'interior de la cutícula de 65 a 85 nm i a l'exterior de 65 a 75 nm.

La matriu té la mateixa densitat que el citosol i s'observen elements fibrosos disposats al llarg de la microvellositat, internant-se uns 125 nm en el citoplasma.

## Discussió

L'epiteli es caracteritza per una gran cohesió interna i per la importància de les unions amb la cutícula i la làmina basal.

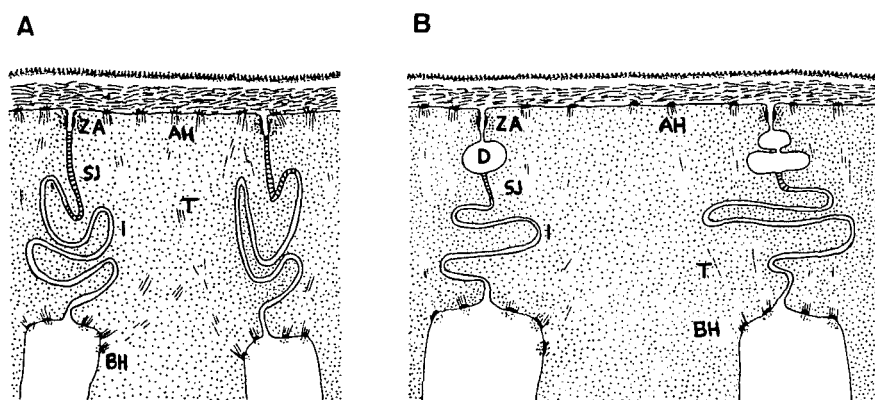
La presència d'una *zonula adherens* en la part superior del complex d'unió, immediatament seguida per una unió septada, es comuna en els invertebrats (Green, 1984). La *zonula adherens* forma una banda a tot el voltant de l'extrem superior de les cèl.lules epitelials amb funció d'ancoratge. Les unions septades també es troben en forma de banda. Són unions oclusives característiques d'invertebrats per sota de tunicats. Les unions septades de tots els teixits epidèrmics estudiats en grups per sobre del nivell dels celenterats i per sota dels equinoderms, són de forma replegada i pertanyen a un tipus caracteritzat per septes d'uns 2 nm de gruix o a un altre tipus caracteritzat per septes d'uns 3-4 nm (Green, 1984). Les unions septades observades a *Hirudo medicinalis*, amb septes d'uns 5 nm, semblen correspondre al segon tipus.



**Fig. 28.** Esquema de l'epitel·li columnar epidèrmic. En la porció apical s'observa un potent citosquelet de tonofilaments, i en la porció basal se situen el nucli i la resta d'orgànuls. A: porció apical. B: porció basal. C: cutícula. D: dermis. E: cèl.lula epitelial. H: capil·lar hemocelòmic. P: projecció citoplasmàtica d'un cromatòfor.

Els hemidesmosomes apicals i basals es diferencien lleugerament per la seva morfologia. Els petits filaments perpendiculars a la superfície dels hemidesmosomes apicals no es distingeixen tan bé en els basals. Aquests filaments han estat descrits amb el nom de filaments d'ancoratge en epitelis de vertebrats, on semblen connectar l'hemidesmosoma amb fibrilles col·làgenes de la matriu (Kurpakus et al, 1990; Marinkovich et al, 1992).

L'epidermis ha de permetre l'extensibilitat i al mateix temps assegurar la cohesió cel·lular. Les unions cel·lulars, les marcades interdigitacions i el potent citosquelet possibiliten aquestes dues funcions (fig. esq). L'alt grau d'interdigitació entre les membranes de les cèl·lules epitelials adjacents és un tret característic de les sangoneres (Welsch et al, 1984) i contribueix a l'acomodament a les alteracions de les dimensions que sofreixen els animals durant la locomoció.



**Fig. 29.** Model segons el qual les dilatacions de l'espai intercel·lular del complex d'unió contribuirien a esmorteir les tensions causades per l'estirament de l'animal. (A) epiteli relaxat. (B) epiteli estirat. AH: hemidesmosoma apical, en contacte amb la cutícula. BH: hemidesmosoma basal, en contacte amb la dermis. D: dilatació de l'espai intercel·lular. I: interdigitacions. T: tonofilaments. SJ: unió septada. ZA: zonula adherens.

A *Hirudo medicinalis* les dilatacions dels espais intercel·lulars són molt més conspicues i freqüents que en altres hirudinis. Malecha (1979) observa, a *Piscicola geometra*, petites dilatacions en el nivell de les unions septades, d'un diàmetre d'uns 0,15 µm. El paper de les dilatacions no és conegut. El fet que siguin buides i que no s'observin vesícules en el citoplasma adjacent, sembla excloure una possible funció d'excreció. Les variacions en el diàmetre i en el nombre de dilatacions podrien estar relacionades amb el grau d'extensió en que es trobaven els animals. Les dilatacions podrien contribuir a esmorteir les tensions ocasionades en un estat de gran extensió de l'animal, que, d'aquesta manera, no han d'afectar tan intensament els components del complex d'unió.

Les cèl.lules columnars són cèl.lules amb activitat secretora, tal com es desprén de l'observació ultrastructural, especialment, per la presència de vesícules secretores. Aquesta activitat es relaciona amb la síntesi dels components cuticulars, tal com ja ha estat descrit en altres treballs (Burke, 1974 a, b i c, Berchtold et al, 1985 i Welsch et al, 1984, Huguet i Molinas, 1986). Es creu que les cèl.lules columnars secreten dos tipus de col.lagen: un basalment cap a la làmina basal i l'altre apicalment, cap a la cutícula (Welsch et al. 1984).

La presència de microvellositats de les cèl.lules epitelials que travessen la cutícula i afloren entre les projeccions epicuticulars, ja ha estat descrita en altres anèl.lids, i sembla estar relacionada amb l'organització de la disposició ortogonal de les fibril.les de col.lagen i en la formació de les projeccions epicuticulars (Richards, 1984).

## GLÀNDULES MUCOSES DEL TEGUMENT

Al tegument s'hi troben nombroses glàndules mucoses. Tenen el cos cel·lular enfonsat a la dermis o entre les capes musculars, i els seus conductes s'obren a la superfície entre les cèl·lules epitelials columnars (fig. 30). Apart de les glàndules que es troben en zones específiques, com les salivals i les clitel·lars, es troben dos tipus de glàndules tegumentàries: les tubulars i les piriformes. Aquests dos tipus glandulars són els encarregats de secretar el moc que recobreix l'animal.

El moc és PA-S positiu, dóna resultats positius en les proves per a mucopolisacàrids carboxilats i sulfatats (blau d'Alcià pH 2,5 i pH 0,3 respectivament) i lleugerament positius en la prova del blau de Coomassie per a proteïnes (taula IV).

### Connexions de les cèl·lules glandulars amb les cèl·lules epitelials columnars

Els porus de les glàndules mucoses mesuren uns 0,7-0,8  $\mu\text{m}$  de diàmetre (fig. 30). Les cèl·lules epitelials columnars que envolten el porus tenen una regió apical

---

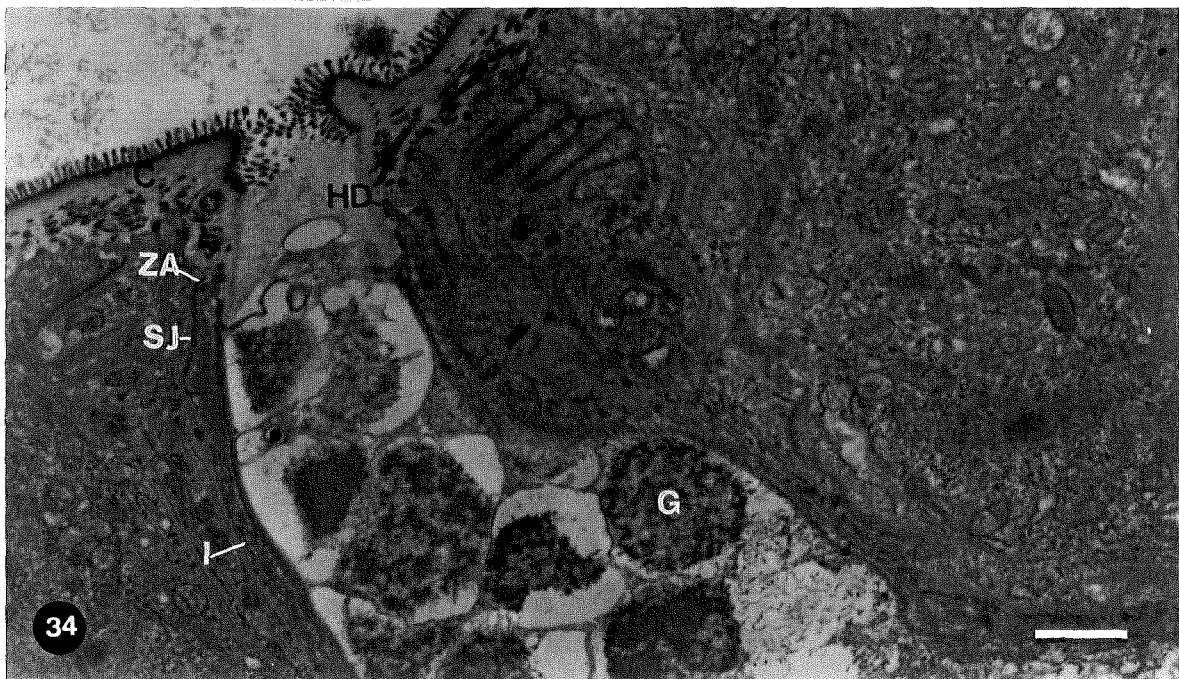
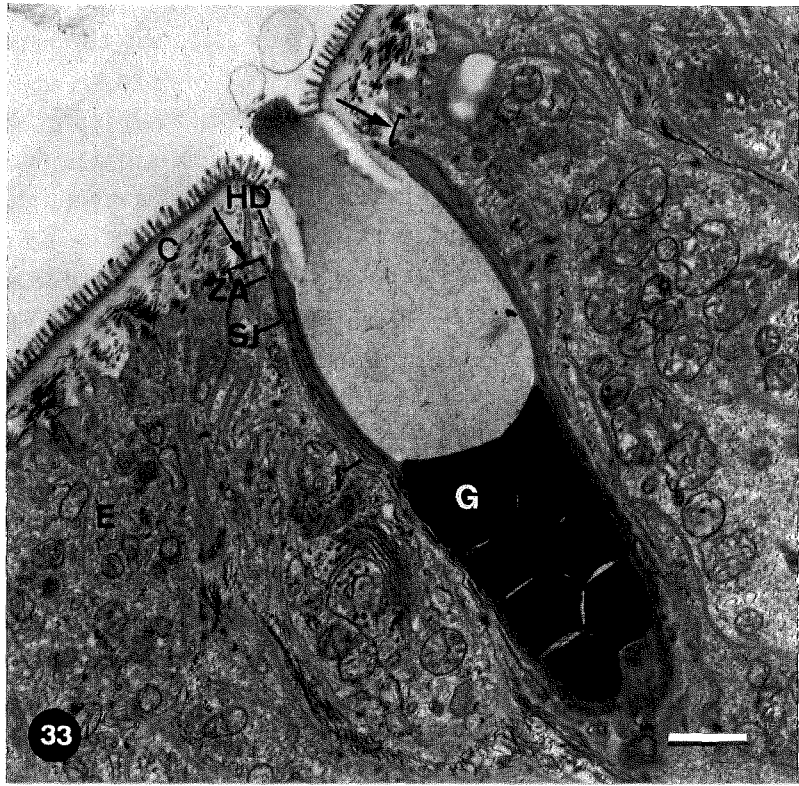
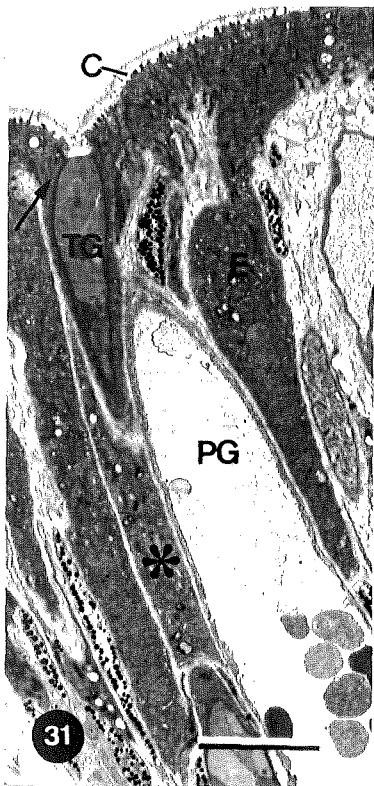
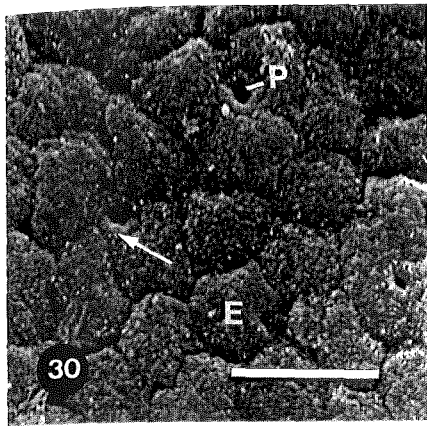
**Fig. 30.** Detall de la superfície del tegument on es poden distingir porus glandulars oberts entre les cèl·lules epitelials. Al voltant dels porus es veuen cèl·lules epitelials especialitzades (fletxa) que tenen una superfície apical molt més petita que la resta de les cèl·lules epitelials. E: cèl·lules epitelials. P: porus. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 31.** Conducte d'una glàndula tubular que s'obre a la superfície corporal entre les cèl·lules epitelials columnars. Es pot distingir, adjacent al conducte, una cèl·lula epitelial que presenta una superfície apical molt petita (fletxa) i que té el cos desplaçat cap ensota (\*). C: cutícula. E: cèl·lula epitelial. PG: conducte d'una glàndula piriforme. TG: conducte d'una glàndula tubular. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 32.** Secció del tegument on es veuen dos glàndules piriformes, una de les quals mostra la part apical del conducte secretor entre les cèl·lules epitelials. E: epiteli columnar. PG: glàndula piriforme. Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 33.** Secció del tegument de *Dina lineata*. Es pot observar l'obertura del conducte d'una glàndula tubular i les unions d'aquest amb les cèl·lules epitelials contigües, les quals presenten una superfície apical molt reduïda (fletxes). S'observen hemidesmosomes contactant la part apical del conducte amb la cutícula. C: cutícula. E: cèl·lula epitelial columnar. G: grànul secretor. HD: hemidesmosomes cuticulars. I: interdigitacions. SJ: unió septada. ZA: *zonula adherens*. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 34.** Part apical del conducte secretor d'una glàndula piriforme de *Dina lineata*, en la qual es distingeixen el complex d'unió amb les cèl·lules epitelials i hemidesmosomes cuticulars. C: cutícula. G: grànul secretor. HD: hemidesmosoma. I: interdigitacions. SJ: unió septada. ZA: *zonula adherens*. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .



més estreta, d'uns 0,8-2  $\mu\text{m}$  d'ampla, que les cèl.lules epitelials normals (4,5-6  $\mu\text{m}$ ), i el cos cel.lular lleugerament desplaçat cap ensota (figs. 30 i 31). Col·lectivament aquestes cèl.lules epitelials formen un anell al voltant del porus glandular.

Les glàndules mucoses es troben unides per la seva porció apical a les cèl.lules epitelials contigües (fig. 32). La unió es dona a nivell de la banda apical de les cèl.lules epitelials, al llarg d'uns 3  $\mu\text{m}$  de profunditat, a partir dels quals el conducte de la glàndula resta separat de les cèl.lules epitelials per internar-se en la dermis. El complex de unió és idèntic al que uneix les cèl.lules epitelials columnars entre si. Consta de: *zonula adherens*, unió septada i interdigitacions (figs. 31, 33 i 34). En la part apical del citoplasma que envolta el porus glandular es troben alguns hemidesmosomes que contacten amb la cutícula. La part apical del conducte només ha estat observada en ME a les glàndules tubulars. En les glàndules piriformes, però, ha estat observada a *Dina lineata*, una sangonera pertanyent també a l'ordre *Arhynchobdellida*, en els curs del treball de tesina "Estructura i ultraestructura del tegument de *Dina lineata*" (Huguet, 1985).

**TAULA IV.- Proves histoquímiques per a mucopolisacàrids i proteïnes aplicades al moc i a les glàndules mucoses del tegument**

Test histoquímic	Glànd. tubulars	Glànd. piriformes	Moc
PA-S	++	-	++
PA-S/blau d'Alcià	blau/violeta	-	/
blau de toluídina	metacromàtic	ortocromàtic	/
blau d'Alcià, pH 2.5	+++	+	++
blau d'Alcià, pH 0.3	+	-	++
blau de Coomassie	-	+	+

+, lleugerament positiu; ++, positiu; +++, fortament positiu; +/-, dèbilment positiu; -, negatiu; /, no provat.

## Glàndules tubulars

Les glàndules tubulars es caracteritzen per presentar un conducte secretor molt llarg, de 80 a 240  $\mu\text{m}$ , d'un diàmetre de 2 a 10  $\mu\text{m}$ , que s'enfonsa fins a les capes musculars, i un cos en forma de cul de sac de 20 a 43  $\mu\text{m}$  de diàmetre (fig. 35). El

nucli es troba a la base de la cèl.lula, junt amb la major part del citoplasma. Els grànuls secretors omplen el cos cel.lular i el conducte secretor.

### **Característiques del nucli i del citoplasma**

El nucli té forma més o menys oval i mesura uns 2,3 X 3,5-5,2  $\mu\text{m}$ . S'observen alguns grànuls d'heterocromatina (fig. 36) i el nucleol és visible.

El citoplasma és ric en reticle endoplasmàtic rugós, les cisternes del qual presenten un contingut lleugerament electrodens (fig. 37). Abunden els mitocondris, de forma bacilar, amb la matriu electrodensa i les crestes ben desenvolupades (fig. 37). Els dictiosomes no s'han pogut observar.

Al voltant de tot el conducte es manté una banda estreta de citoplasma d'uns 50 a 200 nm que arriba fins al porus glandular, on es fa una mica més gruixuda, d'uns 350 nm. S'hi troben ribosomes lliures, algun mitocondri i microtúbuls disposats a tot el voltant del conducte, entre el citoplasma perifèric i la llum, seguint la direcció d'aquest (figs. 38 i 39).

---

**Fig. 35.** Secció del tegument amb la coloració PA-S/blau d'Alcià/hematoxilina/eosina. Es distingeixen les glàndules tubulars, positives tant per la reacció PA-S com per la coloració amb el blau d'Alcià. TG: glàndula tubular. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 36.** Part basal del cos cel.lular d'una glàndula tubular. Es pot observar la presència de grànuls de secreció en diferents estadis de condensació. BM: membrana basal. G: grànuls de secreció. N: nucli. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 37.** Citoplasma basal del cos cel.lular d'una glàndula tubular. ER: reticle endoplasmàtic. G: grànul secretor. M: mitocondri. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 38.** Seccions lleugerament obliqües dels conductes secretors de dues glàndules tubulars. Es pot apreciar la presència de microtúbuls disposats al voltant del conducte (fletxes). En un dels dos conductes el contingut ha estat evacuat i resten les membranes dels grànuls secretors (punta de fletxa). Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

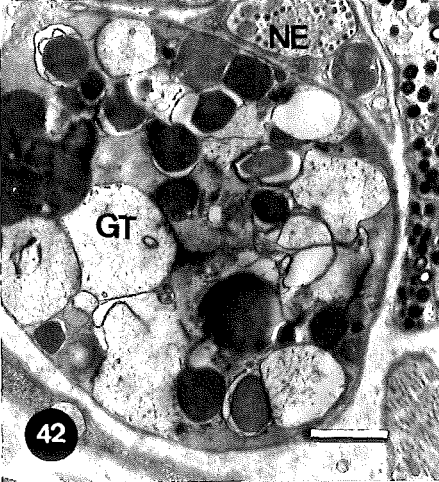
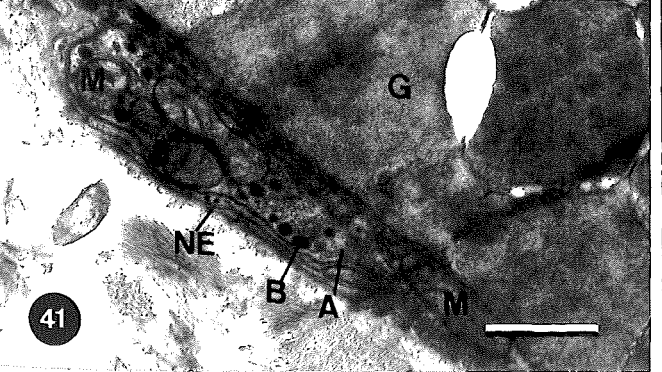
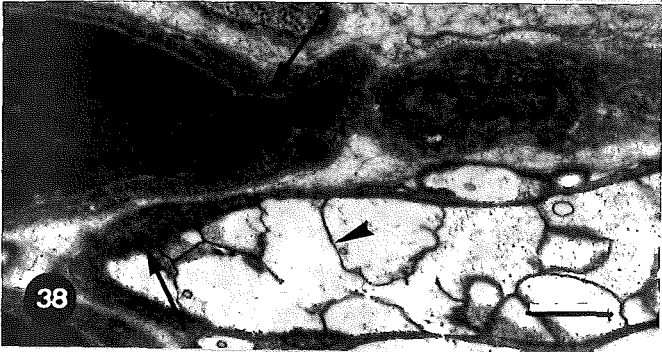
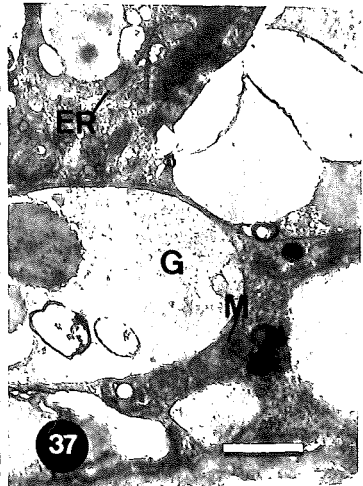
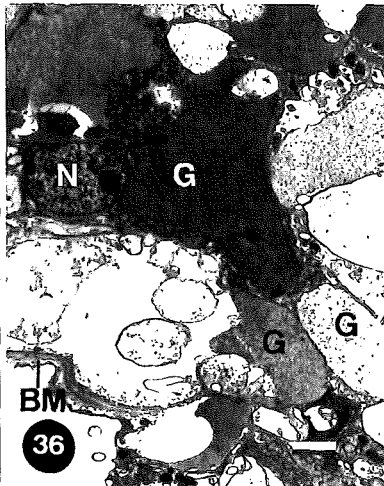
**Fig. 39.** Secció longitudinal d'un conducte d'una glàndula tubular ple de grànuls de secreció. En el citoplasma perifèric es poden distingir alguns mitocondris. La membrana basal presenta evaginacions paral.leles a la superfície (punta de fletxa). G: grànul de secreció. M: mitocondri. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 40.** En aquesta impregnació argèntica es pot apreciar la membrana basal (fletxa) de les glàndules tubulars i també la de les piriformes (doble fletxa). Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 41.** Terminació nerviosa associada a una glàndula tubular. Observi's la presència de mitocondris tant en la terminació nerviosa, com en el citoplasma de la glàndula tubular pròxim a la terminació. G: grànul de secreció. M: mitocondri. NE: terminació nerviosa. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 42.** Secció transversal del conducte secretor d'una glàndula tubular en contacte amb una terminació nerviosa. Observi's la presència de vesícules sinàptiques petites de contingut electrolúcid i vesícules sinàptiques una mica més grans de contingut més electrodens. A: vesícules sinàptiques petites de contingut electrolúcid. B: vesícules sinàptiques una mica més grans de contingut més electrodens. NE: terminació nerviosa. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .







En alguns punts de la membrana plasmàtica s'observen evaginacions paral·leles a la superfície cel·lular (fig. 39).

Es troben revestides d'una membrana basal força conspícua, continua amb la membrana basal de les cèl·lules epitelials veïnes, que es posa de manifest amb les tècniques d'impregnació argèntica (fig. 40). La làmina reticularis és poc estructurada i de gruix variable. La làmina basal mesura de 40 a 60 nm a nivell del conducte (figs. 38 i 39) i de 70 a 110 a nivell del cos cel·lular (fig. 36).

### **Grànuls de secreció**

Els grànuls de secreció són PA-S positius, es tenyeixen intensament en les reaccions per mucopolisacàrids àcids (blau d'Alcià pH 2,5) i dèbilment en les de mucopolisacàrids àcids sulfatats (blau d'Alcià pH 0,3) (fig. 35) (taula IV). Amb el blau de toluïdina són metacromàtics. En les proves per la detecció de proteïnes amb blau de Coomasie donen resultats negatius (taula IV).

Els grànuls són vesícules voltades membrana amb un contingut finament granular (fig. 36). En la part basal de la cèl·lula són més grossos (fins a 5  $\mu\text{m}$ ) i menys condensats (fig. 36), mentre que en el conducte aquests grànuls estan densament empaquetats, tenen el contingut més dens i són de diàmetre menor (de 1 a 2,5  $\mu\text{m}$ ) (fig. 39).

### **Inervació**

S'han observat terminacions nervioses a nivell del conducte glandular que contenen nombroses vesícules sinàptiques i alguns mitocondris (fig. 41). Les vesícules sinàptiques són de dos tipus: unes petites, de 30 a 50 nm de diàmetre, de contingut electrolúcid i unes altres més grans, de 90 a 120 nm de diàmetre, amb un nucli electrodens de 60 a 90 nm de diàmetre (figs. 41 i 42).

Es freqüent observar en el citoplasma glandular pròxim a la zona sinàptica la presència de mitocondris (fig. 41).

## **Glàndules piriformes**

Les glàndules mucoses piriformes són més abundants a la superfície dorsal del tegument que a la ventral. Són de forma globular o piriforme, mesurant entre 13 X 18 i 44 X 68  $\mu\text{m}$  (figs. 43 i 44). Els cossos cel·lulars es troben enfonsats a diferents nivells en la dermis i aboquen a la superfície per un conducte estret, d'una longitud de 25-150  $\mu\text{m}$ . Els cossos cel·lulars situats a les capes més

profundes són generalment grans, mentre que els més superficials són de mesures variables.

Es poden veure glàndules en diferents estadis de maduració, en els quals el cos cel·lular augmenta de volum per acumul de grànuls de secreció i es produeix un enfonsament en la dermis. El citoplasma i el nucli en veuen progressivament desplaçats a una posició més basal, fins que queden aplatats contra la membrana plasmàtica (figs. 43 i 44).

### **Característiques del nucli i del citoplasma**

El nucli es troba en la porció basal, és ovalat en les glàndules més joves, d'uns 10 X 5  $\mu\text{m}$ , i aplatat en les més madures, d'uns 13,5 X 3,5  $\mu\text{m}$  (figs. 45 i 46). El nucleol és visible i la cromatina granular.

El citoplasma es troba confinat a la part basal de la cèl·lula per la presència dels grànuls de secreció. És molt ric en ribosomes, que sovint es veuen en forma de polisomes, i reticle endoplasmàtic rugós (fig. 47). El contingut del reticle és d'una densitat similar o lleugerament més clara a la del citosol i s'hi poden observar nombroses vesícules dilatades (figs. 47 i 48). Els mitocondris i l'aparell de Golgi es troben en posició perinuclear. Els mitocondris són de forma bacilar, amb la matriu densa als electrons i les crestes ben desenvolupades. Els dictiosomes no són molt conspicus, tenen un diàmetre de 1 a 1,3  $\mu\text{m}$  i els seus

---

**Fig. 43.** Secció transversal de la paret corporal on s'aprecien glàndules piriformes a diferents nivells de profunditat. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. M: fibra muscular. N: nucli. PG: glàndula piriforme. Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 44.** Ídem que l'anterior. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. M: fibra muscular. N: nucli. PG: glàndula piriforme. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 45.** Citoplasma basal d'una glàndula piriforme. BM: membrana basal. G: grànul de secreció. N: nucli. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

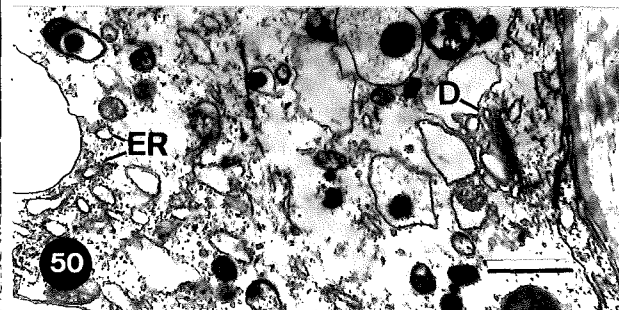
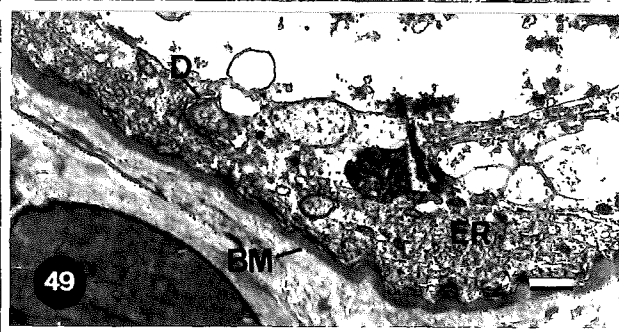
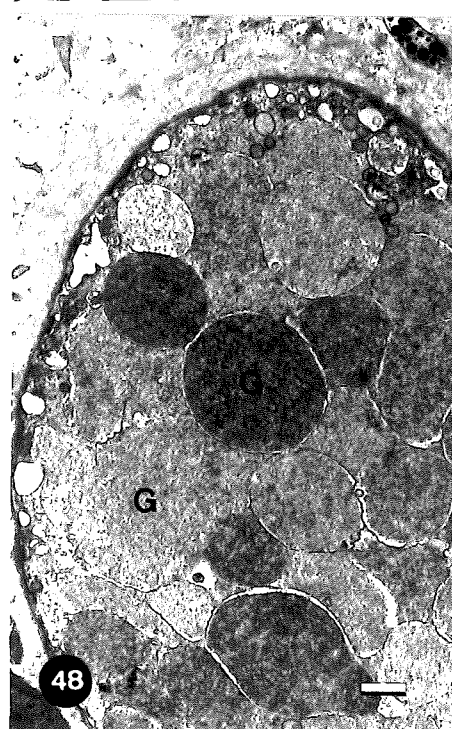
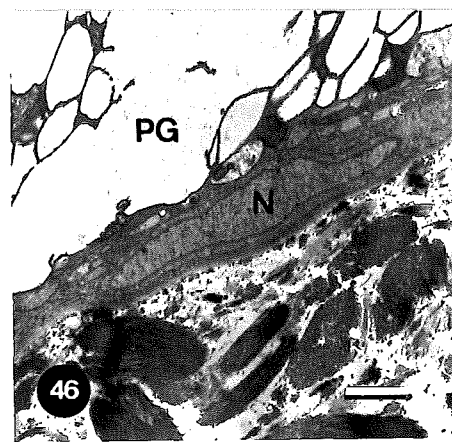
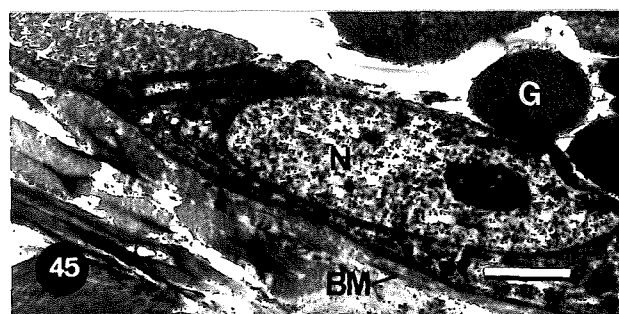
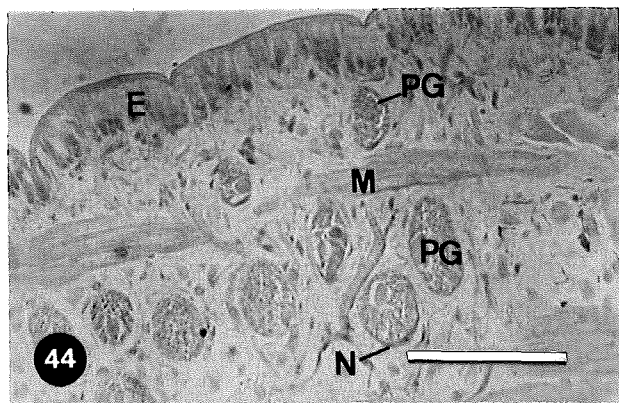
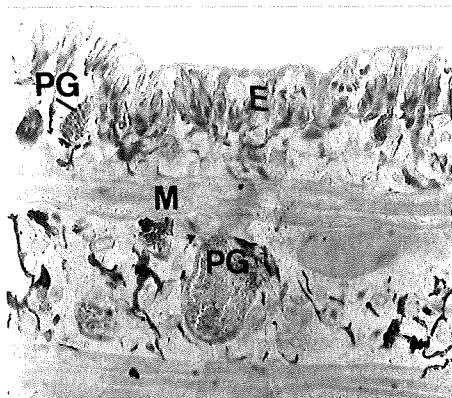
**Fig. 46.** Citoplasma basal d'una glàndula piriforme força madura, amb el nucli aplatat al fons. N: nucli. PG: glàndula piriforme. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 47.** Citoplasma basal d'una glàndula piriforme en el qual abunda el reticle endoplasmàtic rugós. Es pot distingir un grànul de secreció encara no condensat (\*) i altres ja condensats. ER: reticle endoplasmàtic. G: grànul de secreció. 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 48.** Secció transversal del cos cel·lular d'una glàndula piriforme, pròxima a la part basal, en la qual es pot apreciar citoplasma amb abundant reticle endoplasmàtic en la part perifèrica i grànuls en diferent grau de condensació en la part central. G: grànul de secreció. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 49.** Citoplasma basal d'una glàndula piriforme amb força reticle endoplasmàtic rugós i un dictiosoma. BM: membrana basal. ER: reticle endoplasmàtic. D: dictiosoma. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 50.** Detall del citoplasma basal d'una glàndula piriforme en el qual es distingeix un dictiosoma. D: dictiosoma. ER: reticle endoplasmàtic. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .



sàculs mostren dilatacions amb un contingut més o menys electrolúcid (fig. 49 i 50). També es pot observar la presència d'alguns lisosomes.

A nivell del conducte secretor es pot observar un petit gruix de citoplasma perifèric de 70 a 250 nm, en el qual, al igual que en les glàndules tubulars, s'hi troben ribosomes lliures, algun mitocondri i abundants microtúbuls (fig. 51).

La membrana plasmàtica presenta nombroses evaginacions que transcorren paraleles a la superfície cel.lular (figs. 52 i 53).

Les glàndules piriformes també es troben revestides d'una membrana basal conspícua, continua amb la de les cèl.lules epitelials veïnes (fig. 40). La làmina reticularis és poc estructurada i de gruix variable. La làmina basal és lleugerament més gruixuda que la de les tubulars. Mesura de 50 a 80 nm a nivell del conducte (figs. 51 i 53) i de 100 a 200 a nivell del cos cel.lular (fig. 49).

### **Grànuls de secreció**

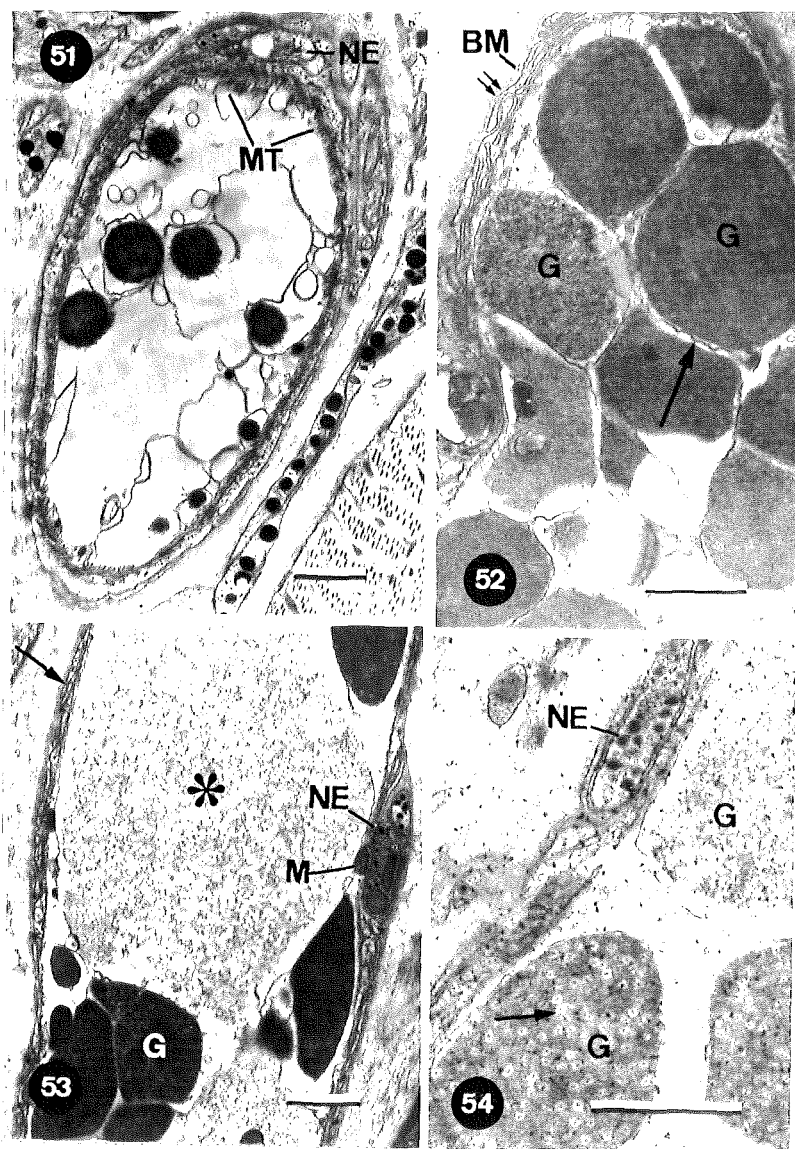
En el cos cel.lular i el conducte es poden veure nombrosos grànuls de secreció. Es tenyeixen bé amb colorants basòfils com l'eosina o el verd llum, i lleugerament amb coloracions per mucopolisacàrids àcids (blau d'Alcià pH 2,5), però són PA-S negatius, ortocromàtics amb el blau de toluïdina i donen resultats negatius en les proves per a mucopolisacàrids àcids sulfatats (blau d'Alcià pH 0,3) (taula IV). En les proves per la detecció de proteïnes (blau de Coomasie) donen resultats dèbilment positius (taula IV).

Els grànuls són vesícules d'un diàmetre de 1,3 a 2,5  $\mu\text{m}$  que estan envoltades de membrana (fig. 52), encara que és freqüent que aquesta es perdi en el recorregut dels grànuls pel conducte secretor, el qual fa que el contingut es dispersi (fig. 53). A la part basal de la glàndula es veuen grànuls en diferents estadis de condensació (fig. 47) al costat de vesícules dilatades del reticle (fig. 48). Una vegada condensats, aquests grànuls no són homogènis, sino que mostren una matriu electrodensa amb presència de nombrosos noduls clars de 60 a 65 nm de diàmetre. Dintre de cada nodulació s'observa un nucli o "core" central electrodens d'uns 25 nm de diàmetre (fig. 54).

### **Inervació**

Es poden trobar terminacions nervioses a diferents punts de la glàndula piriforme, principalment a nivell del conducte (figs. 51 i 53), però també al cos cel.lular (fig. 54).

Al igual que en les glàndules tubulars, és freqüent observar en el citoplasma glandular proper a la zona sinàptica la presència de mitocondris (figs. 53 i 54).



**Fig. 51.** Secció transversal d'un conducte secretor d'una glàndula piriforme en contacte amb una terminació nerviosa. Es pot apreciar la presència de microtúbuls en la perifèria del conducte, entre el citoplasma i la llum. MT: microtúbuls. NE: terminació nerviosa. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 52.** Secció transversal d'una glàndula piriforme. Es pot observar la presència de grànuls de secreció voltats de membrana (fletxa). La membrana plasmàtica presenta evaginacions paral·leles a la superfície (doble fletxa). BM: membrana basal. G: grànul de secreció. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 53.** Secció longitudinal del conducte secretor d'una glàndula piriforme, amb una terminació nerviosa. Es veuen mitocondris tant en la terminació, com en el citoplasma glandular pròxim. Alguns grànuls han perdut la membrana i el contingut s'ha dispersat (\*). Es poden observar evaginacions de la membrana plasmàtica paral·leles a la superfície (fletxa). G: grànul de secreció. M: mitocondri. NE: terminació nerviosa. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 54.** Cos cel·lular d'una glàndula piriforme en contacte amb una terminació nerviosa. Observi's que els grànuls secretors no són homogenis, sino que mostren uns nòduls clars amb un nucli central electrodens (fletxa). G: grànul de secreció. NE: terminació nerviosa. Barra: 1  $\mu$ m.

La majoria de les unions sinàptiques estan formades per terminacions nervioses iguals a les descrites en les glàndules tubulars, les quals contenen majoritàriament vesícules del tipus petit amb algunes vesícules del tipus gran (figs. 51 i 54). En ocasions, just al costat i fent contacte amb aquestes terminacions, es poden observar terminacions nervioses amb només vesícules sinàptiques del tipus gran (fig. 53).

## Discussió

El moc que recobreix la sangonera presenta unes afinitats histoquímiques que concorden amb una secreció mixta de les glàndules piriformes i les tubulars. Les glàndules piriformes, que són les més nombroses, estan relacionades amb una secreció lleugerament positiva per mucopolisacàrids carboxilats i per proteïnes; mentre que les glàndules tubulars, presents en nombre menor però amb un contingut més alt de mucopolisacàrids, secreten mucopolisacàrids carboxilats juntament amb una fracció neutre i una sulfatada (taula IV). Els resultats concorden amb els obtinguts a *Dina lineata* (*Arhynchobdellida*) (Molinas i Hugué, 1993) (taula V). Els estudis electroforètics del moc de *Glossiphonia complanata* (Rahemtulla and Lovtrup, 1975) mostren la presència de dos fraccions de mucopolisacàrids àcids, una de les quals està fortament sulfatada. A *Helobdella stagnalis*, en canvi, les glàndules tubulars han estat associades amb la secreció de mucopolisacàrids carboxilats i algunes glàndules tubulars modificades, situades a la sola adhesiva de la ventosa posterior, han estat associades amb la secreció d'una fracció sulfatada (Cornec, 1990).

**TAULA V.- Proves histoquímiques per a mucopolisacàrids i proteïnes aplicades al moc i a les glàndules mucoses del tegument de *Dina lineata***

Test histoquímic	Glànd. tubulars	Glànd. piriformes	Moc
PA-S	++	-	++
PA-S/blau d'Alcià	blau/violeta	-	/
blau de toluídina	metacromàtic	ortocromàtic	/
blau d'Alcià, pH 2.5	+++	+	++
blau d'Alcià, pH 0.3	+	-	+
blau de Coomassie	-	+	+

+, lleugerament positiu; ++, positiu; +++, fortament positiu; +/-, dèbilment positiu; -, negatiu; /, no provat.

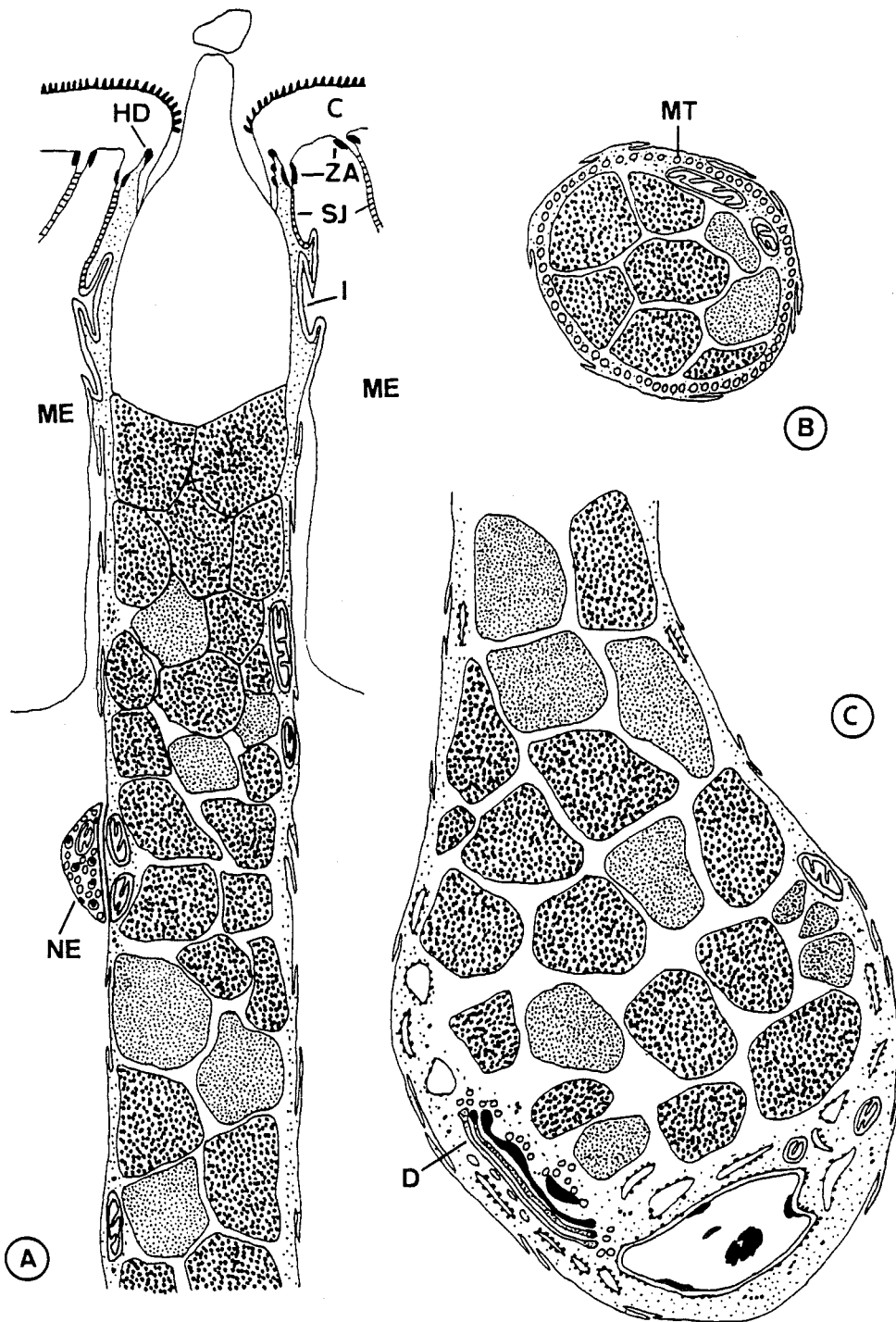


La presència d'un anell de microtúbuls a la perifèria del conducte secretor és comuna a les glàndules cel·lulars dels invertebrats (Rieger et al, 1991; McClintock Turbeville, 1991). En el grup del anèl·lids ha estat observat en les cèl·lules mucoses d'alguns poliquets (Wesch et al, 1984), en les glàndules tubulars de sangoneres rincobdèl·lides (Clark, 1965) i a les glàndules tubulars i piriformes de l'arincobdèl·lide *Dina lineata* (Molinas i Huguet, 1993). L'alliberament dels grànuls secretors per part de les glàndules tubulars i piriformes està probablement associat amb la presència d'aquests microtúbuls.

És de destacar la presència d'un anell de cèl·lules epitelials modificades que envolta l'àpex del conducte glandular. Aquestes cèl·lules han estat ben identificades en la perifèria de les glàndules tubulars i totes les dades indiquen que també hi són presents al voltant de les piriformes. Desconeixem la seva possible implicació com a mecanisme de tancament i obertura de la glàndula. S'han citat diferents exemples de cèl·lules epidèrmiques modificades al voltant dels porus de les glàndules mucoses a invertebrats, els quals poden actuar com a mecanismes de control de l'extrusió del moc. En els turbelaris, els porus glandulars estan voltats per un collar de cilis de cèl·lules epitelials especialitzades (Rieger et al, 1991). Altres especialitzacions de les cèl·lules epitelials veïnes han estat citades en els anèl·lids oligoquets *Lumbricillus mirabilis* i *L. rivalis* en forma de microfilaments disposats en un patró a modus d'esfinter a l'apex d'aquestes cèl·lules (Welsch et al, 1984).

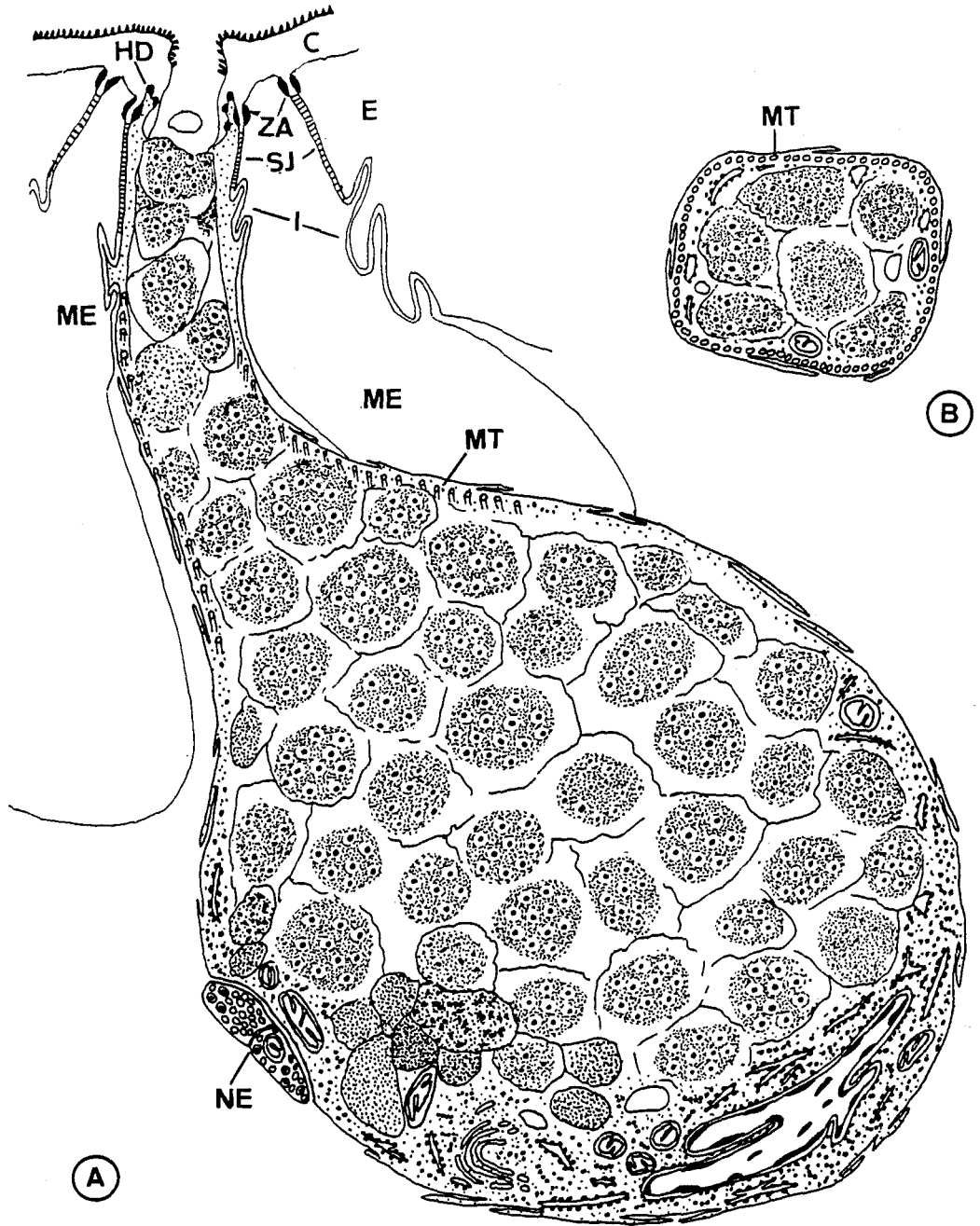
Les glàndules mucoses dels anèl·lids, en general, no tenen terminacions nervioses associades, per la qual cosa la descàrrega de moc es podria donar per l'estimulació de les cèl·lules epidèrmiques adjacents (Welch et al, 1984).

A *Hirudo medicinalis* és de remarcar l'existència de terminacions nervioses directament a sobre la superfície de les cèl·lules glandulars estudiades, donant evidències morfològiques de que les glàndules mucoses del tegument de les sangoneres estan sota control neuronal. Aquesta hipòtesi queda reforçada pel fet que a *Piscicola (Rhynchobdellida)* també s'han observat terminacions en contacte amb cèl·lules glandulars (Welch et al, 1984). El coneixement del mecanisme pel qual aquest control es produeix és incomplet. La presència de terminacions nervioses associades i de cèl·lules epidèrmiques modificades pot fer pensar en un doble mecanisme de control de l'excreció del moc. S'ha vist que hi ha control neuronal de la secreció del moc per part de les neurones Retzius (Lent 1973) i a les cèl·lules glandulars salivals d'*Haementeria ghilianii (Rhynchobdellida)* s'ha vist que l'estimulació neuronal provoca potencials d'acció i secreció (Werner et al, 1989).



**Fig. 54.** Esquema de diferents seccions d'una glàndula tubular. (A) conducte secretor, secció longitudinal. (B) conducte secretor, secció transversal. (C) secció longitudinal de la porció basal del cos cel.lular. C: cutícula. D: dictiosoma. HD: hemidesmosoma. I: interdigitacions. ME: cèl.lula epitelial modificada. MT: microtúbuls. NE: terminació nerviosa. SJ: unió septada. ZA: zonula adherens.





**Fig. 55.** Esquema de diferents seccions d'una glàndula piriforme. (A) secció longitudinal. (B) conducte secretor, secció transversal. C: cutícula. E: cèl.lula epitelial columnar. ME: cèl.lula epitelial modificada. HD: hemidesmosoma. I: interdigitacions. MT: microtúbuls. NE: terminació nerviosa. SJ: unió septada. ZA: *zonula adherens*.

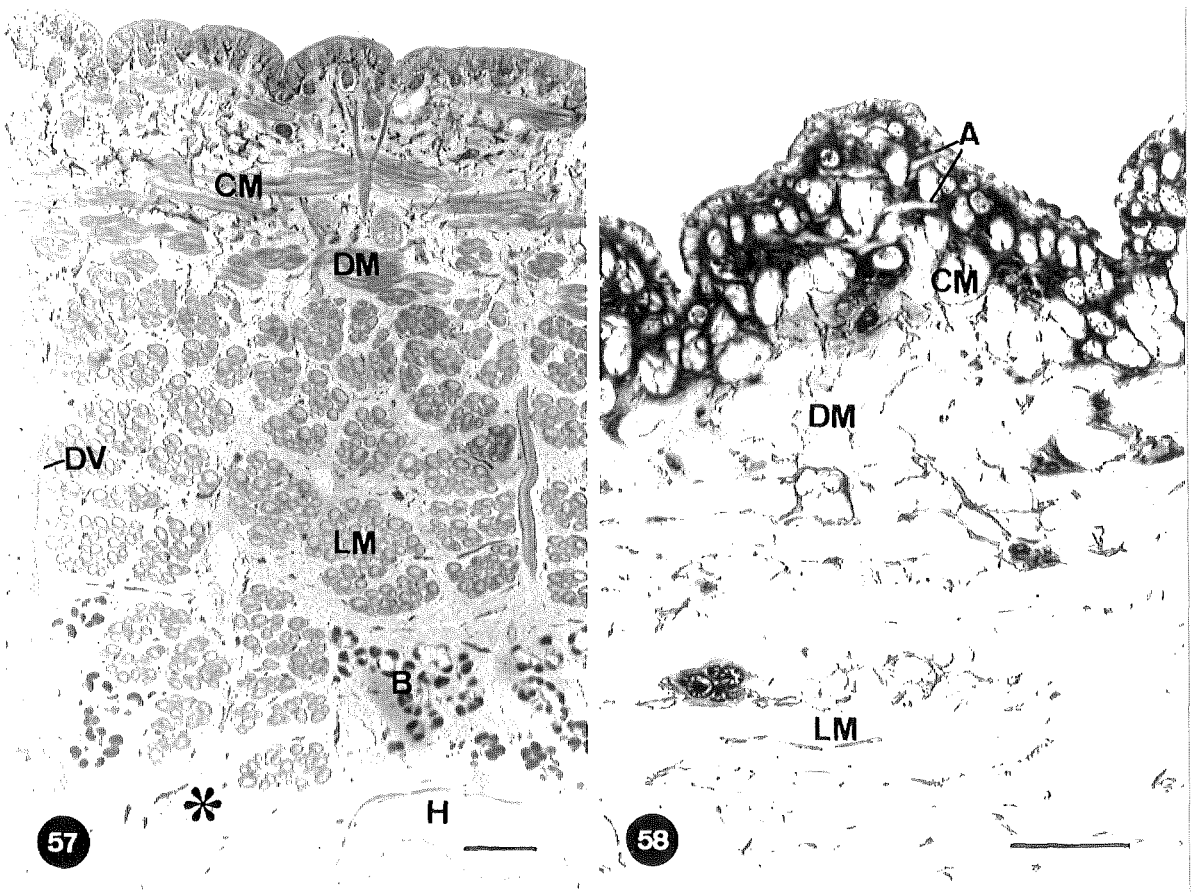
Les observacions indiquen, al menys, dos tipus de terminacions nervioses i coincideixen amb els resultats obtinguts en un altre arincobdèl·lide, *Dina lineata* (Molinas i Huguet, 1993). D'una banda les terminacions amb predominància de vesícules clares, que es troben tant a glàndules tubulars com a piriformes, les quals podrien contenir acetilcolina per la seva similitud amb terminacions colinèrgiques conegudes (Sawyer, 1986). D'altra banda, la presència, al menys en glàndules piriformes, de terminacions amb vesícules electrodenses, les quals coincideixen morfològicament amb d'altres descrites a sangoneres com a serotoninèrgiques (Sawyer, 1986). S'ha vist que el neurotransmissor implicat en la resposta de les neurones Retzius és la serotonina i que aquestes neurones són les úniques serotoninèrgiques que envien processos a la perifèria (Sawyer, 1986). És de destacar que aquest tipus de terminació sempre s'ha observat, en el nostre model, en contacte amb l'altre, fet que suggereix un mecanisme de control indirecte.

L'existència de dos tipus de glàndules mucoses en el tegument presenta el problema afegit de l'especificitat del control.

## MUSCULATURA

### Musculatura de la paret corporal

En la paret corporal d'*Hirudo medicinalis* s'hi troben tres capes musculars, que de interior a exterior són: capa longitudinal, capa diagonal i capa circular (fig. 57). A més, feixos musculars dorsoventrals travessen les capes musculars al llarg del cos de l'animal (fig. 57). També, just per sota de l'epiteli, es poden veure les fibres erectores dels ànuls (fig. 58).



**Fig. 57.** Secció transversal de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis*. Es poden observar els feixos de la musculatura circular, els diagonals i els longitudinals. També s'observen alguns feixos dorsoventrals. En la part inferior es troba el teixit connectiu del parènquima perivisceral (\*), amb teixit botridial i algun vas del sistema hemocel·lòmic. B: teixit botridial. CM: musculatura circular. DM: musculatura diagonal. DV: feix de musculatura dorsoventral. H: vas hemocel·lòmic. LM: musculatura longitudinal. Barra: 100 µm.

**Fig. 58.** Secció longitudinal de la paret corporal. Es pot veure com petites fibres musculars atravesen l'ànul, són les responsables de la seva erecció. A: fibres musculars dels ànuls. CM: musculatura circular. DM: musculatura diagonal. LM: musculatura longitudinal. Barra: 100 µm.

## **Capes musculars**

### *Musculatura circular*

La musculatura circular està formada per dos estrats principals separats per teixit connectiu, en el qual abunden glàndules mucoses del tegument, capil·lars subepidèrmics i cèl·lules pigmentàries (fig. 57). Entre aquests dos estrats principals s'hi troben alguns feixos aïllats de musculatura circular.

### *Musculatura diagonal*

La musculatura diagonal es disposa en dos estrats formats per feixos discrets, els quals transcorren en direccions creuades entre sí i helicoidals respecte l'eix longitudinal de l'animal (fig. 57).

### *Musculatura longitudinal*

La musculatura longitudinal està formada per nombrosos feixos compactes, els quals s'agrupen de forma irregular en feixos més grossos (fig 57). Aquests feixos recorren tota la llargària del cos.

## **Musculatura dorsoventral**

La musculatura dorsoventral és segmentària. Està formada per 4 feixos principals, dos paramedials i dos intermedials, que travessen el cos dorsoventralment insertant-se entre les cèl·lules epitelials (figs. 57 i 59). La musculatura dorsoventral divideix la cavitat del cos en tres cambres: entre els dos feixos paramedials resten el tub digestiu i els vasos hemocelòmics dorsal i ventral i a cada costat del cos, entre els feixos intermedial i paramedial, s'hi troben els vasos hemocelòmics laterals, els cecs del tub digestiu, el sistema nefridial i el sistema reproductor.

A més d'aquests 4 feixos principals, n'hi han d'altres menys conspicus situats lateralment, en una posició externa respecte els feixos intermedials. També es troben feixos d'orientació dorsoventral entre els feixos de la musculatura longitudinal en la part dorsal de l'animal, els quals no arriben a atravesar la totalitat de la paret corporal (fig. 57).

## **Músculs erectors dels ànuls**

Els músculs erectors dels ànuls consisteixen en petites fibres que s'extenen anteroposteriorment al llarg de l'ànul. Aquestes fibres tenen un diàmetre d'uns  $7,5 \times 3-4 \mu\text{m}$  i una llargària que avarca tot l'ànul. Es troben situades a la dermis, just per sota de l'epiteli, i en els seus extrems s'inserten entre les cèl·lules epitelials (fig. 58 i 60).



**Fig. 59.** Marcatge amb fal·loïdina. Secció transversal de la paret corporal on es poden veure les fibres musculars, amb l'actina intensament marcada per la fal·loïdina. Es veuen petites fibres de disposició dorsoventral que s'inserten entre les cèl·lules epitelials (fletxes). CM: musculatura circular. E: epitel·li. Barra: 100  $\mu$ m.

## Fibres musculars de la paret del cos

La fibra muscular és afusada, de varis mil·límetres de longitud, i de secció irregular. Les fibres es troben compactades a dintre del feix de forma que el seu contorn encaixa amb el de les fibres veïnes. El diàmetre oscil·la, en la part mitja del cos cel·lular, entre formes arrodonides d'uns 21 X 21  $\mu$ m de diàmetre a formes aplatades o irregulars d'uns 10 X 28  $\mu$ m de diàmetre. No s'han pogut detectar diferències morfològiques remarcables entre les quatre musculatures diferents de la paret corporal.

Són fibres d'estriació obliqua. És característica la disposició dels elements contràctils en la part perifèrica del citoplasma, mentre que el nucli i els orgànuls se situen en la porció central. La zona cortical contràctil és eosinòfila i el sarcoplasma central és PA-S positiu.

### Característiques del nucli i del citoplasma

El nucli és ovalat, ocupa una posició central axial, mesurant 2-4 X 4-5  $\mu\text{m}$  de diàmetre i 9-10  $\mu\text{m}$  de longitud. La cromatina és homogènia i sovint es veu un nucleol de 0,5-1,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre (fig. 60).

El sarcoplasma central és ric en mitocondris. Aquests, es caracteritzen per tenir les crestes ben desenvolupades i poden arribar a mesurar 1 X 3  $\mu\text{m}$ , siguent visibles inclús en MO (figs. 61 i 62). També s'hi troben nombrosos ribosomes lliures i grànuls de glicogen. El reticle endoplasmàtic rugós és més aviat escàs. En la zona perinuclear es poden observar alguns lisosomes. Ocasionalment s'han observat vesícules golgianes perinuclears (fig. 60). En l'espai perifèric entre el córtex contràctil i el sarcolemma també s'hi poden observar alguns mitocondris.

El sarcolemma presenta nombroses petites evaginacions en forma laminar que transcorren paral·leles a la superfície (fig. 63).

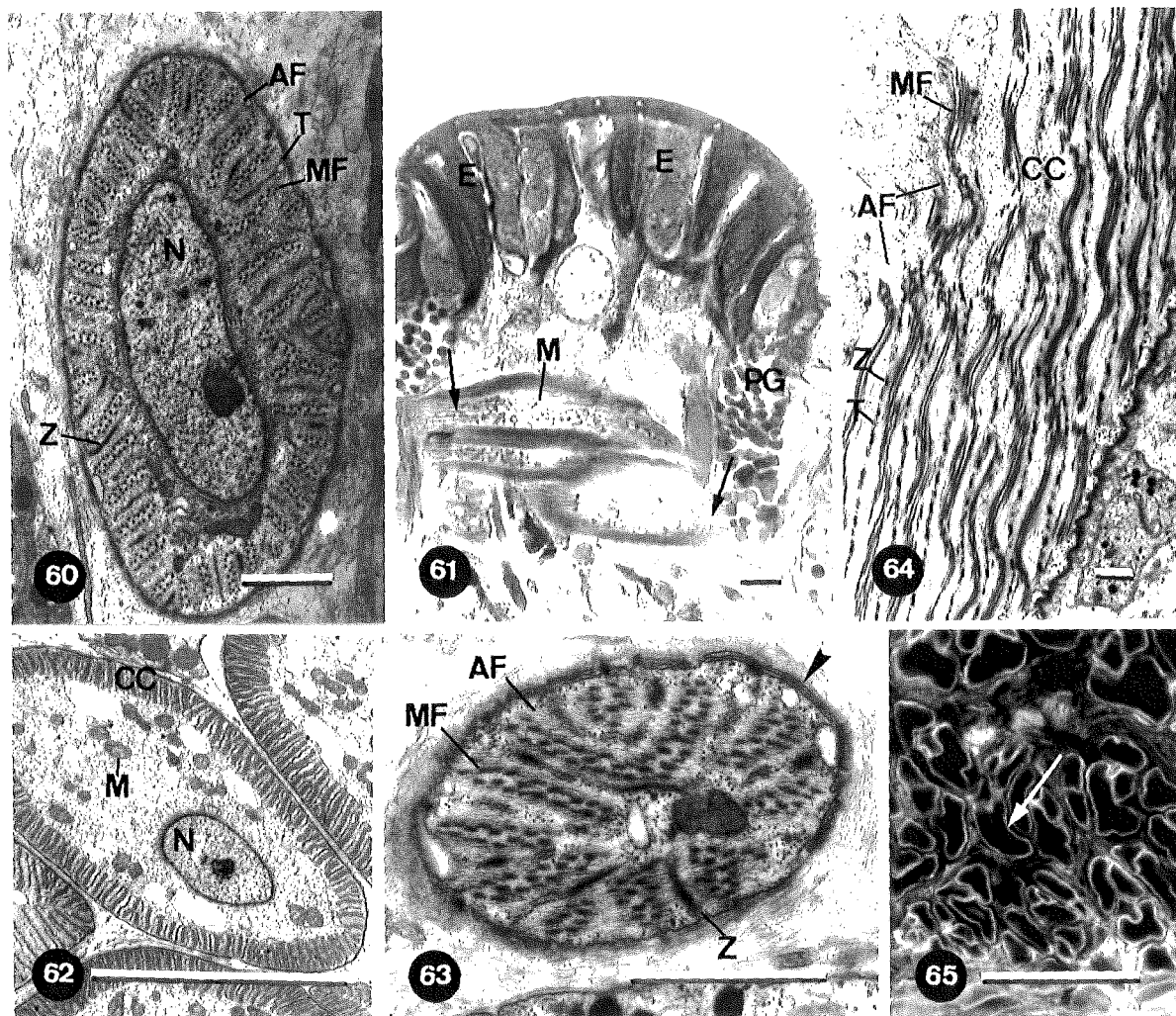
La zona cortical contràctil té un gruix de 1,5 a 5  $\mu\text{m}$ . En seccions transversals de les fibres musculars es pot veure com les barres Z, de forma tubular, i els túbuls T, es disposen formant radis al voltant del córtex cel·lular, perpendicularment a la membrana plasmàtica (figs. 60 i 63). Entre mig d'aquests elements radials es veuen miofilaments fins i gruixuts tallats transversalment. Els elements radials mostren una separació de 400 a 600  $\mu\text{m}$ .

Els miofilaments no estan disposats longitudinalment al llarg de la fibra muscular, sino de forma lleugerament obliqua. Els sarcomeres no queden disposats en registre, formant les bandes transversals que caracteritzen les fibres esquelètiques dels vertebrats, sino que queden desplaçats uns respecte els altres (fig. 64 i esquema adjunt).



Esquema de la disposició dels miofilaments gruixuts. **A)** fibra muscular esquelètica de vertebrat. **B)** fibra muscular d'*Hirudo medicinalis*.

En secció longitudinal es pot veure que les barres Z i els túbuls T s'alinen, alternant-se les unes amb els altres, amb una disposició helicoidal al llarg de la fibra (fig. 64).



**Fig. 60.** Fibra muscular erectora dels ànuls. Es pot apreciar la disposició de les barres Z i els túbuls T formant radis al voltant del córtex cel·lular, entre els quals es veuen els miofilaments prim i els gruixuts. AF: miofilaments prim. MF: miofilaments gruixuts. N: nucli. T: túbul T. Z: barra Z. Barra: 1 µm.

**Fig. 61.** Fibres de la musculatura circular, en les que s'aprecia un citoplasma central, en el qual es distingeixen els mitocondris, i un citoplasma contràctil perifèric, en el qual es veu una estriació longitudinal (fletxes). E: cèl·lula epitelial. M: mitocondris. PG: glàndula piriforme. Barra: 100 µm.

**Fig. 62.** Secció transversal d'una fibra muscular. CC: córtex contràctil. M: mitocondri. N: nucli. Barra: 10 µm.

**Fig. 63.** Secció transversal d'una fibra muscular on s'aprecia la disposició de les miofibril·les i les barres Z. La membrana plasmàtica presenta evaginacions paral·leles a la superfície (punta de fletxa). AF: miofilaments prim. MF: miofilaments gruixuts. Z: barra Z. Barra: 1 µm.

**Fig. 64.** Detall d'una secció longitudinal d'una fibra muscular. Es poden veure els miofilaments prim i gruixuts tallats de forma obliqua, i les barres Z i els túbuls T tallats transversalment. Es pot apreciar com els miofilaments gruixuts queden desplaçats uns respecte als altres, donant lloc a l'estriació longitudinal observada en MO. Observi's com les barres Z i els túbuls T s'alinen alternant-se uns amb els altres. AF: miofilaments gruixuts. CC: córtex contràctil. MF: miofilaments prim. T: túbuls T. Z: barres Z. Barra: 1 µm.

**Fig. 65.** Secció transversal a nivell de la musculatura longitudinal on, amb el marcatge amb la lectina PNA, es pot apreciar la membrana basal de les fibres musculars (fletxa). Barra: 100 µm.

Els túbuls T són lleugerament deprimits, mesurant uns 150 X 25 nm. A l'extrem proper al sarcolemma es veuen formes vesiculars de 100 a 300 nm de diàmetre (fig. 60).

### **Membrana basal i teixit connectiu perimuscular**

Intimament associada al sarcolemma hi ha la membrana basal formada per una làmina basal que mesura de 100 a 250 nm de gruix i una làmina reticularis més conspícua que la de les cèl.lules epitelials, però tampoc gaire estructurada (fig. 63). Les tècniques d'impregnació argèntica i de marcatge amb les lectines Con A i PNA permeten apreciar la presència d'aquesta membrana basal (figs. 65 i 66).

Els espais intersticials entre les fibres musculars es troben ocupats per un teixit connectiu que no es diferencia clarament de la resta del connectiu de la paret del cos. Al voltant dels feixos musculars no s'observa un vertader perimisi, però si una major proporció de fibres al voltant dels feixos de la musculatura longitudinal propera al parenquima perivisceral. El teixit connectiu de la paret del cos és molt ric en elements fibril.lars, especialment a nivell de la dermis, però a mesura que s'acosta al parenquima perivisceral les fibres es fan menys abundants. És en aquesta zona pròxima al parenquima perivisceral, on, per la disminució relativa de les fibres al teixit connectiu contigu, es fa palesa la presència de fibres envoltant els feixos musculars, encara que sense formar una capa contínua (fig. 66).

És de remarcar que en els espais intersticials entre les fibres dels feixos no s'observen capil.lars i que en el teixit connectiu que volta els feixos aquests tampoc són gaire abundants.

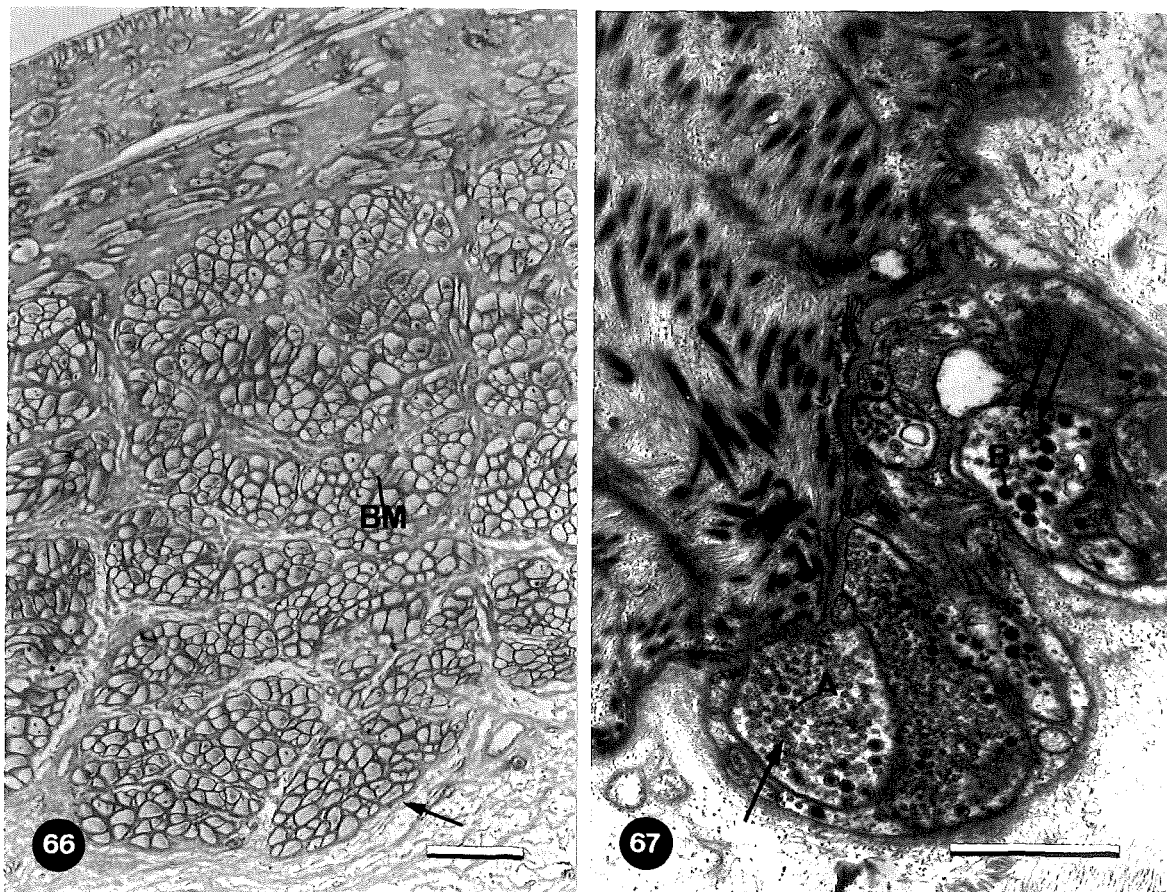
### **Inervació**

Les fibres musculars estan inervades per terminacions nervioses en les que s'observen vesícules sinàptiques de dos tipus: unes petites, de 30 a 40 nm de diàmetre, de contingut electrolúcid i unes altres més grans, de 80 a 125 nm de diàmetre, amb un nucli electrodens de 60 a 90 nm de diàmetre (fig. 67). Els terminals nerviosos també contenen mitocondris amb nombroses crestes ben desenvolupades.

La majoria de les unions neuromusculars estan formades per varies terminacions nervioses intimament unides que contenen preferentment vesícules del tipus petit de contingut electrolúcid. Fent contacte amb aquestes, es poden observar terminacions nervioses amb vesícules sinàptiques dels dos tipus descrits (fig. 67).



L'espai sinàptic, situat entre la membrana presinàptica i la postsinàptica, és força ample, de 60 a 100 nm, i conté material electrodens (fig. 67).



**Fig. 66.** Impregnació argèntica d'una secció transversal de la paret corporal. S'aprecia la membrana basal de les fibres musculars i la presència de fibres connectives a la matriu. En algun punt es pot apreciar la major abundància de fibres al voltant dels feixos musculars, sense que arribin a formar una capsula fibrosa consistent (fletxa). BM: membrana basal. Barra: 100  $\mu$ m.

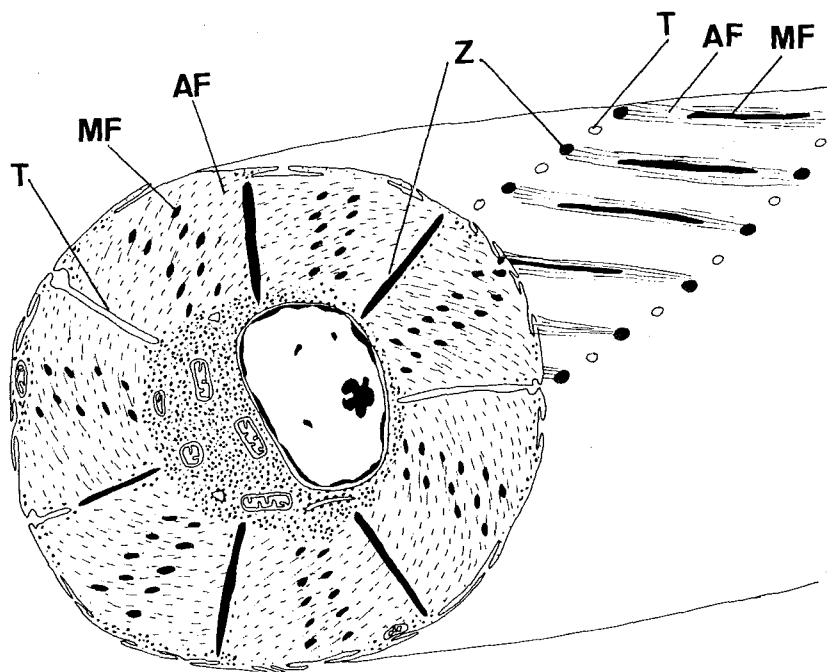
**Fig. 67.** Unió neuromuscular. Es pot apreciar la presència de vesícules sinàptiques petites de contingut electrolúcid i de vesícules sinàptiques una mica més grans de contingut electrodens. Algunes de les terminacions contenen vesícules del tipus petit (fletxa) mentre que altres en tenen del dos tipus (doble fletxa). A: vesícules sinàptiques del tipus petit electrolúcid. B: vesícules sinàptiques electrodenses. Barra: 1  $\mu$ m.

## Discussió

La musculatura de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis* presenta les tres capes musculars típiques dels hirudinis -circular, diagonal i longitudinal- així com els músculs dorsoventrals molt ben desenvolupats.

Les fibres musculars descrites presenten la disposició obliqua dels elements contractils característica de molts invertebrats (Paniagua, 1993).

No observen diferències morfològiques entre les fibres que constitueixen les diferents capes musculars. Altres autors, però, amb estudis immunohistoquímics, han identificat dos tipus de fibres musculars de la paret corporal d'*Hirudo medicinalis* en referència a l'activitat ATPàsica i a la composició de la miosina (Rowlerson i Blackshaw, 1991). Les fibres circulars, diagonals, dorsoventrals i un petit nombre de les longitudinals són de contracció més lenta que la majoria de les longitudinals i contenen una diferent isoforma de la miosina (Rowlerson i Blackshaw, 1991).



**Fig. 68.** Esquema d'una fibra muscular seccionada transversalment. Les barres Z i els túbuls T s'alternen, arranjats en fileres que transcorren obliquament al llarg de la fibra. Els filaments primers i gruixuts queden tallats de forma lleugerament obliqua. AF: filaments primers (actina). MF: filaments gruixuts (miosina). T: túbuls T. Z: barres Z.

En relació a la inervació nerviosa, es creu que les terminacions amb vesícules clares petites corresponen a unions colinèrgiques i les terminacions amb vesícules més grans electrodenses a unions serotoninèrgiques (Sawyer, 1986). S'observa que aquestes últimes no contacten directament amb la fibra muscular, sino que sinapsen amb les terminacions colinèrgiques. Es creu que representen contactes d'inhibició presinàptica (Sawyer, 1986).

## TEIXIT CONNECTIU

### Matriu extracel.lular

#### Substància fonamental

La substància fonamental és lleugerament PA-S positiva, amb el blau de toluïdina mostra una metacromasia de tipus beta i s'hi detecta la presència de mucopolisacàrids àcids amb el blau d'Alcià.

La detecció de proteïnes amb el blau de Coomasie dóna resultats lleugerament positius.

#### Fibres

En MO es pot veure la presència de fibres del teixit connectiu amb la coloració amb blau de toluïdina i amb la impregnació argèntica (figs. 69 i 70). Aquestes fibres són molt llargues, la màxima llargària que s'ha observat en els talls histològics és de 150 µm i segurament són molt més grans. S'observa que les fibres mostren una diferenciació entre "còrtex" argirofil i "medul.la" clara (fig. 70).

---

**Fig. 69.** Teixit connectiu del parènquima perivisceral. Coloració amb blau de toluïdina. B: teixit botridial. E: epitelí intestinal. F: fibres connectives. H: vas hemocel.lòmic. Barra: 100 µm.

**Fig. 70.** Secció a nivell del teixit connectiu dèrmic. Es poden veure fibres connectives en les que s'aprecia un còrtex argiròfil (fletxes) i una medul.la clara (punta de fletxa). Impregnació argèntica. Barra: 1 µm.

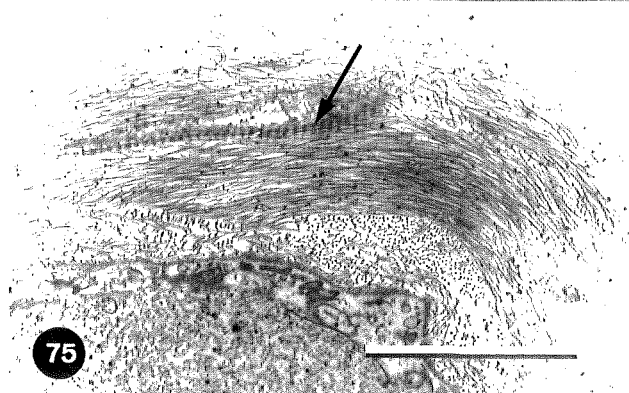
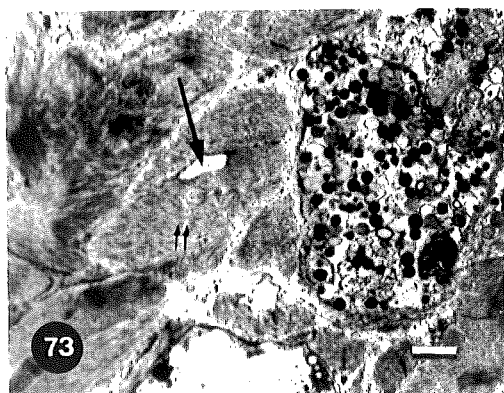
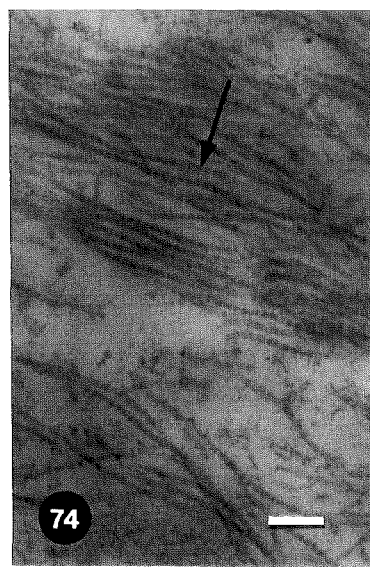
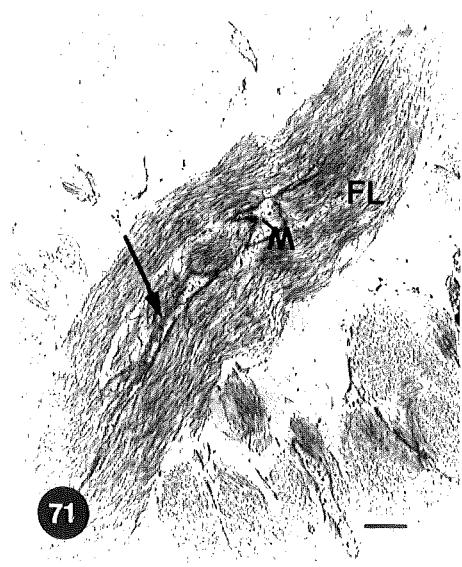
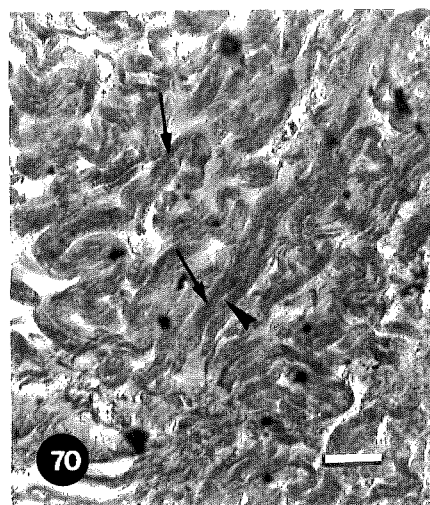
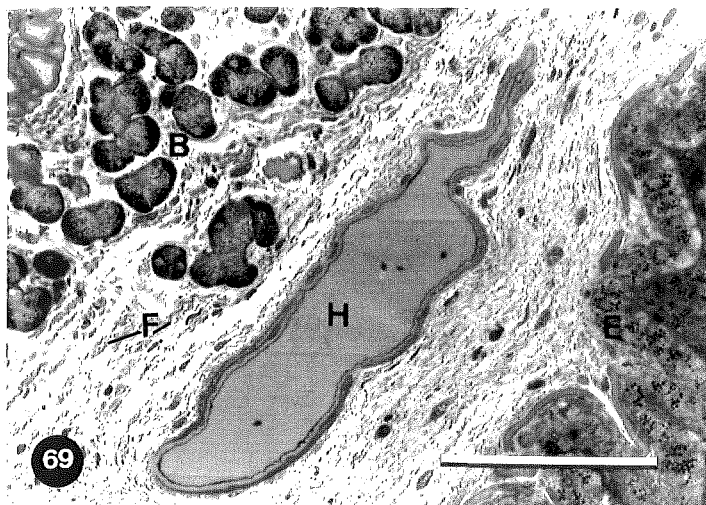
**Fig. 71.** Fibra connectiva tallada de forma més o menys longitudinal. El còrtex està format per fibril.lles disposades en el mateix sentit que la fibra, i la medul.la té un contingut granular. Observi's l'estriació secundària en les fibril.lles adjacents a la medul.la (fletxa). FL: fibril.lles. M: medul.la. Barra: 1 µm.

**Fig. 72.** Secció longitudinal del teixit connectiu del parènquima perivisceral on s'aprecien fibres connectives. La medul.la presenta en aquestes fibres una secció lenticular (fletxes). Barra: 1 µm.

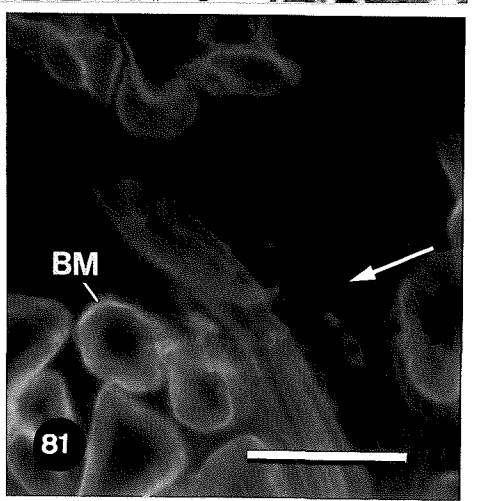
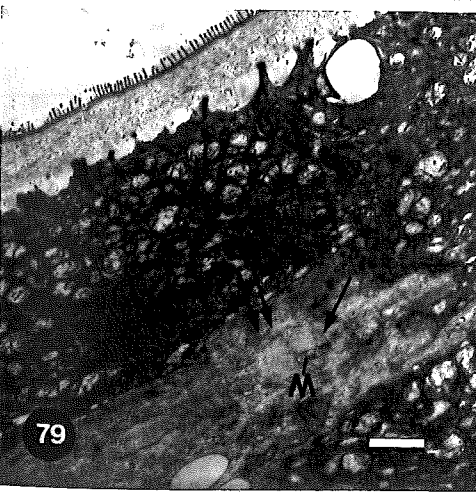
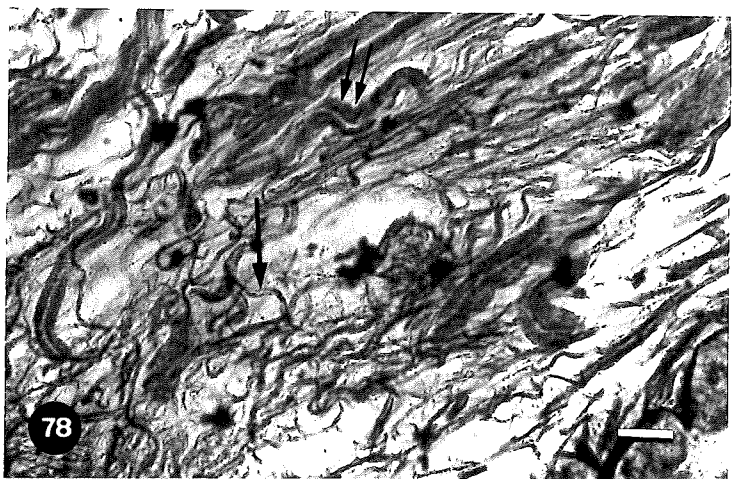
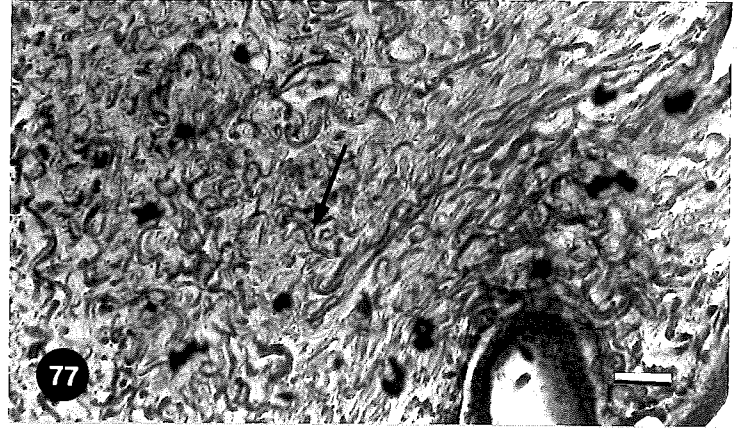
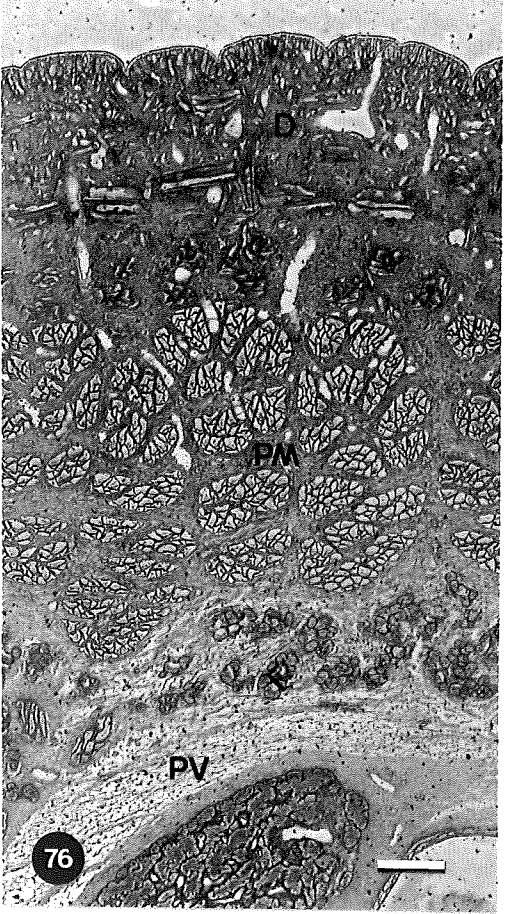
**Fig. 73.** Secció transversal d'una fibra connectiva on s'observa la medul.la, de secció lenticular (fletxa), i el còrtex constituït per fibril.lles paral.leles a l'eix major de la fibra (doble fletxa). Barra: 1 µm.

**Fig. 74.** Detall de les fibril.lles de les fibres del teixit connectiu. Es pot apreciar una estriació d'un període de 117-160 Å (fletxa). Barra: 100 nm.

**Fig. 75.** Fibra connectiva en la qual s'aprecia l'estriació secundària en la part pròxima a la medul.la (fletxa). Barra: 1 µm.







En ME es veu que el córtex està format per fibril·les d'un diàmetre de 10 a 12 nm, les quals poden arribar a tenir més de 3 µm de llargària (figs. 71 a 73). En algunes imatges es pot observar una estriació en les fibril·les d'un període de 117 a 160 Å (fig. 74). Les fibril·les es troben força compactades, a raó de 10 fibril·les per cada 133-170 nm en un mateix pla en les zones de més alta compactació.

La medul·la té una secció lenticular o estrellada, d'uns 0,1-0,25 X 0,5-1,3 µm (figs. 72 i 73), està limitada per membrana i en el seu interior s'observa un citoplasma pobre amb orgànuls i amb alguna estructura granular, possiblement glicogen (fig. 71).

En talls longitudinals o esbiaixats de les fibres (figs. 71 i 75), es pot apreciar una estriació secundària de les fibril·les contigües a la medul·la, d'un període de 415 a 470 Å.

En les diferents regions del cos varia la proporció i la naturalesa de les fibres (fig. 76). La medul·la es manté mes o menys constant, però el córtex varia considerablement. A la dermis i teixit connectiu intermuscular la matriu extracel·lular està quasi totalment ocupada per fibres gruixudes (fig. 70). Al teixit connectiu del parenquima perivisceral les fibres són més primes, definides i escasses (fig. 77). S'observa una zona de transició entre el connectiu intermuscular i el connectiu del parenquima perivisceral on s'hi troben fibres dels dos tipus i formes intermitges (fig. 78).

---

**Fig. 76.** Secció transversal de la paret corporal. La impregnació argèntica mostra la major presència de material fibril·lar en la dermis i en el teixit connectiu perimuscular. En canvi, en el teixit connectiu del parènquima perivisceral les fibres són més primes, definides i escasses. Impregnació argèntica. D: dermis. PM: teixit connectiu perimuscular. PV: teixit connectiu perivisceral. Barra: 100 µm.

**Fig. 77.** Secció a nivell del teixit connectiu del parènquima perivisceral. Les fibres (fletxa) són més primes que en la dermis. Impregnació argèntica. Barra: 10 µm.

**Fig. 78.** Secció a nivell de la zona de transició entre el teixit connectiu perimuscular i el teixit connectiu perivisceral. Es poden veure fibres dels dos tipus: primes (fletxa) i gruixudes (doble fletxa). Impregnació argèntica. Barra: 10 µm.

**Fig. 79.** Secció a nivell de la dermis, just per sota de les cèl·lules epitelials. Les fibril·les s'estructuren al voltant de la medul·la de forma paral·lela a l'eix de la fibra en la part més pròxima (fletxa), i de forma desorganitzada en la part distal (doble fletxa). M: medul·la. Barra: 5 µm.

**Fig. 80.** Parènquima perivisceral amb fibres connectives (fletxa) de tipus més prim que les que es troben a la dermis. Barra: 1 µm.

**Fig. 81.** Amb el marcatge amb la lectina Con A, es poden distingir les fibres connectives (fletxa) entre les fibres musculars. BM: membrana basal de les fibres musculars. Barra: 50 µm.

Les fibres del teixit connectiu intermuscular i dèrmic tenen el córtex gruixut, mesurant tota la fibra de 2,5 a 7,1  $\mu\text{m}$  de diàmetre. En aquests nivells, tota la matriu extracel·lular està pràcticament ocupada pel feixos de fibres, que, amb la impregnació argèntica, prenen una tonalitat carbaça, indicativa de fibres tipus collagen (fig. 76). Les fibril·les s'organitzen al voltant de la medul·la, en un diàmetre de 1,25 a 2,3  $\mu\text{m}$ , paral·lament a l'axis longitudinal de la medul·la; però en una àrea d'influència d'uns 2,5 a 7,1  $\mu\text{m}$  de diàmetre al voltant d'aquest nucli central s'observen fibril·les que l'envolten, i que no transcorren paral·lament a l'axis longitudinal de la medul·la, quedant sovint els límits amb les fibres contigües poc definids (fig. 79).

Les fibres del teixit connectiu del parenquima perivisceral són més primes, de 1,2 a 1,9  $\mu\text{m}$  de diàmetre, amb el córtex més estret, d'uns 0,4 a 0,6  $\mu\text{m}$ , i de límits més ben definids (figs. 71 i 80). Aquestes fibres mostren en les impregnacions argèntiques una tonalitat marró-grisosa fosca, indicativa de fibres tipus reticulina (fig. 77). Ultraestructuralment s'observa que les fibril·les s'organitzen més aviat paral·lament a l'axis longitudinal de la medul·la (fig. 71).

Les lectines Con A i PNA, que marquen la membrana basal de les cèl·lules epitelials i fibres musculars, també marquen de forma més tènue fibres del teixit connectiu (fig. 81). Les fibres apareixen com a filaments de menys de 7  $\mu\text{m}$  de diàmetre en les que no es distingeixen córtex i medul·la.

En l'observació de seccions obtingudes en criotom del teixit connectiu amb microscopi d'epifluorescència, no s'observen fibres tipus elastina, caracteritzades per una fluorescència blau-blanca molt marcada (Franzblau i Faris, 1981).

## Discussió

En la substància fonamental del teixit connectiu s'ha detectat la presència de mucopolisacàrids àcids i de petites quantitats de mucopolisacàrids neutres i de proteïnes, fet que concorda amb les dades obtingudes per Bradbury en aquesta mateixa espècie (1958).

Els estudis de difracció de raigs X (Bradbury, 1958), demostren la naturalesa col·làgena de les fibres. Les diferències que s'han observat en la impregnació argèntica, que mostren una afinitat semblant a la de la reticulina per les fibres del teixit connectiu perivisceral, i una afinitat semblant a la de les fibres col·làgenes de vertebrats pel connectiu intermuscular i pel connectiu dèrmic; són degudes segurament a la disposició de les fibril·les, més ben ordenades longitudinalment en el primer cas, i amb una disposició més laxa en el segon.

No s'ha pogut detectar la presència d'altres tipus de fibres connectives tipus elastina.

El fet que les fibres tenen còrtex i medul·la ja havia estat observat per Bradbury (1957a, 1958) i Bradbury i Meek (1958a). El diàmetre de les fibril·les que constitueixen el còrtex de la fibra, segons Bradbury (1957, 1958) i Bradbury i Meek (1958a) (25 nm), és d'un ordre semblant a l'observat per nosaltres (10-12 nm). La peridiocitat que observen Bradbury i Meek (1958a) de 300 Å probablement es correspon amb la peridiocitat secundària que s'observa en les fibril·les adjacents a la medul·la, d'uns 415 a 470 Å, on les fibril·les resten encara força ben arreglades. En canvi, la peridiocitat primària de 117-160 Å no havia estat observada anteriorment.

Les fibres descrites per Bradbury (1958) i Bradbury i Meek (1958a), d'1 a 2 µm de diàmetre, esparces en el teixit connectiu i amb les fibril·les disposades paral·lelament a l'eix longitudinal de la fibra; es corresponen amb les que s'han descrit pel teixit connectiu perivisceral.

Les fibres que s'han descrit pel teixit connectiu perimuscular i dèrmic, força més gruixudes, de fins a 7 µm de diàmetre, on les fibril·les s'organitzen en la part adjacent a la medul·la de modus semblant a les descrites pel teixit connectiu perivisceral, mentre que en la part externa estan disposades de forma menys organitzada envoltant l'axis central, no habien estat descrites anteriorment.



## **Fibròcits**

Nombrosos fibròcits es troben en el teixit connectiu. El cos cel.lular mesura de 3,5 a 6  $\mu\text{m}$  d'amplària a nivell del nucli, per uns 40  $\mu\text{m}$  de llargària (fig. 82). Són cèl.lules afusades que acaben en fins processos cel.lulars, els quals poden arribar a ser molt llargs, de més de 35  $\mu\text{m}$ , amb un diàmetre de 0,2 a 1  $\mu\text{m}$  (figs. 83 i 84). Les seccions transversals d'aquests processos mostren una forma estrellada (figs. 84 i 85).

### **Característiques del nucli i del citoplasma**

El nucli és de contorn lleugerament irregular, oval amb uns 3 X 12  $\mu\text{m}$  (figs. 83 i 84). És poc ric amb heterocromatina i s'hi pot observar un nucleol d'aproximadament 1  $\mu\text{m}$  de diàmetre (fig. 84).

---

**Fig. 82.** Fibròcits en el teixit connectiu de la paret corporal. Observi's la presència de nombrosos grànuls clars de naturalesa lipídica (fletxa) en el citoplasma. Coloració hematoxilina/eosina. FI: fibròcit. Barra: 50  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 83.** Fibròcit amb nombroses vesícules lipídiques (fletxa) de contingut homogeni. FI: fibròcit. F: fibres connectives. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 84.** Teixit connectiu amb fibròcits i nombroses seccions dels processos citoplasmàtics d'aquestes cèl.lules (fletxa). En un dels fibròcits s'aprecia la part proximal d'un d'aquests processos (doble fletxa). Aquests fibròcits no presenten vesícules lipídiques. En canvi, mostren una gran quantitat de mitocondris vacuolats i sàculs del reticle endoplasmàtic dilatats. FI: fibròcit. VM: mitocondri vacuolat. ER: sàcul del reticle endoplasmàtic. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 85.** Fibròcits amb sàculs dilatats del reticle endoplasmàtic i poques vesícules lipídiques. També es distingeixen seccions dels processos cel.lulars dels fibròcits (puntes de fletxa), algunes força proximals (fletxa). ER: sàcul del reticle endoplasmàtic. F: fibròcit. LV: vesícula lipídica. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

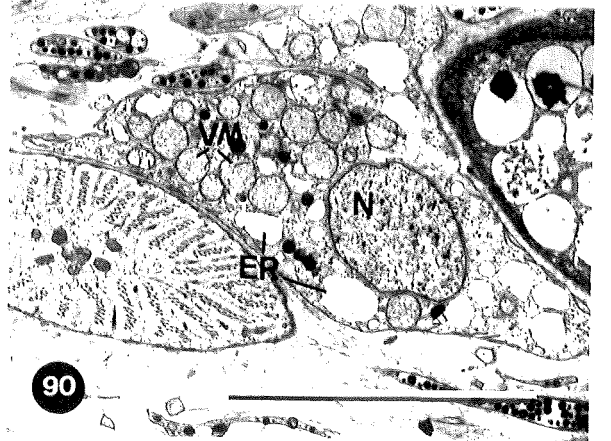
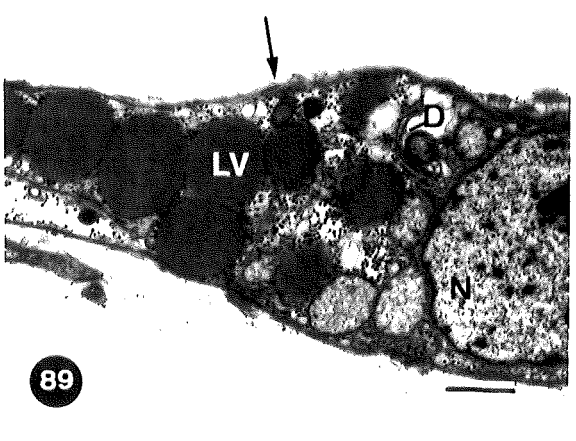
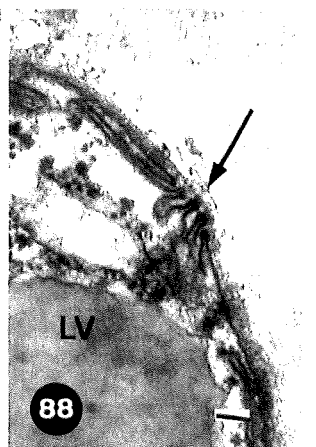
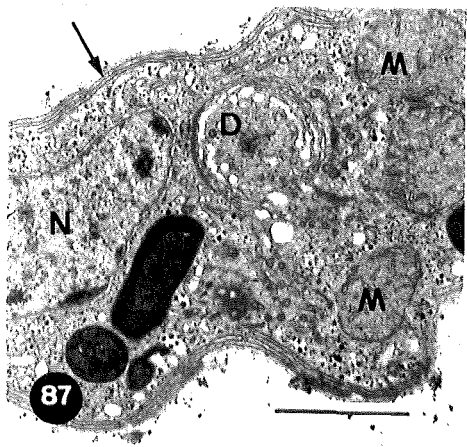
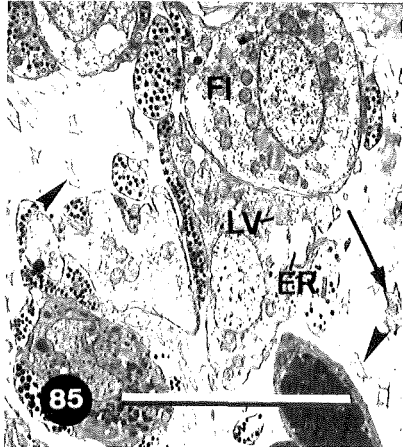
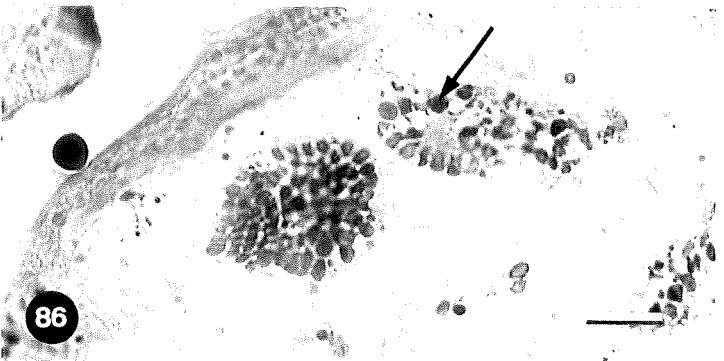
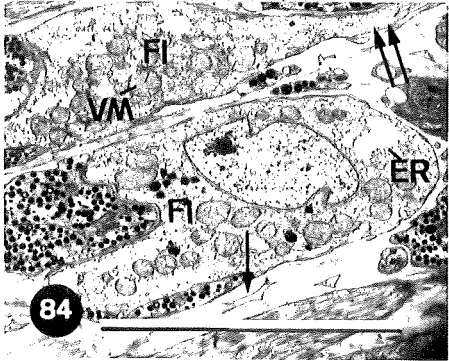
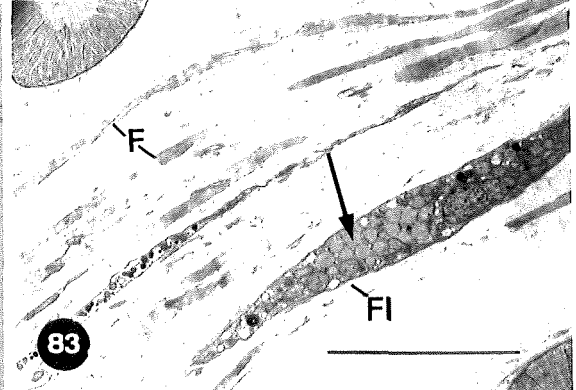
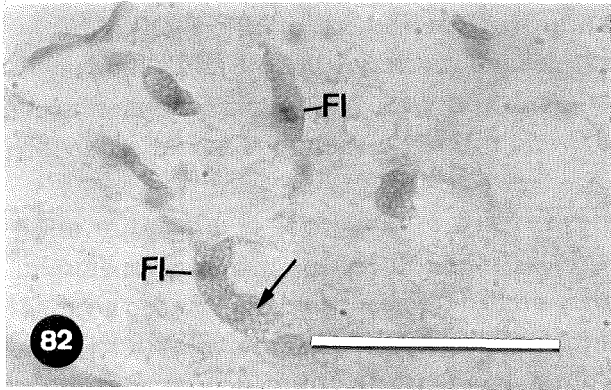
**Fig. 86.** Fibròcits amb les vesícules lipídiques tenyides amb vermell de Sudà (fletxa). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 87.** Detall de la zona perinuclear d'un fibròcit. Observi's els plecs de la membrana plasmàtica paral.lels a la superfície (fletxa). D: dictiosoma. M: mitocondri. N: nucli. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 88.** Detall a nivell de la membrana plasmàtica d'un fibròcit. Observi's la presència de petites evaginacions de la membrana plasmàtica formant ampolletes de contingut electrodens (fletxa). LV: vesícula lipídica. Barra: 100 nm.

**Fig. 89.** Detall de la membrana plasmàtica amb material fibril·lar associat en la cara externa (fletxa). D: dictiosoma. LV: vesícula lipídica. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 90.** Fibròcit sense vesícules lipídiques i amb abundància de sàculs dilatats del reticle endoplasmàtic. ER: sàculs del reticle endoplasmàtic. N: nucli. VM: mitocondri vacuolat. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .



Aquestes cèl·lules es caracteritzen per la presència de vesícules lipídiques de gran mida (de 1 a 2,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre) voltades de membrana, que es tenyeixen amb el vermell Sudà i que prenen un aspecte gris homogeni en les micrografies de microscòpia electrònica (figs. 83 i 86). També es veuen vesícules de contingut electrodens de forma rodona o bacilar d'uns 0,3-0,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre (figs. 83, 84 i 87).

Els mitocondris són bacilars o arronyonats. Tenen aspecte vacuolat, amb molt poques crestes poc desenvolupades, sovint en forma vesicular (fig. 84). En el citoplasma s'observen nombrosos ribosomes lliures i grànuls de glicogen formant rosetes. Hi ha relativament poc reticle endoplasmàtic rugós i s'observen alguns sàculs dilatats de contingut electrolúcid, probablement del reticle endoplasmàtic llis, amb un diàmetre de 0,5-1  $\mu\text{m}$  (figs. 84, 85 i 90). En ocasions s'observa algun dictiosoma perinuclear que sol tenir secció circular (fig. 87). En alguns punts la membrana plasmàtica s'evagina formant petites ampolletes amb contingut electrodens, probablement relacionades amb l'exocitosi (fig. 88).

Al citoplasma dels llargs processos cel·lulars que es troben als extrems del fibròcit s'hi pot observar la presència de glicogen, reticle endoplasmàtic i vesícules electrolúcides, però no d'altres orgànuls (fig. 85).

És característica la presència de petites evaginacions de la membrana plasmàtica que es disposen paral·lelament a la superfície cel·lular (fig. 87). Associat a la cara externa de la membrana plasmàtica s'observa material fibril·lar que és continua cap a les projeccions citoplasmàtiques (fig. 89).

Es poden observar fibròcits que presenten algunes diferències, amb cap o poques vesícules lipídiques i un lleuger augment del nombre i el diàmetre de les vesícules clares del reticle endoplasmàtic llis, que mesuren, en aquestes cèl·lules, de 0,5 a 2,3  $\mu\text{m}$  de diàmetre (figs. 84 i 90). Aquest fibròcit és menys afusat, amb una amplària a nivell del nucli de 4,5 a 11  $\mu\text{m}$  per uns 20  $\mu\text{m}$  de llargària a nivell del cos cel·lular, a l'extrem del qual s'observa la presència dels processos cel·lulars. El nucli pot presentar alguna indentació. Associat a la cara externa de la membrana plasmàtica s'hi observa material dens però no en forma fibril·lar.

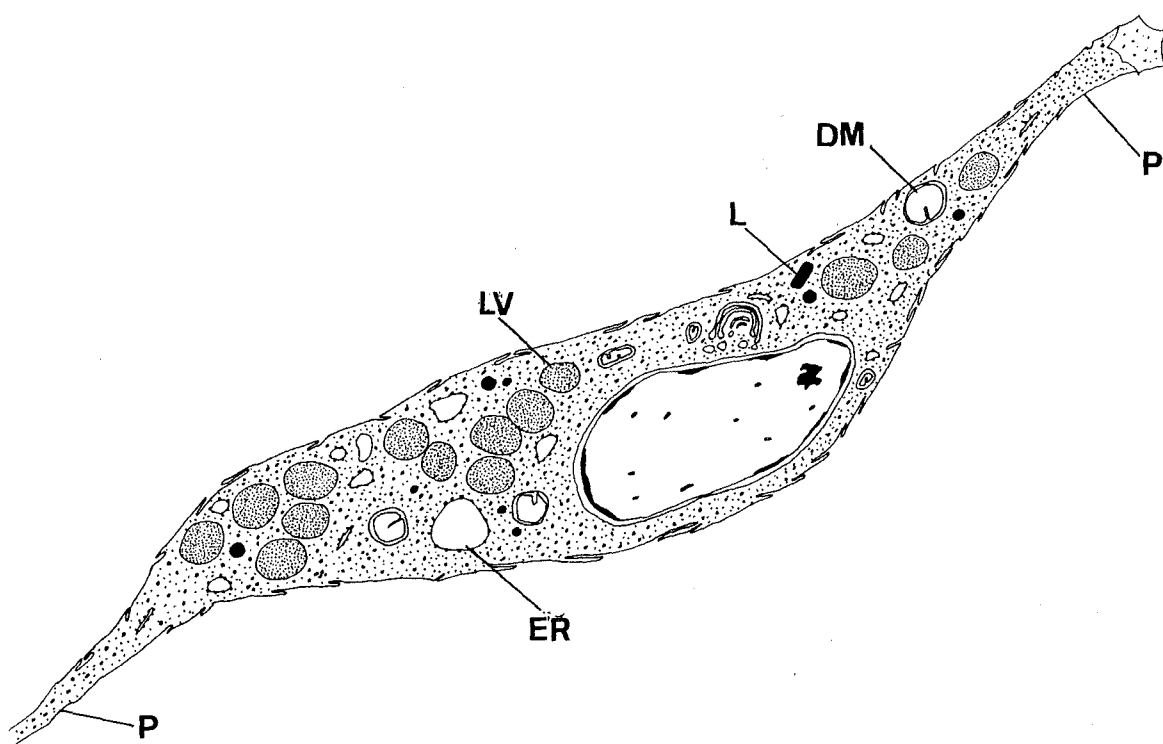
En un mateix exemplar es poden observar fibròcits amb vesícules lipídiques i fibròcits sense. També s'observen fibròcits de morfologia intermitja (fig. 85).

## Discussió

Totes les evidències morfològiques indiquen que el tipus cel·lular que s'ha descrit amb el nom de fibròcit és el responsable de la síntesi i organització del material fibril·lar del teixit connectiu. S'ha pogut observar que la medul·la de les fibres

connectives està constituïda per llargs processos cel·lulars de secció lenticular. Per les característiques comuns del citoplasma, es pot considerar que corresponen a la part distal dels processos que s'originen als extrems dels fibròcits, els quals tenen, en la part proximal, secció estrellada. Aquestes dades concorden amb els estudis realitzats per Bradbury (1958) i per Bradbury i Meek (1958a) dels fibròcits d'*Hirudo medicinalis*.

La funció de reserva lipídica és evident per la presència de nombroses vesícules lipídiques al citoplasma. Els arincobdèl·lides no tenen adipòcits diferenciats com els dels rincobdèl·lides (Bradbury, 1958 a). Dels dos tipus de vesícules lipídiques descrites per Bradbury (1958 a): gotes grans, d'uns 5-2  $\mu\text{m}$  de diàmetre, amb triglicèrids i gotes petites, de menys de 1  $\mu\text{m}$  de diàmetre, compostes probablement per fosfolípids i situades perinuclearment; en el present estudi s'ha pogut observar clarament el primer tipus, encara que eren lleugerament més petites, de 1 a 2,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre. El segon tipus es podria correspondre amb els grànuls electrodensos de 0,3 a 0,8  $\mu\text{m}$  de diàmetre que s'observen a nivell del cos cel·lular, encara que més probablement es pugui tractar de lisosomes.



**Fig. 91.** Esquema d'un fibròcit. Les projeccions citoplasmàtiques només s'han dibuixat en la seva part proximal i no en tota la seva longitud. DM: mitocondri dilatat. P: projecció citoplasmàtica. ER: sàculs dilatats del reticle endoplasmàtic. LV: vesícula lipídica.

La presència de dos tipologies probablement correspon a dos estadis diferents del fibròcit. Un estadi està representat per un fibròcit amb gran quantitat de reserva lipídica, mentre que l'altre pot no tenir cap goteta lipídica del tipus gran. En aquesta segona tipologia cal remarcar un lleuger augment, tant del nombre com del diàmetre, de les vesícules de contingut electrolucid, probablement sàculs de reticle endoplasmàtic llis. Ja que el reticle agranular està relacionat amb el metabolisme lipídic, els sàculs podrien ser llocs de formació de les gotetes lipídiques en fibròcits joves.

## Cromatòfors

A *Hirudo medicinalis* s'hi troba abundant presència de cromatofors tegumentaris. La disposició dèrmica dels cromatòfors responsables de la pigmentació d'*Hirudo medicinalis* es pot observar molt bé en seccions transversals gruixudes sense tenyir, obtingudes en criotom (fig. 92).

En els cromatofors, la tonalitat del pigment pot ser marró-negrosa o marró daurada (figs. 92 i 93). L'acumulació de cromatòfors d'una o altre tonalitat en certes zones de la pell, dóna com a resultat la formació dels dibuixos característics de la pell de la sangonera (fig. 94). Morfològicament no s'han observat diferències entre els cromatòfors responsables d'aquestes dos tonalitats.

El cos cel·lular de la cèl.lula pigmentària mesura uns 14-25 X 6-13  $\mu\text{m}$  i és de forma irregular, estrellada amb llargues projeccions citoplasmàtiques, d'un diàmetre d'entre 0,4 i 1,2  $\mu\text{m}$ , que s'internen en el teixit connectiu i penetren entre els espais laterals que resten entre les cèl.lules epitelials (figs. 17, 93 i 95).

---

**Fig. 92.** Secció transversal gruixuda (d'uns 100  $\mu\text{m}$ ) de la paret corporal, sense tenyir. Es pot apreciar la presència de dues coloracions diferents degudes a l'acumulació en la dermis dels cromatòfors, una marró daurada (fletxa) i l'altre marró negrosa (doble fletxa). Les fibres pigmentades que s'observen en els teixits subjacents a la dermis corresponen a les cèl.lules vasofibrós del teixit vasofibrós. V: teixit vasofibrós. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 93.** Tegument dorsal d'*Hirudo medicinalis* en el qual es poden apreciar cromatòfors marró negrosos i marró daurats, les perllongacions dels quals (fletxa) penetren entre les parts basals de les cèl.lules epitelials. Coloració hematoxilina/eosina. GD: cromatòfor marró daurat. BC: cromatòfor marró negros. E: cèl.lula epitelial. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 94.** Tegument dorsal de la sangonera en el que s'aprècia el patró de pigmentació característic.

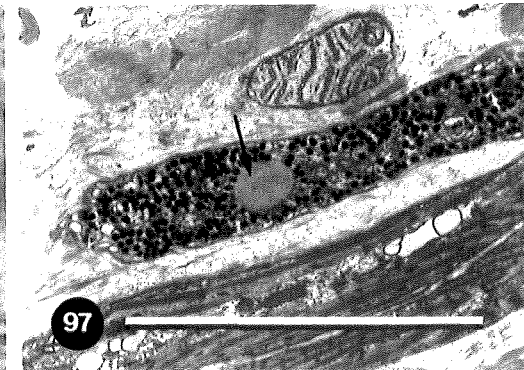
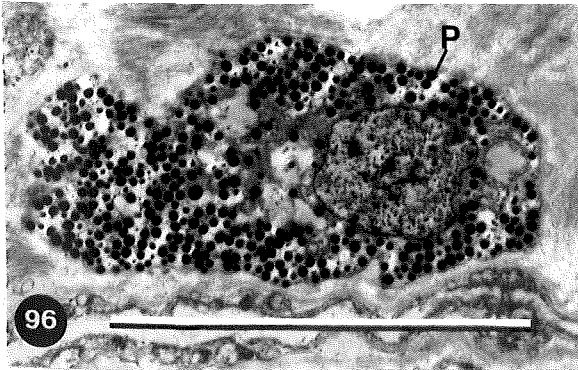
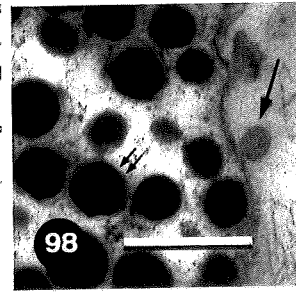
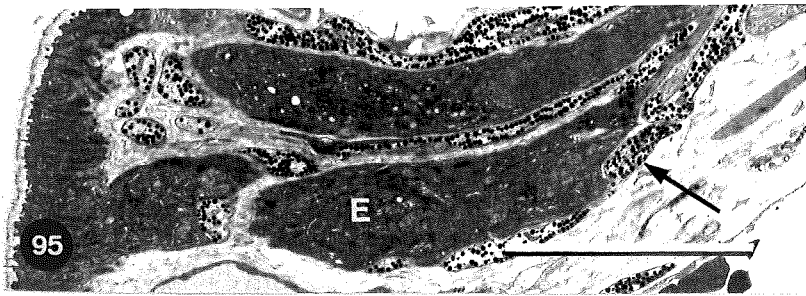
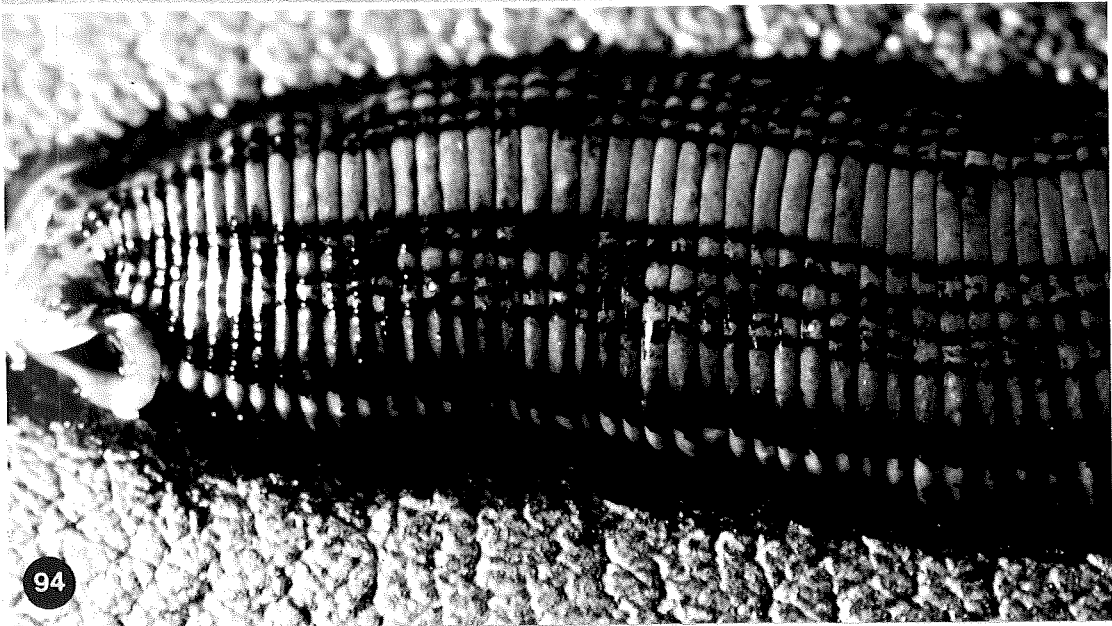
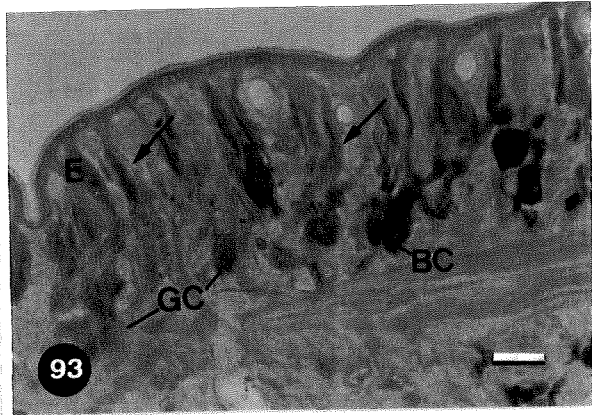
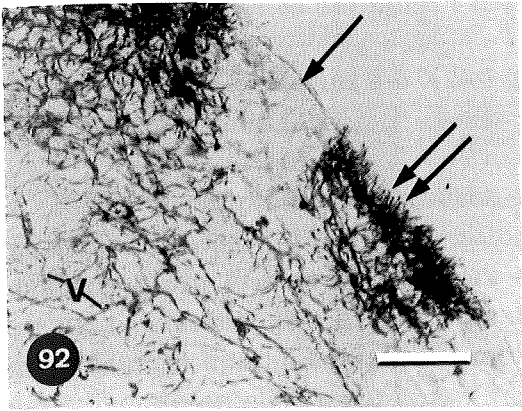
**Fig. 95.** Secció del tegument on es poden observar perllongacions citoplasmàtiques dels cromatòfors (fletxa) penetrant entre les parts basals de les cèl.lules epitelials. E: cèl.lula epitelial. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 96.** Cos cel·lular d'un cromatòfor amb nombrosos grànuls de pigment. P: grànul de pigment. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 97.** Cromatòfor en el qual es pot veure una vesícula de contingut homogeni i gris als electrons (fletxa). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 98.** Detall del citoplasma marginal del cos cel·lular d'un cromatòfor, on s'observen dues vesícules exocítiques (fletxa). Observi's que els grànuls de pigment estan voltats de membrana (doble fletxa). Barra: 0,5  $\mu\text{m}$ .





### Característiques del nucli i del citoplasma

El nucli es oval, mesurant 4-5 X 2-3  $\mu\text{m}$ , i sovint s'observa un nucleol d'uns 0,8  $\mu\text{m}$  de diàmetre (figs. 93 i 96).

En el citoplasma s'observen cisternes del reticle endoplasmàtic rugós i ribosomes lliures (fig. 96). Els mitocondris estan molt vacuolats i no són gaire nombrosos. En alguns cromatòfors es pot veure la presència d'alguna vesícula grisa als electrons, de 1 a 1,7  $\mu\text{m}$  de diàmetre (fig. 97). Aquestes vesícules són molt probablement lipídiques, ja que amb el vermell de Sudà ocasionalment es tenyeix alguna goteta en els cromatòfors.

Els grànuls de pigment mesuren uns 0,16-0,28  $\mu\text{m}$  de diàmetre, amb una mitja de 0,2 i un màxim de 0,33. Aquests grànuls són molt electrodensos i estan voltats de membrana (fig. 98).

La membrana plasmàtica és llisa en la major part de la superfície cel.lular, però s'observen, de tant en tant, petites evaginacions i vesícules exocítiques d'uns 0,05-0,2  $\mu\text{m}$  de diàmetre a nivell del cos cel.lular (fig. 98).

### Discussió

Els patrons de pigmentació de les sangoneres contrasten amb els d'oligoquets en els que pràcticament no hi ha cèl.lules pigmentàries (Sawyer, 1986).

El cromatòfor d'*Hirudo medicinalis* es pot comparar amb els cromatòfors descrits en altres espècies d'hirudinis. S'han descrit tres tipus de cèl.lules pigmentàries o cromatòfors en les sangoneres: la cèl.lula pigmentària marró, que és la més comuna; la cèl.lula pigmentària color crema, de forma allargada i un cos cel.lular d'uns 40  $\mu\text{m}$ , que ha estat descrita només a glosifonids; i la cèl.lula pigmentària verda (Sawyer, 1986). Els dos primers tipus estan associats a l'epiteli tegumentari. El tercer és hipodèrmic, es creu que funciona com a cèl.lula de magatzematge dels productes del metabolisme de l'hemoglobina i sembla correspondre a un estadi avançat de la cèl.lula adiposa. A arincobdèl.lides falta aquest tercer tipus, a menys que es correspongui amb les cèl.lules vasofibroses (Sawyer, 1986; Bradbury, 1957b).

Els cromatòfors observats a *Hirudo medicinalis*, probablement corresponen al tipus marró cutani descrit a *Glossiphonia complanata*, que segons Bradbury (1957b), té forma estrellada amb un cos cel.lular d'uns 20-25  $\mu\text{m}$  de diàmetre, grànuls de pigment de dimensions semblants a les observades a *H. medicinalis*, i un color que varia de marró vermellós a groc marronós.



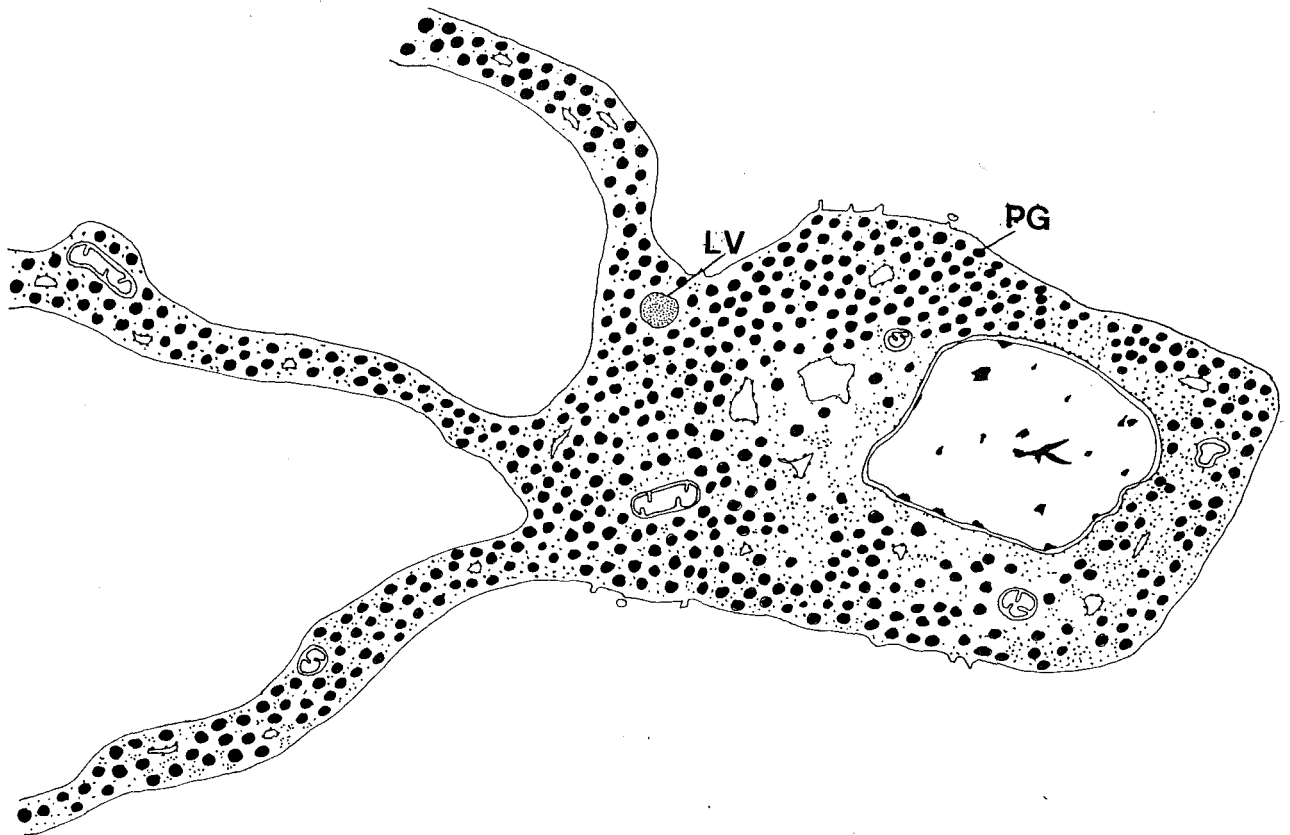


Fig. 99. Esquema d'un cromatòfor. Les projeccions citoplasmàtiques només s'han dibuixat en la seva part proximal. PG: grànuls de pigment. LV: vesícula lipídica.

La naturalesa del pigment d'aquests cromatòfors no ha estat determinada anteriorment. Per les característiques histoquímiques del pigment de la sangonera *Glossiphonia complanata*, que redueix fortament les solucions alcalines de plata i forma blau de Prússia en presència de sals fèrriques, Bradbury (1957b) creu que podria correspondre a melanina. A més, segons Spearman (1973), la melanina és el pigment més comú en invertebrats.

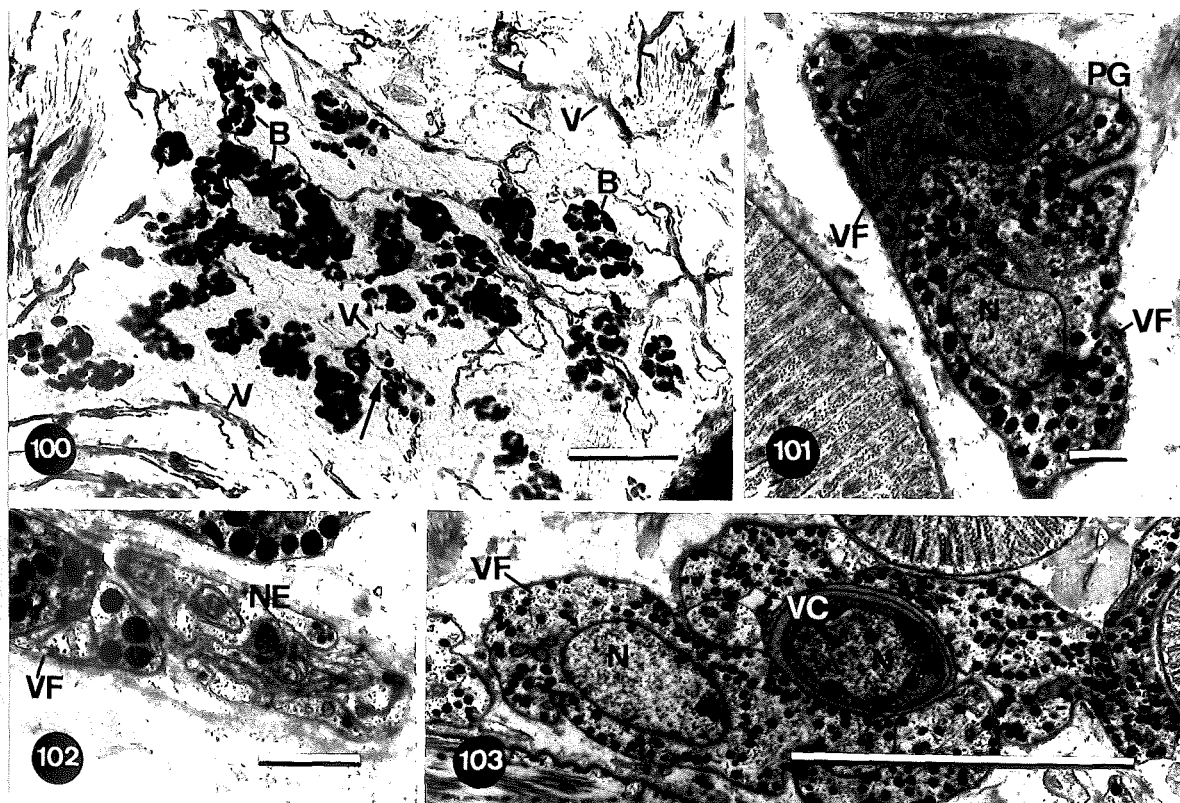
A *Hirudo medicinalis* no s'han fet proves per a la identificació d'aquest pigment, però sí que s'havien fet a *Dina lineata*, una espècie pertanyent a l'ordre *Arhynchobdellida*, en el curs del treball de tesina "Estructura i ultraestructura del tegument de *Dina lineata*" (Huguet, 1985). El pigment es decolora amb aigua oxigenada, al igual que la melanina. En les proves per a la detecció de l'enzim tirosinasa, que converteix la tirosina a DOPA i aquesta a melanina (reacció DOPA tirosinasa), s'observen resultats lleugerament positius, amb acumulacions de melanina formades a partir de DOPA afegida artificialment.

Per tots aquests motius, es pot pensar que el pigment dels cromatòfors d'*Hirudo medicinalis* és una melanina.

## Teixit vasofibrós

Sota la lupa binocular, el teixit vasofibrós es veu com una xarxa de fibrilles marró-negres anastomosades, que es troben al teixit connectiu del parènquima corporal, especialment al voltant del canal hemocelòmic ventral, i també, en menys quantitat, al teixit connectiu intermuscular (fig. 100).

Aquestes fibres, d'un diàmetre que oscil·la entre 1 i 17  $\mu\text{m}$ , estan formades per dos tipus cel·lulars, les cèl·lules vasofibrós i les cèl·lules vasocentrals. S'han observat alguns contactes entre el teixit vasofibrós i el teixit botridial (fig. 100).



**Fig. 100.** "Squaix" d'una secció transversal gruixuda (d'uns 100  $\mu\text{m}$ ) de la paret corporal. Es poden veure les fibres del teixit vasofibrós i les cèl·lules botridials. En ocasions s'observen contactes entre les fibres del teixit basofibrós i el teixit botridial (fletxa). V: fibres del teixit vasofibrós. B: teixit botridial. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 101.** Secció transversal d'una fibra del teixit vasofibrós. S'observa el cos cel·lular d'una cèl·lula vasofibrós que es caracteritza per l'abundància de grànuls electrodensos en el citoplasma. En l'interior de la fibra s'observen cèl·lules vasocentrals densament empaquetades. N: nucli. PG: grànuls pigmentats. VC: cèl·lula vasocentral. VF: cèl·lula vasofibrós. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 102.** Terminació nerviosa associada a una cèl·lula vasofibrós. NE: terminació nerviosa. VF: cèl·lula vasofibrós. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 103.** Secció d'una fibra del teixit vasofibrós. N: nucli. VC: cèl·lula vasocentral. VF: cèl·lula vasofibrós. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

## **Cèl.lules vasofibroses**

Les cèl.lules vasofibroses destaquen per la seva pigmentació marró-negrosa. Es troben a la perifèria de la fibra, embolcallant parcialment a les cèl.lules vasocentrals, i tenen perllongacions citoplasmàtiques que s'interconnecten amb les cèl.lules contigües formant fibres (figs. 100 i 101).

Són cèl.lules allargades i aplanades, d'uns 4 X 8 µm de diàmetre a nivell del nucli i de 1 a 5 µm a nivell de les projeccions. La llargaria d'aquestes és difícil de determinar atès que en el microscopi òptic no es distingeix on comença una cèl.lula i acaba l'altre.

Tot i que no s'han observat sinapsis, s'ha pogut observar la presència de terminacions nervioses associades a les cèl.lules vasofibroses (fig. 102).

### **Característiques del nucli i del citoplasma**

El nucli de les cèl.lules vasofibroses és ovalat, d'uns 4 X 4,8 µm, i en ocasions es pot veure un nucleol (fig. 103).

El citoplasma està majoritàriament ocupat pels grànuls que l'hi donen la pigmentació marró negrosa característica. Aquests grànuls, fortament electrodensos, estan voltats de membrana i mesuren de 0,23 a 0,45 µm de diàmetre, amb una mitja de 0,32 i un màxim de 0,7 µm. Es troben tant al cos cel·lular com a les projeccions (figs. 101 i 103).

En el poc citoplasma restant, s'observa força reticle endoplasmàtic rugós, algun dictiosoma perinuclear, ribosomes lliures, grànuls de glicogen i mitocondris (figs. 101 i 103).

---

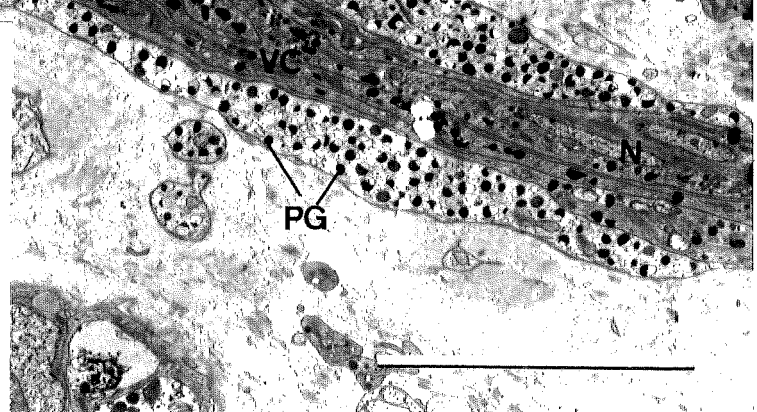
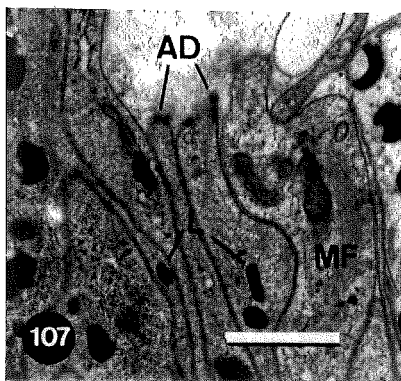
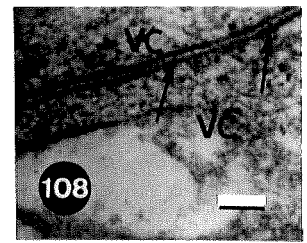
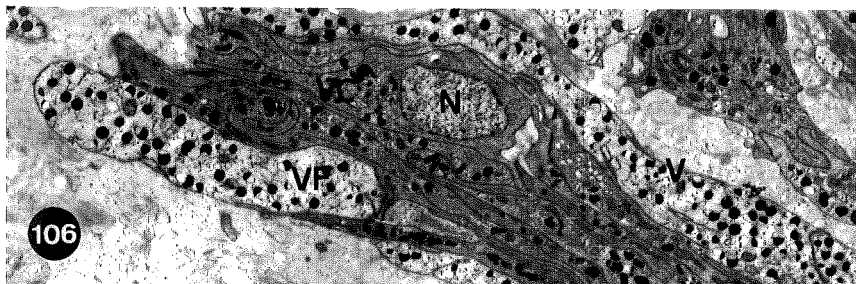
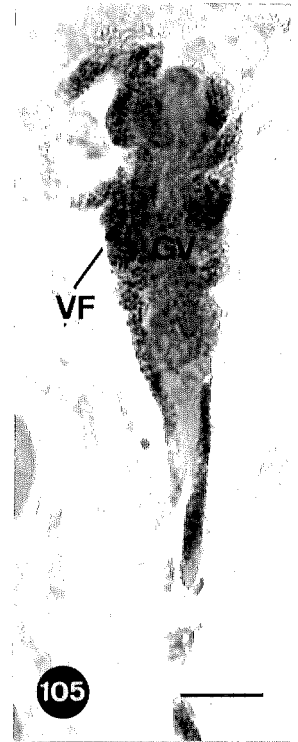
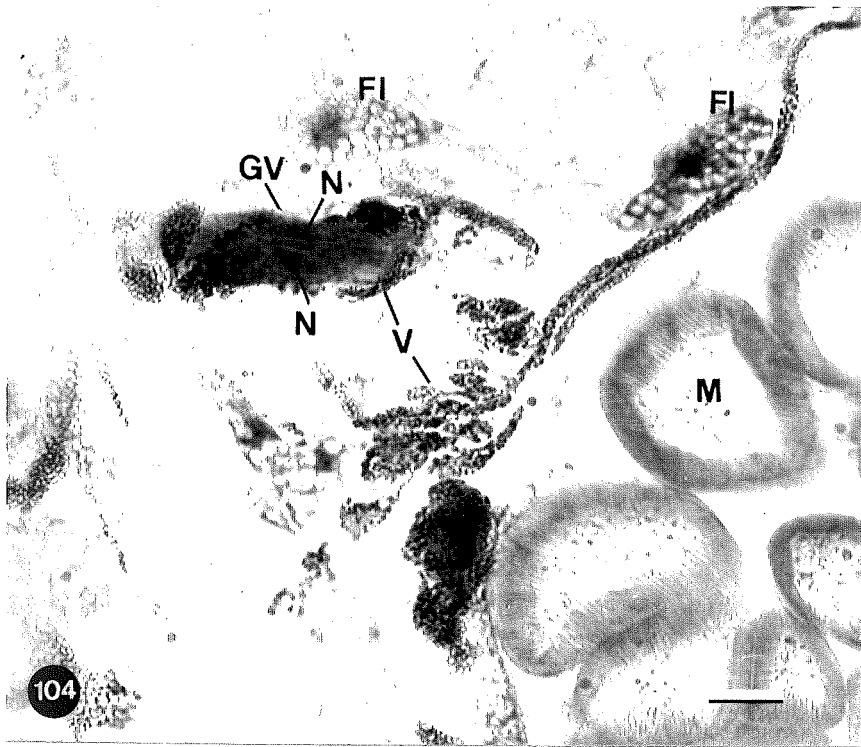
**Fig. 104.** Grup de cèl.lules vasocentrals envoltades per les projeccions de les cèl.lules vasofibroses. Coloració hematoxilina/eosina. FI: fibròcit. M: fibra muscular. N: nucli. GV: grup de cèl.lules vasocentrals. VF: cèl.lules vasofibroses. Barra: 10 µm.

**Fig. 105.** Secció d'una fibra del teixit vasofibrós. Coloració hematoxilina/eosina. GV: grup de cèl.lules vasocentrals. VF: cèl.lula vasofibrosa. Barra: 10 µm.

**Fig. 106.** Secció d'una fibra del teixit vasofibrós. PG: grànuls pigmentats. N: nucli. VF: cèl.lula vasofibrosa. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 10 µm.

**Fig. 107.** Detall de la figura 86, on, en els llocs on les cèl.lules vasocentrals no estan envoltades per les vasofibroses, es poden observar les unions especialitzades amb la matriu. S'observen feixos de microfilaments convergint cap a aquestes unions. AD: unions amb la matriu. L: lisosoma. MF: microfilaments. Barra: 1 µm.

**Fig. 108.** Contactes entre les cèl.lules vasocentrals, mostrant material fibrilar molt tenue que connecta les membranes plasmàtiques (fletxa). VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 100 µm.



La membrana plasmàtica d'aquestes cèl·lules presenta petites evaginacions disposades paralelament a la superfície cel·lular, idèntiques a les que presenten els fibròcits.

Associada a la cara externa de la membrana plasmàtica, en les zones on les cèl·lules contacten amb la matriu, es troba un recobriment cel·lular poc conspicu (figs. 101 i 102).

### **Cèl·lules vasocentrals**

Associades a la xarxa de cèl·lules vasofibroses es troben les cèl·lules vasocentrals. Aquestes cèl·lules es troben formant agrupacions compactes envoltades per cèl·lules vasofibroses (figs. 104 a 106). Les cèl·lules vasocentrals estan imbrincades entre si per mitjà de projeccions citoplasmàtiques (fig. 106). Són cèl·lules en estadi de repòs, que, quan són activades, són capaces de migrar a altres parts del cos.

#### **Característiques del nucli i del citoplasma**

En l'estadi de repòs el nucli té una forma més o menys ovalada, de 3,8-10 X 0,5-2, estant més o menys aprimat segons el compactament de les propies cèl·lules vasocentrals (fig. 106). El contorn del nucli pot ser lleugerament irregular. És poc heterocromàtic i no s'ha pogut observar la presència de nucleol en cèl·lules vasocentrals en estadi de repòs.

El citosól d'aquestes cèl·lules és molt electrodens (fig. 106). Aquest segon tipus del teixit vasofibrós no té grànuls pigmentaris, però s'hi troben nombroses vesícules de contingut molt electrodens, d'un diàmetre de 0,2 a 0,5  $\mu\text{m}$ , probablement lisosomes. S'observen alguns lisosomes secundaris. Els mitocondris són de forma allargada (0,2-0,4 X 1,25-1,75) amb crestes ben desenvolupades. El reticle endoplasmàtic rugós està ben desenvolupat i abunden els ribosomes lliures. Els dictiosomes són escassos, no havent-s'en pogut observar cap en l'estadi de repòs. El citoplasmà conté abundància de feixos de filaments d'un diàmetre d'uns 0,2-0,3  $\mu\text{m}$  (figs. 107, 109 i 110). S'ha determinat la presència d'actina amb marcatge amb fal·loïdina fluoresceïnada. Es veu que l'actina es disposa en forma de feixos de filaments, els quals, donada la disposició de les cèl·lules en la fibra, es veuen força entortolligats (figs. 111 i 112).

La membrana plasmàtica no presenta les evaginacions observades a les cèl·lules vasofibroses i als fibròcits.

### Unions cel·lulars i contactes amb la matriu

Les associacions de cèl·lules vasocentrals i cèl·lules vasofibroses estan envoltades per un recobriment fibrós. Aquest recobriment és especialment conspicu en les zones on les cèl·lules vasocentrals no estan envoltades per les cèl·lules vasofibroses sino en contacte directe amb la matriu extracel·lular.

Les cèl·lules vasocentrals mantenen unions especialitzades amb la matriu (figs. 107 i 110). Aquestes unions presenten material dens en la cara citoplasmàtica i extracel·lularment contacten amb el recobriment cel·lular. En ocasions es pot veure com feixos de filaments convergeixen cap a aquestes unions (fig. 110). No s'observen unions especialitzades amb les altres cèl·lules vasocentrals ni amb les cèl·lules vasofibroses. Entre les cèl·lules veïnes, les membranes plasmàtiques estan en contacte molt estret, deixant un espai intercel·lular d'uns 17 a 20 nm. En alguns punts es pot observar la presència de material fibril·lar molt fi connectant les dos cèl·lules, especialment en els contactes entre cèl·lula vasocentral i cèl·lula vasocentral (fig. 108).

### Cèl·lules vasocentrals lliures

A l'interior dels vasos hemocelòmics i dels canals botridials s'ha observat, ocasionalment, la presència de cèl·lules que s'identifiquen com a vasocentrals (figs. 113 i 114). Tenen el citoplasma característic de les cèl·lules vasocentrals que es troben en el teixit connectiu: citosol força electrodens, abundància de lisosomes, amb reticle endoplasmàtic força ben desenvolupat i algunes vesícules de contingut

---

**Fig. 109.** Detall de les cèl·lules vasocentrals on es pot observar la presència de feixos de microfilaments. MF: microfilaments. Barra: 1 µm.

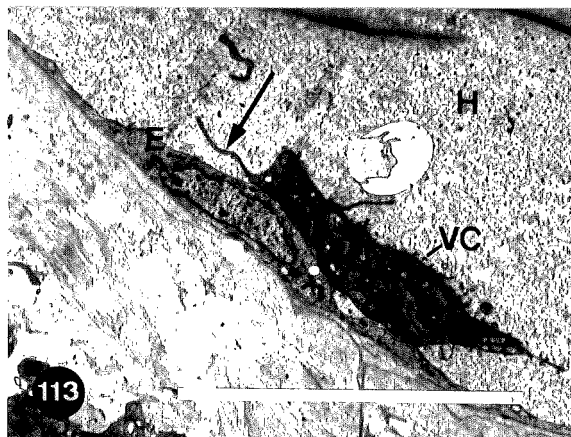
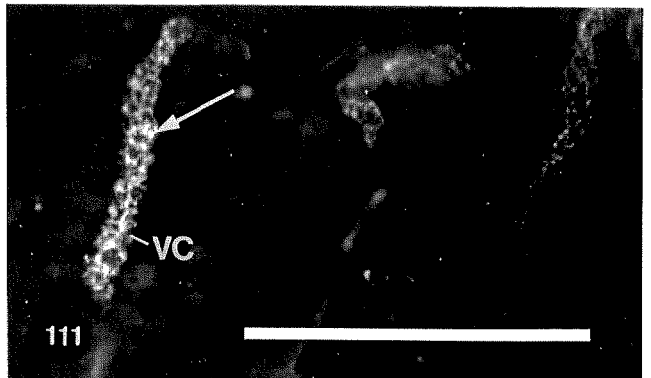
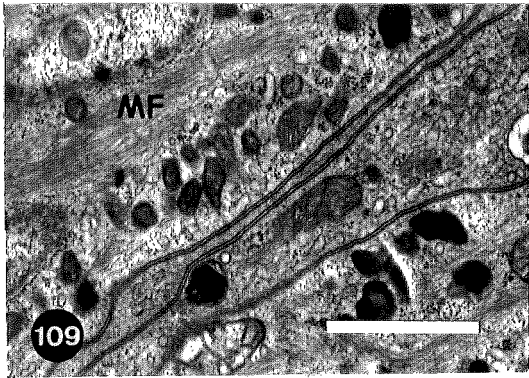
**Fig. 110.** Detall de les cèl·lules vasocentrals on es veu un feix de microfilaments convergint cap a les unions amb la matriu (fletxa). MF: microfilaments. VC: cèl·lula vasocentral. VF: cèl·lula vasofibrosa. Barra: 1 µm.

**Fig. 111** Marcatge amb fal·loidina mostrant feixos d'actina (fletxa) disposats de forma entortolligada en el citoplasma de les cèl·lules vasocentrals. VC: cèl·lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 112.** Idem que l'anterior. (fletxa): feixos d'actina. VC: cèl·lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 113.** Cèl·lula vasocentral a l'interior d'un vas hemocel·lòmic, en contacte amb la paret del vas. Observi's la presència de filopodis (fletxa). E: cèl·lula endotelial del vas hemocel·lòmic. H: vas hemocel·lòmic. VC: cèl·lula vasocentral. Barra: 10 µm.

**Fig. 114.** Cèl·lula vasocentral a l'interior d'un canal del teixit botridial, en contacte amb les parets del canal. B: canal botridial. BC: cèl·lula botridial. VC: cèl·lula vasocentral. Barra: 10 µm

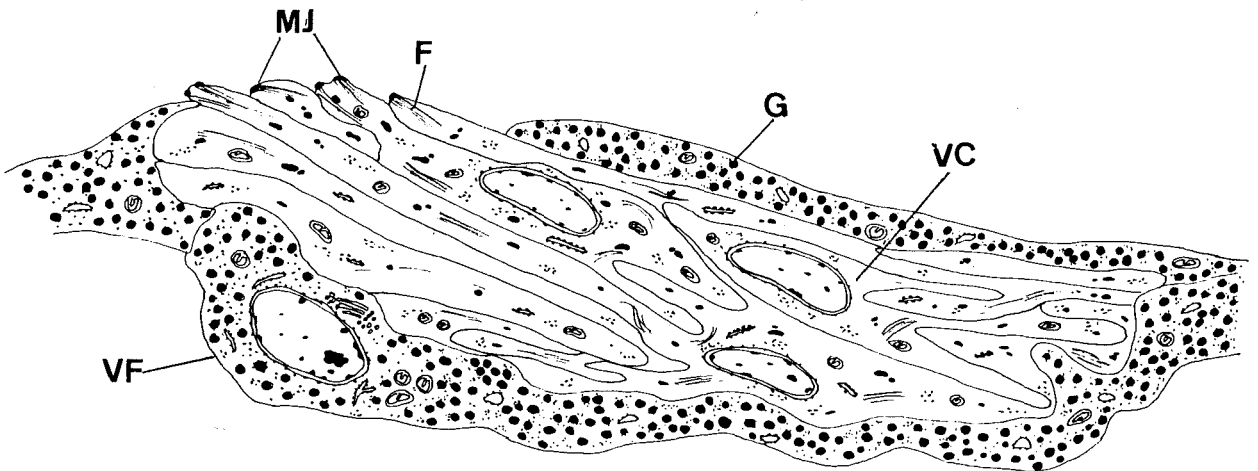




electrolúcid. Emeten llargs filopodis que poden presentar ramificacions (fig. 114). En tots els casos observats s'han trobat lligats a les parets dels vasos i no lliures a la llum, a diferència des amebòcits hemocelòmics. El contacte amb la paret dels vasos es dóna tan a nivell del cos cel.lular (fig. 113) com a nivell dels filopodis (fig. 114).

## Discussió

El teixit vasofibrós forma una xarxa anastomosada dintre el teixit connectiu. Els estudis de Bradbury del teixit connectiu d'*Hirudo medicinalis* (1959), el descriuen com a un sistema de canals connectats amb el sistema hemocelòmic, en els que les cèl.lules que formen les parets dels canals s'han omplert de grànuls, d'una forma semblant a la que es dóna a les cèl.lules botridials. La presència d'un lúmen en les fibres vasofibroses com el que descriu Bradbury (1959) no ha estat observada. Possiblement el lumen observat per Bradbury correspongui en realitat a les cèl.lules vasocentrals, que, com el seu nom indica, resten en la part central de la fibra, embolcallades parcialment per les cèl.lules vasofibroses.



**Fig. 115.** Esquema d'un segment d'una fibra del teixit vasofibrós. Les cèl.lules vasofibroses s'observen en la part externa i les vasocentrals formen acumulacions en la part interna. G: grànuls pigmentats. F: feixos de filaments. L: lisosoma. MJ: unions amb la matriu especialitzades. VC: cèl.lula vasocentral. VF: cèl.lula vasofibrosa.



Els dos tipus cel·lulars descrits, cèl·lules vasofibroses i cèl·lules vasocentrals, es corresponen amb els descrits per Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974) en el teixit vasofibrós d'*Hirudo medicinalis* com a tipus I i tipus II, i als dos tipus descrits per Fischer et al (1976) a *Haemopis sanguisuga*, dels que s'ha adoptat la nomenclatura.

Segons Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974), la xarxa vasofibrosa no està connectada amb el teixit botridial o amb el sistema hemocelòmic. En canvi, en el present estudi s'han observat contactes amb el teixit botridial. La presència ocasional de cèl·lules vasocentrals en els canals botridials i hemocelòmics, també suggereix l'existència de contactes entre aquests dos sistemes, tot i que les cèl·lules vasocentrals haurien pogut migrar a través del teixit connectiu, sense necessitat d'un contacte directe.

La citologia dels dos tipus cel·lulars del teixit vasofibrós ha estat descrita amb detall per Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974) a *Hirudo medicinalis* i, en general, coincideix amb les nostres observacions.

Les cèl·lules vasofibroses són cèl·lules allargades que contenen uns grànuls de color marró negrós molt electrodensos, els quals morfològicament es corresponen amb l'únic tipus de grànul descrit en aquestes cèl·lules per Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974) i amb el descrit com a tipus "a" per Fischer et al (1976). Aquests grànuls són de dimensions més grans que els que es troben als cromatòfors i aquest tret permet diferenciar aquests dos tipus de cèl·lules pigmentades amb facilitat.

Segons Bradbury (1959), la cèl·lula vasofibrosa conté productes de trencament de la sang ingerida i funciona com a un ronyó per acumulació. Coggeshall i Yaksta-Sauerland (1974) demostren que els grànuls pigmentats redueixen les sals de dicromats i capten ràpidament la serotonina, el que podria ser un mètode important d'inactivació d'aquesta molècula, que d'altre banda s'ha vist que té una funció de neurotransmissor en les sangoneres (Wallace, 1981). La presència de terminals nerviosos associats a les cèl·lules vasofibroses corrobora aquesta hipòtesi.

Fischer et al (1976) observen un segon tipus de grànuls en les cèl·lules vasofibroses, el tipus "b", que molt probablement es correspon amb el que s'ha descrit en els resultats com a probables lisosomes i que, d'acort amb Fischer et al, també es troben presents en les cèl·lules vasocentrals. Segons Fischer et al (1976), aquests grànuls es poden trobar freqüentment entre les cèl·lules vasocentrals, en l'espai extracel·lular, fet que en el present estudi no s'ha observat en cap ocasió. A diferència dels grànuls pigmentats de les cèl·lules vasofibroses, els grànuls de les cèl·lules vasocentrals no redueixen les sals de dicromats ni capten serotonina (Coggeshall i Yaksta-Sauerland, 1974).

La disposició dels dos tipus cel·lulars en el teixit vasofibrós, amb grups de cèl·lules vasocentrals estretament unides les unes amb les altres parcialment

embolcallats per les cèl.lules vasocentrals, ha estat observat també a *Haemopsis sanguisuga* (Fisher et al, 1976).

Una aportació important del nostre treball és la descripció dels contactes amb la matriu i els contactes intercel.lulars.

Es constata la presència d'unrecobriment cel.lular en les zones on les cèl.lules vasofibroses contacten amb la matriu. Fischer et al (1976) també descriuen a *Haemopsis sanguisuga* la presència d'un recobriment extern undolant, semblant al dels fibròcits, una mica més conspicu del que s'observa a *Hirudo medicinalis*.

La coherencia de les agrupacions de cèl.lules vasocentrals sembla assegurada per la imbrincació de les seves projeccions citoplasmàtiques, amb contactes molt estrets entre les membranes plasmàtiques, i per algun tipus d'interaccions evidenciades per la presència de material fibril.lar connectant les membranes plasmàtiques de les cèl.lules veïnes. Aquests filaments connecten les cèl.lules a través d'un espai intercel.lular molt petit, de 17-20 nm, pel que podrien ser molècules de superfície cel.lular mediadores de l'adhesió. Les cèl.lules vasocentrals estan, a més, lligades a la matriu per unions cel.lulars especialitzades. Aquestes unions estan connectades a feixos de filaments força conspicus del citosquelet. Donada la determinació de la presència de feixos, també força conspicus, de filaments d'actina amb fal.loïdina fluoresceïnada en MO, sembla raonable suposar que els filaments connectats a les unions es corresponen amb els filaments d'actina. Si aquesta hipòtesi fos certa, les unions serien unions *adherens* del tipus contacte focal, descrit a diferents tipus cel.lulars de vertebrats com a una unió cel.lular amb la matriu que connecta amb els filaments d'actina del citosquelet (Burridge et al, 1988).

La funció d'aquestes cèl.lules serà discutida detalladament en l'apartat referent al procés de regeneració.

## Amebòcits

Els amebòcits, cèl.lules circulants del sistema hemocel·lòmic, són cèl.lules amebocítiques capaces de formar llargs pseudopodis. Quan es troben lliures en el sistema hemocel·lòmic presenten una morfologia afusada, d'uns 1,5-3 X 4-8  $\mu\text{m}$  (fig. 116).

Els amebòcits aïllats i incubats amb solució fisiològica a sobre d'un portaobjectes, presenten un aspecte arrodonit, d'uns 4  $\mu\text{m}$  de diàmetre, amb llargs filopodis que poden arribar a 6  $\mu\text{m}$  de llargària en un nombre de 4 o 5 per cèl.lula (figs. 117 i 118).

### Característiques del nucli i del citoplasma

El nucli és molt basòfil, més o menys ovalat segons la morfologia de la cèl.lula, d'uns 2 X 2,5  $\mu\text{m}$  en les més arrodonides i d'uns 1 X 3  $\mu\text{m}$  en les afusades. Amb MET sovint es veu una invaginació profunda (fig. 116). S'observen força grànuls d'heterocromatina, sovint associats a l'embolcall nuclear. També s'han observat nòduls de material granulós a l'interior del nucli associats a l'embolcall nuclear (fig. 119).

---

**Fig. 116.** Amebòcits en un vas del sistema hemocel·lòmic. Observi's la presència de cavitats i canaliculs connectats amb l'exterior de la cèl.lula (fletxa). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

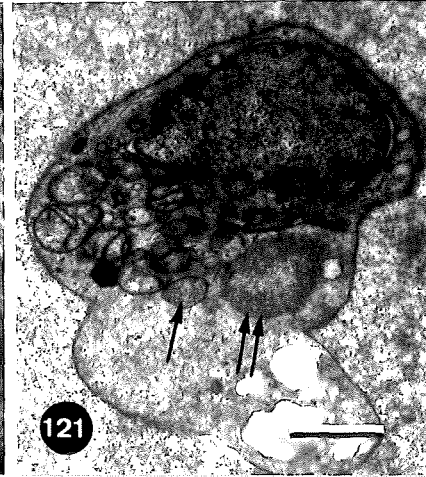
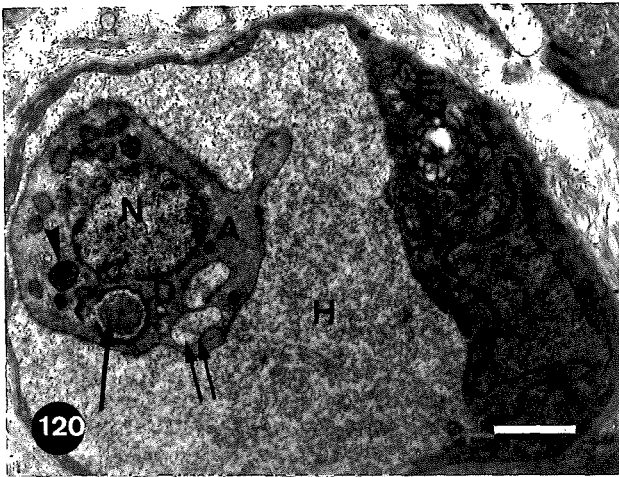
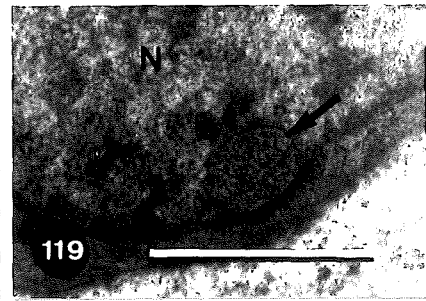
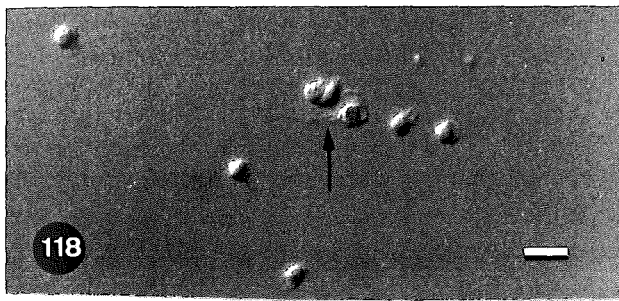
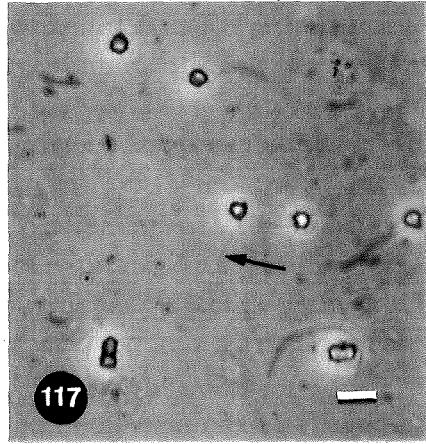
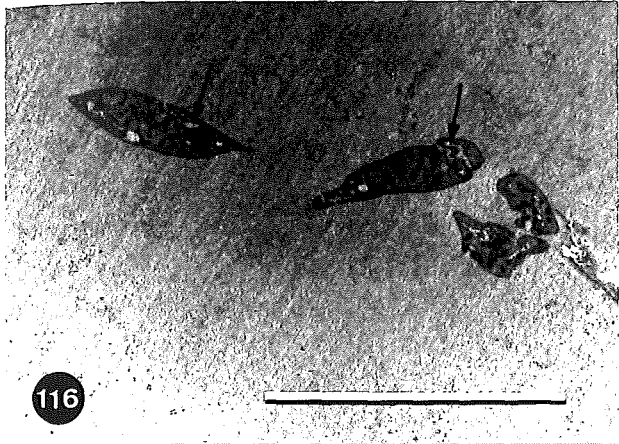
**Fig. 117.** Amebòcits aïllats i incubats en solució fisiològica a sobre d'un portaobjectes. Es pot observar la presència de llargs filopodis (fletxa). Microscòpia de contrast de fases. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 118.** Amebòcits aïllats i incubats en solució fisiològica a sobre d'un portaobjectes. Amb la microscòpia de contrast interdiferencial de Normanski s'aprecia millor la presència de filopodis (fletxa). Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 119.** Detall del nucli d'un amebòcit en el qual es pot distingir un nòdul de material granulós (fletxa) associat a l'embolcall nuclear. N: nucli. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 120.** Amebòcit en un capil·lar hemocel·lòmic. Es pot veure material granulós en la cara trans del dictiosoma de l'amebòcit (fletxa). S'observa també una vesícula de doble membrana amb estructures de secció circular a l'interior (punta de fletxa). Observi's la presència de cavitats on s'hi troba material d'aparença idèntica a la de l'hemolimfa (doble fletxa). A: amebòcit. D: dictiosoma. E: cèl.lula endotelial del capil·lar. H: hemolimfa. N: nucli. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 121.** Amebòcit en un vas hemocel·lòmic. En el citoplasma es pot observar la presència de nòduls de material granulós amb (fletxa) o sense membrana (doble fletxa). Barra: 1  $\mu\text{m}$ .



El citoplasma és lleugerament basòfil i en MET apareix força electrodens. Hi han nombrosos lisosomes, d'uns 2-2,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre. Els mitocondris tenen les crestes ben desenvolupades. S'observen forces microtúbuls. L'aparell de Golgi és força conspicu i s'hi pot observar, associat a la cara trans, material granulós no voltat de membrana (fig. 120). En el citoplasma s'observen vesícules de diferents mides (0,25-0,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre) amb contingut granular semblant al que es troba a la cara trans de l'aparell de Golgi (figs. 120 i 121). En una ocasió s'ha observat acumulació d'aquest material en forma de gota d'uns 1,2  $\mu\text{m}$  de diàmetre sense membrana (fig. 121). També s'observa alguna vesícula de doble membrana d'uns 0,3  $\mu\text{m}$  de diàmetre amb petites estructures de secció circular a l'interior (fig. 120).

A nivell de la membrana plasmàtica s'observen densificacions del citoplasma en la cara interna i en la cara externa petits acumulats del material granulós que forma l'hemolimfa (fig. 120).

Es característica d'aquestes cèl·lules la presència de cavitats en forma canalicular que, en ocasions, es veuen connectades amb l'exterior. En aquestes cavitats s'hi observa material d'aparença idèntica al que es troba a l'exterior, l'hemolimfa. La membrana d'aquestes cavitats té les mateixes característiques que la membrana plasmàtica, amb densificacions del citoplasma adjacent i acumulats de material granulós de l'hemolimfa (figs. 120 i 116).

## **Discussió**

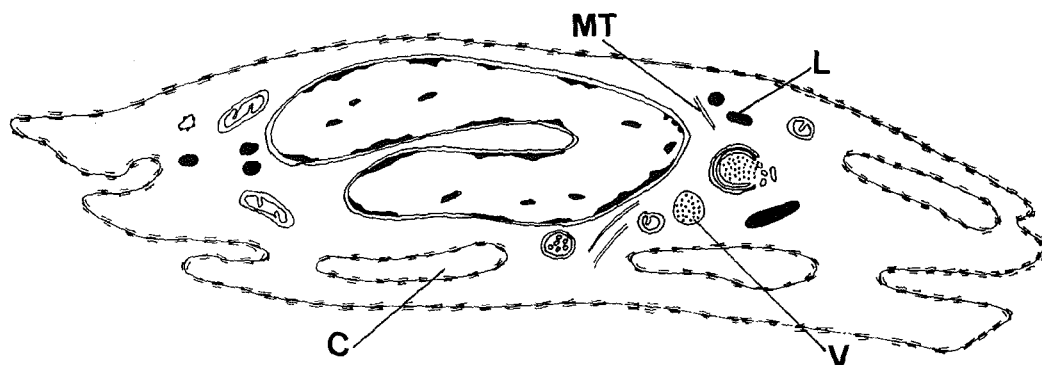
En la sang dels hirudinis s'hi troben dos tipus de cèl·lules: els amebòcits i les cèl·lules cloragògenes lliures (Sawyer, 1986).

Els més abundants són els amebòcits que es troben lliures o lligats a les parets dels vasos. En els acantobdèl·lides i rincobdèl·lides els amebòcits del sistema vascular són diferents dels del sistema cel·lular. En els arincobdèl·lides, grup en el qual estan reunits tots dos sistemes circulatoris en un de sol, l'hemoceloma, no hi ha evidències de més de un tipus d'amebòcits.

Les cèl·lules cloragògenes lliures són menys abundants. Són cèl·lules cloragògenes que s'han deslligat de les parets de les cavitats cel·lulars. En els arincobdèl·lides no se n'hi troben, ja que no tenen cèl·lules cloragògenes sino teixit botridial.

Els amebòcits són cèl·lules amebocítiques que formen llargs filopodis i tenen un citoplasma caracteritzat per la presència de canaliculs i/o vacuols amb material similar al que es troba a fora de la cèl·lula, coincidint totes aquestes característiques amb les descrites en amebòcits d'altres hirudinis (Sawyer i Fitzgerald, 1981; Cornec 1984). Es coneix molt poc respecte l'origen i la funció dels amebòcits a les sangoneres, però semblen estar relacionats principalment amb la

fagocitosis i transport de productes inerts o en degeneració, objectes estranys i probablement substàncies nutritives (Sawyer, 1986).



**Fig. 122.** Esquema d'un amebòcit. C: canals intracitoplasmàtics. L: lisosoma. MT: microtúbuls. V: vesícula de contingut granular.

Un tret diferencial d'aquestes cèl·lules és la presència d'un rosari esparç d'acumuls electrodensos que es troben tant al costat citoplasmàtic com extracitoplasmàticament de la membrana plasmàtica. Aquests acumuls han estat descrits com a extracel·lulars per Cornec (1984), que els cita com a unrecobriment cel·lular esparç, o com a grànuls intracitoplasmàtics per Sawyer i Fithgerald (1981). La presència d'aquests acumuls a nivell dels canaliculs i les vacuoles i el fet que s'hi observi hemolimfa al seu interior permet identificar als canaliculs i vacuoles com a producte de la invaginació de la membrana plasmàtica.

A *Hirudo medicinalis* és de remarcar la presència d'un aparell de Golgi força conspicu, probablement relacionat amb les vesícules de material granulós no identificat, que, si bé són comunes a les que s'observen en les microfotografies d'altres hirudinis (Sawyer i Fithgerald, 1981), no han estat citades anteriorment.

## **CURACIÓ DE FERIDES**

### **RESULTATS**

S'estudia la curació de ferides per incisió, cauterització i cremades causades per nitrat de plata.

En primer lloc s'exposa detalladament el procés de curació de les ferides per incisió i s'en descriuen les diferents etapes. A continuació s'estudien els processos de curació dels altres tipus de ferides en relació al primer que serveix de model. S'estudien també alguns mecanismes relacionats amb el procés de curació: activitat fagocítica i capacitat mitòtica dels teixits en regeneració.

## FERIDES PER INCISIÓ

Les ferides, fetes amb un bisturí, mostren un tall que afecta el tegument i les tres capes musculars, arribant, en ocasions, fins al teixit connectiu del parenquima perivisceral, quedant els teixits afectats en contacte directe amb l'exterior (fig. 123).

Immediatament després de produir-se la ferida, es produeix una contracció muscular dels segments afectats.

El procés de regeneració provoca primer un fluxe de cèl.lules procedents del teixit connectiu que tanca efectivament la ferida i forma un pseudoblastema. Una vegada el pseudoblastema ha estat format comença la reepitelització. Acompanyant aquests processos de regeneració s'observa una activitat fagocítica important. Finalment es pot observar en el lloc de la ferida un teixit connectiu cicatricial i una epidermis amb molt poques glàndules mucoses i pràcticament sense projeccions citoplasmàtiques de cèl.lules pigmentàries al seu voltant (figs. 123 a 126).

---

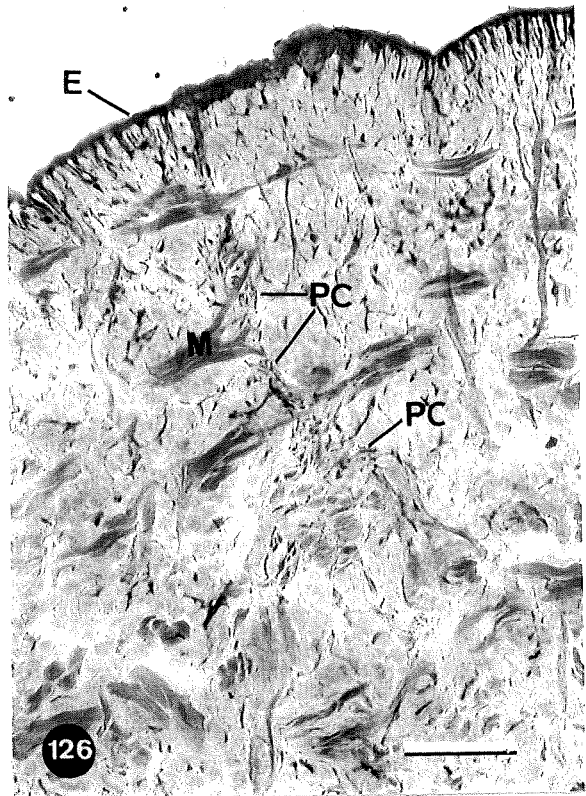
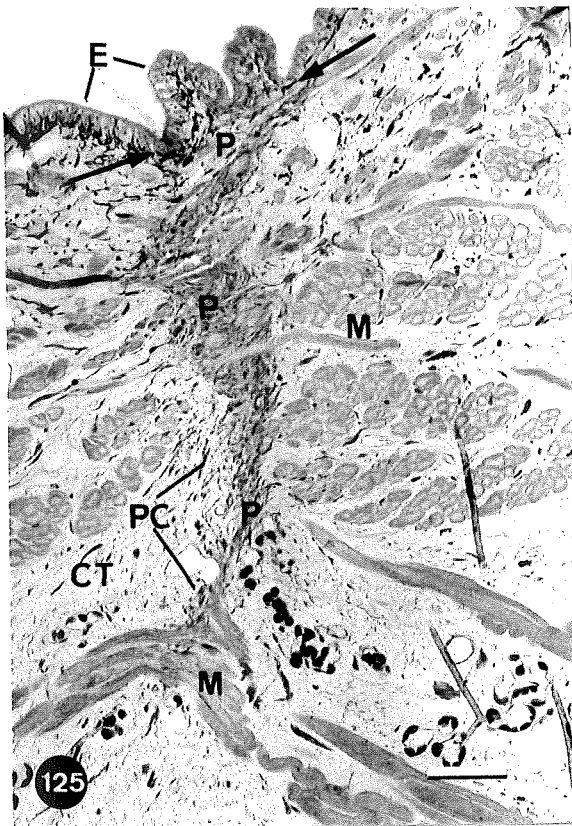
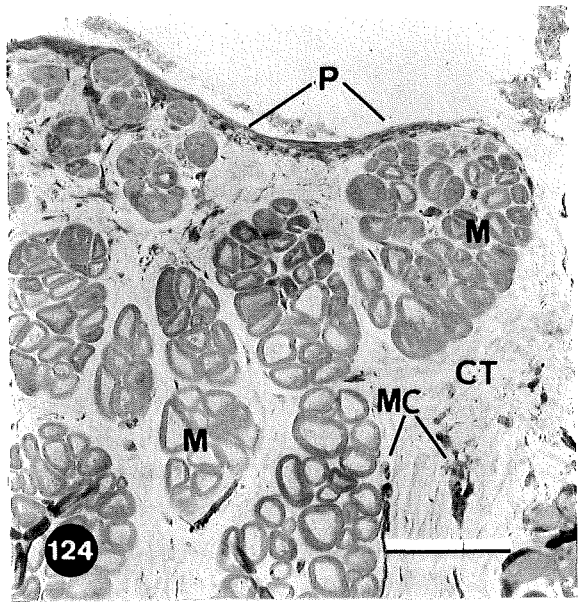
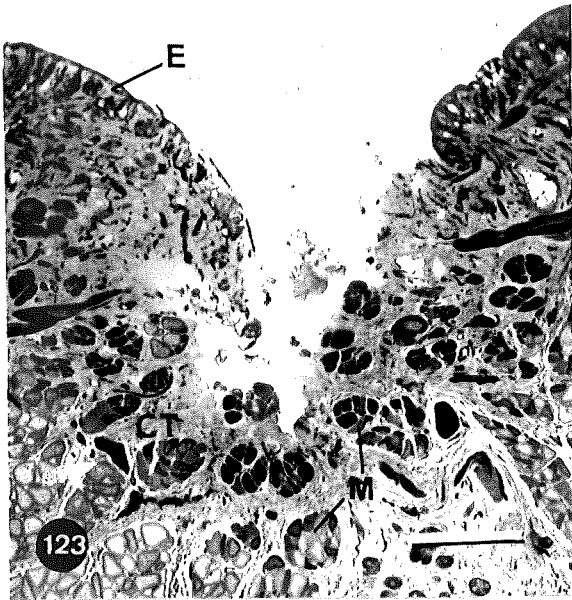
**Fig. 123.** Immediatament després de la realització del tall, els teixits dels marges de la ferida queden exposats al medi extern. Coloració blau de toluidina. CT: teixit connectiu. E: epiteli. M: fibra muscular. Barra: 100 µm.

**Fig. 124 .** A les 4 h les cèl.lules migratòries han arribat als marges de la ferida i un tap cel.lular, el pseudoblastema, es forma per sobre dels teixits exposats, actuant com una barrera protectora. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. M: fibra muscular. MC: cèl.lules migratòries. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 125.** 10 dies després de la realització de la ferida. El pseudoblastema s'ha retractat totalment i els marges de la ferida s'han ajuntat (fletjes). provocant plecs en l'epidermis. Coloració hematoxilina /eosina. CT: teixit connectiu. E: epidermis. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 126.** Als 28 dies el pseudoblastema està força disgregat. Només un nombre reduït de cèl.lules del pseudoblastema es troben en la zona cicatricial. Coloració hematoxilina/eosina. E: epidermis. M: fibra muscular. PC: cèl.lules del pseudoblastema. Barra: 100 µm.





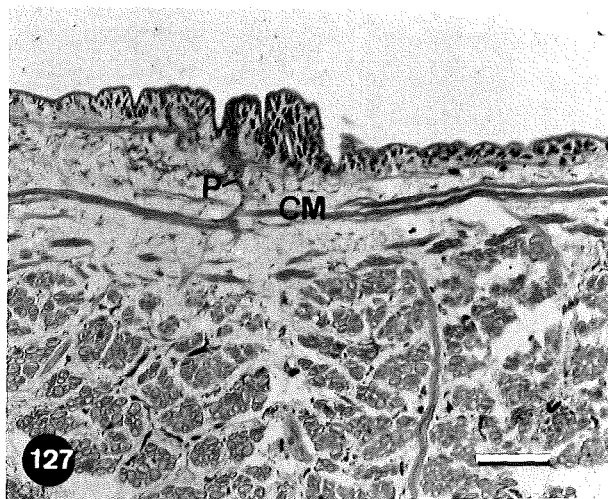
## Pseudoblastema

### Evolució del pseudoblastema

Després del tancament de la ferida per contracció muscular, es dona la formació d'un tap cel·lular, el pseudoblastema. En successius estadis, les cèl·lules que formaran el pseudoblastema migren cap a la ferida, s'organitzen lleugerament i sofreixen diversos canvis.

En les presents condicions experimentals, les primeres cèl·lules migratòries s'observen al cap de 10 minuts de realitzada la ferida. Una hora després, les cèl·lules han arribat al límit de la ferida, i a les 4 h formen un pseudoblastema ben desenvolupat, el qual està completament reepitelitzat a les 24 h. Cap a les 48 h, el pseudoblastema comença a reatreure's, al mateix temps que els marges de la ferida s'ajunten. Cap als 6 dies, el pseudoblastema en retracció ha adoptat una forma de falca allargada. Entre els dies 10 i 14, el pseudoblastema comença a desintegrar-se, i finalment, cap a les 5 setmanes, tot ell es troba practicament disgregat (figs. 123 a 126).

Aquesta pauta temporal pot variar segons el tipus i l'importància de la ferida. En ferides de menor consideració, que només afectin les capes musculars circulars, el pseudoblastema ja es troba totalment retractat a les 48 h (fig. 127).



**Fig. 127.** 48 h després de la realització d'una ferida que afecta només fins a les capes musculars circulars. En aquesta ferida, de menys consideració que les efectuades usualment, s'observa un pseudoblastema ja totalment retractat. Coloració hematoxilina/eosina. CM: musculatura circular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu$ m.

En aquest procés es diferencien les següents etapes:

- I - Activació i migració cel.lular
- II - Formació del pseudoblastema
- III - Retracció del pseudoblastema
- IV - Disgregació del pseudoblastema

### I- Migració de les cèl.lules vasocentrals

Les cèl.lules que migren cap a la ferida provenen del teixit connectiu proper, on, en el seu estat normal, es troven formant petites agrupacions cel.lulars. Aquestes cèl.lules, anomenades vasocentrals, estan fortament imbrincades entre sí per mitjà de projeccions citoplasmàtiques i envoltades per les cèl.lules vasofibroses, constituint el teixit vasofibrós (figs. 103 a 106). En produir-se una ferida les cèl.lules vasocentrals s'activen i inicien la migració cap a l'àrea afectada, on s'acumulen (fig. 128).

Immediatament després de la realització de la ferida, els grups de cèl.lules vasocentrals comensen a desenvolupar-se (fig. 129). Les projeccions citoplasmàtiques gradualment es van desplegant (fig. 130). Les cèl.lules vasocentrals es van separant les unes de les altres i de les cèl.lules vasofibroses, al mateix temps que inicien la migració (fig. 131). Durant el procés de separació, les unions especialitzades que connecten les cèl.lules vasocentrals amb la matriu connectiva es trenquen. Als 10 minuts de realitzada la ferida es poden veure cèl.lules vasocentrals, encara associades a la xarxa vasofibrosa, en l'inici de la seva migració (fig. 129). Posteriorment es troben grups de cèl.lules vasofibroses que, tot

---

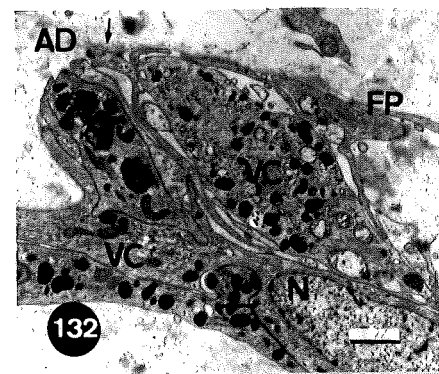
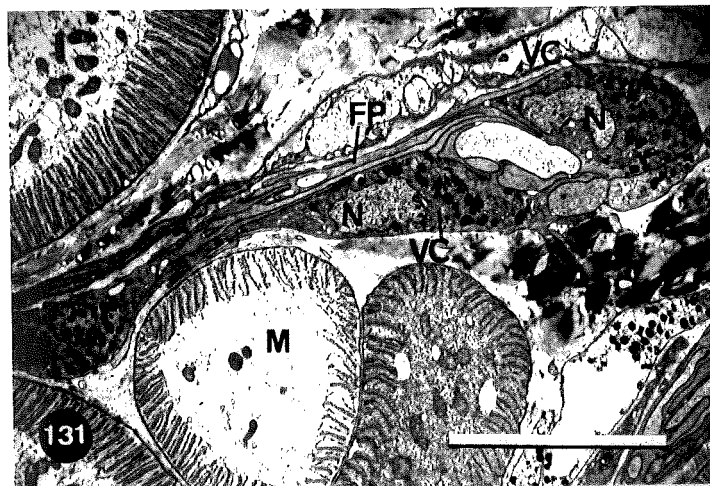
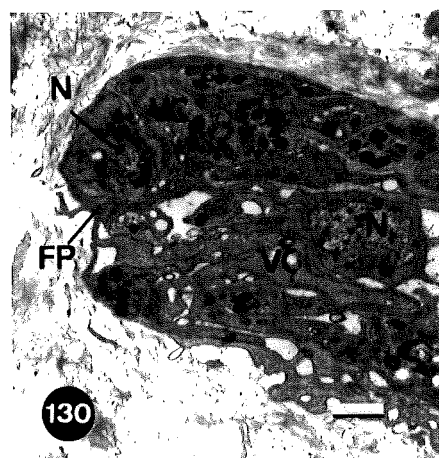
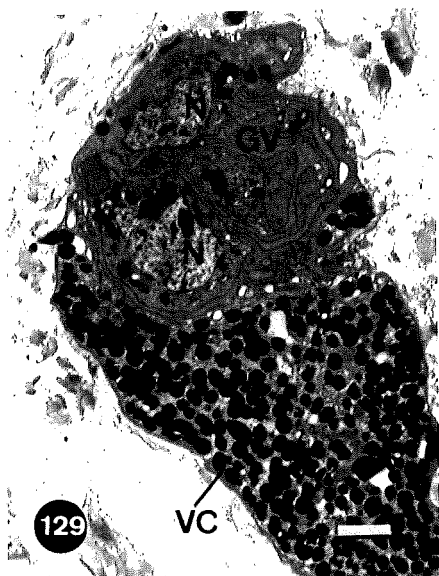
**Fig. 128.** 4 h després de la realització de la ferida. Les cèl.lules vasocentrals migren cap a la ferida per formar el pseudoblastema. Noti's la presència de grups de cèl.lules vasocentrals encara no dissociats. Coloració hematoxilina/eosina. FI: fibròcit. GV: grup de cèl.lules vasocentrals. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. VC: cèl.lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 129.** Grup de cèl.lules vasocentrals parcialment separades de les cèl.lules vasofibroses en les proximitats de la ferida. GV: grup de cèl.lules vasocentrals. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 1 µm.

**Fig. 130.** Grup de cèl.lules vasocentrals encara no dissociat del tot, iniciant la migració per mitjà de filopodis. FP: filopodi. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 1 µm.

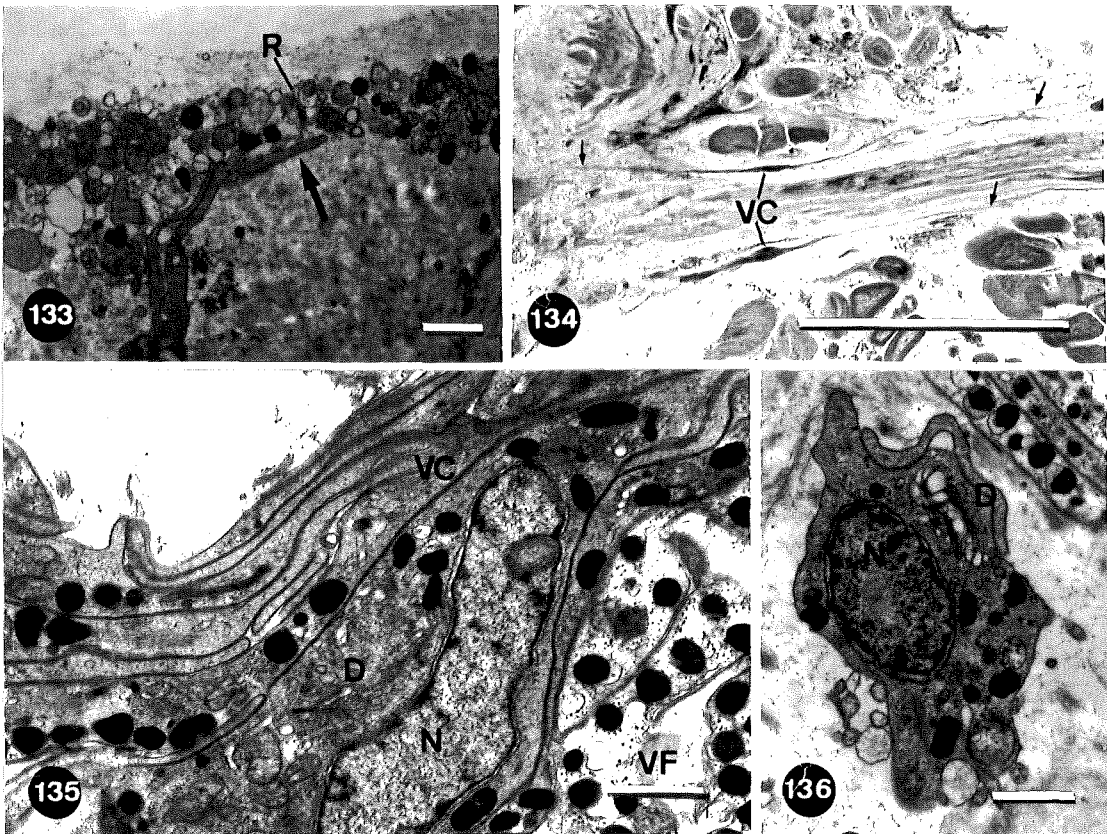
**Fig. 131.** Dues cèl.lules vasocentrals quasi totalment dissociades, migrant cap a la ferida a través de les capes musculars. FP: filopodi. M: fibra muscular. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 10 µm.

**Fig. 132.** Cèl.lules vasocentrals en l'inici de la migració, mostrant algunes unions especialitzades en contacte amb un recobriment fibrós desorganitzat (fletxa). AD: unió especialitzada. FP: filopodis. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 1 µm.



i que no s'han separat les unes de les altres, ja no estan associades al teixit vasofibrós i mostren alguns filopodis desplegats (figs. 128 i 130). Finalment aquests grups es desmembraren i les cèl.lules vasocentrals migren per mitjà dels filopodis fins al marge de la ferida (figs. 131 i 133).

Desde l'inici de la formació del pseudoblastema fins aproximadament les 24 h, s'observa una afluència continuada de cèl.lules vasocentrals cap al pseudoblastema, més important a les primeres hores (0 h-12 h) i que va minvant progressivament (12 h-24 h). A partir de les 24 h s'observen encara algunes cèl.lules vasocentrals en les proximitats del pseudoblastema, encara que la majoria no sembla que s'estiguin incorporant, mostrant moltes d'elles restes de l'activitat fagocítica que han estat realitzant en els teixits afectats.



**Fig. 133.** Detall del marge de la ferida amb restes cel.lulars. Els filopodis de les cèl.lules vasocentrals migratòries arriben al marge dels teixits afectats (fletxa). R: restes cel.lulars. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 134.** Cèl.lules vasocentrals migratòries en la proximitat de la ferida (fletxa). Observi's la presència de llargs filopodis (fletxes). Coloració hematoxilina/eosina. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 100  $\mu$ m.

**Fig. 135.** Detall de la zona perinuclear d'una cèl.lula vasocentral en l'inici de la migració. Noti's la presència d'un dictiosoma i nombroses vesícules golgianes. D: dictiosoma. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. VF: cèl.lula vasofibrosa. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 136.** Cèl.lula vasocentral migratòria. D: dictiosoma. N: nucli. Barra: 1  $\mu$ m.



Durant la fase migratòria, les cèl.lules vasocentrals prenen forma afusada, amb els filopodis orientats cap a la ferida. El cos cel.lular mesura uns 2,5-4,5 µm X 17-40 µm i la llargaria cel.lular, inclosos els filopodis, pot arribar als 100 µm (fig. 134). El citoplasma no presenta diferències remarcables respecte l'estadi de repòs. Els dictiosomes i/o vesícules golgianes s'han pogut veure amb en algunes cèl.lules en l'estadi inicial de la separació (fig. 135) i en la migració (fig. 136), cosa que no havia estat possible en l'estat de repòs. El nucli és menys aplatat, d'uns 2,5 X 6 µm, i més heterocromàtic (fig. 136). En ocasions es pot veure un nucleol. Els filopodis mesuren de 0,2 a 0,8 µm de diàmetre i no contenen orgànuls. Els feixos de filaments citoplasmàtics mesuren aproximadament igual que en la fase de repòs al teixit vasofibrós, uns 0,2 µm (fig. 136). Les unions especialitzades amb la matriu desapareixen durant la migració, però al començament de la fase migratòria encara s'en observen algunes, desconnectades del citosquelet, en contacte amb un recobriment cel.lular desorganitzat (fig. 132).

## II-Formació del pseudoblastema

Entre la primera i la quarta hora les cèl.lules vasocentrals es van situant al límit de la ferida, externament al teixit malmés, i orientades paral.lelament a la superfície (figs. 124 i 137-140). Les cèl.lules més exteriors sovint presenten signes de degeneració i el nucli picnòtic (fig. 141). El pseudoblastema és un teixit més fràgil que els teixits circundants i s'esqueixa fàcilment (fig. 142).

---

**Fig. 137.** A les 4 h, les cèl.lules del pseudoblastema s'han acumulat als marges de la ferida, externament als teixits danyats. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. M: fibra muscular. MC: cèl.lula vasocentral migratòria. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

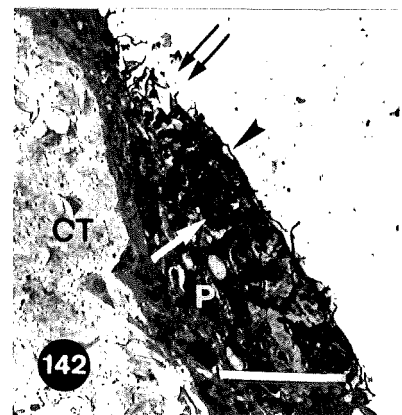
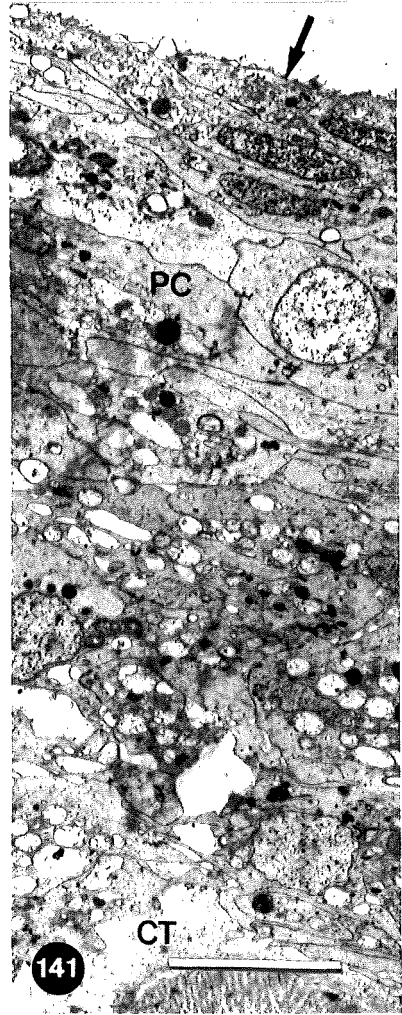
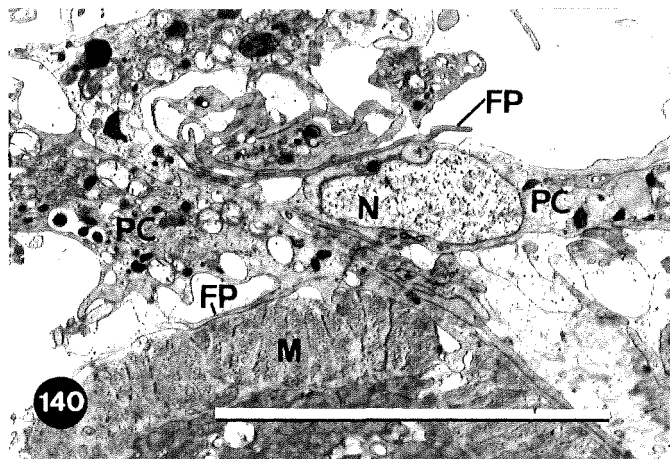
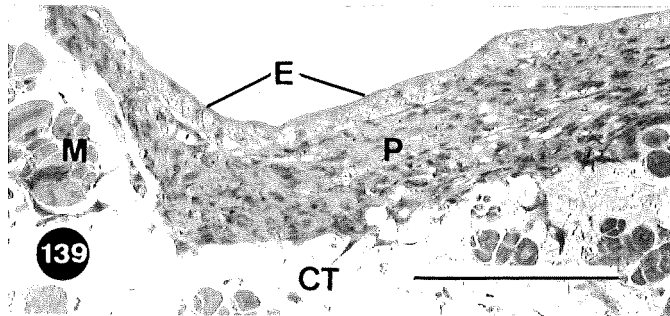
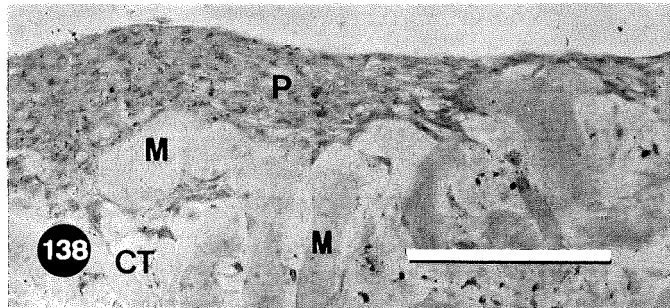
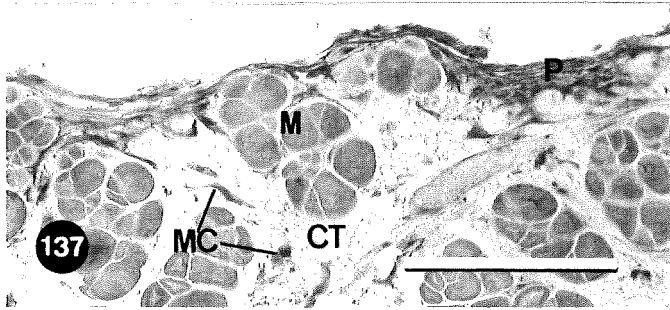
**Fig. 138.** Pseudoblastema a les 8 h de la realització de la ferida. Noti's la compactació del tap cel.lular. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

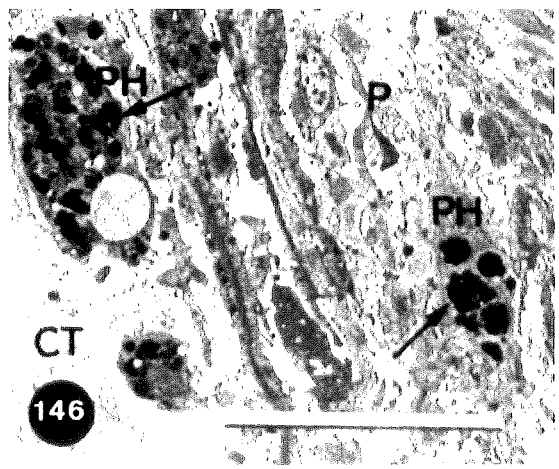
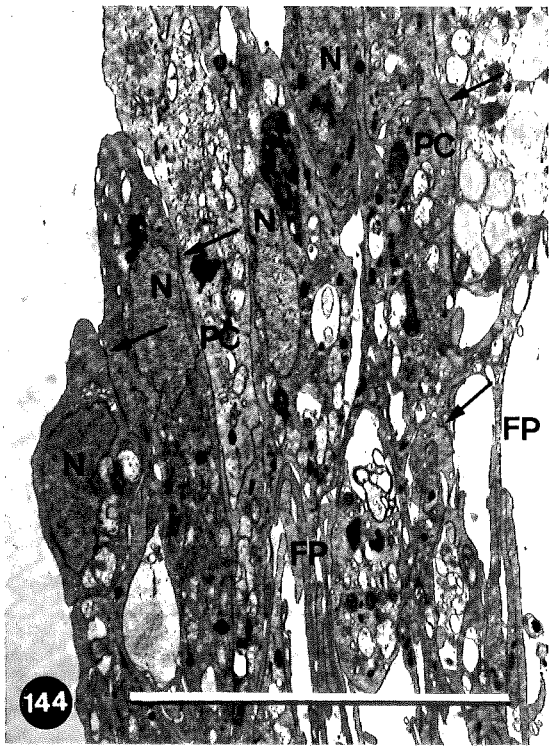
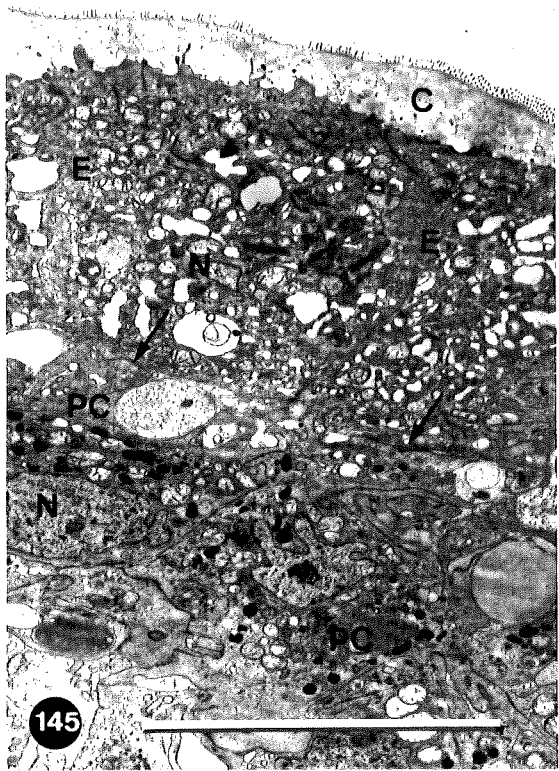
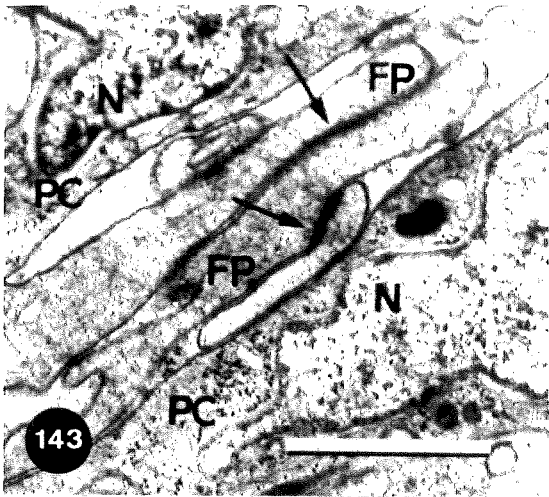
**Fig. 139** A les 24 h el pseudoblastema està completament reepitelitzat. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. E: epiteli. M: fibres musculars. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 140.** 4 h després de la realització de la ferida. Les cèl.lules vasocentrals que estan constituint el pseudoblastema s'extenen per sobre els teixits afectats per mitjà de filopodis. FP: filopodis. M: cèl.lula muscular danyada. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 10 µm.

**Fig. 141.** Pseudoblastema en els estadis inicials de la formació. Observi's la presència de cèl.lules amb nucli picnòtic en la part més externa (fletxa). CT: teixit connectiu. PC: cèl.lules del pseudoblastema. Barra: 5 µm.

**Fig. 142** Pseudoblastema en els estadis inicials de la seva formació. En alguns punts el pseudoblastema ha estat esqueixat (doble fletxa). En les parts que no estan esqueixades es pot observar que els filopodis estan orientats paral.lelament a la superfície (punta de fletxa). A l'interior de les cèl.lules del pseudoblastema s'observen restes cel.lulars (fletxa). CT: teixit connectiu. P: pseudoblastema. Barra: 10 µm.







De la quarta a la vuitena hora es pot observar ja un pseudoblastema ben constituït. Les cèl.lules estan força compactades, formant una capa d'un gruix de 3 a 10 cèl.lules (fig. 138). El cos cel.lular, tot i ser força irregular, pren una forma afusada i els filopodis estan fortament imbricats amb les cèl.lules veïnes. En algunes seccions s'han pogut observar cèl.lules del pseudoblastema en les que el cos cel.lular, d'uns 22  $\mu\text{m}$  de llargària, acaba amb un llarg filopodi a cada extrem, arribant a mesurar tota la cèl.lula fins a 125  $\mu\text{m}$  de llargària. Aquests filopodis tenen un diàmetre d'uns 0,8  $\mu\text{m}$ . Ultraestructuralment les cèl.lules vasocentrals del pseudoblastema no mostren diferències evidents respecte la fase de repòs de les cèl.lules vasocentrals.

Durant la formació i compactació del pseudoblastema les cèl.lules progressivament es van aplatant. Les dimensions varien d'una fase en la qual les cèl.lules encara no estan gaire compactades (8 h) amb 22,5 X 2,8  $\mu\text{m}$  de mitja, a una fase de més compactació (12-24 h) amb 34 X 2  $\mu\text{m}$  de mitja.

En la part que limita amb l'exterior, el pseudoblastema és uniformement continu i llis, amb filopodis col·locats paral·lelament a la superfície (fig. 142). Al seu interior, s'observen restes cel.lulars, com grànuls pigmentaris dels cromafors, bé entre les cèl.lules del pseudoblastema o bé fagocitats per aquestes (fig. 142). Al seu límit intern s'observen restes de teixit que han estat malmesos en la ferida i que queden parcialment englobats pel pseudoblastema (fig. 138).

Quan les cèl.lules vasocentrals s'acumulen per formar el pseudoblastema, apareixen unions entre elles. Les cèl.lules, que presenten un alt grau de compactació, mantenen en moltes zones les membranes plasmàtiques estretament unides, amb una separació d'uns 17-20 nm (fig. 143). Ja en aquests primers estadis s'observen unions especialitzades, zones de 0,15-0,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre i un espai intercel.lular de 15-20 nm. A l'espai intercel.lular s'observen fibril·les que l'atravesen perpendicularment i en les superfícies citoplasmàtiques material electrodens cap el qual convergeixen feixos de filaments citoplasmàtics (fig. 143).

---

**Fig. 143** Unes 48 h després de la realització de la ferida s'observen contactes molt estrets i unions especialitzades (fletxa) entre les cèl.lules del pseudoblastema. FP: filopodi. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1  $\mu\text{m}$ .

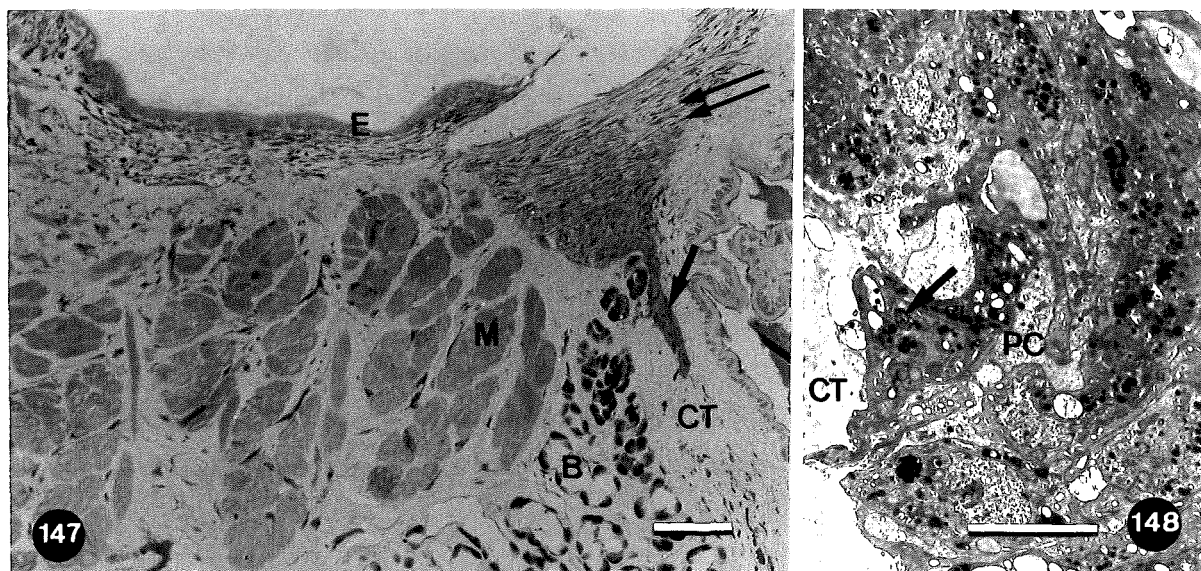
**Fig. 144.** Pseudoblastema a les 12 h de la realització de la ferida. Les membranes de les cèl.lules del pseudoblastema estan en contacte molt estret i mostren abundància d'unions intercel.lulars especialitzades (fletxes). FP: filopodis. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 145.** Pseudoblastema recent reepitelitzat a les 48 h de la realització de la ferida. Noti's que les cèl.lules epitelials no tenen membrana basal i que les seves parts basals estan en contacte molt estret amb les cèl.lules del pseudoblastema (fletxes). C: cutícula. E: cèl.lula epitelial. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 146** 14 dies després de la realització de la ferida. Les cèl.lules fagocítiques estan presents tant a l'interior, com als marges del pseudoblastema. Els fagòcits mostren abundància de lisosomes, vesícules fagocítiques i cossos multivesiculats (fletxa). CT: teixit connetiu. P: pseudoblastema. PH: fagòcit. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

En aquesta fase els feixos de filaments segueixen tenint un diàmetre aproximat de 0,2-0,4  $\mu\text{m}$ . Aquestes unions es poden trobar en totes les zones de contacte, però són especialment abundants quan els filopodis hi estan implicats. Proporcionalment i a mesura que es consolida el pseudoblastema, entre les 8 i les 24 h, s'incrementa el nombre d'unions especialitzades (fig. 144). Quan la reepitelització s'ha completat també es poden observar unions d'aquest tipus entre les cèl.lules epitelials i les del pseudoblastema (fig. 145).

Durant l'evolució del pseudoblastema, algunes de les cèl.lules del pseudoblastema mostren evidències d'activitat fagocítica. Tenen gran abundància de lisosomes i vesícules fagocítiques en el seu citoplasma. Ocasionalment, poden presentar abundants cossos multivesiculars de 0,7 a 1,8  $\mu\text{m}$  de diàmetre. Els cossos multivesiculars són grups de petites vesícules de 0,13 a 0,6  $\mu\text{m}$  de diàmetre amb un contingut electrodens i heterogeni (fig. 146). Altres cèl.lules presenten característiques intermitjtes entre aquests fagòcits i les cèl.lules del pseudoblastema ordinàries. En les zones pròximes al pseudoblastema també es troben cèl.lules fagocítiques, les quals ocasionalment engloben restes de teixit malmés de grans dimensions (fig. 146).



**Fig. 147.** 3 dies després de la realització de la ferida. Observi's que les cèl.lules del pseudoblastema de la regió centrobasal han iniciat el procés de retracció cap a l'interior del cos (fletxa), mentre que la resta de les cèl.lules del pseudoblastema estan encara disposades paral·lelament a la superfície (doble fletxa). B: teixit botrioidal. E: epitelí. CT: teixit connectiu. M: fibres musculars. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 148.** 3 dies després de la realització de la ferida. Les cèl.lules del pseudoblastema prenen una disposició perpendicular a la superfície. Observi's la presència de lisosomes secundaris (fletxa) en les cèl.lules del pseudoblastema. CT: teixit connectiu. PC: cèl.lules del pseudoblastema. Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

### III- Retracció del pseudoblastema

Entre el segon i tercer dia s'inicia la retracció del pseudoblastema. Durant aquest estadi, les cèl.lules del pseudoblastema progressivament s'orienten i migren cap a l'interior del cos, sense que es desfaci la coherencia del pseudoblastema.

Els primers símptomes de retracció s'observen pel canvi d'orientació que manifesten les cèl.lules situades en la porció centro-basal, les quals prenen una orientació progresivament perpendicular a la superfície (figs. 147 i 148). A mesura que progressa la retracció, disminueix el gruix del pseudoblastema. Durant aquest procés de retracció no es descarta que continui l'aportació de cèl.lules vasocentrals al pseudoblastema.

Als 6 dies tot el pseudoblastema es troba en forma de falca que s'interna cap a les capes més profundes de la paret del corporal, mentre que els marges de la ferida s'han aproximat. Sovint s'observen un o dos plecs en l'epidermis que ha recobert la ferida (fig. 125). En aquest estadi, el pseudoblastema és encara força compacte, però les cèl.lules del marge d'avanç de la punta de la falca segueixen camins diferents, a modus de cercells que s'internen en els teixits (fig. 149).

Els feixos de filaments citoplasmàtics es veuen disposats preferentment de forma paral.lel.la a l'eix major de les cèl.lules (fig. 150). Durant aquesta fase els feixos es fan més gruixuts, d'uns 0,3-0,9  $\mu\text{m}$ , i més nombrosos (fig. 150).

En quasi totes les cèl.lules del pseudoblastema s'observen restes d'activitat fagocítica, junt amb lisosomes primaris s'observen força lisosomes secundaris, alguns en forma multivesicular, fagosomes i cossos en forma de peses (fig. 148).

En l'estadi de retracció, les cèl.lules del pseudoblastema mostren un reticle endoplasmàtic rugós més conspicu. Als 7 dies es veuen vesícules del reticle endoplasmàtic rugós molt dilatades de contingut més aviat electrolúcid (figs. 150 i 151).

Gradualment les cèl.lules són revestides per un recobriment cel.lular fibrós i es diposita una matriu extracel.lular entre elles (fig. 151).

Al començar la retracció i a mesura que progressa, les unions entre les cèl.lules del pseudoblastema es fan més conspícues i canvien d'aspecte. En una mateixa zona es veuen acumulades varies unions. L'espai intercel.lular a nivell d'aquesta zona es fa més ample, d'uns 70-150 nm, i s'hi observa material electrodens filamentós. En la superfície citoplasmàtica de la membrana es veuen varies unions consistents en material electrodens cap al que convergeixen feixos de filaments citoplasmàtics (figs. 150 i 152). A les dues setmanes la majoria d'unions prenen aquest aspecte. Aquestes unions són especialment freqüents als

llocs on tres o més cèl.lules estan en contacte. A més, es formen unions entre les cèl.lules del pseudoblastema i la matriu extracel.lular, les quals també estan connectades amb els feixos de filaments (figs. 151 i 153).

Durant aquest estadi es pot observar com les cèl.lules del pseudoblastema estableixen contactes amb les fibres musculars de la paret corporal (figs. 125 i 154), presentant unions en diferents punts de la superfície de contacte (figs. 155 i 156). Les membranes cel.lulars de les cèl.lules del pseudoblastema i les de les fibres musculars estan adosades, deixant un espai intercel.lular molt estret de 15 a 20 nm (fig. 156). A més, en alguns punts de la zona de contacte, s'observen algunes formes d'unió especials (figs. 155 i 156). Aquestes unions es caracteritzen per un espai intercel.lular força ample, de 100 a 300 nm, i per la presència de diposits electrodensos en la superfície citoplasmàtica de les membranes cap als que convergeixen feixos de filaments citoplasmàtics. No hi ha evidència de fibres o material eletrodens en l'espai intercel.lular.

En el zona de contacte es pot observar com fibres musculars longitudinals i ocasionalment alguna de dorsoventral es veuen desviades de la seva posició normal en direcció al pseudoblastema (fig. 125).

---

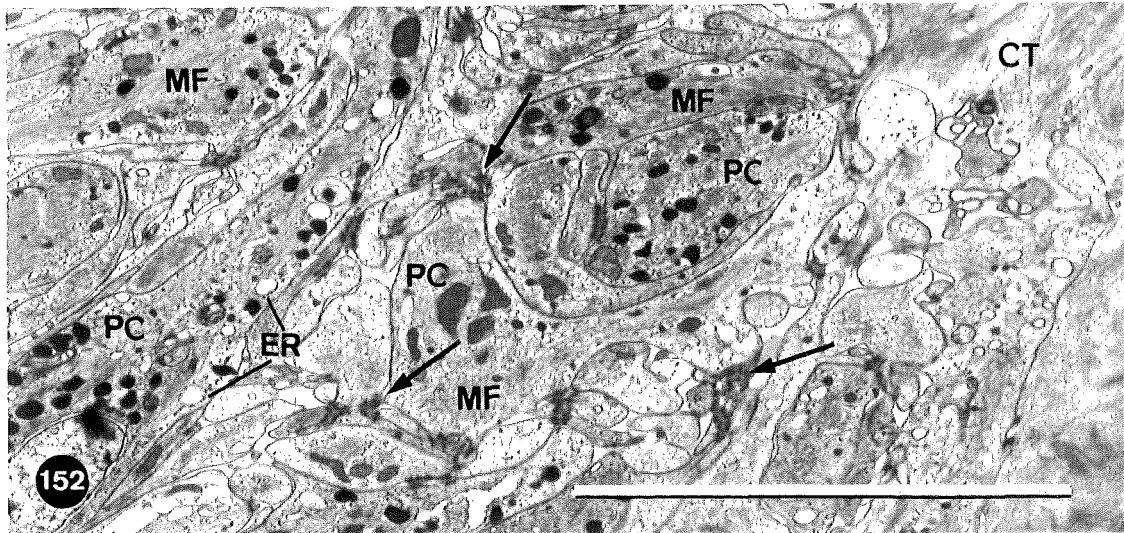
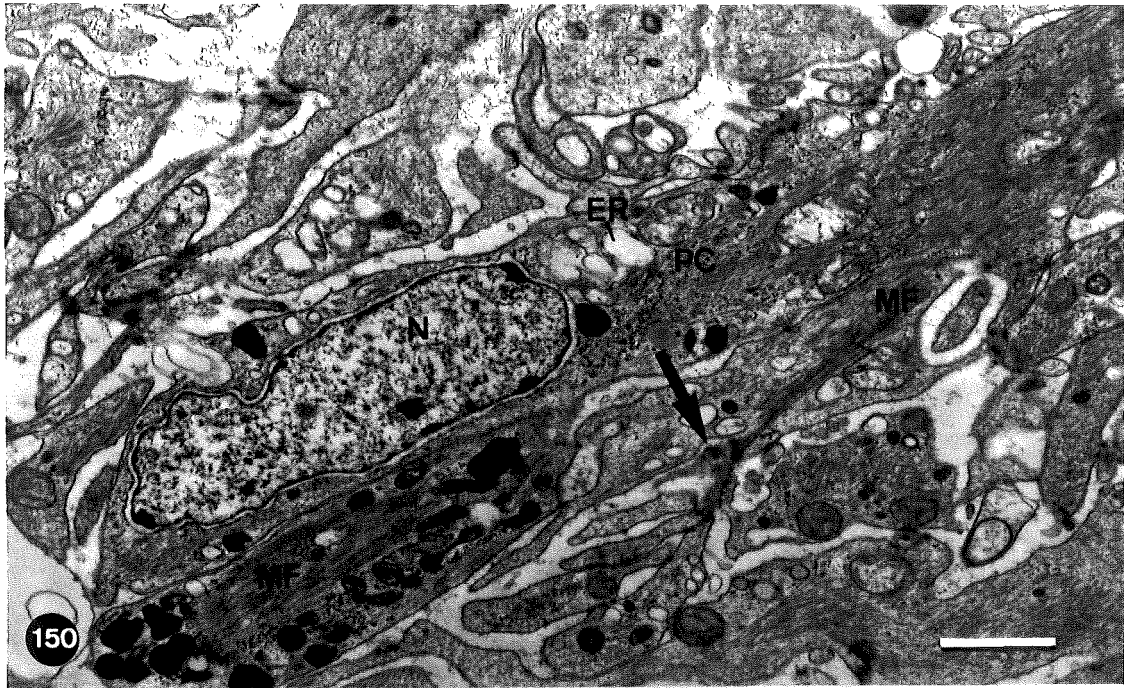
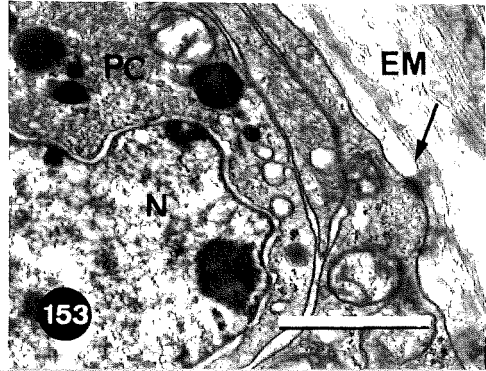
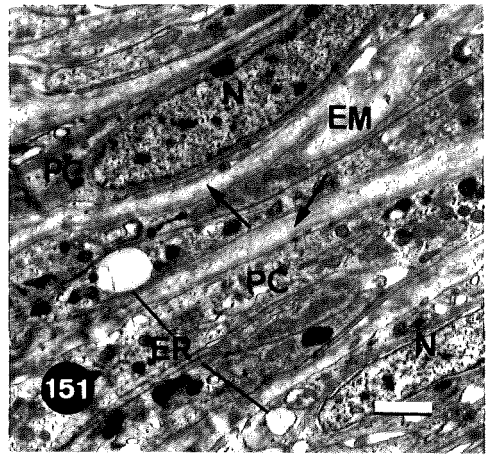
**Fig. 149.** 6 dies després de la realització de la ferida. Les cèl.lules capdavanteres de la punta de la falca del pseudoblastema en retracció, avancen a modus de cercells a trabes del teixit connectiu (fletxa). CT: teixit connectiu. P: pseudoblastema. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 100  $\mu$ m.

**Fig. 150.** Durant l'estadi de retracció, les cèl.lules del pseudoblastema mostren feixos de filaments conspicus i molt abundants, els quals convergeixen cap a les unions especialitzades (fletxa). S'observen també vesícules del reticle endoplasmàtic rugós dilatades. ER: vesícula dilatada del reticle endoplasmàtic. MF: feixos de filaments. N: nucli. PC; cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1  $\mu$ m.

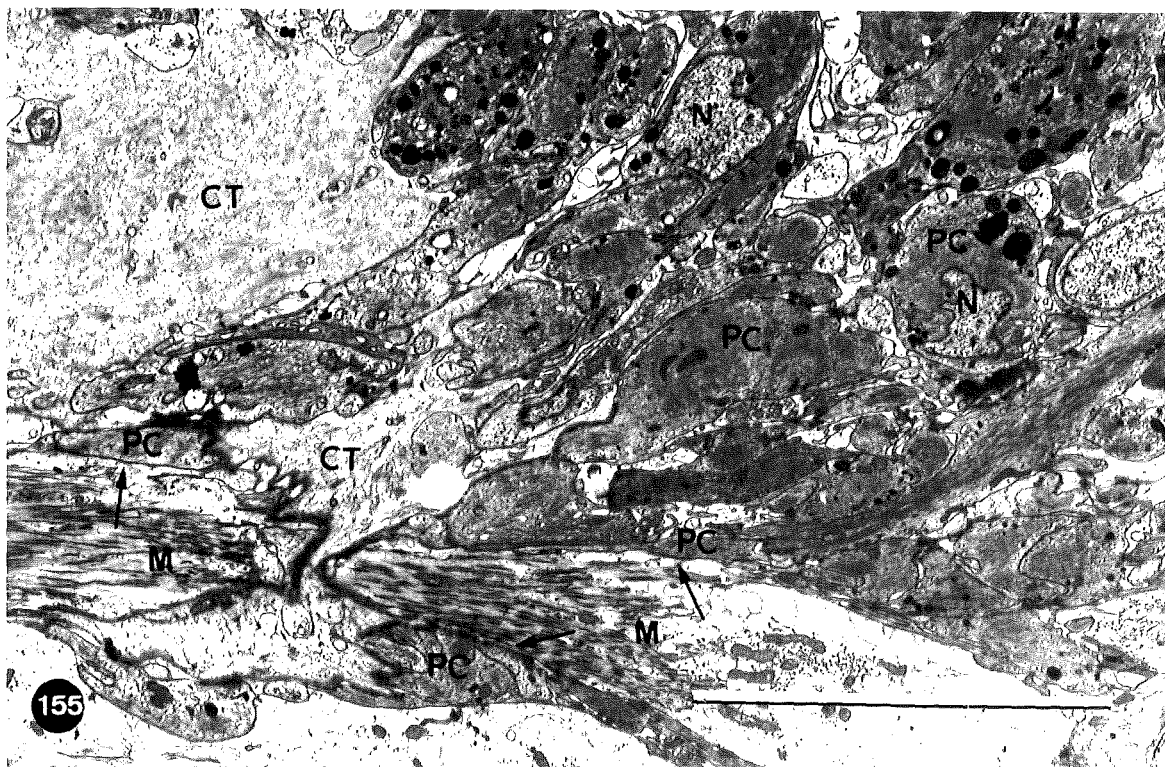
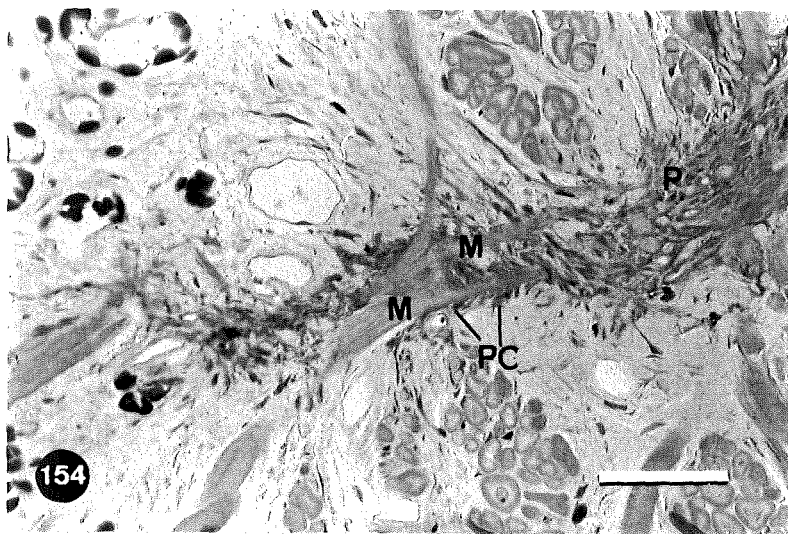
**Fig. 151.** Cèl.lules del pseudoblastema als 9 dies de la realització de la ferida. S'observen vesícules del reticle endoplasmàtic rugós dilatades. Les cèl.lules es veuen revestides per una **cell coat** (fletxa) i es veu matriu extracel.lular entre elles. EM: matriu extracel.lular. ER: vesícula dilatada del reticle endoplasmàtic. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1  $\mu$ m.

**Fig. 152.** 10  $\mu$ m. Pseudoblastema durant l'estadi de retracció. En el citoplasma de les cèl.lules del pseudoblastema, s'observen vesícules dilatades del reticle i feixos de filaments força conspicus. Noti's la presència d'unions especialitzades entre les cèl.lules del pseudoblastema, amb presència de material electrodens en l'espai intercel.lular (fletxa). ER: vesícula del reticle endoplasmàtic. MF: feixos de filaments. CT: teixit connectiu. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 10  $\mu$ m.

**Fig. 153.** Unió especialitzada entre una cèl.lula del pseudoblastema i la matriu extracel.lular (fletxa). EM: matriu extracel.lular. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1  $\mu$ m.



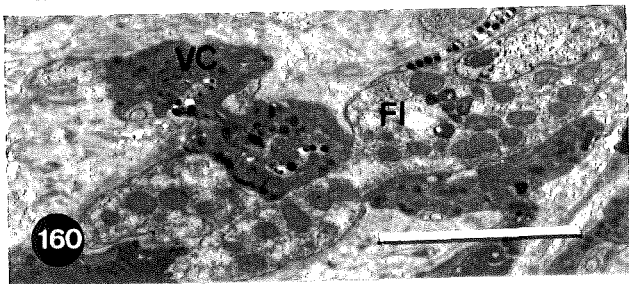
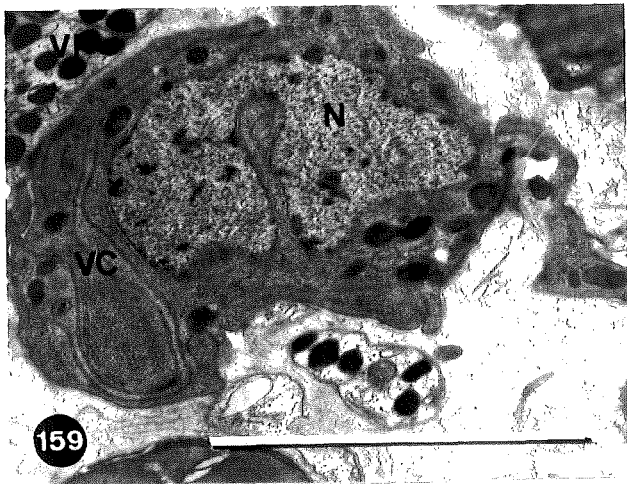
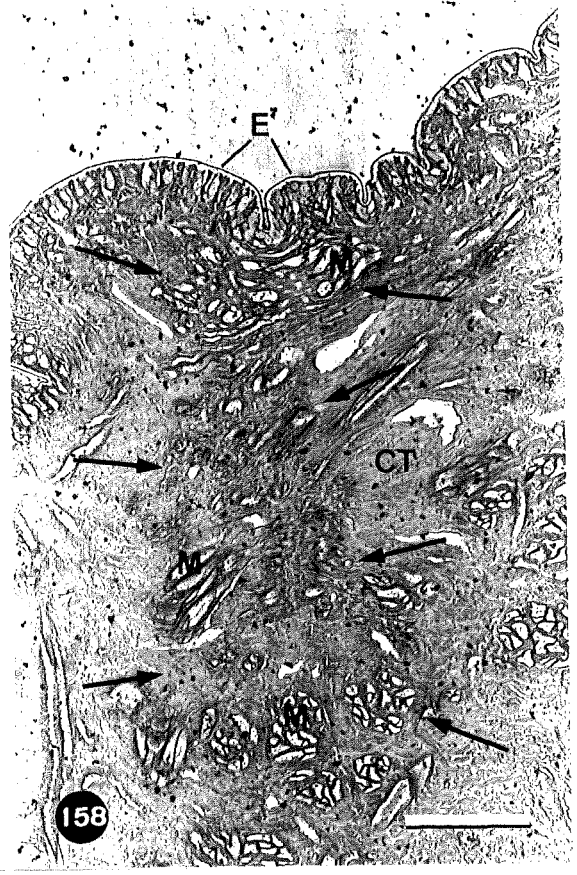




**Fig. 154.** Contactes entre les cèl.lules del pseudoblastema i les fibres musculars durant l'estadi de retracció. Coloració hematoxilina/eosina. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 100  $\mu$ m.

**Fig. 155.** Unions especialitzades i contactes entre les membranes plasmàtiques de les cèl.lules del pseudoblastema i les cèl.lules musculars (fletxes). CT: teixit connectiu. M: cèl.lula muscular. N: nuclis. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 10  $\mu$ m.

**Fig. 156.** (9741-A). Epiteli marginal als 7 dies de la realització de la ferida. Les porcions basals de les cèl.lules epitelials (\*) es desplacen cap a l'interior de la dermis, mentre que el nucli encara resta en una posició apical. CT: teixit connetiu. E: cèl.lula epitelial. N: nuclis. Barra: 5  $\mu$ m.



#### IV- Disgregació del pseudoblastema

Progressivament el pseudoblastema perd la seva compactació i coherència i les cèl.lules abandonen la zona migrant a través del teixit connectiu (figs. 126 i 157). En les primeres fases de la disgregació, cap a les dues setmanes, al voltant del pseudoblastema s'hi troben cèl.lules amebocítiques de citoplasma lleugerament més basòfil, amb més lisosomes secundaris i ocasionalment amb cossos multivesiculars (fig. 157)

Als 28 dies, encara que en la zona cicatricial es veuen nombroses cèl.lules del pseudoblastema, aquestes estan força separades entre sí, amb pocs punts de contacte (fig. 126) Encara s'observen contactes amb les cèl.lules musculars (fig 126).

Als 48 dies ja no s'identifica el pseudoblastema, encara que la zona de la cicatriu es veu diferenciada respecte la resta amb l'impregnació argèntica (fig. 158). Quan les cèl.lules deixen el pseudoblastema migren cap a altres zones del teixit connectiu o, ocasionalment, es mantenen en la zona cicatricial. Les cèl.lules vasocentrals que romanen en la zona de la cicatriu formen les agrupacions característiques de l'estadi de repòs, però la presència de les cèl.lules vasofibroses associades no és tan palesa com en l'estadi de repòs (figs. 159 i 160).

---

**Fig. 156.** Detall de les unions especialitzades (fletxa) i dels contactes entre les cèl.lules del pseudoblastema i les cèl.lules musculars (doble fletxa). EM: matriu extracel.lular. FP: filopodi d'una cèl.lula del pseudoblastema. M: cèl.lula muscular. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1 µm.

**Fig. 157.** 14 dies després de la realització de la ferida. Cèl.lules del pseudoblastema, amb un citoplasma marcadament basòfil, migren a través del teixit connectiu i el pseudoblastema es desintegra. Coloració hematoxilina/eosina. BC: cèl.lules basòfiles. CT: teixit connetiu. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 158.** Uns 2 mesos després de la realització de la ferida la matriu extracel.lular de la cicatriu (fletxes) pot diferenciar-se del teixit normal amb la impregnació argèntica. CT: teixit connectiu, E: epidermis. M: fibra muscular. Barra: 100 µm.

**Fig. 159.** Cèl.lules vasocentrals agrupades en la zona de la cicatriu. N: nucli. VC: cèl.lula vasocentral. VF: cèl.lula vasofibrosa. Barra: 5 µm.

**Fig. 160.** Agrupacions de cèl.lules vasocentrals en la zona de la cicatriu. FI: fibròcit. VC: agrupacions de cèl.lules vasocentrals. Barra: 5 µm.



## **Estudi dels filaments d'actina mitjançant marcatge amb fal.loïdina.**

Amb la MET s'han pogut observar els feixos de filaments citoplasmàtics i la seva relació amb les unions. El marcatge amb fal.loïdina fluoresceïnada permet observar la disposició dels feixos d'actina durant el procés d'evolució del pseudoblastema.

Durant la fase migratòria, els filaments d'actina ja no estan tan entortolligats com en la fase de repòs, sino que s'orienten en la direcció de la migració (figs. 161 i 162).

Quan les cèl.lules vasocentrals es depositen a sobre la ferida per formar el pseudoblastema, els filaments d'actina presenten una lleugera orientació paral.lela a la superfície (fig. 163). A mesura que les cèl.lules del pseudoblastema es van aplanar i compactar, s'observa com els filaments d'actina es disposen més paral.lels a la superfície (fig. 164). En aquesta fase es poden veure feixos aparentment molt llargs (130  $\mu\text{m}$ ), mes llargs del que correspondria a una cèl.lula del pseudoblastema en les seccions observades (uns 34  $\mu\text{m}$ ) (figs. 164 i 165).

---

**FIGS. 161-168.** Marcatge de l'actina amb fal.loïdina fluoresceïnada.

**Fig. 161.** Cèl.lules vasocentrals en el teixit connectiu a les poques hores de la realització de la ferida. En un grup de cèl.lules vasocentrals els filaments d'actina poden observar-se en la disposició entortolligada típica de la fase de repòs en el teixit vasofibrós (fletxa). En l'altre els filaments mostren una certa orientació indicativa del inici de la fase migratòria (doble fletxa). VC: cèl.lula vasocentral. M: fibra muscular. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 162.** Cèl.lules vasocentrals durant l'estadi de migració. Observi's la disposició orientada dels filaments d'actina (fletxes). M: fibra muscular. VC: cèl.lula vasocentral migratòria. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 163.** Pseudoblastema a les 48 h de la realització de la ferida. Els filaments d'actina presenten una lleugera orientació paral.lela a la superfície (fletxa). M: fibres musculars. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

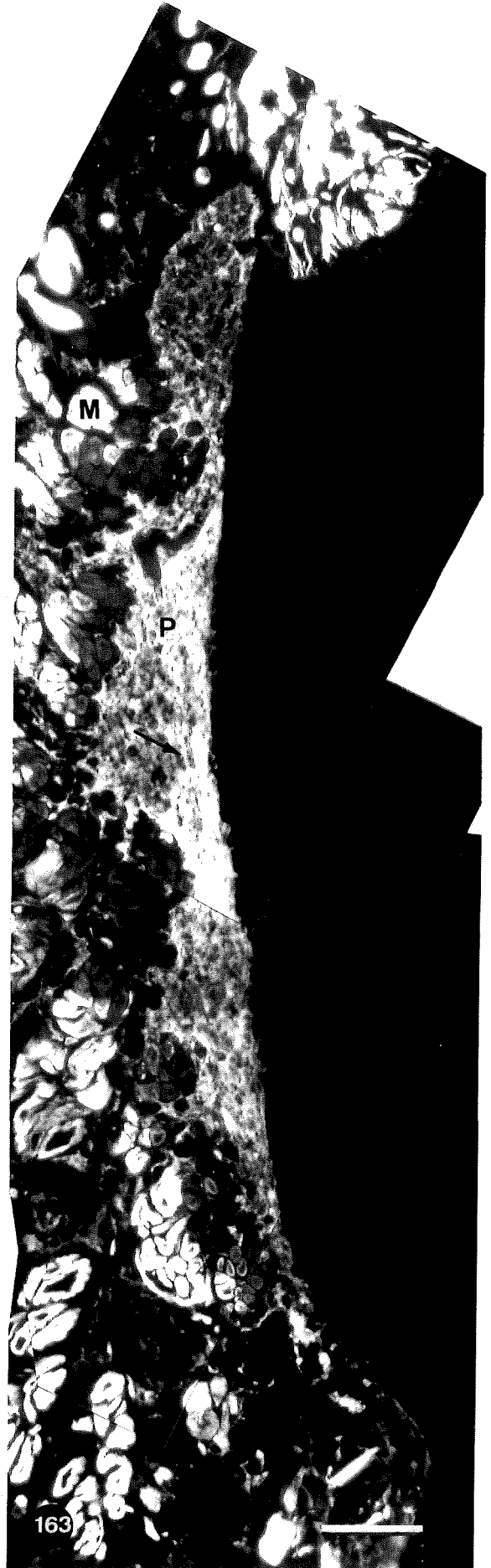
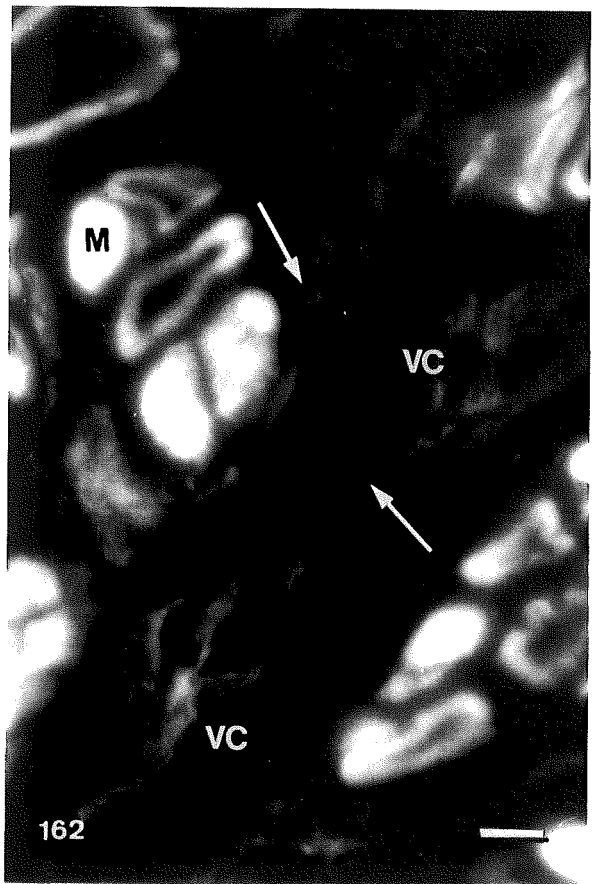
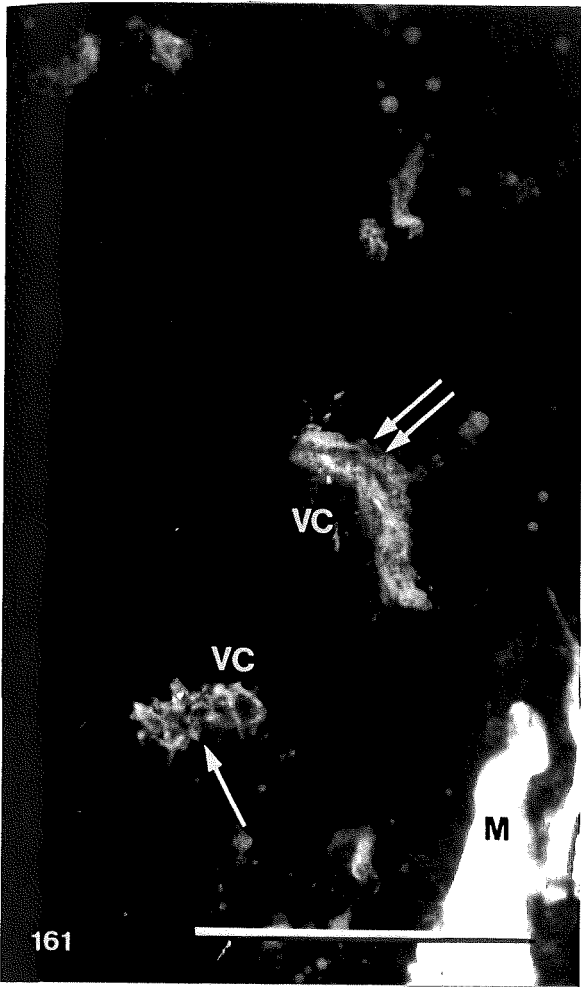
**Fig. 164.** Pseudoblastema als 4 dies de la realització de la ferida. Els filaments d'actina es disposen més paral.lelament a la superfície (fletxa). Es pot veure que les cèl.lules centrobasals ja han iniciat la retracció (punta de fletxa). P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

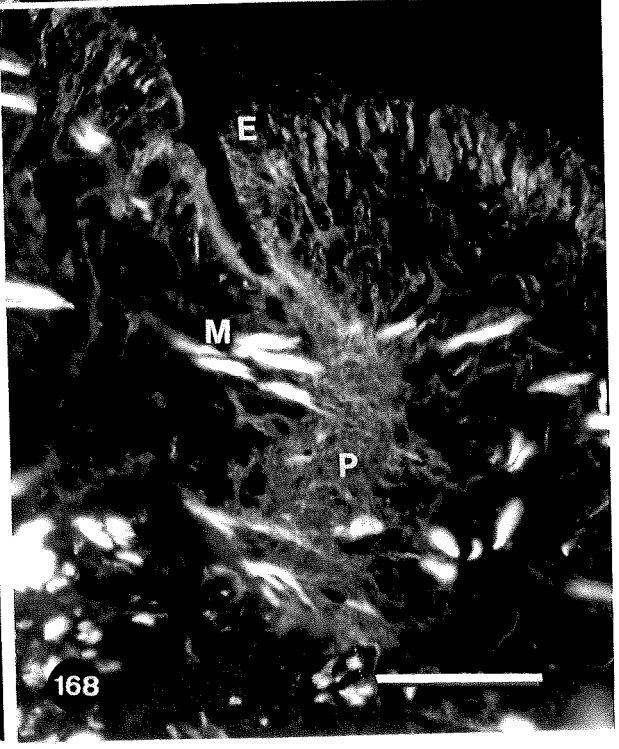
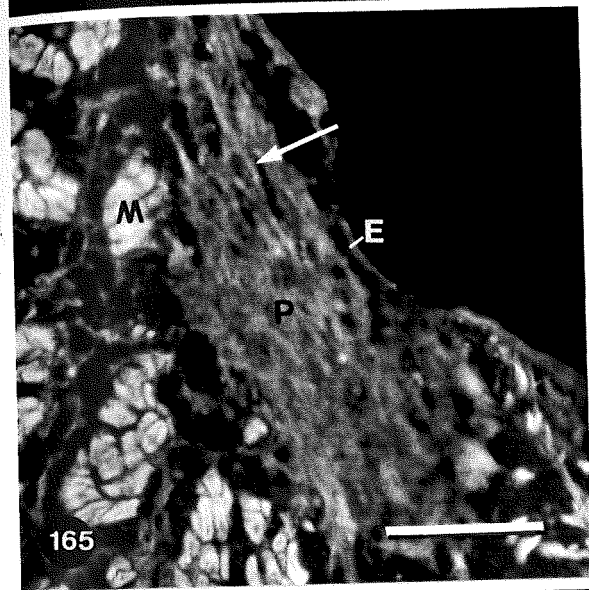
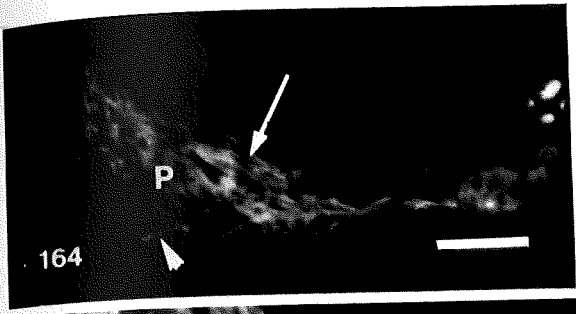
**Fig. 165.** Pseudoblastema als 3 dies de la realització de la ferida. Els feixos d'actina estan disposats paral.lelament a la superfície. En ocasions es veuen feixos molt llargs (fletxa). E: epidermis. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 166.** Pseudoblastema en retracció als 11 dies de la realització de la ferida. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 167.** 11 dies de la realització de la ferida. Els filaments d'actina de les cèl.lules del pseudoblastema envolten les fibres musculars (fletxa). M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 168.** Pseudoblastema als 16 dies de la realització de la ferida. En les últimes fases de la retracció, els filaments d'actina formen una xarxa densa en la qual les fibres musculars s'hi veuen immerses. E: epidermis. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .





Durant la fase de retracció del pseudoblastema, els filaments s'orienten cap a l'interior de l'animal. Aquest canvi d'orientació es fa palès primer en les cèl·lules de la posició centrobasal, que són les primeres en iniciar la retracció (fig. 164), i, posteriorment, en totes les cèl·lules de la falca que s'interna en els teixits (fig. 166).

Les imatges obtingudes en aquest estadi posen de manifest la presència dels contactes de les cèl·lules del pseudoblastema amb les fibres musculars de la paret corporal (fig. 167).

En les últimes fases de la retracció, una vegada ja s'ha donat la contracció de la ferida, els filaments d'actina es veuen poc orientats, formant una xarxa emmaranyada, i les fibres musculars es veuen immerses en aquesta xarxa (fig. 168).

## Reepitelització

### Procés de reepitelització

Un cop la ferida ha estat recoberta pel pseudoblastema, comença el procés de reepitelització. La formació d'un nou epitelí en la zona cicatricial es fa a partir de l'epitelí sa dels marges de la ferida. Els elements glandulars no participen en el procés de reepitelització.

La re-epitelització s'inicia cap a les 4 h de la realització de la ferida. Les cèl.lules epitelials dels marges de la ferida perden el seu aspecte columnar (fig. 18), per adoptar una forma aplatada (uns 5  $\mu\text{m}$ . d'alçària per 25  $\mu\text{m}$ . de longitud en la direcció d'avanç) i migren per sobre el pseudoblastema fins a recobrir tota la ferida (figs. 169 i 170). 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 24 h. Una cop han recobert la ferida, les cèl.lules epitelials recobren paulatinament la seva forma columnar, assolint als 6 dies les dimensions originals (fig. 125). Aquesta pauta temporal és només aplicable a ferides que afectin fins a les capes musculars longitudinals. En ferides de menor importància, que afecten només epidermis i dermis, s'observa ja un epitelí d'estructura normal a les 48 h.

Durant el procés de reepitelització no s'ha observat un increment en el marcatge de l'actina mitjançant fal.loïdina fluoresceïnada. Les cèl.lules epitelials es veuen molt dèbilment marcades, com en l'epitelí normal, sense que es pugui observar la distribució dels filaments.

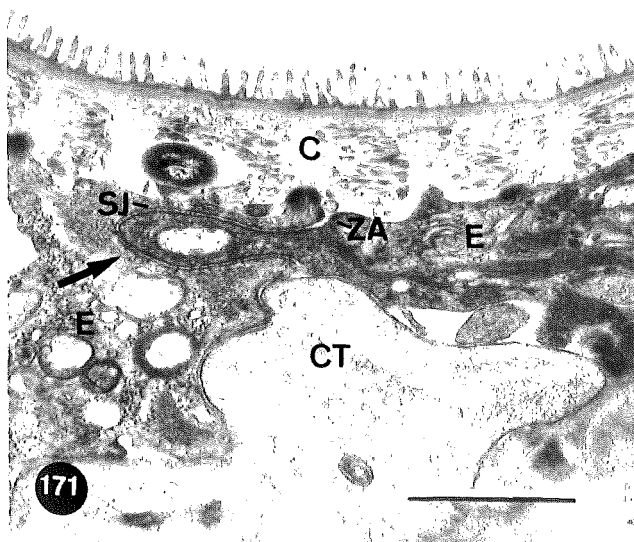
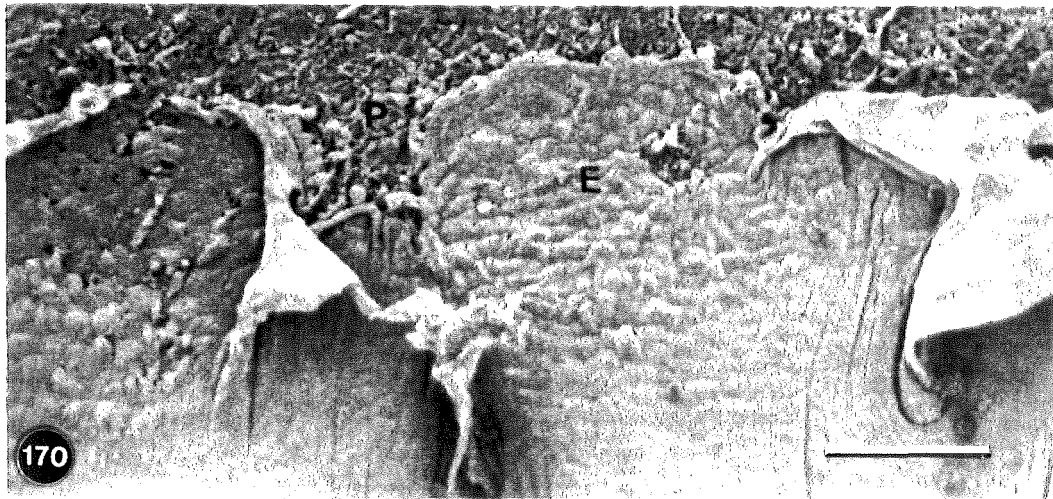
#### I- Migració de les cèl.lules epitelials

Durant la reepitelització, l'epitelí avança en forma d'una capa unificada, desde els marges de la ferida, per sobre del teixit connectiu exposat i per la superfície del nou format pseudoblastema (fig. 170). 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 en ocasions es pot apreciar una reducció del nombre d'interdigitacions respecte l'estat normal (fig. 24 i 171).

---

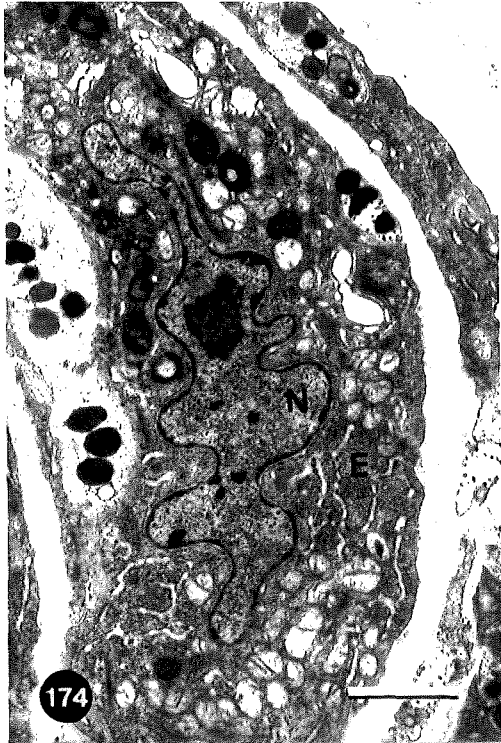
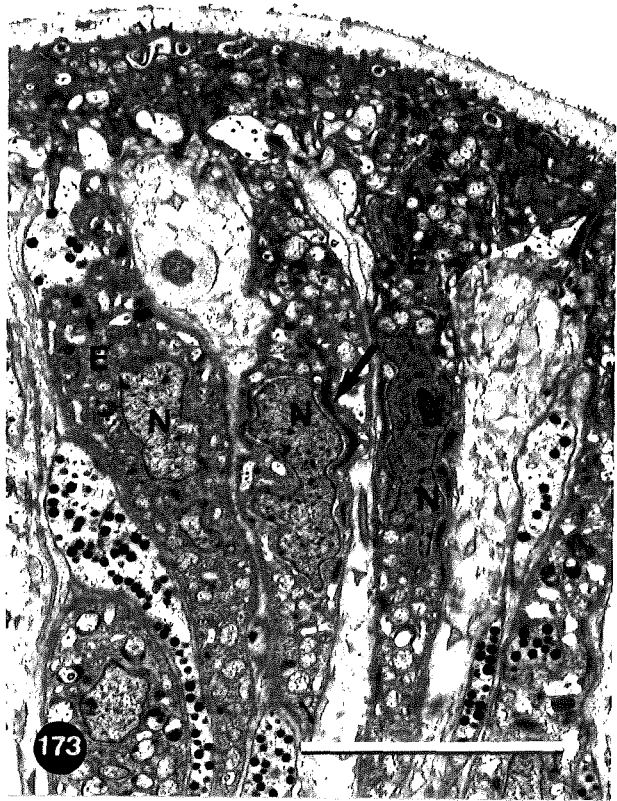
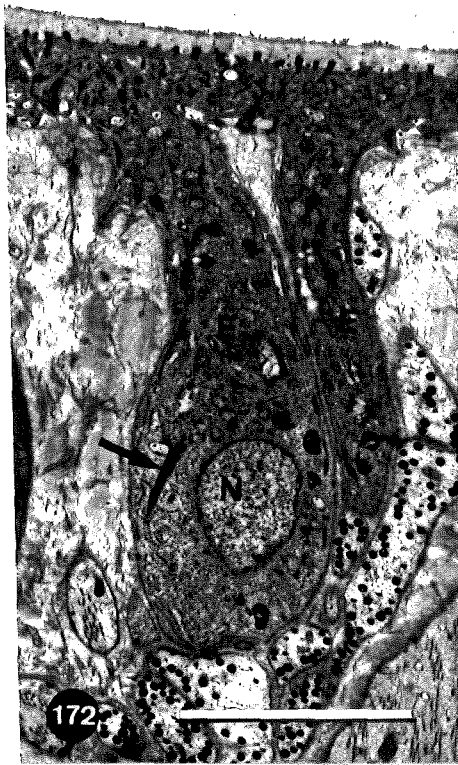
**Fig. 169.** 24 h de la realització de la ferida. El pseudoblastema ja ha estat recobert per l'epitelí. La transició entre l'epitelí columnar i l'aplatat es pot observar al marge de la ferida (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. CE: epitelí columnar. FE: epitelí aplatat. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

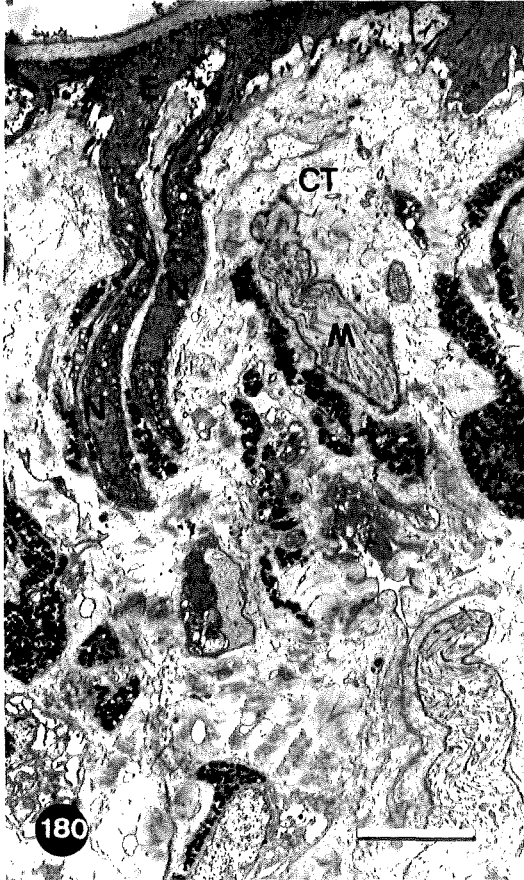
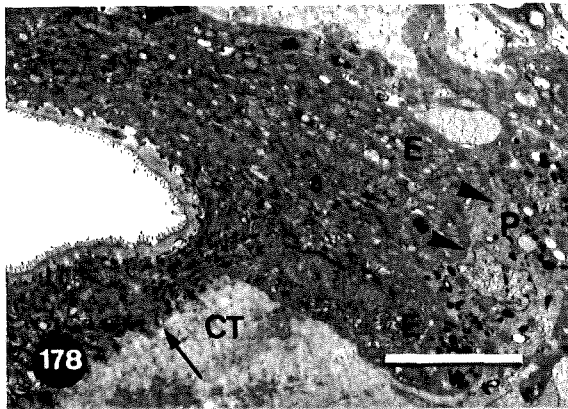
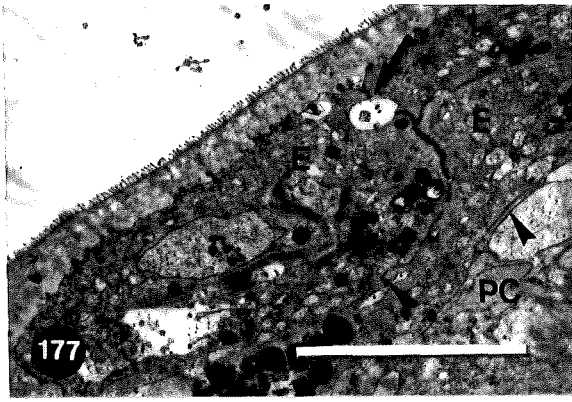
**Fig. 170.** Imatge en MES d'una ferida de 12 h que mostra la capa epitelial migrant sobre la superfície del pseudoblastema. E: epitelí. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .



**Fig. 171.** Detall del complexe d'unió de les cèl.lules epitelials durant la migració. Les interdigitacions (fletxa) pràcticament han desaparegut i no es veuen hemidesmosomes en contacte amb la dermis. C: cutícula. CT: teixit connectiu. E: cèl.lula epitelial. SJ: unió septada. ZA: zonula adherens. Barra: 1 µm.









Durant el procés migratori les cèl.lules registren importants canvis morfològics que afecten al citoesquelet, al nucli i a la zonació citoplasmàtica.

La pèrdua de la forma columnar s'inicia amb la translocació del nucli de la part basal de la cèl.lula a l'apical. Durant la translocació, el nucli adquireix una forma lobulada i apareixen petites masses d'heterocromatina (figs. 172-174). Un cop la cèl.lula epitelial ha adoptat la forma plana de l'estat migratori, el nucli recupera l'aspecte ovalat.

Al mateix temps que s'inicien els canvis nuclears, es perd la distribució zonal dels orgànuls, caracteritzada pels dictiosomes perinuclears i major abundància de vesícules a la part apical, i s'adquireix una distribució més uniforme. Els tonofilaments es desconnecten dels hemidesmosomes i s'agrupen al voltant del nucli reagrupant-se en grans feixos, i es perd la connexió entre els hemidesmosomes cuticulars i els hemidesmosomes dèrmics (figs. 172-175). Els hemidesmosomes dèrmics desapareixen i no s'estructuren de nou fins completada l'epitelització.

**Fig. 172.** Cèl.lula epitelial localitzada prop del marge d'una ferida de 4 h. El nucli encara no ha iniciat la translocació, però el citoesquelet està desorganitzat i els tonofilaments es reagrupen en una posició perinuclear (fletxa). E: cèl.lula epitelial. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 173.** 8 h després de la realització de la ferida. Els feixos de tonofilaments (fletxa) es troben agrupats al costat del nucli. E: cèl.lula epitelial. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 174.** 8 h després de la realització de la ferida. En aquesta cèl.lula epitelial pròxima al marge de la ferida, es pot veure la característica lobulació del nucli durant la seva translocació a la part apical. E: cèl.lula epitelial. N: nucli. Barra: 1 µm.

**Fig. 175** Cèl.lules epitelials migrant per sobre el teixit connectiu a les 8 h de la realització de la ferida. Els feixos de tonofilaments es troben reagrupats al voltant del nucli i els hemidesmosomes dèrmics estan desorganitzats (fletxa). CT: teixit connectiu. N: nucli. T: feix de tonofilaments. Barra: 1 µm.

**Fig. 176.** Cèl.lula epitelial migratòria molt propera al marge d'avanç. En la part basal de la cèl.lula s'observen petits filopodis (fletxes). E: cèl.lula epitelial. N: nucli. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 1 µm.

**Fig. 177.** Cèl.lules epitelials aplanades a sobre del pseudoblastema a les 12 h de la realització de la ferida. S'observen unions laterals entre les cèl.lules epitelials (fletxa) i unions especialitzades entre les cèl.lules epitelials i les cèl.lules del pseudoblastema (punta de fletxa). E: cèl.lula epitelial. PC: cèl.lula del pseudoblastema. Barra: 5 µm.

**Fig. 178.** 6 dies després de la realització de la ferida. Les cèl.lules epitelials estan en contacte molt estret amb les cèl.lules del pseudoblastema (punta de fletxa). En els marges de la ferida l'epiteli ha recobrat les unions dèrmiques i la membrana basal (fletxa). CT: teixit connectiu. E: cèl.lula epitelial. P: pseudoblastema. Barra: 5 µm.

**Fig. 179.** Epiteli marginal als 7 dies de la realització de la ferida. Les porcions basals de les cèl.lules epitelials (\*) es desplacen cap a l'interior de la dermis, mentre que el nucli encara resta en una posició apical. CT: teixit connectiu. E: cèl.lula epitelial. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 180.** Cèl.lules epitelials del marge d'una ferida de 9 dies. Es pot observar la translocació del nucli cap a la regió basal. CT: teixit connectiu. E: cèl.lula epitelial. M: fibra muscular. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 181.** Epiteli als 6 dies de la realització de la ferida. En les zones submarginals ja s'ha restablert la morfologia columnar (punta de fletxa), mentre que en la zona més pròxima encara està aplanat (fletxa). Coloració blau de toluïdina. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

Mentre avancen, les cèl·lules epitelials emeten petits filopodis en el seu citoplasma basal (fig. 176).

## II- Consolidació de l'epiteli

Un cop el pseudoblastema ha estat recobert, s'observen unions especialitzades entre la membrana basal de les cèl·lules epitelials i les cèl·lules del pseudoblastema (fig. 145 i 177). Aquestes unions tenen el mateix aspecte que el de les unions entre les cèl·lules del pseudoblastema durant la fase de compactació. A més, les membranes de les cèl·lules epitelials estan en contacte estret amb les cèl·lules del pseudoblastema, deixant un espai intercel·lular d'uns 20 nm (fig. 177).

Entre el tercer i el nové dia té lloc el desplaçament de la porció basal de les cèl·lules epitelials cap a l'interior de la dermis, per adoptar novament la forma columnar (fig 179). Finalment el nucli migra cap a la posició basal original (fig. 180). Durant aquesta segona translocació el nucli torna a adoptar una forma lobulada, tornant a la seva morfologia normal un cop recuperada la posició basal. Durant aquest període reapareixen els hemidesmosomes dèrmics, i els feixos de tonofilaments recuperen paulatinament la seva distribució original, per unir els

---

**Fig. 182.** Ferida als 4 dies. Secció de control per la de la figura següent. Es pot observar un pseudoblastema ben consolidat que ja ha estat reepitelitzat. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 183.** Ferida als 4 dies. Marcatge amb la lectina PNA fluoresceïnada. El pseudoblastema es veu molt dèbilment marcat. No s'observa marcatge de la membrana basal en l'epiteli que es troba recobrint el pseudoblastema. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 184.** Ferida de 3 dies. Amb la impregnació argèntica tampoc es detecta la presència de membrana basal. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

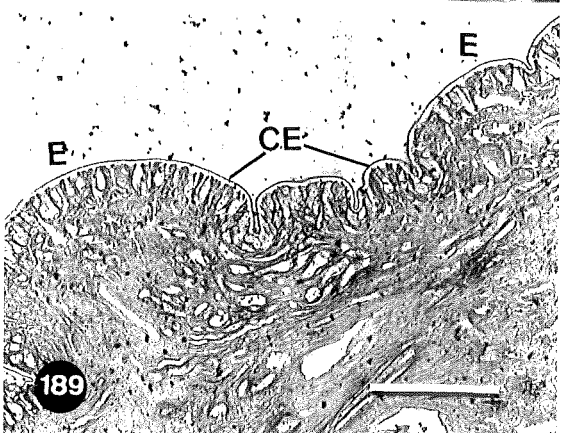
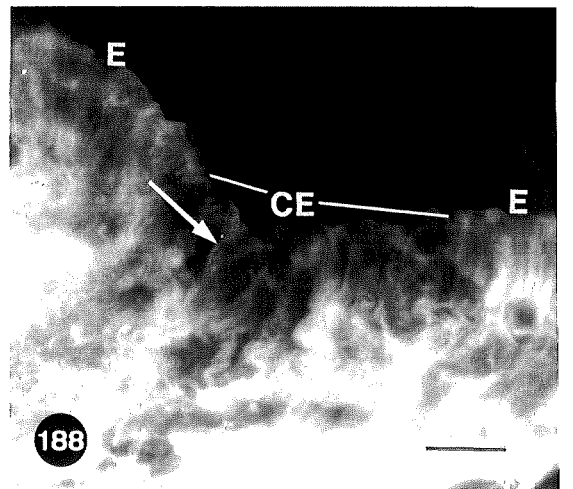
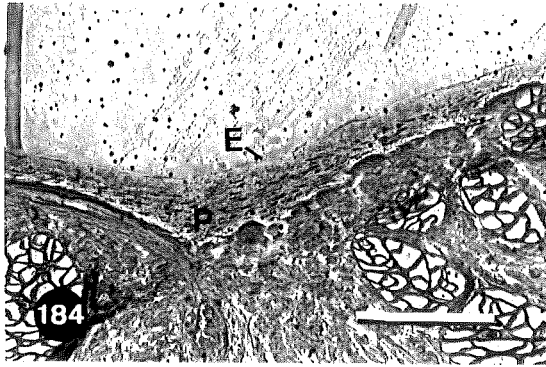
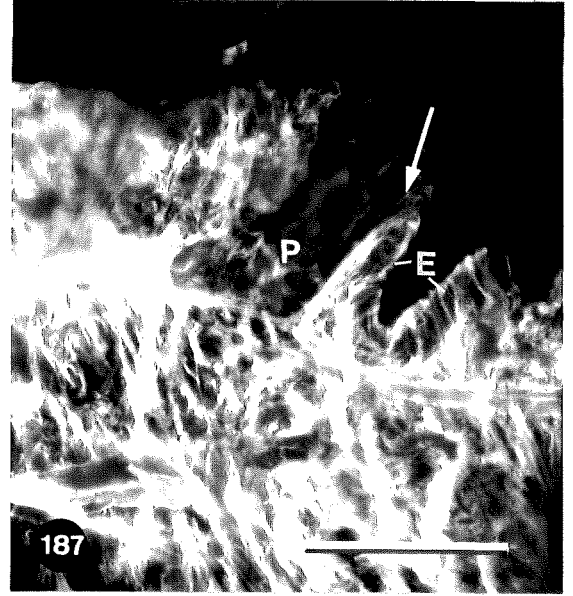
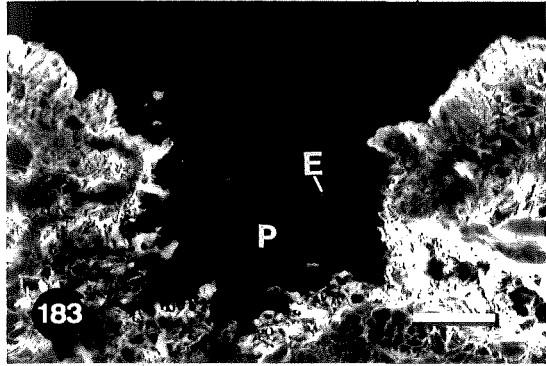
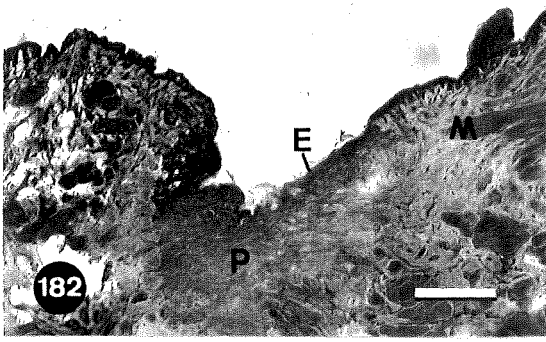
**Fig. 185.** Ferida als 7 dies. Les cèl·lules epitelials recobren la forma columnar, però la membrana basal encara no és visible amb la impregnació argèntica. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 186.** Ferida als 14 dies. S'observen fibres argentòfiles (fletxa) reseguint parcialment la part basal de les cèl·lules epitelials de sobre el pseudoblastema. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 187.** Ferida als 14 dies. Amb la lectina PNA fluoresceïnada s'observa marcatge a nivell de la membrana basal de l'epiteli que recobreix el pseudoblastema (fletxa), encara que més dèbil que a la resta de l'epiteli. E: epiteli normal. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 188.** Als 8 mesos de la realització de la ferida encara s'observen diferències en el marcatge amb la lectina PNA en la membrana basal de l'epiteli normal i la de l'epiteli cicatricial (fletxa). CE: epiteli cicatricial. E: epiteli normal. Barra: 10 µm.

**Fig. 189.** Amb la impregnació argèntica no es detecten diferències entre la membrana basal de l'epiteli normal i la del cicatricial en cicatrius de 2 mesos. CE: epiteli cicatricial. E: epiteli normal. Barra: 100 µm.



hemidesmosomes cuticulars amb els hemidesmosomes dèrmics. El restabliment de la morfologia columnar i de les unions s'inicia en les zones marginals (figs. 178 i 181) i posteriorment es propaga a la zona cicatricial (fig. 180).

## **Regeneració de la membrana basal**

La membrana basal es desestructura en l'inici del procés migratori, per tornar-se a reconstituir un cop recobert el pseudoblastema per l'epiteli.

L'estudi de la regeneració de la membrana basal s'ha realitzat amb microscòpia electrònica de transmissió i en microscòpia òptica amb tècniques específiques per a la membrana basal com el marcatge amb lectines i la impregnació argèntica.

Les observacions fetes amb les diferents tècniques mostren resultats concordants:

Durant la pèrdua de la forma columnar la membrana basal encara es manté (fig. 173). Una vegada assolida la forma aplatada es veu una membrana basal força desestructurada i els hemidesmosomes ja no estan connectats per la xarxa de tonofilaments (fig. 175).

Durant la migració, la membrana basal s'acaba de desestructurar i les cèl.lules del marge d'avanç n'estan totalment desprovistes, migrant directament per sobre del teixit connectiu o de les cèl.lules del pseudoblastema (fig. 176).

Un cop el pseudoblastema ha estat recobert per l'epiteli, encara tarda uns dies a poder-se observar l'inici de la formació de la membrana basal. Les cèl.lules epitelials estan intimament unides a les del pseudoblastema amb un espai intercel.lular d'uns 20 nm, sense que s'observi cap material amorf o fibril·lar en la cara externa de la membrana plasmàtica (fig. 177).

Als 4 dies, amb un epiteli aplatat sobre del tap, encara no s'observa marcatge amb PNA (figs. 182 i 183) ni impregnació de la membrana basal amb plata (fig. 184).

Als 7 dies, amb l'epiteli que ja comença a recobrir la forma columnar, encara no s'observa membrana basal en la zona que contacta amb el pseudoblastema (fig. 185). En canvi, en la zona del marge de la ferida, a partir de la qual ha migrat l'epiteli, es troben cèl.lules epitelials que encara no han recobert la forma columnar però que ja presenten una nova membrana basal (fig. 178). Els hemidesmosomes nouformats estan amb contacte amb aquesta membrana basal (fig. 178). Encara no s'observa membrana basal en la part més pròxima al pseudoblastema, quedant alguna porció d'epiteli en contacte amb el teixit connectiu.

A les 2 setmanes ja es poden observar fibres argentòfiles reseguint parcialment la part basal de les cèl.lules epitelials situades a sobre el pseudoblastema (fig. 186). També s'observa un lleuger marcatge amb PNA (fig.

187). La formació de la membrana basal segueix a l'inici de la formació de la matriu connectiva entre les cèl.lules del pseudoblastema.

Al cap d'un mes, la membrana basal de la zona de la cicatriu encara es marca amb PNA més dèbilment que a la resta de l'epiteli (fig. 202), fet que es manté fins als 8 mesos (fig. 188). Amb la impregnació argèntica, en canvi, no s'aprecien diferències (fig. 189).

## **Regeneració de les glàndules epitelials mucoses**

En les sèries de ferides per incisió processades per MO no s'ha pogut observar regeneració d'elements glandulars. Entre les cèl.lules columnars de l'epiteli cicatricial d'aquest tipus de ferides no s'ha observat, en cap ocasió, cap cèl.lula glandular. S'ha de tindre en compte que es tracta de ferides de petita amplària que han estat observades en seccions transversals, en les que només es veuen de 15 a 35 cèl.lules epitelials a sobre la cicatriu. Tampoc s'han pogut observar cèl.lules epitelials en procés de diferenciació cap a glandular durant el procés de regeneració de la ferida.

En canvi, en les preparacions fetes per a ME s'ha pogut observar la presència de glàndules immadures en les immediacions de la ferida.

Les cèl.lules en diferenciació presenten un aspecte semblant al de les cèl.lules epitelials columnars, amb un augment dels caràcters típics d'una cèl.lula en síntesi activa. No s'han pogut observar les parts apicals d'aquestes cèl.lules. Dependent de les característiques dels orgànuls, es poden diferenciar en dos tipus: tipus I i tipus II.

Les glàndules immadures tipus I es troben situades a nivells no molt profunds de la dermis. Els cos cel.lular és allargat i mesura uns 6 X 24 µm.

El nucli està situat en posició basal, és oval amb uns 6,5 X 4,5 µm, lleugerament lobulat i amb la cromatina granular. El nucleol és força conspicu (fig. 190).

El tret que caracteritza aquestes cèl.lules és l'abundància de cisternes dilatades del reticle endoplasmàtic rugós amb contingut electrolúcid. (figs. 190 i 191). S'observen alguns mitocondris i alguns lisosomes. S'han pogut observar un grup de vesícules golgianes supranuclears de contingut no molt electrodens (fig. 191). També s'han observat, en una de les cèl.lules, microtúbuls poc organitzats situats en la part superior del cos cel.lular, a la base del conducte (fig. 192).

La membrana plasmàtica presenta evaginacions paral.leles a la superfície cel.lular, al igual que les glàndules madures. S'observa una làmina basal força conspicua, d'uns 120 nm de gruix, i una làmina reticularis de gruix variable (figs. 191 i 192).

Les glàndules immadures tipus II s'han observat tant a nivells superficials en la dermis com a nivells profunds, per sota de les capes musculars diagonals. Els cossos cel.lulars mesuren uns 5-6 X 16-24 µm.

S'observa un nucli basal de forma ovalada, d'uns 5 X 3 µm, amb la cromatina granular i el nucleol és també força conspicu (fig. 193).

Es característic d'aquestes cèl.lules la presència d'un reticle endoplasmàtic rugós abundant amb cisternes allargades de contingut més electrodens que el citosol (fig. 194). També s'hi troben mitocondris i lisosomes.

Un altre tret que permet diferenciar aquestes glàndules immadures és la presència de dictiosomes característics de glàndules tubulars de hirudinis, com els observats a *Dina lineata* (figs. 194-196). Els dictiosomes de les glàndules immadures són força conspicus, amb uns 2-4 sàculs estrets, d'uns 25 nm d'amplària i d'una llargària de 1,5 a 2,6 µm (de 4 a 8 sàculs d'aproximadament les mateixes dimensions en el cas de glàndules madures a *Dina lineata*). En la cara cis s'observen petites vesícules electrolucides properes a cisternes del reticle endoplasmàtic rugós. A mesura que s'acosten a la cara trans, el contingut dels sàculs es fa més electrodens. En la cara trans d'un dels dictiosomes s'observen tres vesícules de 0,3 a 0,5 µm de diàmetre, molt electrodenses, a partir de les quals s'originen vesícules golgianes més electrolúcides, tret que també és característic dels dictiosomes de les glàndules tubulars madures de *Dina lineata*.

La membrana plasmàtica presenta evaginacions paral.leles a la superfície cel.lular (fig. 194). A nivell del cos cel.lular s'observa una làmina basal de 60 a 160 nm de gruix i una làmina reticularis ben constituïda de 200 a 450 nm.

---

**Fig. 190.** Cèl.lula glandular immadura tipus I a nivell de la dermis, en la proximitat d'una ferida de 7 dies. El reticle endoplasmàtic rugós és molt abundant i presenta un contingut força electrolúcid. BM: membrana basal. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 1 µm.

**Fig. 191.** Detall de la zona supranuclear d'una cèl.lula glandular immadura tipus I. Observi's l'abundància de reticle endoplasmàtic i la presència de vesícules golgianes (fletxa). BM: membrana basal. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 1 µm.

**Fig. 192.** Detall del procés citoplasmàtic d'una glàndula immadura tipus I que uneix el cos cel.lular amb la superfície del tegument. El procés ha estat seccionat obliquament i es pot observar un feix de microtúbuls (fletxa). BM: membrana basal. Barra: 1 µm.

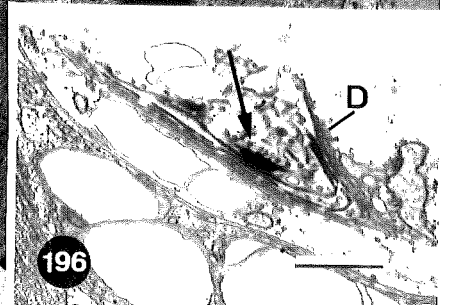
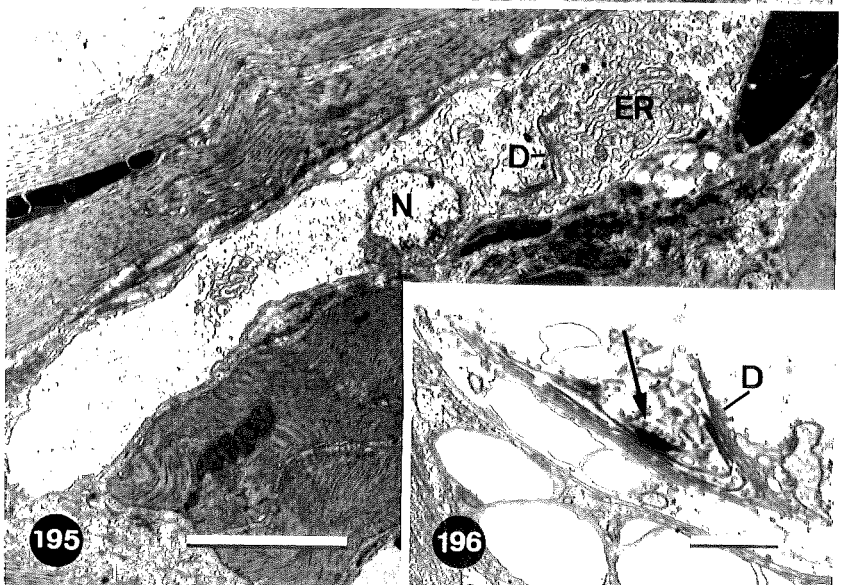
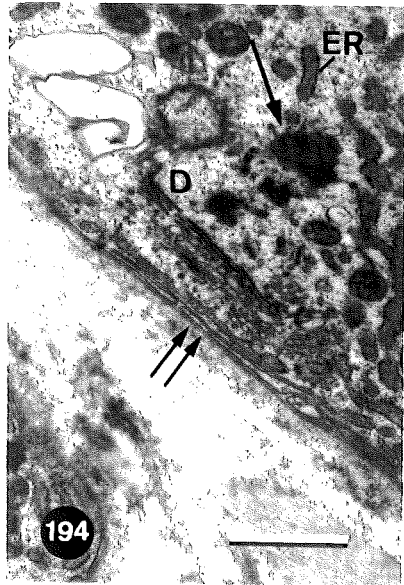
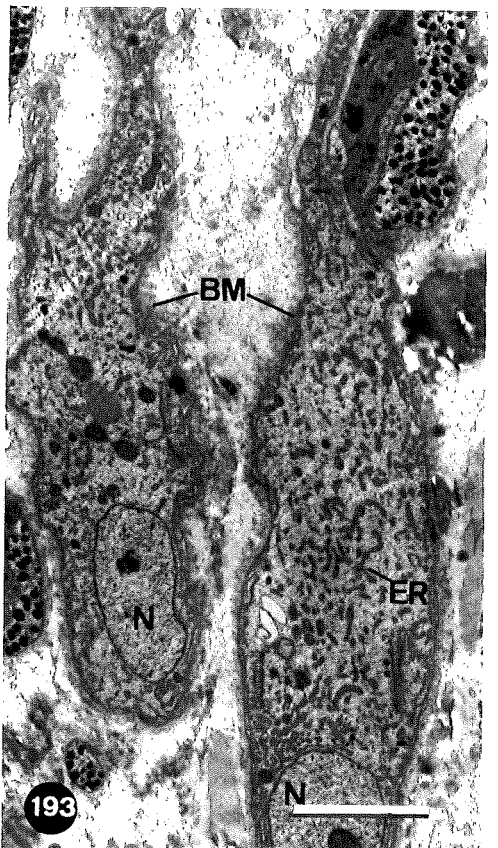
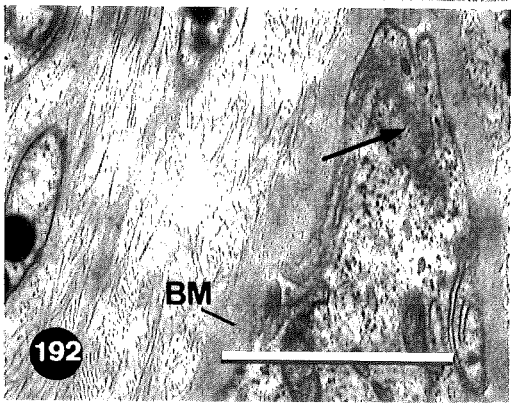
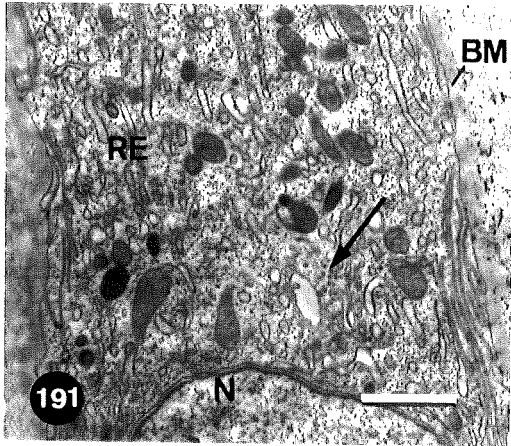
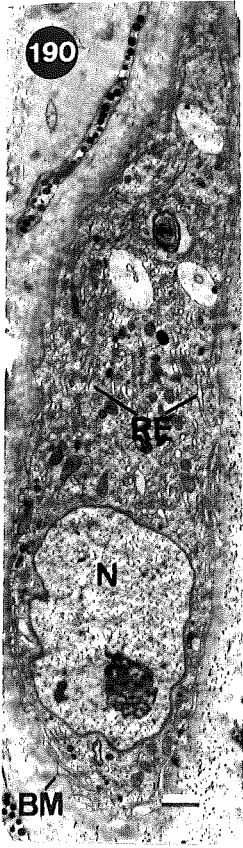
**Fig. 193.** Glàndules immadures tipus II en les proximitats d'una ferida de 14 dies. Els cossos cel.lulars d'aquestes glàndules s'han localitzat a nivells força profunds, entre la musculatura circular. Observi's l'abundància de reticle endoplasmàtic rugós amb contingut electrodens. BM: membrana basal. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 194.** Detall d'una glàndula immadura tipus II en la qual s'observa un dictiosoma. Els sàculs del dictiosoma són força estrets i el seu contingut es fa progressivament més electrodens a mesura que s'acosta a la cara trans. Noti's la presència en aquesta zona de vesícules electrodenses grans (fletxa) a partir de les quals s'originen vesícules golgianes. En la membrana plasmàtica es poden veure evaginacions paral.leles a la superfície (doble fletxa). D: dictiosoma. ER: reticle endoplasmàtic. Barra: 1 µm.

**Fig. 195.** Glàndula tubular jove del tegument de l'hirudini *Dina lineata*. Es pot apreciar un dictiosoma força conspicu. D: dictiosoma. ER: reticle endoplasmàtic. N: nucli. Barra: 5 µm.

**Fig. 196.** Detall d'una glàndula tubular jove de *Dina lineata*. Es pot observar un dictiosoma caracteritzat per sàculs força estrets, de contingut progressivament més electrodens a mesura que s'acosta a la cara trans. Noti's la presència en la cara trans d'un sàcul electrodens força gran a partir del qual s'originen vesícules típicament golgianes (fletxa). D: dictiosoma. Barra: 1 µm.





## **Regeneració del teixit cicatricial**

Un cop ha finalitzat l'epitelització i el pseudoblastema s'ha disgregat, en la zona de la ferida resta un teixit que es diferencia lleugerament de la resta, és el teixit cicatricial. Per al seu estudi s'han observat cicatrius de 48 dies a 8 mesos.

## **Regeneració de la matriu connectiva**

Durant les últimes fases d'evolució del pseudoblastema, s'observa l'aparició d'una matriu extracel·lular. Aquesta matriu es limita primer a un recobriment fibrós de les cèl·lules del pseudoblastema (fig. 151) i posteriorment s'observa un increment de la matriu connectiva entre les cèl·lules, fet que es fa palés inicialment en els marges del pseudoblastema (figs. 197-199).

Amb la impregnació argèntica es detecta la presència de fibres força conspicues entre les cèl·lules del pseudoblastema cap a les dues setmanes (fig. 200), les quals probablement es corresponen amb el recobriment fibrós de les cèl·lules del pseudoblastema observat en ME a partir dels 9 dies (fig. 151).

Amb la lectina PNA s'observa un lleuger marcatge d'un material fibrós en el pseudoblastema a partir dels 4 dies (fig. 183) que s'incrementa progressivament durant la fase de retracció (figs. 201 i 202).

Mentrestant, als marges del pseudoblastema, s'observa matriu connectiva entre les cèl·lules del pseudoblastema (fig. 197). Cap als 14 dies, la presència d'una matriu fibrosa cicatricial és evident, i ocasionalment, en zones més marginals, s'observen perllongacions citoplasmàtiques típiques dels fibròcits (fig. 198). En alguna ocasió s'han observat cossos cel·lulars de fibròcits en la zona marginal del pseudoblastema (figs. 199 i 204). Després de la dispersió del pseudoblastema resta en la zona de la cicatriu una matriu connectiva fibrosa (fig. 203).

## **Teixit cicatricial**

El teixit connectiu de la zona de la cicatriu té la matriu diferenciada de la resta. La impregnació argèntica posa aquest fet de manifest en cicatrius de 2 mesos (fig. 205). Les fibres connectives tenen estructura de córtex i medul·la i són del tipus prim, d'uns 1,6 µm de diàmetre (fig. 206).

En ferides de 8 mesos, s'observa un marcatge amb la lectina PNA molt diferent en la zona de la cicatriu respecte la resta del connectiu. En el teixit normal s'observen fibres marcades fluorescentment sobre un fons fosc, en canvi, en la zona cicatricial la matriu apareix marcada de forma difusa i les fibres no es veuen tant definides (fig. 206).

A nivell ultraestructural s'observa en ferides de 7 mesos una matriu menys organitzada. Les fibril·les es troben o bé disperses i desestructurades (figs. 208 i 209), o bé organitzades al voltant de les perllongacions citoplasmàtiques dels fibròcits formant fibres (fig. 210). Aquestes fibres són més primes que les del teixit connectiu dèrmic o intermuscular normal de la perifèria de la cicatriu.

---

**Fig. 197.** Pseudoblastema als 9 dies de la realització de la ferida. Es pot observar un increment de la matriu extracel·lular entre les cèl·lules (fletxa), fet que es fa especialment evident als marges del pseudoblastema (doble fletxa). CT: teixit connectiu. P: pseudoblastema. Barra: 1 µm.

**Fig. 198.** Pseudoblastema als 14 dies de la realització de la ferida. Entre les cèl·lules del pseudoblastema, a més de la matriu extracel·lular, s'observen seccions de les perllongacions cel·lulars dels fibròcits. EM: matriu extracel·lular. FI: perllongació citoplasmàtica d'un fibròcit. PC: cèl·lula del pseudoblastema. Barra; 1 µm.

**Fig. 199.** Pseudoblastema als 14 dies de la realització de la ferida. Es pot observar els cos cel·lular d'un fibròcit entre les cèl·lules del pseudoblastema en una zona pròxima al marge. CT: teixit connectiu. FI: fibròcit. PC: cèl·lula del pseudoblastema. Barra: 1 µm.

**Fig. 200.** Ferida als 14 dies. S'observen fibres argiròfiles a l'interior del pseudoblastema. (fletxa). Impregnació argèntica. CT: teixit connectiu. E: epiteli. M: fibres musculars. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 201.** Als 21 dies es pot observar marcatge de material fibrós amb la lectina PNA fluoresceïnada a nivell del pseudoblastema. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 202.** Als 30 dies s'observa en el pseudoblastema un increment del marcatge amb la lectina PNA fluoresceïnada. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 203.** Als 21 dies, durant el període de dispersió del pseudoblastema, s'observa en la zona de la cicatriu una matriu connectiva fibrosa. CM: matriu connectiva. VC: cèl·lules vasocentrals. 10 µm.

**Fig. 204.** Als 14 dies, en les proximitats del pseudoblastema, es poden observar fibròcits, les projeccions dels quals (fletxa) penetren en el pseudoblastema. CT: teixit connectiu. FI: fibròcit. P: pseudoblastema. Barra: 50 µm.

**Fig. 205.** Cicatriu de 2 mesos. Amb la impregnació argèntica es pot veure que la matriu connectiva de la zona cicatricial és diferent de la del teixit normal. CT: teixit cicatricial. NT: teixit normal. Barra: 100 µm.

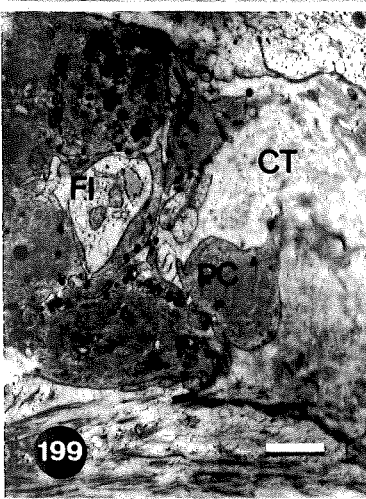
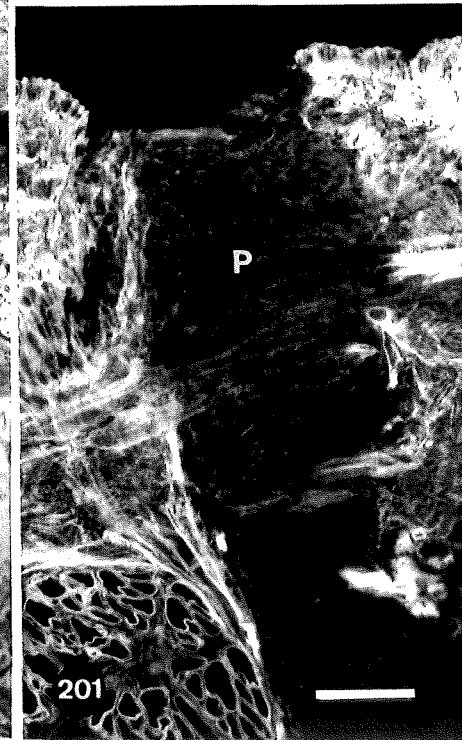
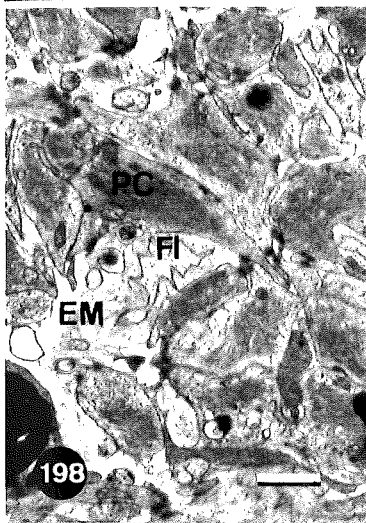
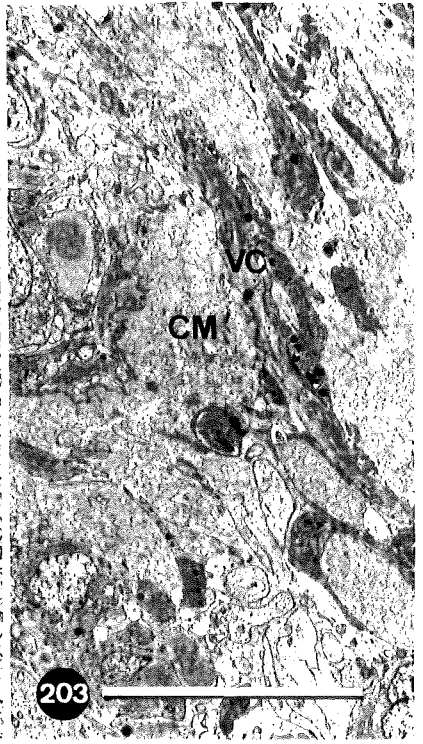
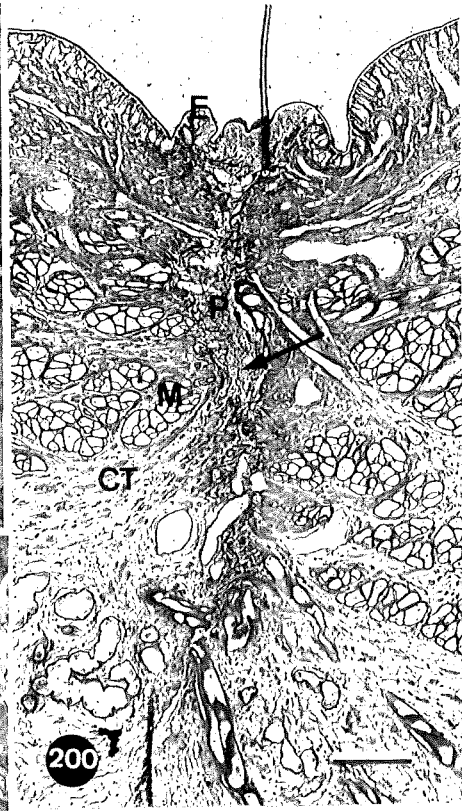
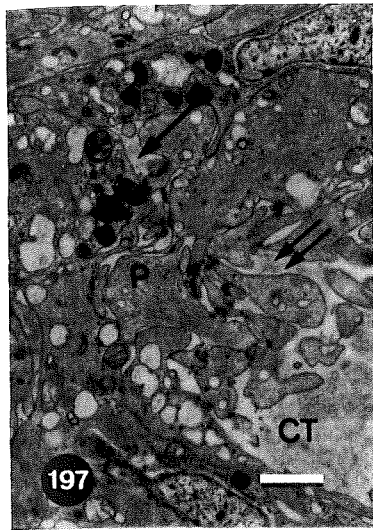
**Fig. 206.** Detall de la figura precedent. En la zona cicatricial s'observen fibres connectives del tipus prim, amb estructura de còrtex i medul·la (fletxa). Impregnació argèntica. M: fibra muscular. Barra: 10 µm.

**Fig. 207.** Cicatriu de 8 mesos amb una matriu fibrosa que es diferencia de la matriu del teixit normal amb el marcatge amb la lectina PNA fluoresceïnada (fletxes). M: fibres musculars. Barra: 100 µm.

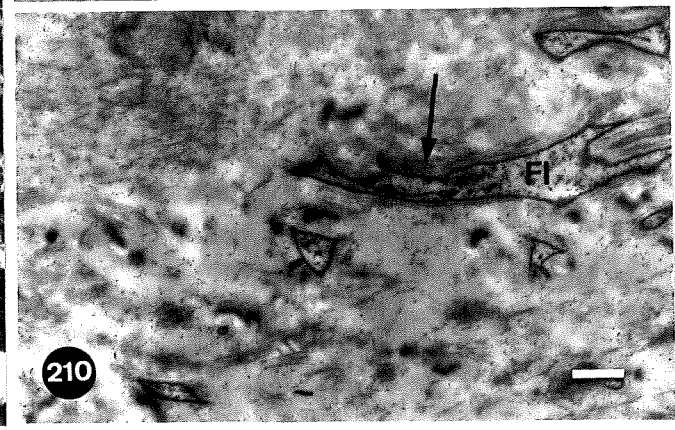
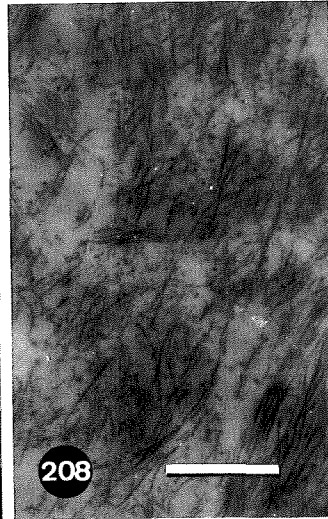
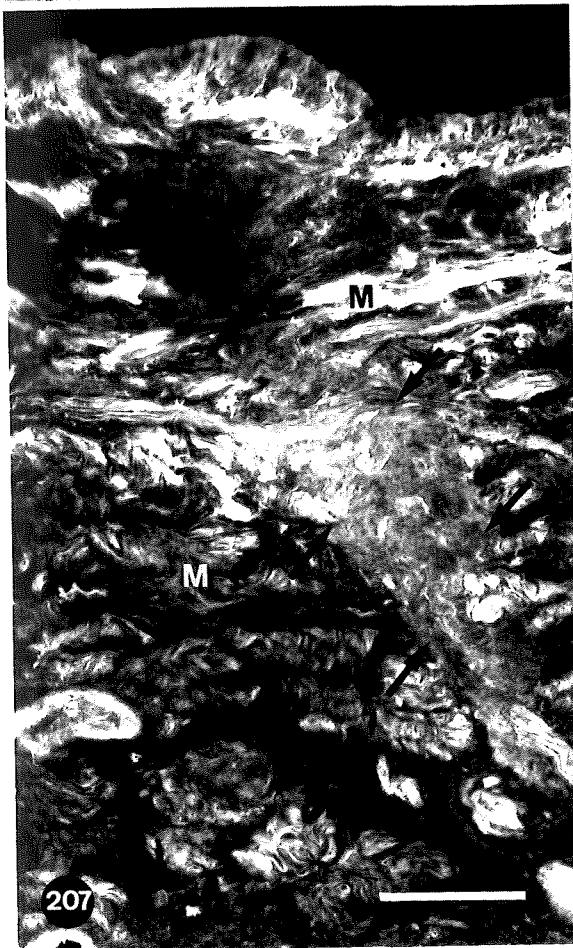
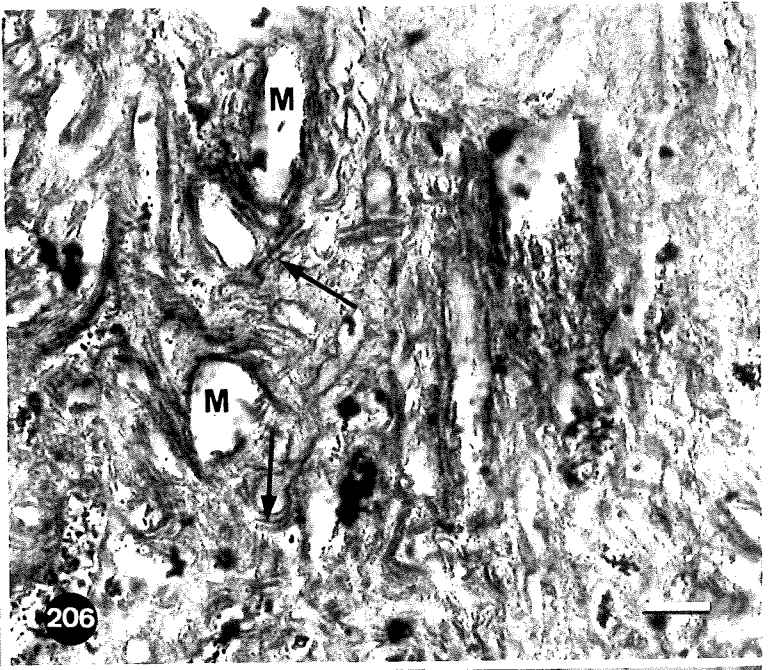
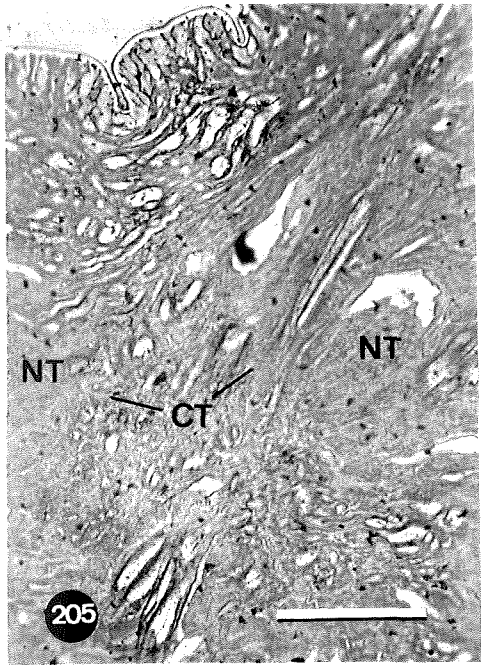
**Fig. 208.** Detall de la matriu connectiva d'una cicatriu de 7 mesos. En moltes zones de la matriu cicatricial s'observen fibril·les desorganitzades, sense formar fibres. Barra: 0,5 µm.

**Fig. 208.** Detall de la matriu connectiva del teixit normal. Les fibril·les es troben organitzades formant fibres. F: fibres connectives. Barra: 0,5 µm.

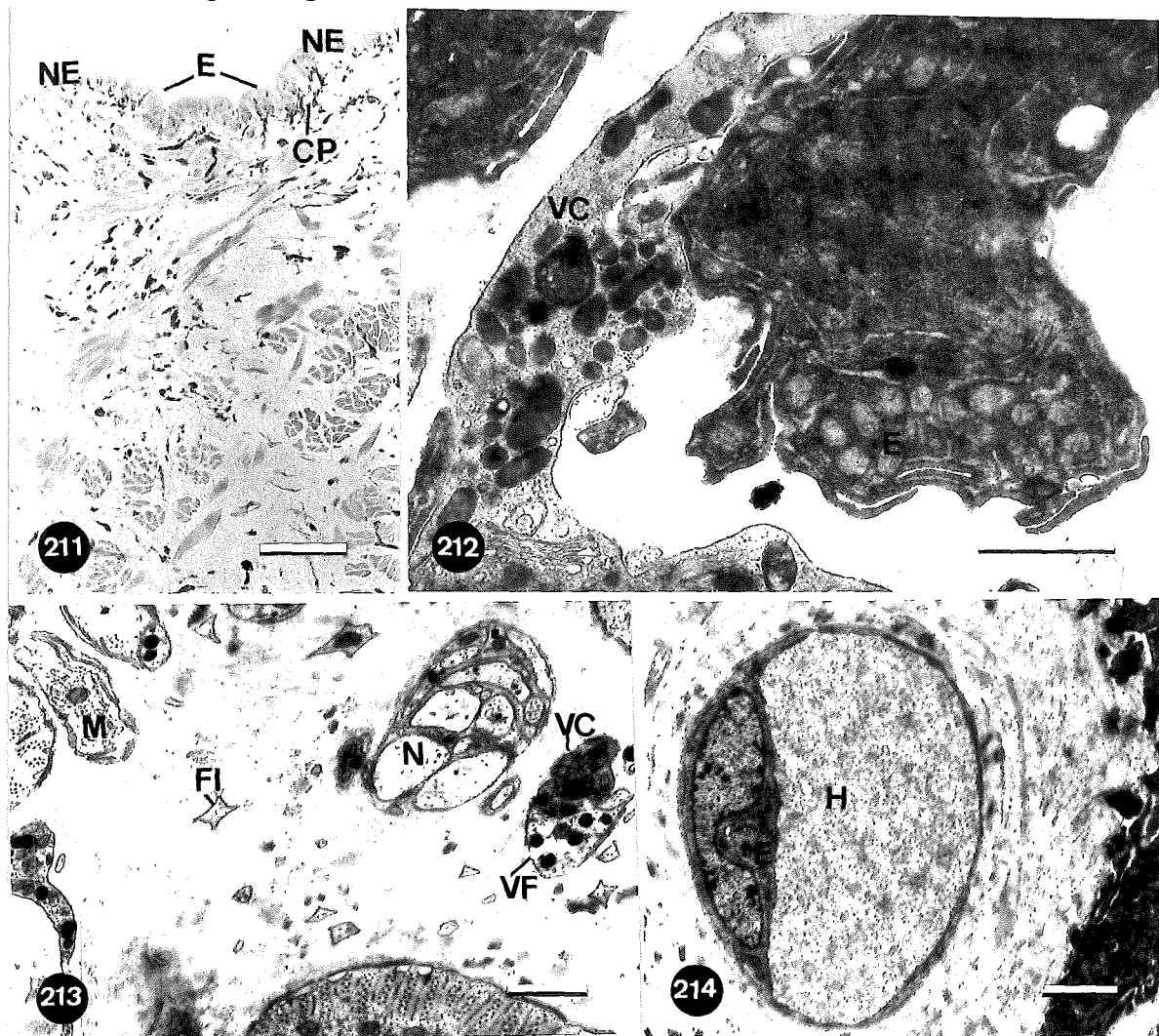
**Fig. 210.** Cicatriu de 7 mesos. S'observen fibril·les (fletxa) organitzades al voltant de perllongacions citoplasmàtiques dels fibròcits. FI: perllongacions citoplasmàtiques dels fibròcits. Barra: 0,5 µm.







En el teixit connectiu de cicatrius de 2 mesos ja s'observen cèl·lules pigmentades al MO, sense que es pugui distingir si es tracta de cromatòfors o cèl·lules vasofibroses. No s'observen projeccions citoplasmàtiques dels cromatòfors internant-se entre les cèl·lules epitelials, a diferència dels teixits normals contigus (fig. 211).



**Fig. 211.** Cicatriu de 2 mesos. Entre les cèl·lules epitelials de la cicatriu no s'observen projeccions citoplasmàtiques dels cromatòfors, a diferència de l'epiteli normal. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli cicatricial. CP: projeccions citoplasmàtiques dels cromatòfors. NE: epiteli normal. Barra: 100 µm.

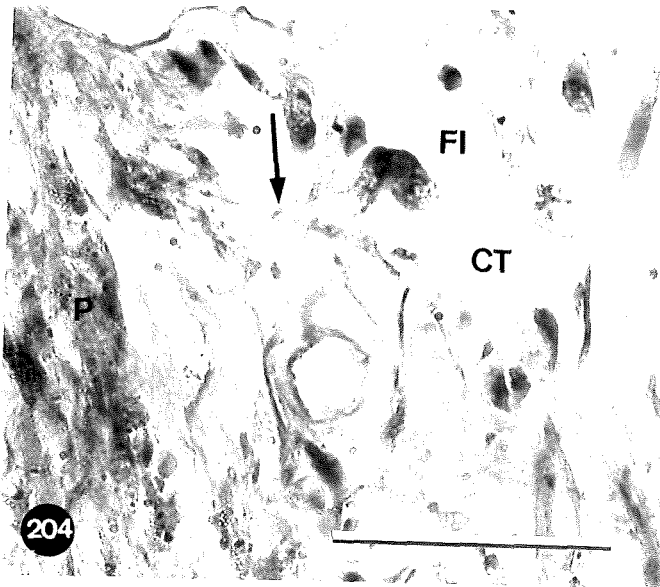
**Fig. 212.** Cicatriu de 7 mesos. Contactes entre la part basal d'una cèl·lula epitelial i una cèl·lula vasocentral que resta en la zona de la cicatriu. E: cèl·lula epitelial VC: cèl·lula vasocentral. Barra: 1 µm.

**Fig. 213.** Nervi i petites fibres musculars en la zona cicatricial als 7 mesos de realitzada la ferida. FI: projecció citoplasmàtica d'un fibròcit. M: petites fibres musculars. N: nervi. VC: cèl·lula vasocentral. VF: cèl·lula vasofibrosa. Barra: 1 µm.

**Fig. 214.** Capil·lar en una cicatriu de 7 mesos. H: capil·lar hemocel·lòmic. E: cèl·lula endotelial. Barra: 1 µm.

En la zona de la cicatriu es poden trobar agrupacions de cèl.lules vasocentrals en contacte amb cèl.lules vasofibroses (fig. 160) i sovint amb les parts basals de les cèl.lules epitelials (fig. 212). En aquestes cèl.lules vasocentrals es poden observar cossos en forma de peses i lisosomes multivesiculars. També s'observen algunes cèl.lules vasocentrals tipus fagòcit amb abundància de lisosomes secundaris, lisosomes multivesiculars i alguna figura mielínica.

La presència de fibròcits s'ha pogut observar en cicatrius de 7 mesos. També s'han observat capil.lars, nervis i petites fibres musculars dels anuls en la zona cicatricial (figs. 213 i 214). No s'ha pogut observar, però, regeneració de les fibres musculars de la paret corporal seccionades.





## **FERIDES PER CAUTERITZACIÓ DEL TEGUMENT**

L'aplicació d'un filament de platí incandescent sobre la superfície ventral de la sangonera provoca la formació d'una àrea cremada que es distingeix per una coloració més clara. Aquesta àrea té uns 10 mm de llargària i 2-2,5 mm d'amplària. L'animal presenta una forta contractura i queda immobilitzat durant un període de 24 h aproximadament, passades les quals recupera el comportament normal.

La superfície lesionada es recupera a un ritme lent. Al cap d'una setmana, l'epidermis està regenerada però la lesió es manté clarament delimitada per la tonalitat més clara. Progressivament la cicatriu es va reduint, si bé, al cap de tres mesos, encara s'identifica per una lleugera diferència de color.

### **Danys als teixits**

L'observació d'animals en cremades de 1 h, mostra una superfície cremada deprimida, on els petits solcs longitudinals de la paret del cos han desaparegut, però no els anells (fig. 215). S'observa la persistència de la cutícula sobre la superfície cremada, encara que en alguns punts es presenta separada de les cèl.lules epitelials i en altres està erosionada. L'epiteli columnar presenta un aspecte anormal: les cèl.lules epitelials es mostren inflades i necrosades amb nucli picnòtic. La necrosi pot afectar també algunes de les fibres musculars més externes. Al llarg dels marges la cremada s'observa com, en una amplària de 100-200  $\mu\text{m}$ , la cutícula i restes de cèl.lules epitelials adherits s'aixequen, separant-se de la làmina basal per formar una butllofa (figs. 216-218).

### **Pseudoblastema**

Durant la primera hora no s'observa la presència de cèl.lules vasofibroses a l'entorn de l'àrea afectada.

A les 12 h es veu acumulació de cèl.lules vasocentrals en la superfície cremada. Acumulació que es fa progressivament palesa fins a esdevenir un pseudoblastema ben visible a les 24 h, el qual recobreix parcialment la superfície cremada (fig. 219). El pseudoblastema té un gruix escàs, d'entre 30 i 70  $\mu\text{m}$ . Les cèl.lules que formen el pseudoblastema mesuren, en visió superficial, de 4,5 X 10  $\mu\text{m}$  a 7 X 6  $\mu\text{m}$ . Es pot veure com el pseudoblastema es forma per sobre de l'epiteli cremat i sovint per sota la cutícula en els llocs en que aquesta encara es manté; siguent l'epiteli encara identificable a les 48 h (figs. 220 i 221), però no a partir del tercer dia. El teixit necròtic queda englobat en el tap i deixa de ser identificable. En la superfície cremada encara es distingeixen els anells que no han sigut totalment recoberts pel pseudoblastema (fig. 222). Es mantenen restes de la cutícula adherits a la perifèria (fig. 222).

A les 48 h el pseudoblastema forma un tap compacte estès sobre la totalitat de l'àrea afectada, impedit la visió dels anells (fig. 223).

Al 3 dies el pseudoblastema és dens i té tendència a disminuir en extensió, fent-se més gruixut en la porció central.

A la setmana de la realització de la cremada, s'observa com nombroses cèl.lules vasocentrals colonitzen el teixit connectiu de la part basal del pseudoblastema i contacten amb les fibres musculars circulars, diagonals i en

---

**Fig. 215.** Cremada per cauterització. Aspecte del tegument 1 h després de la cremada. Observi's que en la zona cremada (fletxa) els solcs característics dels anells han desaparegut. Barra: 1 mm.

**Fig. 216.** Cremada per cauterització 1 h després de la seva realització. En la zona de transició entre el teixit normal i la cremada es veu una butllofa (fletxa). Coloració blau de toluidina. BT: teixit cremat cremada. NT: teixit normal. Barra: 100 µm.

**Fig. 217.** Detall d'una cremada per cauterització 1 h després de la seva realització. Es pot observar la formació de butllofes (fletxa) a nivell del marge de la cremada. C: cremada. NT: teixit normal. Barra: 100 µm .

**Fig. 218.** Detall de la zona marginal de la cremada. Les cèl.lules epitelials se separen de la làmina basal (punta de fletxa) i s'aixequen formant una butllofa (fletxa). Coloració blau de toluidina. BT: zona cremada. Barra: 100 µm.

**Fig. 219.** Cremada a les 24 h. S'observa com les cèl.lules vasocentrals es dipositen per sobre de l'epiteli cremat per formar el pseudoblastema. Coloració blau de toluidina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 220.** Cremada a les 48 h. En aquesta cremada es pot apreciar com el pseudoblastema es forma entre la cutícula i l'epiteli cremat, el qual ja quasi no es distingeix. Coloració hematoxilina/eosina. C: cutícula. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 221.** Cremada a les 48 h. Amb la impregnació argèntica encara es poden distingir bé les cèl.lules epitelials necrosades (fletxa) a sota del pseudoblastema. E: cèl.lules epitelials. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 222.** Aspecte d'una cremada a les 24 h. En la zona cremada encara es distingeixen els anells, els quals encara no han sigut recoberts totalment pel pseudoblastema. La cutícula es veu arrencada als marges de la cremada. C: cutícula. A: anell. Barra: 1 mm.

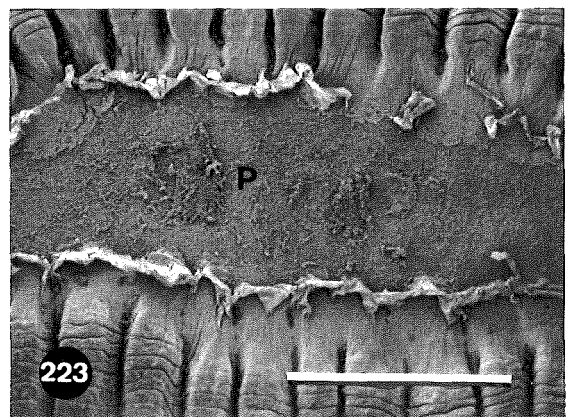
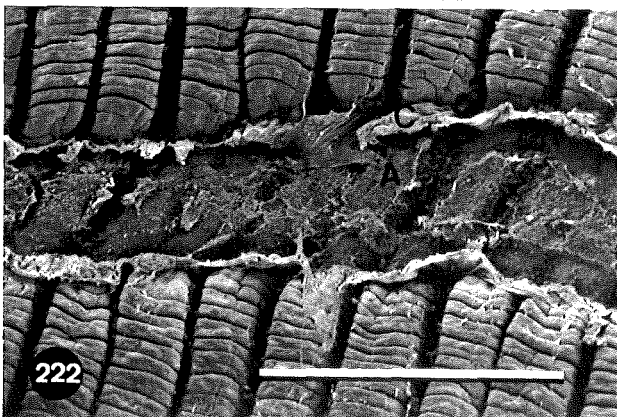
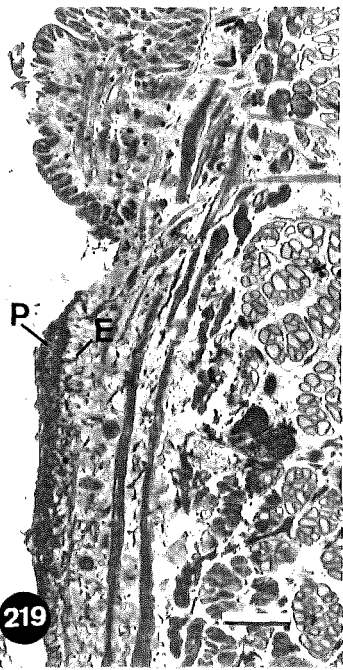
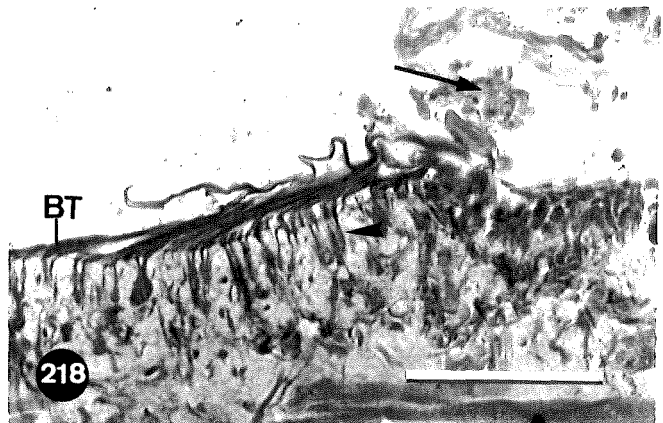
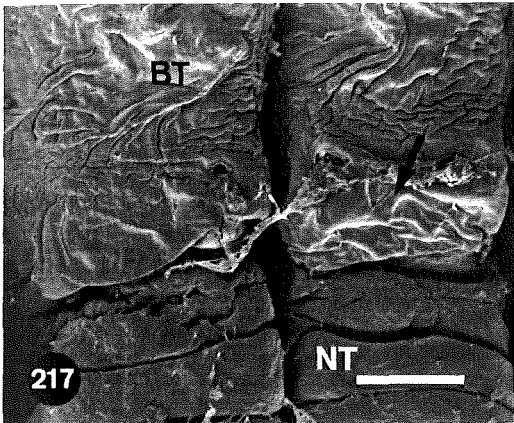
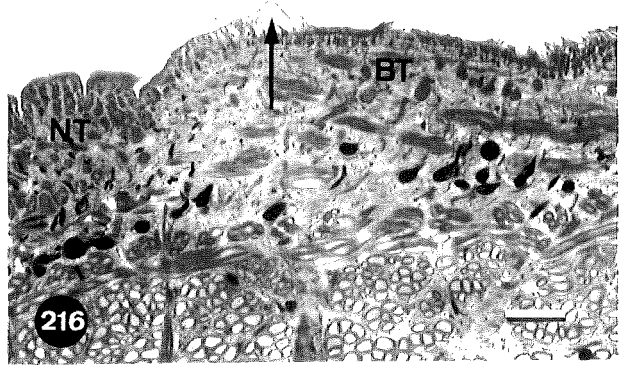
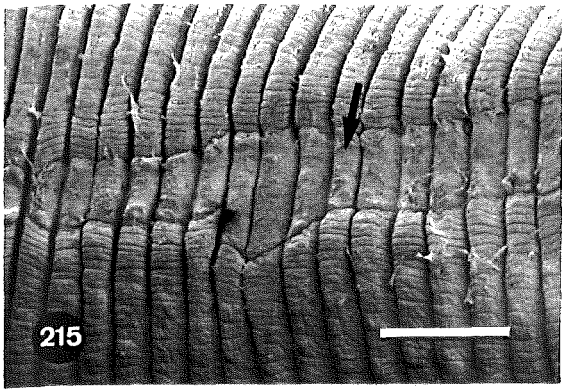
**Fig. 223.** A les 48 h la superfície cremada es veu totalment recoberta per les cèl.lules del pseudoblastema. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

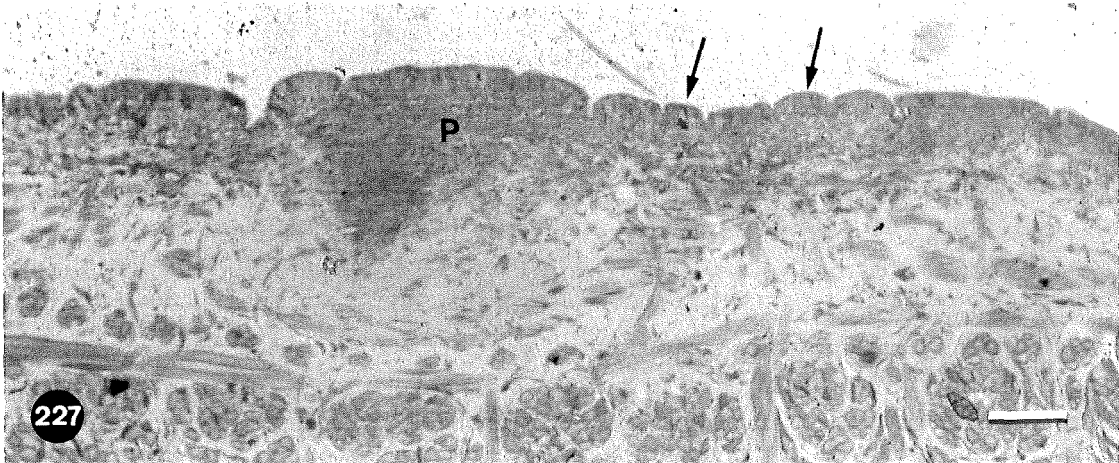
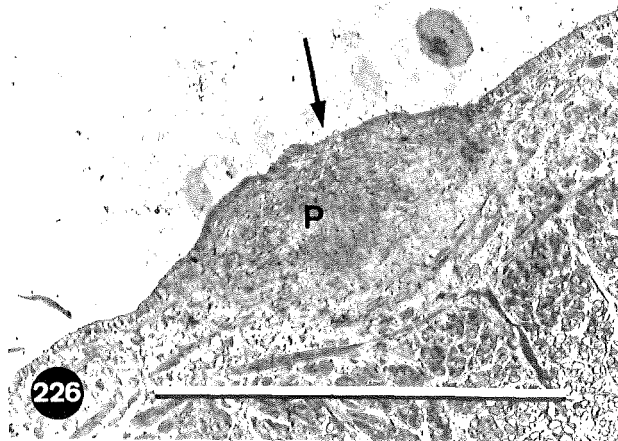
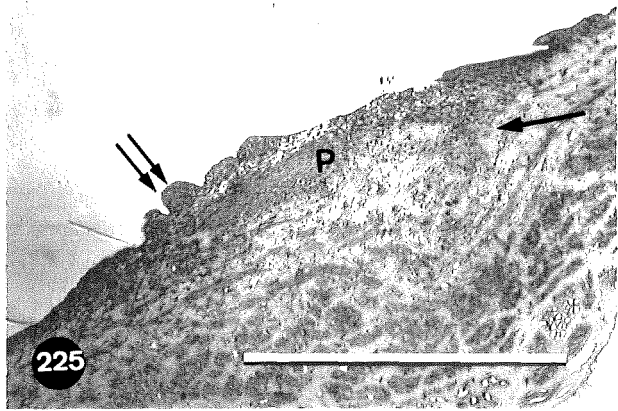
**Fig. 224.** 7 dies després de la realització de la cremada. El pseudoblastema ha adquirit un gruix considerable, i en el teixit connetiu subjacent s'observen nombroses cèl.lules vasocentrals, sovint en contacte amb les fibres musculars (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. M: fibra muscular. P: pseudoblastema .VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 100 µm.

**Fig. 225.** 14 dies després de la realització de la cremada. En alguns punts de la zona cremada s'observen falques (fletxa) del pseudoblastema que s'internen cap a la dermis. Es poden observar plectes a nivell de la superfície (doble fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

**Fig. 226.** Als 21 dies de la realització de la cremada la zona afectada forma una protuberància (fletxa), aparentment per acostament dels marges de la ferida. Coloració hematoxilina/eosina. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

**Fig. 227.** Després d'un més de realitzada la cremada, el pseudoblastema és força conspicu i forma falques que s'internen en la dermis. El tegument recupera els solcs característics dels anells (fletxes). Coloració hematoxilina/eosina. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.





ocasions longitudinals (fig. 224). Cap a les dues setmanes s'observa una clara retracció del pseudoblastema, el qual, en la part central de la cremada, pren la forma de falca, observant-se, en ocasions, "falques" secundàries als marges de la cremada (fig. 225). L'amplària de la cremada es veu reduïda a 0,8-1 mm i sovint s'observen alguns plecs en l'epiteli (fig. 225). Per la disposició dels teixits subjacents, s'observa clarament que els marges de la cremada s'han acostat, formant la zona de la cremada una petita protuberància (fig. 226). Posteriorment, aproximadament al voltant d'un mes de realitzada la cremada, el nou tegument recupera els petits solcs longitudinals característics dels anells (fig. 227). El pseudoblastema ha disminuït en gruix i encara s'observen falques de retracció (fig. 227).

## **Reepitelització**

Cap a les 48h comença la migració de les cèl.lules epitelials (fig. 228). El nou epiteli s'exten a partir de les cèl.lules columnars perifèriques, les quals, en la seva migració sobre el pseudoblastema, es transformen en cèl.lules planes. La reepitelització es fa especialment palesa en MES, observant-se clarament com l'epiteli dels marges de la cremada s'exten per sobre del pseudoblastema (fig. 229). Les cèl.lules es mantenen unides mentre llisquen sobre el pseudoblastema, encara que les 3-5 primeres cèl.lules del marge d'avanç, al llarg d'uns 65 µm, presenten la cutícula arrencada observant-se alguns espais entre elles (figs. 229 i 230). Les cèl.lules mesuren uns 18 µm de llargària en la direcció d'avanç per uns 12 d'amplària i uns 8 µm de gruix. Els elements glandulars no participen en el procés de reepitelització.

Als tres dies les cèl.lules epitelials continuen avançant, en forma d'un epiteli pla d'uns 30-40 µm de llargària i 9-10 µm de gruix. Aquestes cèl.lules epitelials no estan molt estretament unides al pseudoblastema en la seva part basal, la qual cosa permet observar freqüentment en MO un ampli espai de separació, probablement artefactual, en el qual es veuen projeccions citoplasmàtiques que les uneixen al substrat (figs. 231 i 232). Cap al quart dia la reepitelització és total i les cèl.lules epitelials no presenten espais entre elles i el pseudoblastema (fig. 233). En ocasions s'arrenca la vella cutícula d'aquest epiteli mostrant una cutícula més fina.

Durant el període de retracció del pseudoblastema, cap a les dues setmanes, les cèl.lules epitelials gradualment tornen a l'aspecte columnar propi del tegument. Es constata una migració dels nuclis cap a la porció basal de les cèl.lules que progressivament s'enfonsen en el teixit (fig. 234).



## Regeneració del teixit cicatricial

Als tres mesos de la realització de la cremada, s'observa una zona cicatricial en la qual abunden les cèl.lules vasocentrals (fig. 235).

En cicatrius de tres mesos l'epiteli cicatricial pràcticament no es diferencia del normal amb les tècniques de coloració generals. La impregnació argèntica, que marca clarament la làmina basal, mostra una disposició de les cèl.lules epitelials més compactada i regular que en l'epiteli normal (fig. 236). No s'observen glàndules en la zona cicatricial.

---

**Fig. 228.** Cremada a les 48 h. Es pot observar com als marges de la cremada (fletxa), l'epiteli adopta la forma aplatada per iniciar la migració per sobre el pseudoblastema. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 229.** A les 48 h de la realització de la ferida es pot observar com l'epiteli dels marges s'extén i migra per sobre del pseudoblastema. L'epiteli migra a modus d'una capa unificada, tot i que en alguns punts l'epiteli capdavanter es mostra una mica esqueixat (fletxa). ME: epiteli migratori. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 230.** Detall de la figura anterior. Les cèl.lules epitelials del marge d'avanç han perdut la cutícula i en alguns punts s'han trencat les unions laterals (fletxa). E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 231.** Als 3 dies de la realització de la cremada, les cèl.lules epitelials migratòries mostren espais entre la superfície basal i el pseudoblastema (fletxes). Coloració blau de toluïdina. E: epiteli. ME: epiteli migratori. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

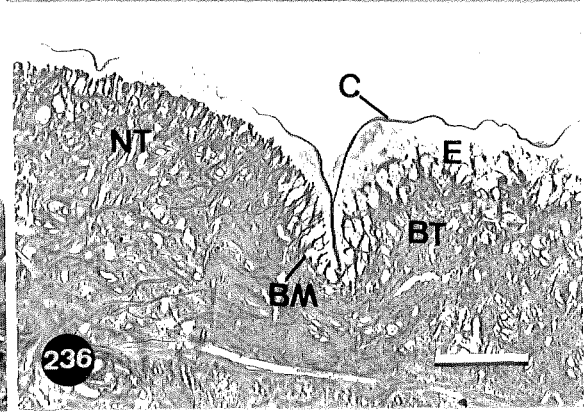
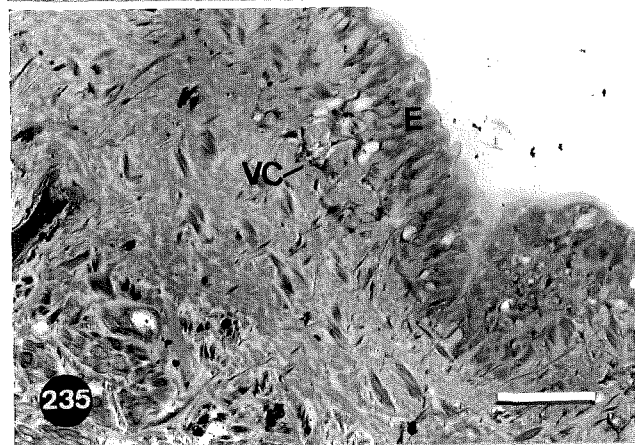
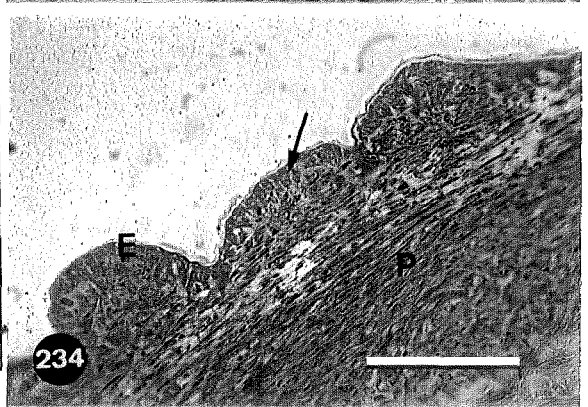
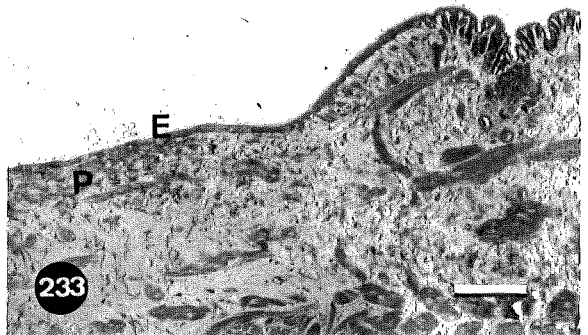
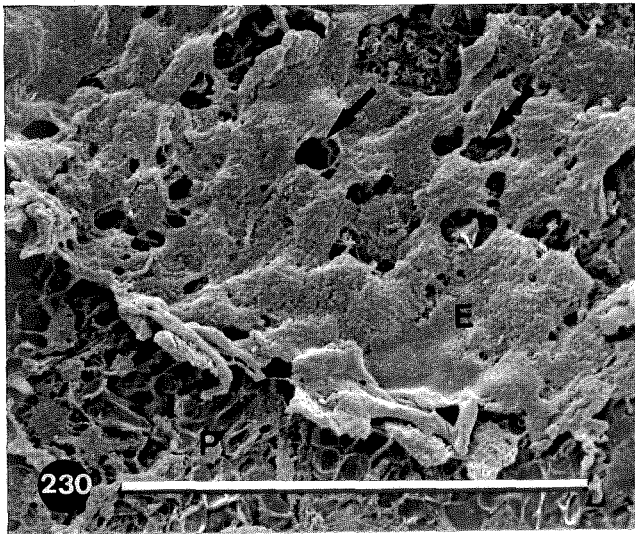
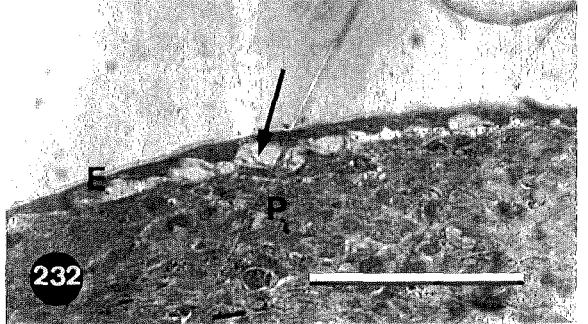
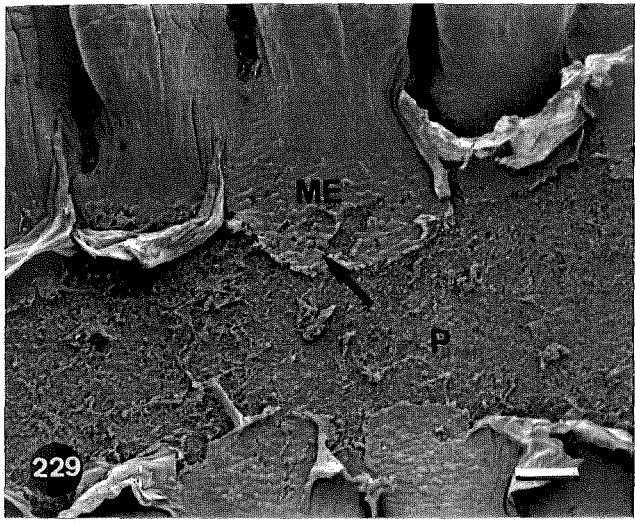
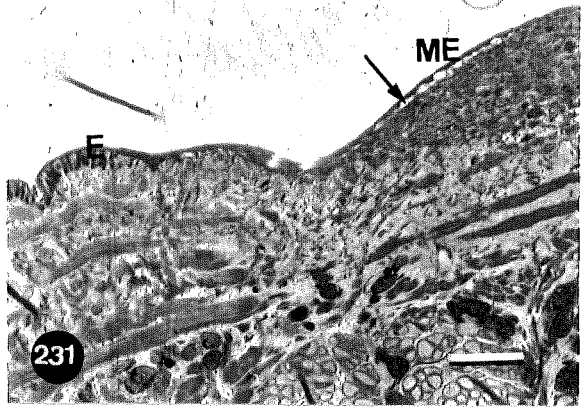
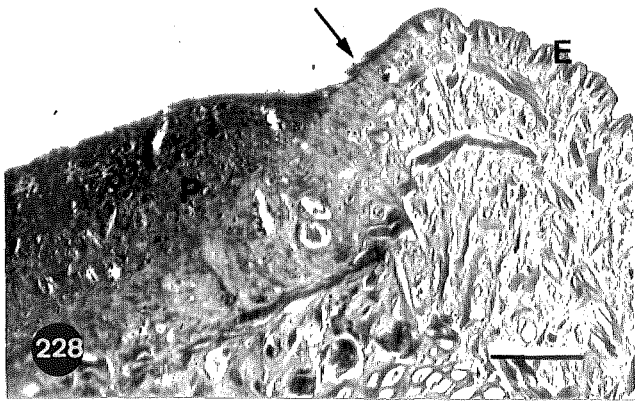
**Fig. 232.** Detall de la figura anterior on s'observen projeccions citoplasmàtiques de les cèl.lules epitelials (fletxa) en contacte amb el substrat. Coloració blau de toluïdina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 233.** Als 4 dies de la realització de la cremada, l'epiteli ja ha recobert tota la zona afectada i no s'observen espais entre les cèl.lules i el substrat. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 234.** Cremada de 14 dies. Les cèl.lules epitelials recobren parcialment la forma columnar (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 235.** Als 3 mesos de realitzada la cremada, s'observen encara força cèl.lules vasocentrals en contacte amb l'epiteli. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. VC: cèl.lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 236.** Cicatriu de 3 mesos. La impregnació argèntica mostra que les cèl.lules epitelials de la zona cicatricial estan menys compactades i es desorganitzen més fàcilment. BM: membrana basal. BT: cicatriu de la cremada. C: cutícula. E: epiteli. NT: teixit normal. Barra: 100 µm.





## **CREMADES PER NITRAT DE PLATA**

Després de l'aplicació del nitrat de plata s'observa com la superfície tractada, d'uns 2-3 X 4-4,5 mm queda ràpidament deprimida i adopta una coloració blanquinosa (fig. 237). Al voltant d'aquesta zona s'hi evidencia una contractura muscular que ajuda a mantenir immòbils els segments afectats.

Als pocs minuts s'observa la formació de butllofes al marge de la cremada, que es mantenen fins cap a les 48 h (fig. 238). Passades 24 h es perd l'estructura en solcs longitudinals. En aquest estadi comença a desprendre's la cutícula i l'àrea cremada adopta una coloració més fosca, fins que, cap a les 72 h, es desprèn tota la massa de teixit afectat pel nitrat de plata (figs. 239 i 240).

L'àrea afectada té un aspecte llis, sense solcs ni anells (fig. 241), els quals als dos mesos de la realització de la cremada encara no s'han recuperat totalment (fig. 242).

En aquest tipus de ferida, a diferència de les altres estudiades, destaca una alta mortalitat, d'aproximadament un 20%.

## **Danys als teixits**

En el moment de produir-se la cremada (fig. 243) s'observa com la sal de plata precipita, formant un front que arriba fins a la musculatura diagonal o fins a la longitudinal, a una profunditat d'uns 300-500  $\mu\text{m}$ . Els teixits a través dels quals ha passat el nitrat de plata es veuen enfosquits en les preparacions histològiques (fig. 244). Els cossos de les glàndules tubulars es veuen buids i les sortides de les glàndules obertes (figs. 245 i 246).

Entre les 0 i les 4 h, la cutícula, junt amb alguns restes de cèl.lules epitelials adherides, se separa dels teixits en alguns punts, i a nivell dels marges de la cremada s'aixeca uns 170  $\mu\text{m}$  formant butllofes d'uns 250-750  $\mu\text{m}$  d'ample. Aquestes butllofes contenen líquid i restes cel.lulars al seu interior (fig. 247).

Cap a les 24 h els anells tenen aspecte desorganitzat i els solcs quasi no es distingeixen (fig. 248). Encara s'observen les butllofes marginals (fig. 249) i en alguns punts la cutícula es comença a trencar (figs. 250 i 251). Les glàndules tubulars de la zona afectada continuen buides i es veuen lleugerament inflades, amb un diàmetre de 33-48  $\mu\text{m}$  (fig. 246).

## **Pseudoblastema**

### **Eliminació del teixit necròtic i formació del pseudoblastema**

Al cap de 4 h de realitzada la cremada es pot constatar l'inici de la separació de les cèl.lules vasocentrals del teixit vasofibrós, fet que es fàcilment observable en la



zona que envolta el canal hemocelòmic ventral, rica en teixit vasofibrós. A les 24 h s'observen cèl.lules vasocentrals que migren cap als teixits afectats i se situen en els teixits sans, just per sota del precipitat de nitrat de plata (fig. 252).

A nivell dels marges de la cremada, en la zona abutllofada, els teixits es comencen a esqueixar per la zona del front de nitrat de plata o just per sota (figs. 250 i 251).

Posteriorment, cap a les 48 h, les butllofes es trenquen i l'esqueixament dels teixits es fa més palés a nivell dels marges de la zona cremada (fig. 253), iniciant un procés que acabarà amb la total escissió de la massa de teixit afectada pel nitrat de plata.

Les cèl.lules vasocentrals migren de forma massiva per formar acúmul just per sota del front de nitrat de plata al mateix temps que es va separant la massa de teixit afectada pel pas del nitrat de plata. Aquest procés passa per un estadi, entre els 2 i 3 dies, en el qual els teixits afectats queden subjectes a l'animal només per la zona central (figs. 239, 240 i 254). En les zones perifèriques, on el teixit cremat ja està separat, la ferida està totalment recoberta per cèl.lules vasocentrals (fig. 255).

---

**Fig. 237.** Aspecte en MES d'una cremada per nitrat de plata a les 12 h de la seva realització. Barra: 1 mm.

**Fig. 238.** A les 48 h s'observa la desestructuració dels anells. Es poden veure butllofes (fletxes) als marges de la cremada. Barra: 1 mm.

**Fig. 239.** Als 3 dies de la realització de la cremada es comença a despendre la massa de teixit afectat (fletxa). Barra: 1 mm.

**Fig. 240.** En aquesta imatge es pot veure l'aspecte del teixit després (fletxa). Barra: 1 mm.

**Fig. 241.** Una vegada despresos els teixits, la zona afectada mostra una gran depressió. Aquesta zona està recoberta per les cèl.lules del pseudoblastema. A nivell dels marges de la cremada ja s'ha iniciat la reepitelització (fletja). P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

**Fig. 242.** Després d'un mes de la realització de la cremada la zona afectada ja ha estat reepitelitzada (\*), però encara no s'ha recuperat l'estructura de solcs i anells. Barra: 100 µm.

**Fig. 243.** Als pocs minuts de la realització de la cremada s'observa un front de precipitats de plata que s'interna en els teixits (puntes de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 1 mm.

**Fig. 244.** Detall de la figura precedent, en la qual es distingeix bé la zona impregnada pel nitrat de plata (\*), de la zona no afectada. Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100 µm.

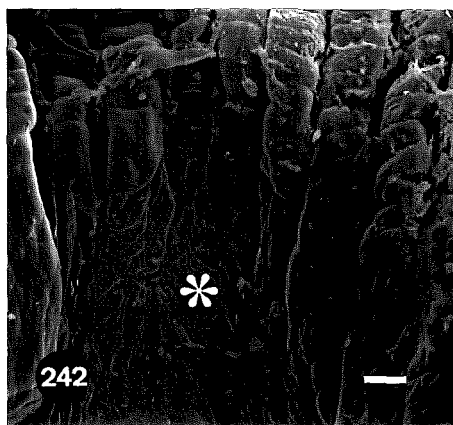
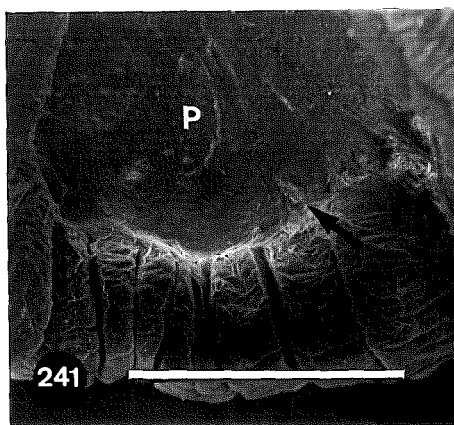
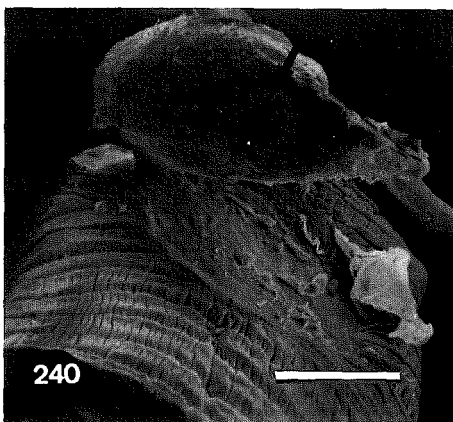
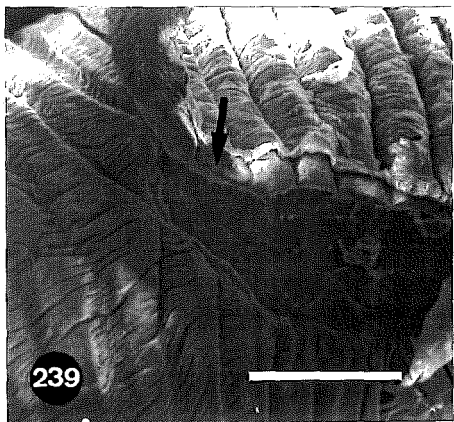
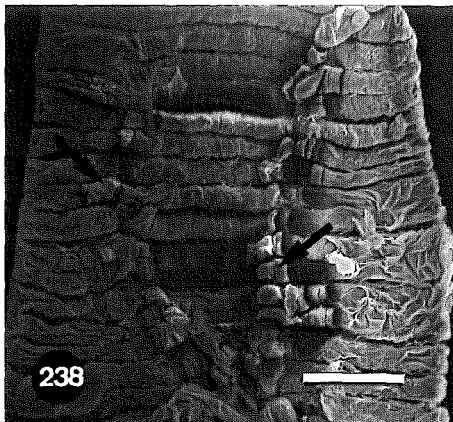
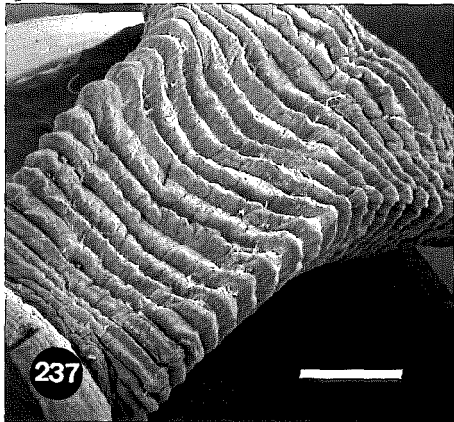
**Fig. 245.** Als pocs minuts de la realització de la cremada, les glàndules tubulars mucoses del tegument es veuen buides i els porus glandulars oberts (fletxa). Impregnació argèntica. TG: glàndula tubular. Barra: 100 µm.

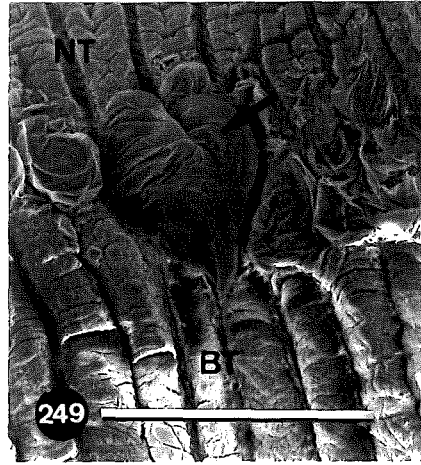
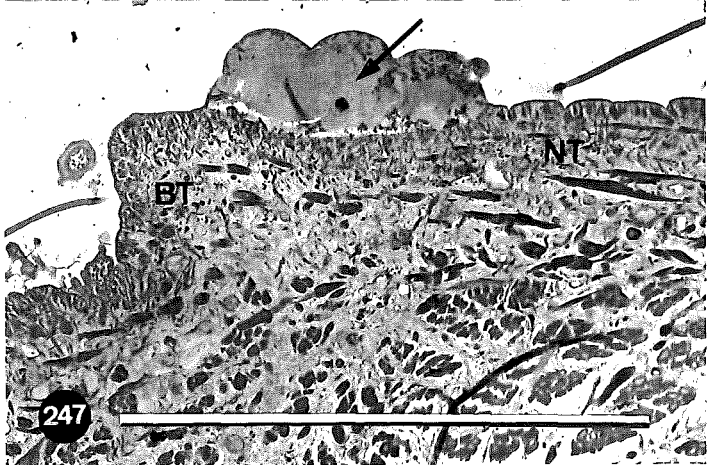
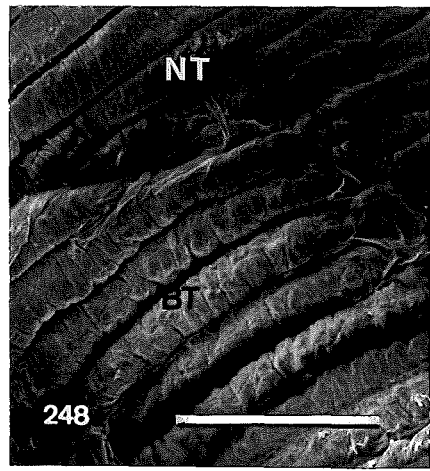
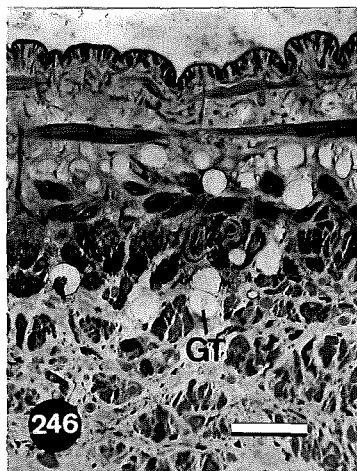
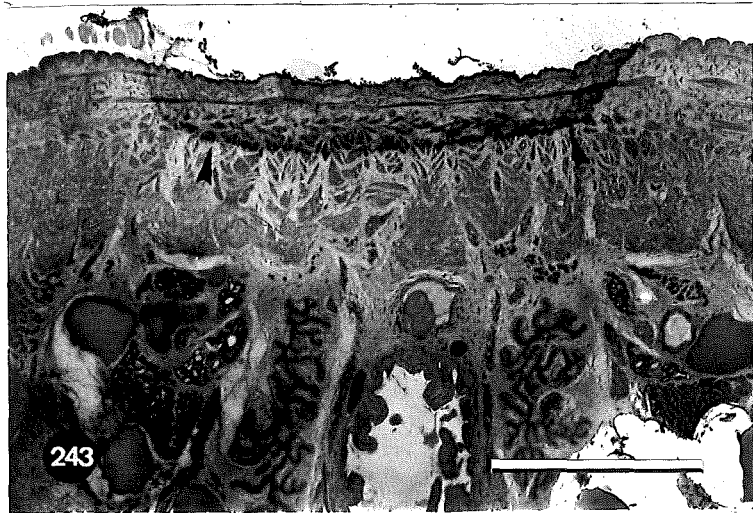
**Fig. 246.** A les 24 h de la realització de la cremada encara es veuen els cossos glandulars buits. Coloració hematoxilina/eosina. TG: glàndula tubular. Barra: 100 µm.

**Fig. 247.** A les 4 h s'observen butllofes a nivell del marge de la cremada (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. BT: teixit cremat. NT: teixit normal. Barra: 1 mm.

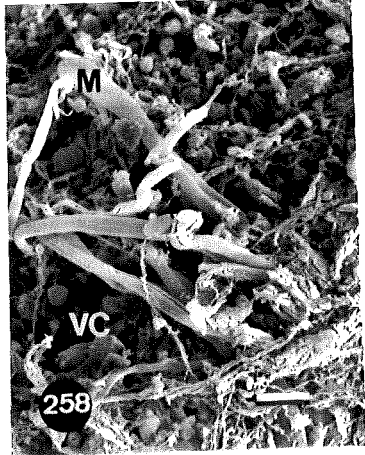
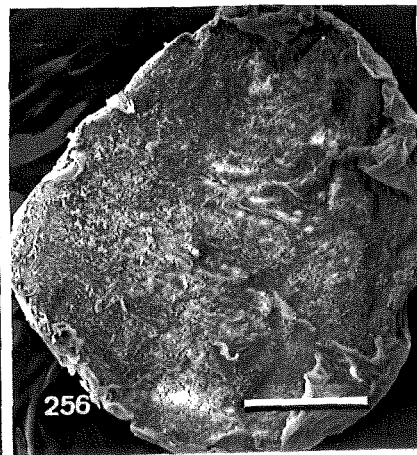
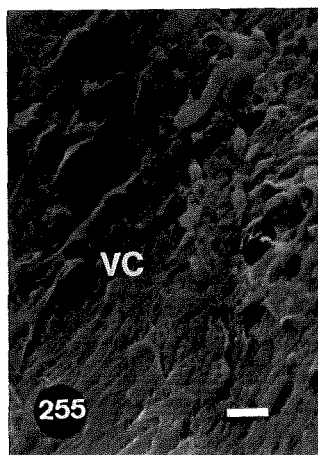
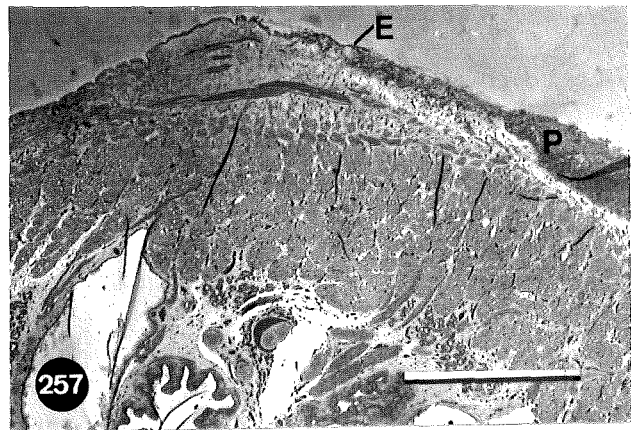
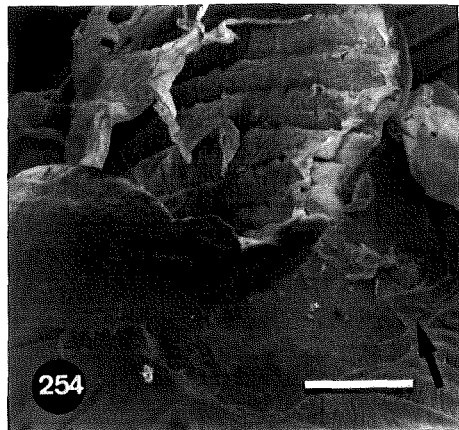
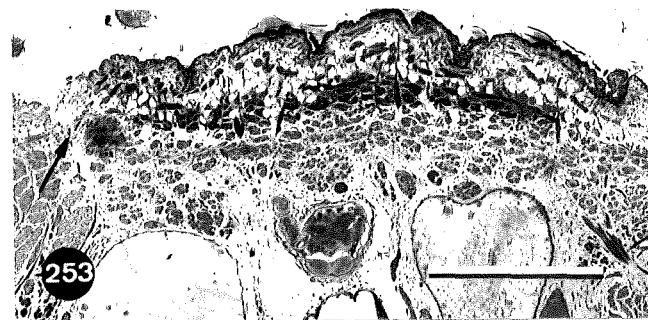
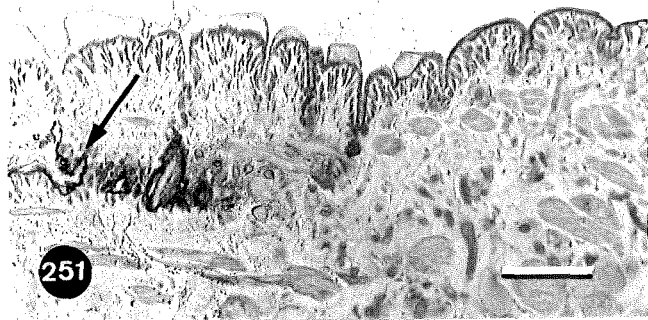
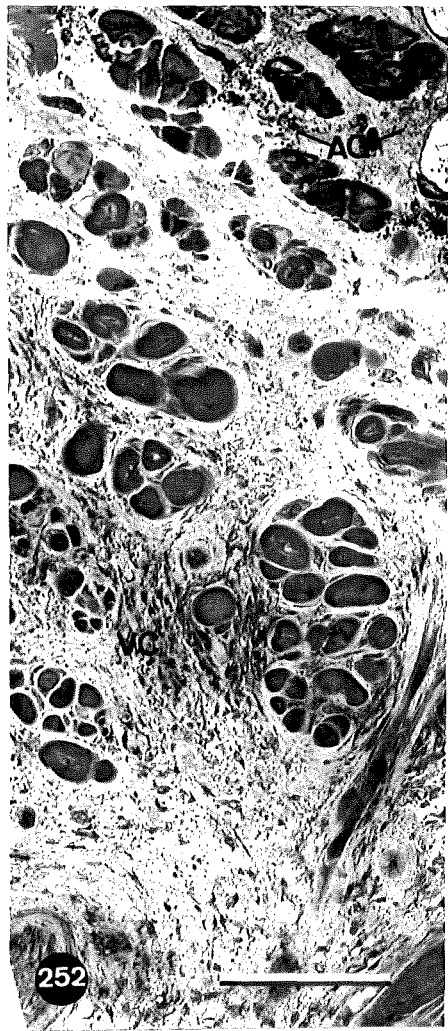
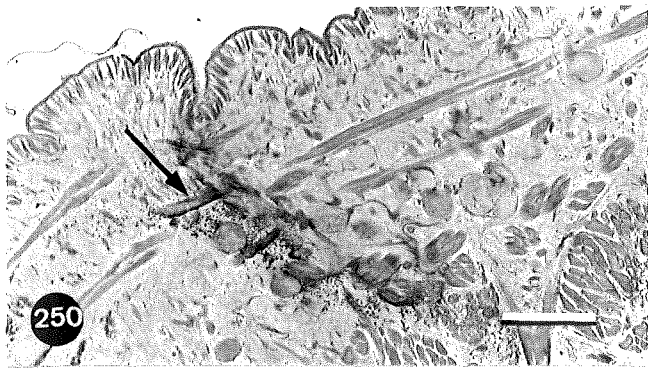
**Fig. 248.** Amb la MES es pot observar la desorganització dels anells en una cremada de 24 h. BT: teixit cremat. NT: teixit normal. Barra: 1 mm.

**Fig. 249.** Cremada de 24 h amb butllofes (fletxa) a nivell del marge amb el teixit sa. BT: teixit cremat. NT: teixit normal. Barra: 1 mm.









Finalment, entre els tres i cinc dies, tota la massa de teixit cremat es desprèn (figs. 256 i 257). Aquesta massa de teixit, que no perd la seva consistència, comprèn les diferents capes afectades pel pas del nitrat de plata: epidermis, dermis, musculatura circular i part de la diagonal (fig. 256). En la part inferior d'aquesta massa de teixit després, a nivell d'on els teixits han quedat trencats, es poden veure cèl.lules vasocentrals del pseudoblastema i restes de fibres musculars (fig. i 258).

L'animal mostra una depressió en la zona on s'han perdut aquests teixits. La ferida està recoberta per cèl.lules vasocentrals que, en aquest estadi, formen un pseudoblastema ben constituït, d'uns 160-350 µm de gruix, que pot englobar restes de teixits (fig. 259). En les fases inicials de formació del pseudoblastema, les cèl.lules no es disposen paral·lelament a la superfície, com en les ferides per incisió, sino que estan disposades de forma desordenada.

Als 15 dies, les cèl.lules del pseudoblastema es veuen lleugerament més ordenades, amb tendència a pendre una disposició paral·lela a la superfície (fig. 260). S'observen moltes cèl.lules vasocentrals en el teixit connectiu situat immediatament per sota del pseudoblastema, si bé no es pot determinar si es

---

**Fig. 250.** A les 12 h s'observa com, a nivell del front de precipitats de nitrat de plata, aquests s'acumulen al voltant de les cèl.lules (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100 µm.

**Fig. 251.** A les 24 h, a nivell dels marges de la ferida i just per sota d'on es troba el front de precipitats, s'inicia l'esqueixament dels teixits (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100 µm.

**Fig. 252.** A les 24 h de la realització de la ferida, les cèl.lules vasocentrals han format acúmuls una mica per sota del front de precipitats. Coloració hematoxilina/eosina. AG: precipitats de nitrat de plata. VC: cèl.lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 253.** A les 48 h l'escisió a nivell dels marges de la cremada és evident (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 1 mm.

**Fig. 254.** Als 3 dies la massa de teixits afectats es veu ja força separada de la paret corporal, tot i que encara resta unida per algun punt. En algunes zones es pot veure que l'epitelització ha progressat a partir dels marges de la ferida (fletxa). Barra: 1 mm.

**Fig. 255.** Cremada de 3 dies. En les zones on el teixit ja ha estat separat, la cremada està recoberta per cèl.lules vasocentrals. VC: cèl.lules vasocentrals. Barra: 10 µm.

**Fig. 256.** Als 5 dies, es pot observar la massa de teixit ja totalment separada. Barra: 1 mm.

**Fig. 257.** Cremada de 5 dies. Un cop ja s'ha després tota la massa de teixit afectat, la cremada es veu recoberta per un pseudoblastema, el qual ja s'ha començat a reepitelitzar per els marges. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

**Fig. 258.** Detall de la part inferior de la massa de teixit escindit. Es poden observar cèl.lules vasocentrals i fibres musculars. M: fibra muscular. VC: cèl.lula vasocentral. Barra: 10 µm

tracta de cèl.lules del pseudoblastema que inicien la retracció o si són cèl.lules que es continuen afegint. El teixit connectiu de la paret corporal de sota la zona cremada és ric en cèl.lules vasocentrals en migració.

Cap als 30-36 dies el pseudoblastema forma varies falques que s'internen en el teixit connectiu (figs. 261 i 262). El pseudoblastema engloba fibres de la musculatura circular i forma petites falques que s'unieixen a fibres musculars dorsoventrals (fig. 262). En alguns punts d'insersió de les fibres musculars dorsoventrals en el pseudoblastema, es pot veure com les fibres estan envoltades per perllongacions citoplasmàtiques de les cèl.lules del pseudoblastema (fig. 263). En el lloc on la fibra s'inserta s'observa una lleugera retracció del tegument. Es pot constatar una certa desintegració del pseudoblastema, que entre els 30 i els 36 dies té menys gruix, uns 40-90 µm, que en etapes anteriors (fig. 262).

Cap els 2 mesos el pseudoblastema està totalment disgregat.

---

**Fig. 259.** Als 5 dies s'observa un pseudoblastema ben constituït, el qual, en la seva part basal, engloba restes de fibres musculars i altres cèl.lules. CT: teixit connectiu. E: epiteli. P: pseudoblastema. M: fibra muscular. Barra: 100 µm.

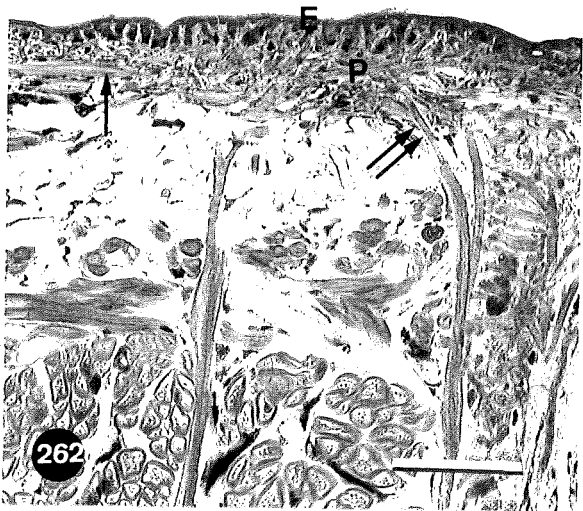
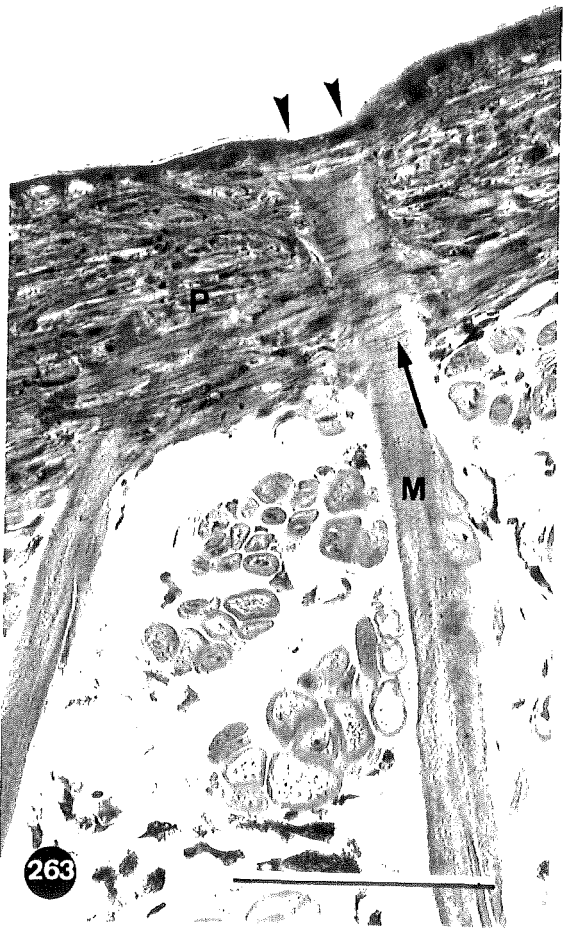
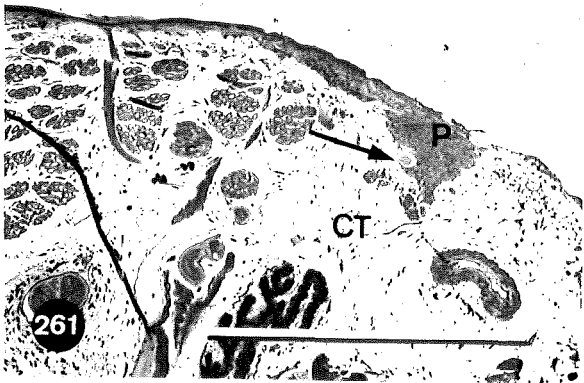
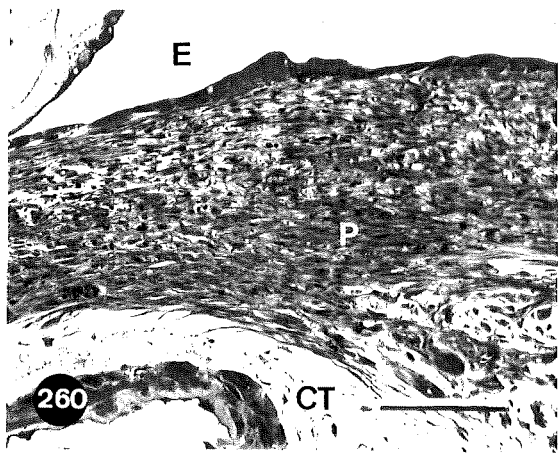
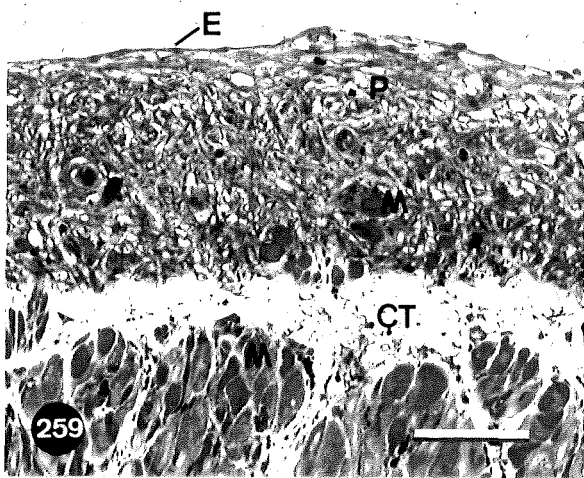
**Fig. 260.** Al 15 dies, les cèl.lules del pseudoblastema presenten un orientació paral·lela a la superfície. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

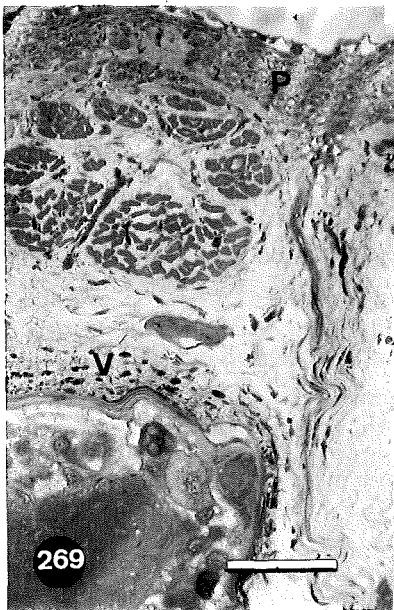
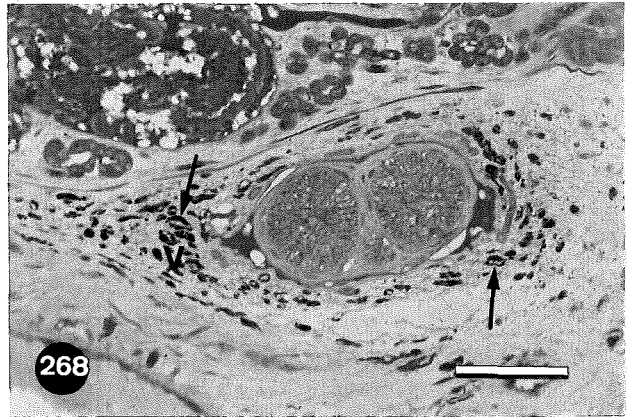
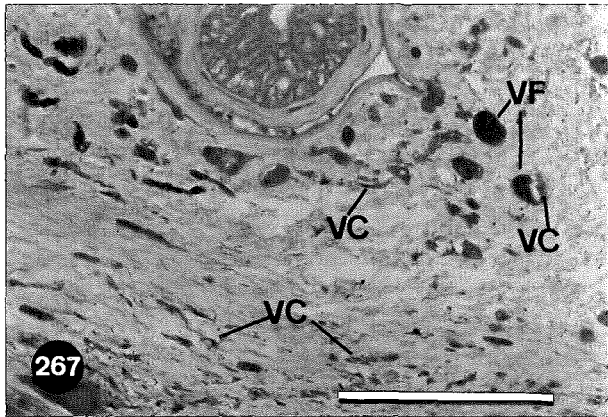
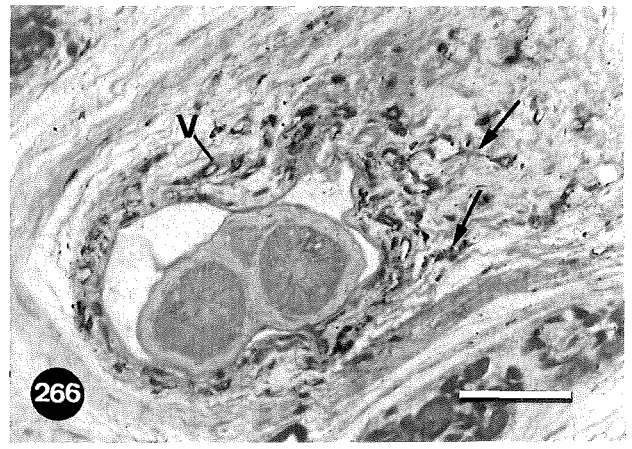
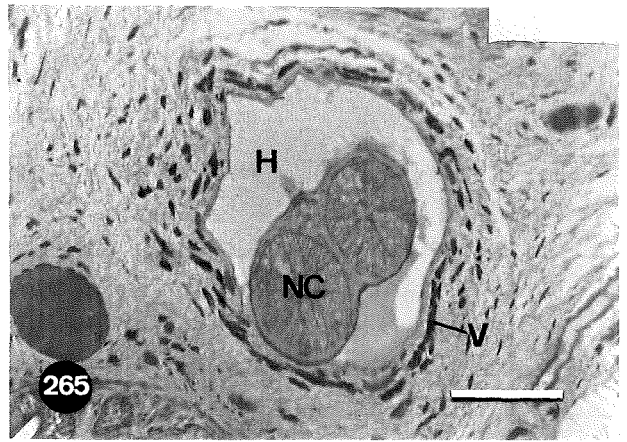
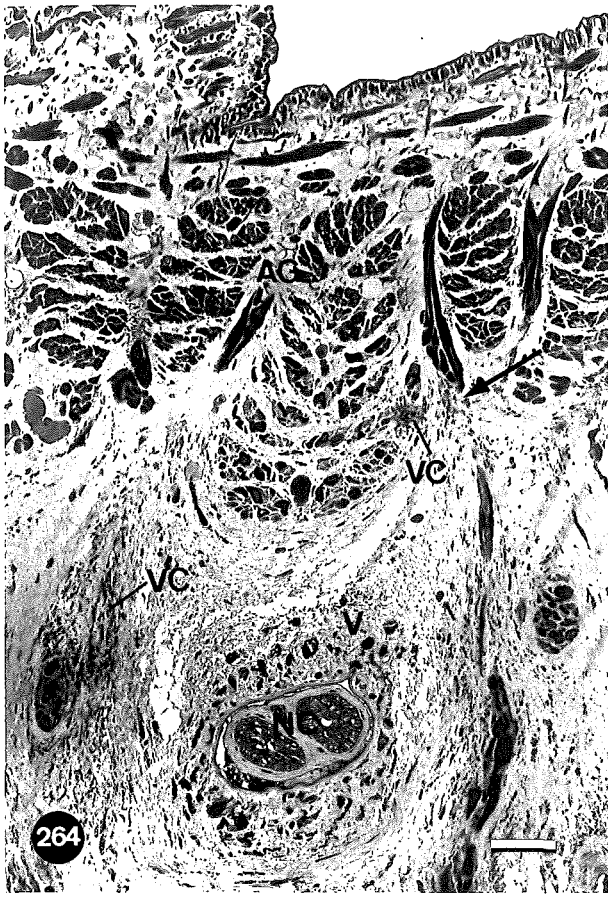
**Fig. 261.** Cremada de 30 dies. El pseudoblastema forma falques que s'internen cap al teixit connectiu (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. P: pseudoblastema. Barra: 1 mm.

**Fig. 262.** En aquesta cremada de 36 dies, es pot apreciar com el pseudoblastema forma petites falques en la seva part basal i contacta amb fibres musculars de la paret corporal, tan circulars (fletxa), com dorsoventrals (doble fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 263.** Detall dels contactes de les cèl.lules del pseudoblastema amb les fibres musculars en una cremada de 36 dies. Es pot observar com la fibra dorsoventral s'inserta en el pseudoblastema i com està envoltada per filopodis de les cèl.lules del pseudoblastema (fletxa). Noti's que, en el punt d'insersió, el tegument mostra una petita retracció (punta de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.







## **Teixit vasofibrós durant l'evolució del pseudoblastema**

El les etapes previes al desprendiment dels teixits afectats, es pot observar com les cèl.lules vasocentrals se separen del teixit vasofibrós i migren cap el límit de la zona sana amb la zona impregnada (figs. 264-266). Progressivament aquesta migració es fa més massiva (fig. 267). Al cap d'un cert temps d'iniciada aquesta migració i durant els primers estadis de la formació del pseudoblastema (24 h - 6 dies), el teixit vasofibrós de les proximitats de la cremada es veu empobrit de cèl.lules vasocentrals, fet que s'observa molt clarament en la zona que envolta el canal hemocelòmic ventral (figs. 267-269). Posteriorment, entre 8 i els 36 dies s'observa un increment de la presència de cèl.lules vasocentrals en el teixit vasofibrós, inclús per sobre dels valors normals, especialment en l'estadi de 15 dies (fig. 270). Als 63 dies, una vegada s'ha disgregat el pseudoblastema, el teixit vasofibrós presenta un aspecte normal (fig. 271).

**Fig. 264.** A les 24 h, es pot observar una migració massiva de les cèl.lules vasocentrals cap a la zona immediatament inferior del front de precipitats de nitrat de plata (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. AG: front de precipitats del nitrat de plata. NC: cordó nerviós. VC: cèl.lules vasocentrals. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 265.** Teixit vasofibrós en les proximitats del vas cel.lòmic ventral en el qual es troba el cordó nerviós. Coloració hematoxilina/eosina. H: vas hemocel.lòmic ventral. NC: cordó nerviós. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 266.** A les 4 hores de la realització de la cremada, s'observa com les cèl.lules vasocentrals se separen del teixit vasofibrós per iniciar la migració (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 267.** A les 24 h, la migració de cèl.lules vasocentrals persisteix. En el teixit vasofibrós resten pràcticament només cèl.lules vasofibroses, caracteritzades per una pigmentació marronosa, mentre que s'hi veuen poques cèl.lules vasocentrals, de citoplasma eosinòfil. Coloració hematoxilina/eosina. VC: cèl.lula vasocentral. VF: cèl.lula vasofibrosa. Barra: 100 µm.

**Fig. 268.** Als 5 dies, el teixit vasofibrós es veu considerablement empobrit en cèl.lules vasocentrals. A molts punts del teixit vasofibrós es veuen espais buits (fletxes) on abans hi havia hagut les cèl.lules vasocentrals. Coloració hematoxilina/eosina. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 269.** Als 6 dies de la realització de la cremada, el pseudoblastema es veu ben constituït, mentre que el teixit vasofibrós resta força empobrit en cèl.lules vasocentrals. Coloració hematoxilina/eosina. P: pseudoblastema. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 270.** Als 15 dies s'observa un increment de cèl.lules vasocentrals en el teixit vasofibrós, amb grups de cèl.lules vasocentrals molt conspicus a l'interior de les fibres vasofibroses (fletxes). Coloració hematoxilina/eosina. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

**Fig. 271.** Als 2 mesos, en exemplars en els quals el pseudoblastema ja està pràcticament disgregat, el teixit vasofibrós presenta un aspecte normal. Coloració hematoxilina/eosina. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

## Reepitelització

La pèrdua de la forma columnar de l'epiteli per començar a adoptar la forma aplatada s'observa a les 48 h, poc abans de començar l'esqueixement dels teixits (fig. 272). La migració s'inicia quan els teixits malmesos ja s'han començat a separar a les zones perifèriques de la cremada, cap als 3 dies, a partir de l'epiteli no malmès dels marges de la cremada.

En aquestes fases inicials es pot veure com les cèl.lules epitelials marginals s'estiren en direcció al centre de la cremada i inicien la migració per sobre els acumulats de cèl.lules vasocentrals (fig. 273). Atès que la massa de teixit cremat es va separant progressivament de forma centripeta, els marges ja es comencen a epitelitzar quan en la part central els teixits malmesos encara no s'han separat (fig. 254).

---

**Fig. 272.** Cremada a les 48 h. L'epiteli dels marges de la cremada inicia la migració adoptant una forma aplatada, quasi al mateix temps que es produeix el trencament dels teixits (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. AG: front de precipitats de nitrat de plata. ME: epiteli migratori. NE: epiteli normal. VC: acúmulo de cèl.lules vasocentrals. Barra: 100 µm.

**Fig. 273.** Marge d'avanç (fletxa) de l'epiteli que migra per sobre el pseudoblastema. E: epiteli migratori. P: pseudoblastema. Barra: 10 µm.

**Fig. 274.** Als 5 dies, es pot observar a una certa distància dels marges de la cremada, com l'epiteli perd la forma columnar (fletxa) per iniciar la migració. Coloració hematoxilina/eosina. ME: epiteli migratori. NE: epiteli normal. Barra: 100 µm.

**Fig. 275.** Detall de la figura anterior. Es pot veure com les cèl.lules epitelials mantenen les unions laterals a la part apical (fletxa), mentre que resten separades en les porcions basals (doble fletxa). En la part basal, contactant amb el substrat, s'observen perllongacions citoplasmàtiques a modus de pedicels (puntes de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 10 µm.

**Fig. 276.** Cremada als 5 dies. Un cop finalitzada la reepitelització, l'epiteli que recobreix el pseudoblastema té un aspecte molt aplatat. S'observen sovint espais entre les seves parts basals i el pseudoblastema (fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 277.** Als 15 dies, l'epiteli té una morfologia cuboidal. S'observen algunes dilatacions de l'espai intercel·lular a nivell de les unions laterals (fletxa). Les parts basals de l'epiteli estan ben adherides al substrat. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

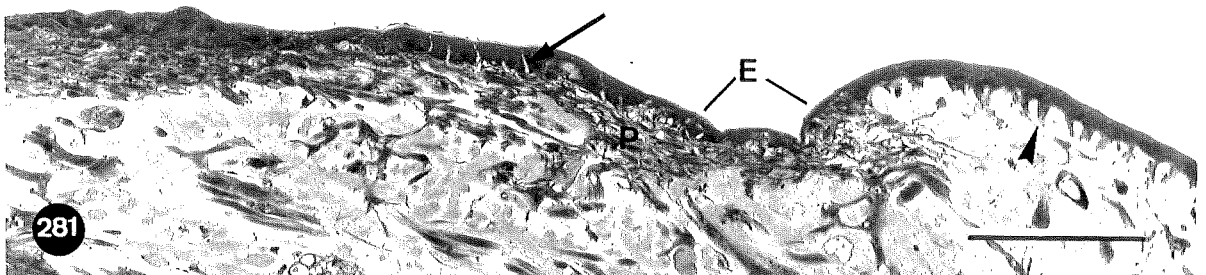
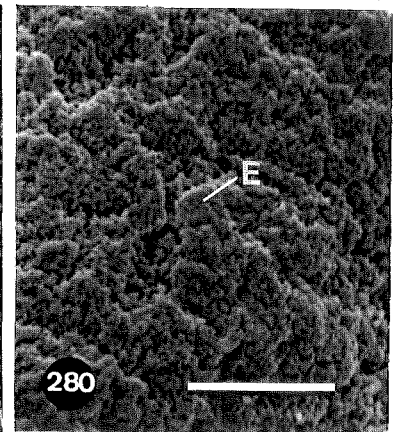
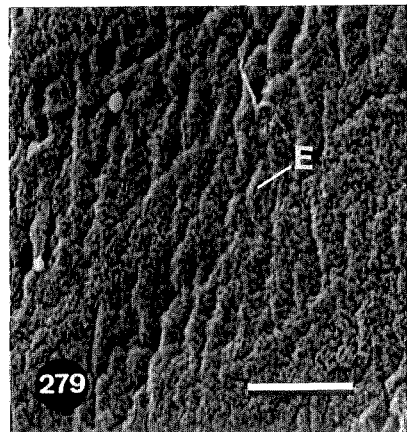
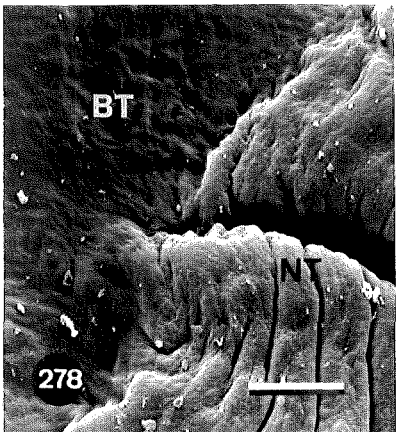
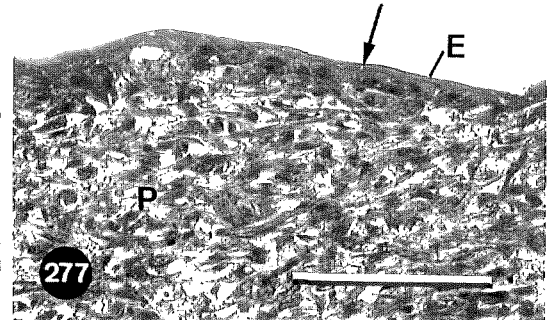
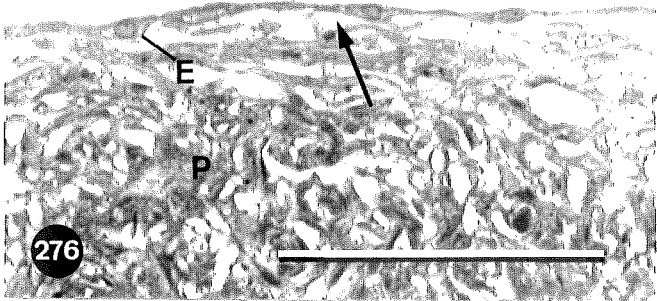
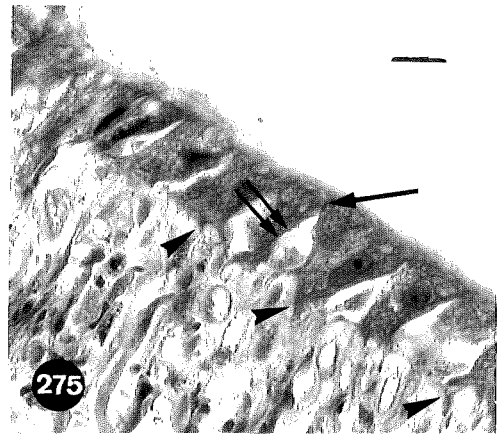
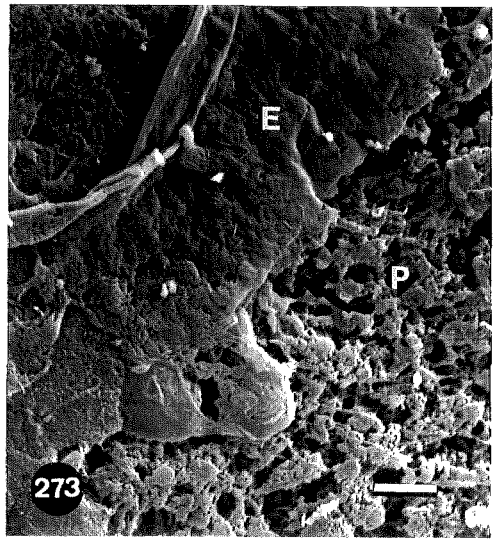
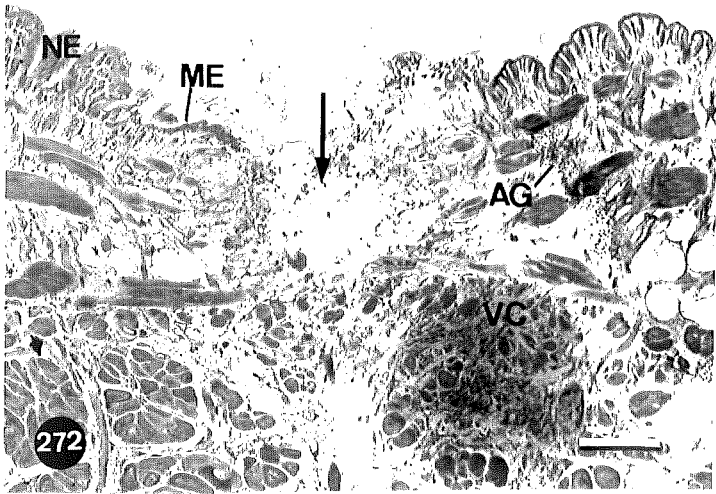
**Fig. 278.** Zona dels marges de la cremada als 15 dies de la seva realització. El tegument de la cremada presenta un aspecte llis i estirat. BT: tegument de la cremada. NT: tegument normal. Barra: 100 µm.

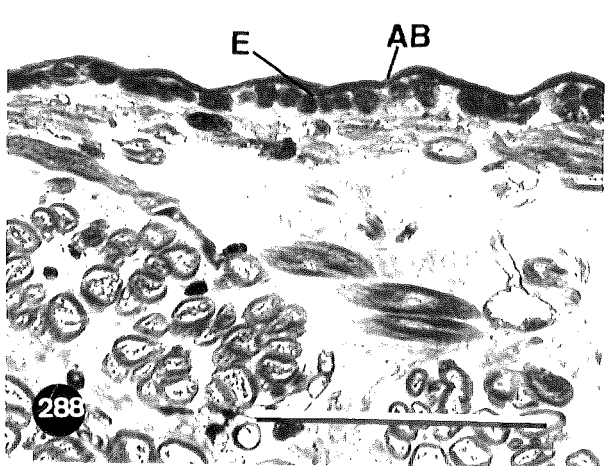
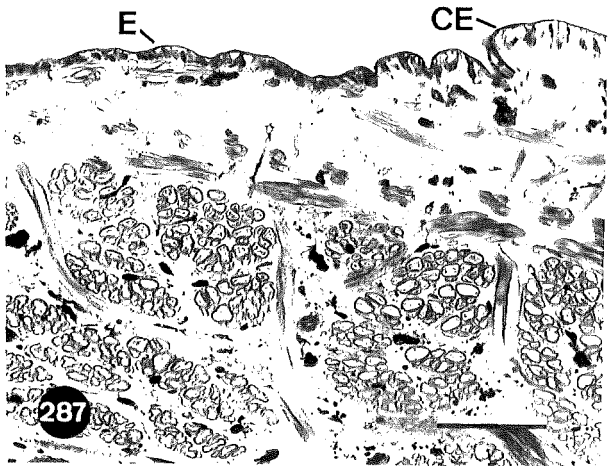
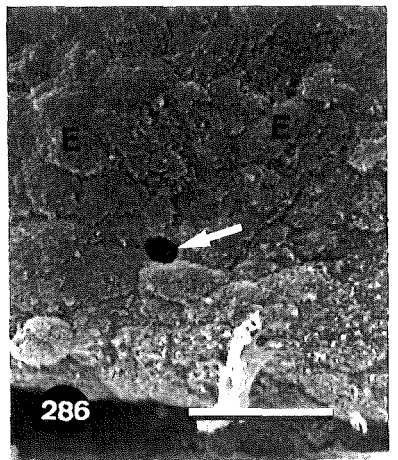
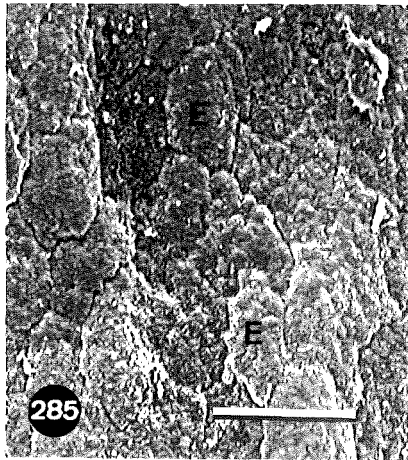
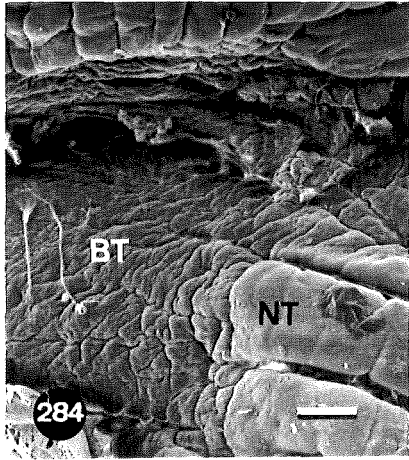
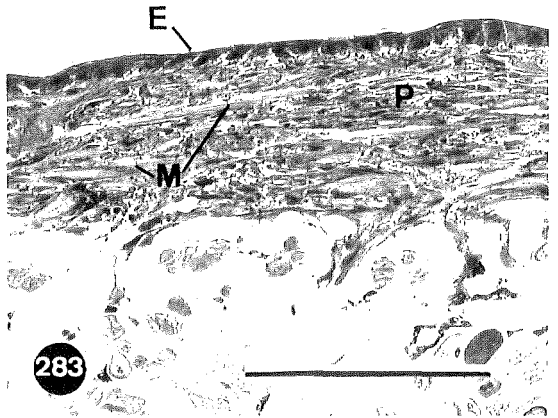
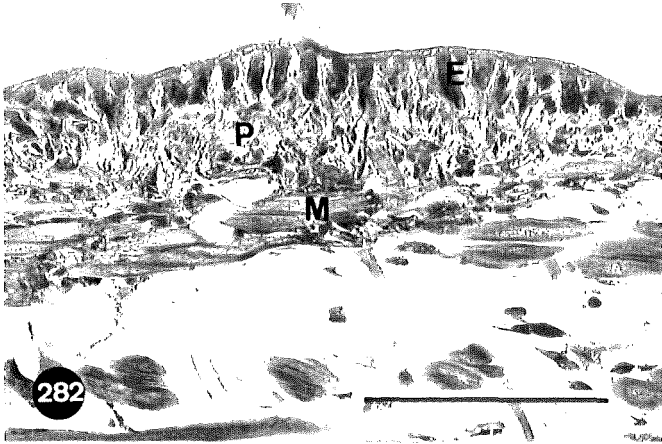
**Fig. 279.** Detall de l'epiteli de sobre la cremada de 15 dies. Observi's que les cèl.lules presenten una morfologia encara força allargada en la direcció en la qual havien migrat. E: cèl.lula epitelial. Barra: 10 µm.

**Fig. 280.** Detall de l'epiteli normal. E: cèl.lula epitelial. Barra: 10 µm.

**Fig. 281.** Cremada de 15 dies. Algunes cèl.lules mostren una distribució zonal, amb el nucli basal i unions en una banda apical, mentre que les porcions basals queden separades (fletxa). Als marges de la cremada es veu, en algunes cèl.lules epitelials, el desplaçament de la porció basal cap a l'interior de la dermis, per adoptar la forma columnar (punta de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.







Als marges de la cremada, sobre el teixit sà, s'observa com l'epiteli té morfologies intermitjes entre les cèl.lules columnars típiques i les cèl.lules aplatades migratòries (fig. 274). En fases avançades del procés de reepitelització, en la zona on comença la diferenciació, s'observen cèl.lules prismàtiques, una mica més curtes i més amples (18 X 9  $\mu\text{m}$ ) que les cèl.lules de l'epiteli normal (31 X 5  $\mu\text{m}$ ), i que estan separades del teixit connectiu en les seves parts laterals, observant-se espais buits entre les cèl.lules exepte en la part més apical, on es manté una banda de citoplasma que les uneix (figs. 274 i 275). Les parts basals contacten amb el substrat per mitjà de pedicels (fig. 275). Aquesta zona d'epiteli de morfologies intermitges, que va de l'epiteli normal fins al marge de la ferida, afecta a uns 0,5-1,5 mm (fig. 257) en la fase última de la migració, i ve a representar la zona que ha realitzat l'aport d'epiteli per recobrir la cremada.

La fase migratòria de la reepitelització finalitza cap els 5 dies. El nou epiteli està format per cèl.lules molt planes, de 4,5-6  $\mu\text{m}$  de gruix en la part on hi ha el nucli per 25-35  $\mu\text{m}$  de llarg en la direcció d'avanç (fig. 276). Aquestes cèl.lules no estan unides al pseudoblastema en la totalitat de les seves parts basals sino que s'observen molts espais.

Progresivament, degut a l'aport de nou epiteli a partir dels marges de la cremada, les cèl.lules epitelials que recobreixen el pseudoblastema pasen d'una morfologia aplatada a una cuboidal, les quals, cap als 15 dies, tenen uns 12,5  $\mu\text{m}$

---

**Fig. 282.** Epiteli a sobre d'una cremada de 36 dies. En aquesta zona, l'epiteli ha recobrat la forma columnar. Coloració hematoxilina/eosina.. E: epiteli. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 283.** Una altra zona de la cremada de 36 dies de la figura precedent. En aquesta zona no s'ha recuperat la morfologia columnar. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 284.** Zona al marge d'una cremada de 30 dies. El tegument de la zona cremada ja no presenta un aspecte tan llis com en l'estadi de 15 dies (fig. 258). BT: tegument de la cremada. NT: tegument normal. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 285.** Detall de l'epiteli de sobre una cremada de 30 dies. Les cèl.lules encara presenten una morfologia una mica allargada en la direcció d'avanç. E: cèl.lula epitelial. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 286.** Detall de l'epiteli normal proper a la cremada. Es pot apreciar l'obertura d'una glàndula mucosa de tegument (fletxa). E: cèl.lula epitelial. Barra: 10  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 287.** Als 2 mesos de realitzada la cremada, quan el pseudoblastema ja ha estat disgregat, les cèl.lules epitelials de la zona cicatricial encara mantenen una morfologia cuboidal, mentre que les del marge de la cremada ja han adoptat la forma columnar. Coloració hematoxilina/eosina. E: epiteli cuboidal. CE: epiteli normal columnar. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .

**Fig. 288.** Detall de la zona cicatricial als 2 mesos. Les cèl.lules epitelials, de morfologia més o menys cuboidal, mostren una distribució zonal, amb una banda apical amb unions laterals i les porcions basals separades i immerses en la dermis. Coloració hematoxilina/eosina. AB: banda apical. E: epiteli. Barra: 100  $\mu\text{m}$ .



d'alçària per 11-19  $\mu\text{m}$  de llargària en la direcció d'avanç (fig. 277). En MES el tegument ofereix un aspecte molt llis, amb les cèl.lules epitelials encara estirades en la direcció en la qual han avançat (figs. 278-280). A nivell del complex de unió de les cèl.lules epitelials s'observen dilatacions de l'espai intercel.lular, típiques d'estadis en els que l'epiteli està estirat. En aquest estadi ja no s'observen separacions entre part basals de les cèl.lules epitelials ni entre aquestes i el pseudoblastema, formant l'epiteli una capa continua ben adherida al substrat (fig. 277).

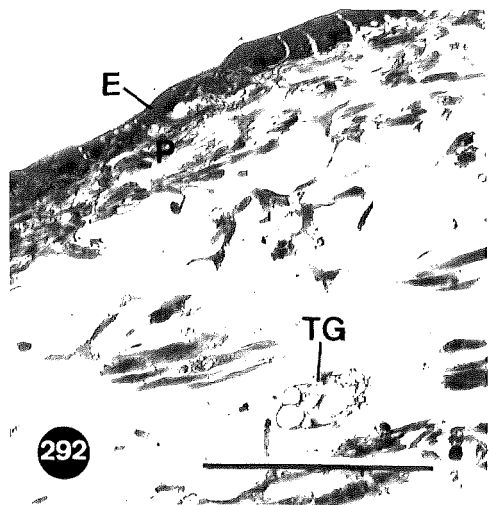
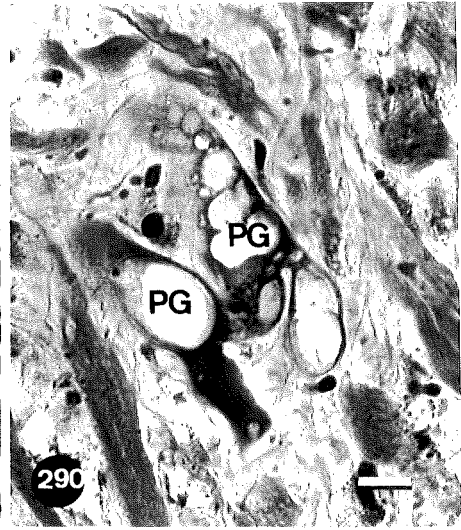
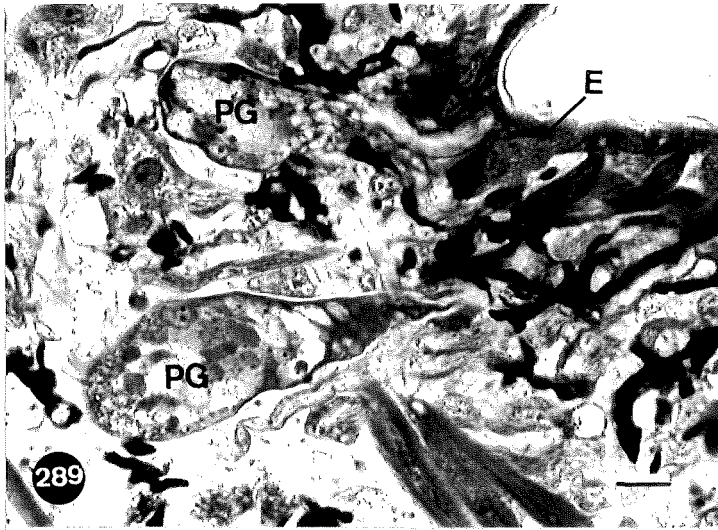
En les zones perifèriques de l'epiteli que recobrix el pseudoblastema, algunes cèl.lules epitelials recobren la seva distribució zonal, amb unions només en la part apical i parts basals separades, mantenint però la morfologia cuboidal (fig. 281). Més als marges de la cremada, sobre teixit sà, es veuen algunes cèl.lules que recobren l'aspecte columnar, produint-se una elongació de la part basal de les cèl.lules cap a l'interior del teixit connectiu subjacent, mentre els nuclis encara resten en la part apical (fig. 281).

Al cap d'un mes de realitzada la cremada, es pot observar com les cèl.lules epitelials, sota les quals encara es troba el pseudoblastema, recobren en algunes petites zones la forma columnar, amb uns 6,5  $\mu\text{m}$  de diàmetre en la zona basal per 22-27  $\mu\text{m}$  d'alçària, mentre que la resta manté una morfologia cuboidal (figs. 282 i 283). En MES l'aspecte del tegument no és ja tan llis (fig. 284), però encara s'observa que les cèl.lules del pseudoblastema estan lleugerament estirades en la direcció d'avanç (figs. 285 i 286). En aquest estadi encara s'observen moltes boses intercel.lulars a nivell del complex de unió (fig. 282).

L'epiteli cicatricial està format per cèl.lules més o menys cuboidals, d'uns 9-10  $\mu\text{m}$  d'alçària per 10-11 d'alçària, molt poques de les quals tenen la morfologia típica de l'epiteli columnar. Es distingeix, però, una zona apical on les membranes laterals estan unides amb les de les cèl.lules veïnes i una zona mediobasal, que conté el nucli, on les cèl.lules veïnes resten força separades unes de les altres per travecules de teixit connectiu (figs. 287 i 288). Aquest tret les distingeix de l'epiteli cuboidal de les etapes immediatament posteriors a la reepitelització, en les que les cèl.lules epitelials estan unides a les cèl.lules veïnes a tot el llarg de la membrana lateral i el nucli té encara una posició central.

## **Regeneració de les glàndules epitelials mucoses**

Durant el procés de reepitelització no s'observa que hi participin els elements glandulars. En l'epiteli columnar dels marges de la ferida, abans de que iniciï la migració, es poden observar cèl.lules glandulars que han alliberat quasi tot el seu contigut i es troben en procés de degeneració, amb el citoplasma molt vacuolat (figs. 289-291). En estadis posteriors, cap als 15 dies, quan la ferida ja ha estat reepitelitzada, encara es poden observar algunes glàndules tubulars en procés de degeneració (fig. 292).



**Fig. 289.** Als 5 dies, en la zona dels marges de la cremada, es poden observar glàndules piriformes vacuolades. Coloració hematoxilina/eosina. E: cèl.lula epitelial. PG: glàndula piriforme degenerada. Barra: 10  $\mu$ m.

**Fig. 290.** Glàndula piriforme degenerada a nivell del marge d'una cremada de 5 dies. Observi's que els grànuls secretors estan molt desestructurats. Coloració hematoxilina/eosina. PG: glàndula piriforme degenerada. Barra: 10  $\mu$ m.

**Fig. 291.** Al marge d'una cremada de 5 dies es poden observar glàndules piriformes degenerades. Coloració hematoxilina/eosina. PG: glàndula piriforme degenerada. Barra: 100  $\mu$ m.

**Fig. 292.** Cos cel·lular d'una glàndula tubular degenerada sota d'una cremada de 15 dies. Coloració hematoxilina/eosina. E: epitel·li. P: pseudoblastema. TG: glàndula tubular. Barra: 100  $\mu$ m.

Durant un cert temps en el nou epitelí no s'hi observa cap element glandular.

Al voltant de un mes de la realització de la cremada, entre les cèl·lules epitelials que recobreixen el pseudoblastema, es poden apreciar cèl·lules que, amb MO, presenten un citoplasma més clar i finament granulat (fig. 293). El nucli és ovalat, d'uns 7 X 5,5 µm, i sovint s'hi observen dos nucleols (fig. 294).

En el cas de diferenciació cap a glàndules piriformes, la granulació, que en un principi era lleugerament basòfila, s'enriqueix amb uns grànuls una mica més grans i lleugerament eosinòfils (fig. 295). Progressivament els grànuls de secreció desplacen el nucli i el citoplasma a una posició més basal, fins que queden aplatats a la base (figs. 296-298). A mesura que la glàndula va madurant els cossos cel·lulars s'internen en la dermis (fig. 299).

No s'han pogut observar estadis intermitxos de la diferenciació de cèl·lules epitelials a glàndules tubulars, però sí que s'ha pogut observar la presència d'algun conducte de secreció en l'epitelí que recobreix la zona cicatricial (fig. 299).

---

**Fig. 293.** En l'epitelí cicatricial d'una cremada de 30 dies es pot observar una cèl·lula epitelial més clara, el citoplasma de la qual té una fina granulació basòfila. Coloració hematoxilina/eosina. CE: cèl·lula epitelial clara. E: cèl·lula epitelial. M: fibra muscular. P: pseudoblastema. Barra: 100 µm.

**Fig. 294.** Cèl·lula epitelial clara d'un epitelí cicatricial de 30 dies. El citoplasma és finament granulat i en el nucli s'observen dos nucleols. Coloració hematoxilina/eosina. CE: cèl·lula epitelial clara. E: cèl·lula epitelial. PC: cèl·lula del pseudoblastema. Barra: 10 µm.

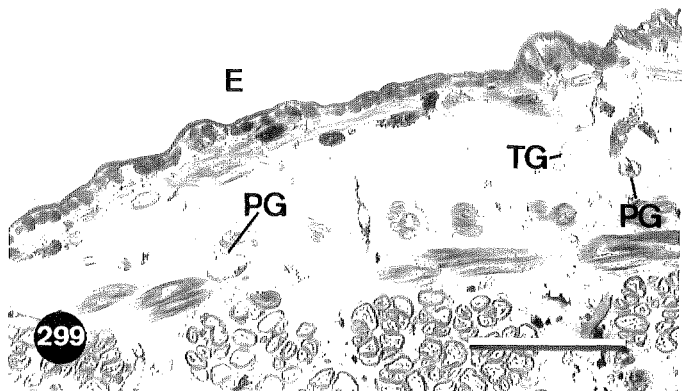
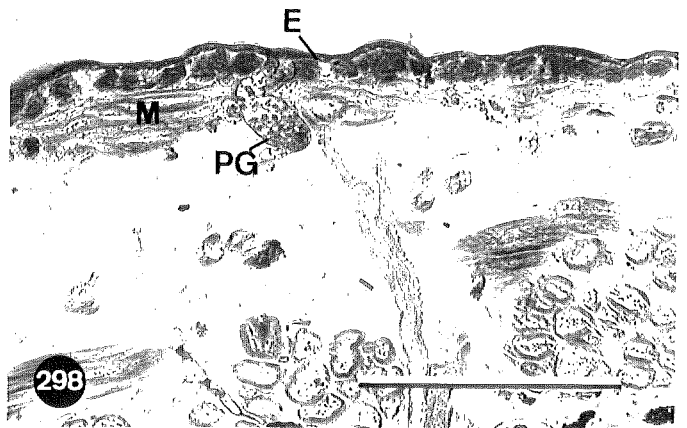
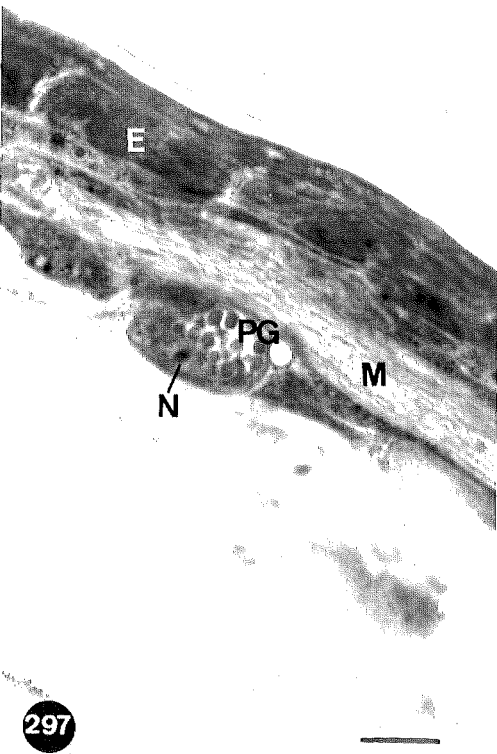
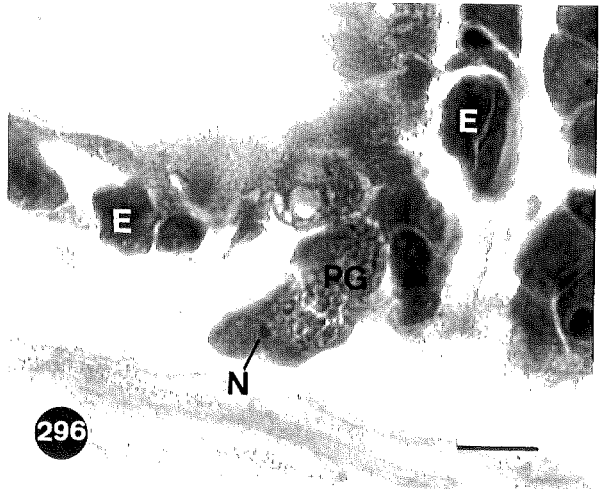
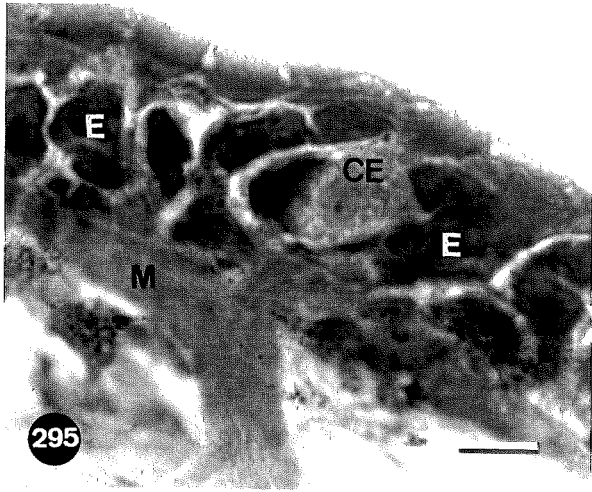
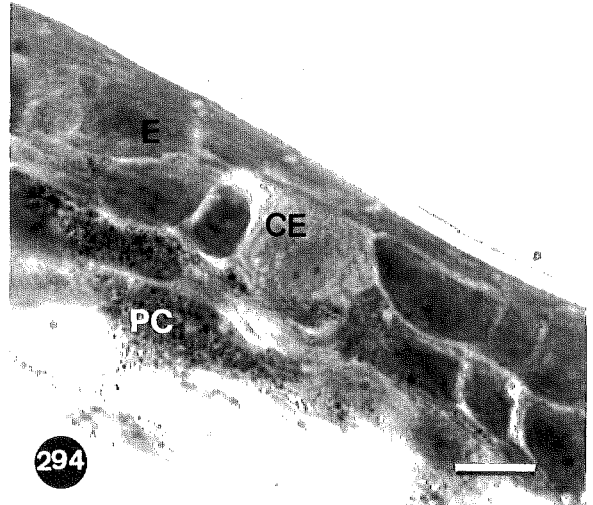
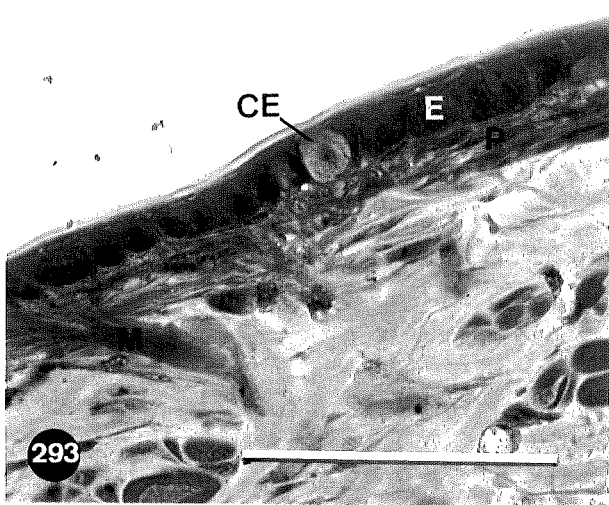
**Fig. 295.** Cèl·lula epitelial clara en l'epitelí cicatricial de 30 dies. En el citoplasma es poden observar grànuls lleugerament eosinòfils. Coloració hematoxilina/eosina. CE: cèl·lula epitelial clara. E: cèl·lula epitelial. M: fibra muscular. Barra: 10 µm.

**Fig. 296.** Glàndula piriforme jove al marge d'una cremada de 30 dies. El cos cel·lular està ple de grànuls eosinòfils (fletxa) i el nucli es troba en la part basal. Coloració hematoxilina/eosina. E: cèl·lula epitelial. N: nucli. PG: glàndula piriforme jove. Barra: 10 µm.

**Fig. 297.** Glàndula piriforme jove al marge d'una cremada de 30 dies. Coloració hematoxilina/eosina. E: cèl·lula epitelial. M: fibra muscular. PG: glàndula piriforme jove. N: nucli. Barra: 10 µm.

**Fig. 298.** Glàndula piriforme jove al marge d'una cremada de 2 mesos. Coloració hematoxilina/eosina. E: epitelí. M: fibra muscular. PG: glàndula piriforme jove. Barra: 100 µm.

**Fig. 299.** Zona cicatricial d'una cremada de 2 mesos. Es veuen glàndules piriformes i el conducte secretor d'una glàndula tubular. Coloració hematoxilina/eosina. E: epitelí. PG: glàndula piriforme jove. TG: conducte secretor d'una glàndula tubular. Barra: 100 µm.



## Regeneració del teixit cicatricial

Al cap d'uns dos mesos es veu encara una depressió en la zona cicatricial. S'observa que el pseudoblastema està totalment disgregat (fig. 300). Les capes musculars perdudes no s'han regenerat i el teixit connectiu dèrmic tampoc. El nou epiteli queda pràcticament adjacent a la musculatura, amb molt poc teixit connectiu entre mig (figs. 298 i 299).



**Fig. 300.** Als 2 mesos de la realització de la cremada, el pseudoblastema està pràcticament disgregat. Observi's que, en al zona cicatricial, l'epiteli està en contacte molt estret amb les capes de la musculatura circular, ja que no s'ha regenerat el teixit perdut. Coloració hematoxilina/eosina. BT: teixit cicatricial de la cremada. E: epiteli. M: musculatura circular. NT: teixit normal. Barra: 100  $\mu$ m.

## **ESTUDI DE L'ACTIVITAT MITÒTICA EN EL PROCÉS DE REGENERACIÓ**

L'estudi de la proliferació cel.lular en el procés de regeneració s'ha intentat realitzar mitjançant la detecció de figures mitòtiques i amb mètodes de marcatge per incorporació de 5-bromo-2'-deoxi-uridina (BrdU)

### **Detecció de figures mitòtiques**

En l'estudi de les sèries temporals de regeneració de ferides, tant de talls per congelació, parafina o glicol-metacrilat, no s'han observat figures mitòtiques.

El tractament previ al sacrifici amb colquicina en una sèrie de sangoneres amb diferents temps de regeneració, tampoc ha donat resultats positius.

Tampoc s'han observat figures mitòtiques en preparacions obtingudes pel mètode de "squash" tenyides amb coloracions cromosòmiques.

### **Detecció de proliferació cel.lular per incorporació de BrdU**

Les diferents proves d'incorporació de BrdU i posterior marcatge amb anticossos monoclonals no han donat cap resultat positiu en sangoneres adultes.

No s'ha observat marcatge nuclear ni en teixits en regeneració, ni en teixits circumdants. Tampoc s'ha observat marcatge en altres teixits en els que s'esperaria trobar proliferació cel.lular, com ara a nivell de la línia germinal masculina al testis o en teixits subjectes a freqüent desgast, com l'epiteli intestinal.

En un exemplar immadur corresponent a la prova nº 6, d'aproximadament un mes d'edat, el qual havia realitzat un sol àpat amb granotes, si s'han obtingut resultats positius. En aquest exemplar s'havia practicat una ferida ventral per incisió 5 dies abans del sacrifici i s'havia incubat amb BrdU durant les 48 h precedents al sacrifici. S'observa marcatge en les cèl.lules epitelials intestinals, teixit vasofibrós, especialment al voltant de l'intestí, i cèl.lules del pseudoblastema (figs. 301-304). No s'observa marcatge en altres zones, incloent-hi l'epidermis. Pràcticament totes les cèl.lules epitelials del tub digestiu principal estan marcades, però no s'observa marcatge a nivell dels cegs intestinals (fig. 301). El teixit vasofibrós mostra un marcatge més difús i és difícil distingir si és a les cèl.lules vasofibroses o a les vasocentrals, atès que en exemplars immadurs les primeres estan encara poc diferenciades. Aparentment, les cèl.lules marcades semblen cèl.lules vasocentrals en migració (fig. 302). El pseudoblastema, que es troba en fase de retracció, mostra un marcatge abundant, si bé no totes les zones del pseudoblastema estan marcades (fig. 303). En les immediacions del

pseudoblastema s'observen cèl.lules marcades, possiblement cèl.lules vasocentrals en migració.

En el segon exemplar de la prova nº 6, processat en les mateixes condicions que l'anterior però que va morir unes 24 h abans del sacrifici previst, també s'ha observat marcatge. L'epidermis i la part central de l'animal no s'han conservat, restant únicament la paret corporal. En aquest cas el marcatge està distribuït per tot el teixit connectiu, sense que es pugui distingir a quin tipus cel.lular correspon (fig. 305). No s'observa marcatge en les cèl.lules musculars.

Els controls fets amb llengua de ratolí i teixits meristemàtics d'alzina surera han donat resultats clarament positius en tots els diferents experiments. Els bacteris nefridials de la sangonera també han donat resultats positius, tant en sangoneres madures com immadures (fig. 306).

En totes les proves s'observa marcatge inespecífic amb l'anticòs primari dels grànuls de les cèl.lules vasofibroses, que queden marcats inclús sense incubar amb BrdU.

**FIGS. 301-306.** Seccions obtingudes d'exemplars amb ferides de 5 dies i incubats amb BrdU, corresponents a la prova nº 6. La detecció d'aquest anàleg de la timidina s'ha realitzat amb anticossos monoclonals. L'anticòs secundari estava marcat amb peroxidasa, per la qual cosa els positius es detecten per la presència d'un precipitat marronós.

**Fig. 301.** Zona peridigestiva. S'observa marcatge a nivell dels nuclis de l'epiteli intestinal (fletxa) i a nivell del teixit vasofibrós que envolta el tub digestiu (doble fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. I: intestí. IC: cec intestinal. Barra: 100 µm.

**Fig. 302.** Detall de la figura precedent. Coloració hematoxilina/eosina. IE: epiteli intestinal. V: teixit vasofibrós. Barra: 100 µm.

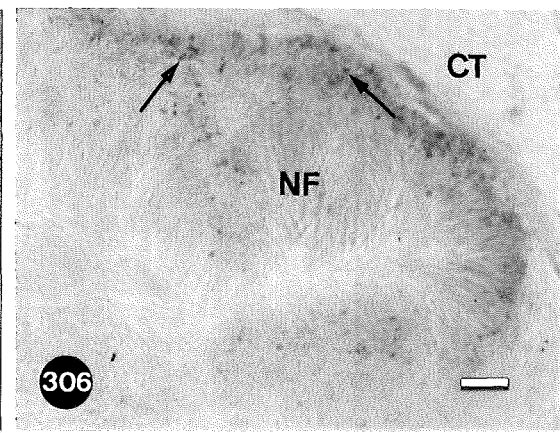
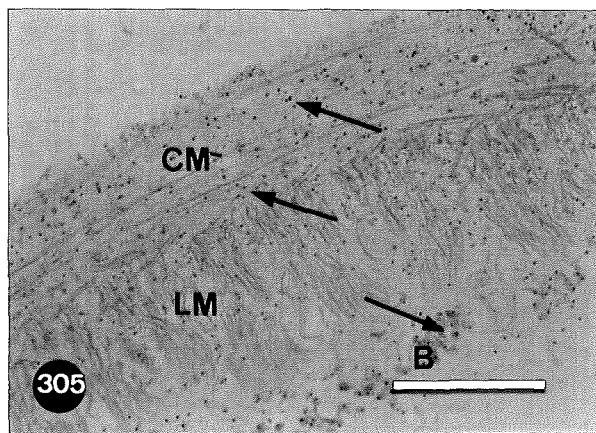
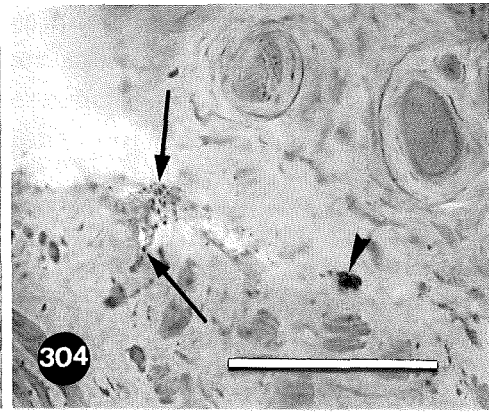
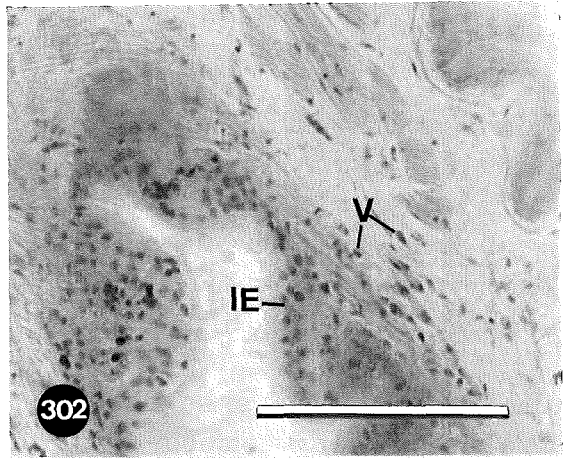
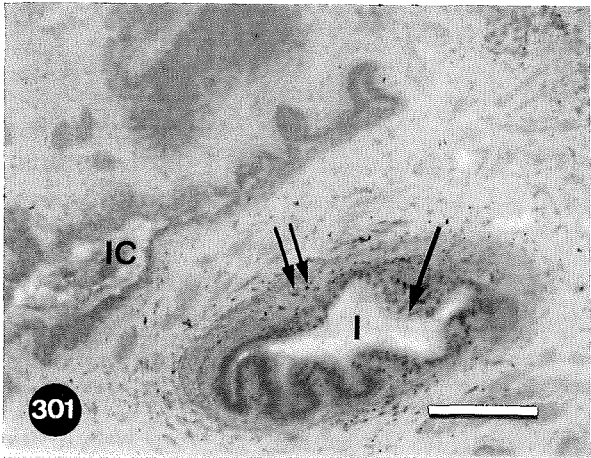
**Fig. 303.** Pseudoblastema d'una ferida per incisió de 5 dies. Algunes cèl.lules del pseudoblastema presenten marcatge (fletxa), especialment en la zona de la falca de retracció, mentre que altres no (doble fletxa). Observi's la presència d'algunes cèl.lules marcades en la proximitat del pseudoblastema (punta de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100 µm.

**Fig. 304.** Pseudoblastema d'una ferida per incisió de 5 dies, amb algunes cèl.lules marcades (fletxes). En les proximitats del pseudoblastema, també s'observen cèl.lules marcades (punta de fletxa). Coloració hematoxilina/eosina. Barra: 100 µm.

**Fig. 305.** Exemplar incubat amb BrdU, el qual havia mort 24 h abans de ser fixat. La paret del cos està força desestructurada i manca l'epiteli. Es veuen cèl.lules marcades a nivell de tot el teixit connectiu (fletxa) i també a nivell del teixit botridial. Coloració hematoxilina/eosina. B: teixit botridial. CM: musculatura circular. LM: musculatura longitudinal. Barra: 100 µm.

**Fig. 306.** Bacteris nefridials marcats (fletxa) en un exemplar incubat amb BrdU. Coloració hematoxilina/eosina. CT: teixit connectiu. NF: nefridi. Barra: 10 µm.

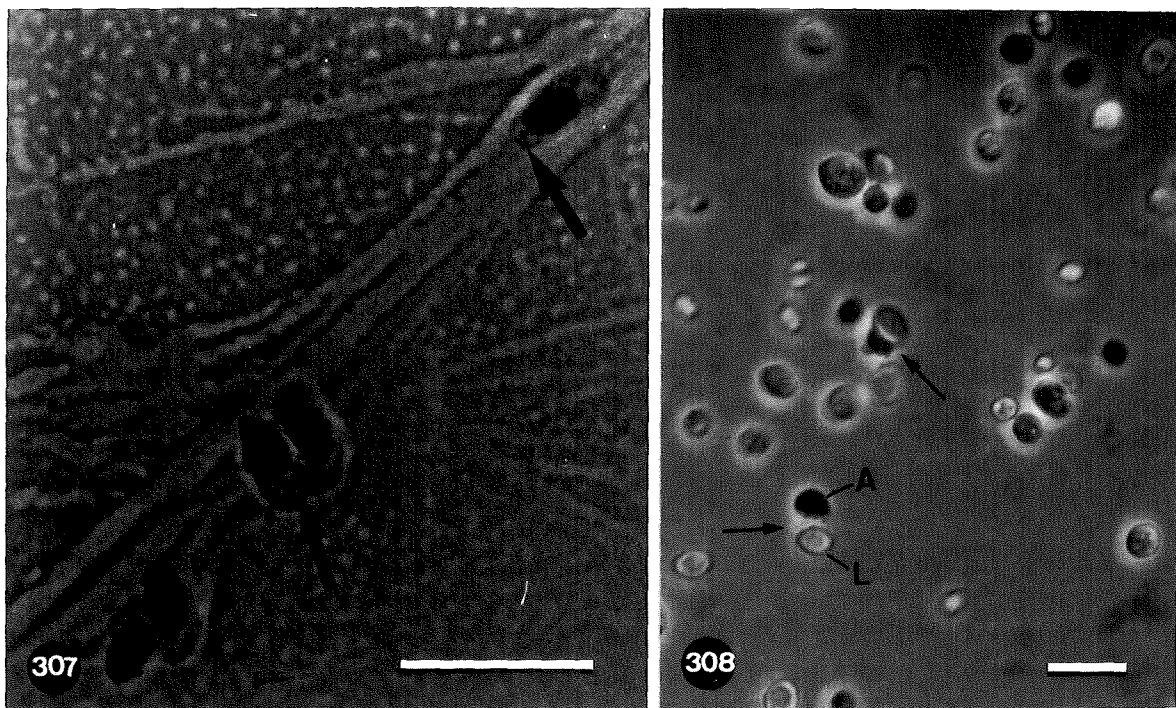




## ACTIVITAT FAGOCÍTICA DELS AMEBÒCITS

Els amebòcits mostren activitat fagocítica *in-vitro*. Els amebòcits han estat aïllats i incubats amb solució fisiològica de Nicholss i Kuffler per hirudinis i diferents agents a sobre d'un portaobjectes. La fagocitosis de carbó coloidal s'observa al cap de 30 minuts d'incubació (fig. 307). El bacteri *Escherichia coli* i el llevat *Saccharomyces cerevisiae* no són fagocitats, però si s'observa una adhesió dels amebòcits a aquests corpuscles mitjançant els filopodis (fig. 308). No s'observa fagocitosis ni adhesió d'eritròcits de vaca.

*In-vivo* no s'han observat amebòcits participant en la fagocitosis dels teixits malmesos per la ferida ni en la formació del pseudoblastema. Tampoc s'ha observat cap amebòcit en els vasos hemocelòmics que presenti restes d'activitat fagocítica. Si s'han observat alguns amebòcits per sobre de la ferida o entre les restes de teixit en els primers estàdis de regeneració, però són cèl.lules que presenten un nucli picnòtic i probablement corresponen a cèl.lules hemocelòmiques que s'han alliberat al trencar-se els capil.lars.



**Fig. 307.** Fagòcits aïllats i incubats a sobre un portaobjectes amb solució fisiològica, en la qual s'havia afegit carbó coloidal. Als 30 minuts d'incubació, es pot observar que les cèl.lules han incorporat el carbó (fletxes). Microscòpia de contrast de fases. Barra: 10 µm.

**Fig. 308.** Fagòcits aïllats i incubats a sobre un portaobjectes amb una suspensió de llevats *Saccharomyces cerevisiae*. Els llevats no són fagocitats, però s'observa adhesió d'aquests per part dels fagòcits per mitjà de filopodis (fletxes). Microscòpia de contrast de fases. A: amebòcit. L: llevat. Barra: 10 µm.

## DISCUSSIÓ

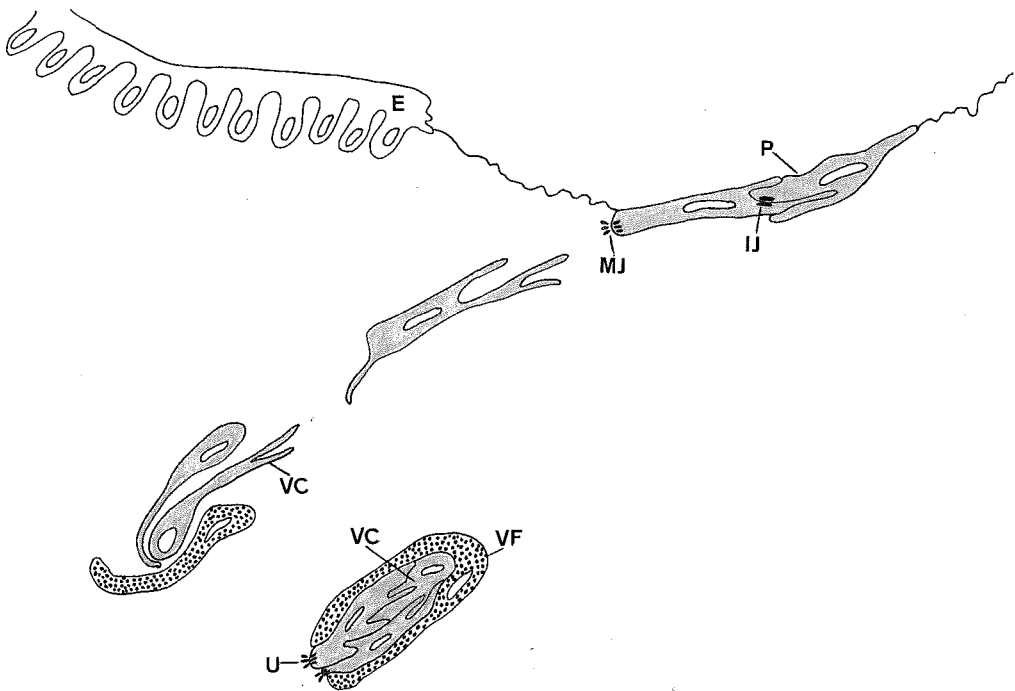
El tancament ràpid i la regeneració dels teixits afectats són fets molt importants en el procés de curació de ferides. La contracció muscular que s'observa en realitzar la ferida, és un mecanisme ràpid de tancament de mitjana eficàcia, comú en hirudinis (LeGore i Sparks, 1971; Sawyer, 1986) i en d'altres anèl·lids (Sparks, 1972). La formació d'un tap cel·lular, el pseudoblastema, és un mecanisme més eficient de tancament de la ferida. El pseudoblastema compleix inicialment una funció de taponament, anàloga a la de la coagulació de la sang en els vertebrats, a la de la coagulació de l'hemolimfa i agregació d'hemòcits en els artròpodes (Gupta, 1986) i a la de la formació d'acúmul de cèl·lules celòmiques en els oligoquets (Sparks, 1972, Burke, 1974 c). Mentre que en els oligoquets i els poliquets les cèl·lules celòmiques del tap són substituïdes posteriorment per blastòcits que formen un blastema capaç de regenerar parts amputades del cos (Chapron, 1964; Douglas, 1970; Jamieson, 1981), a *Hirudo medicinalis*, el pseudoblastema intervé en la regeneració d'una matriu connectiva cicatricial, però no té la capacitat regeneradora d'un veritable blastema. L'epitelització de la ferida, que es dona un cop consolidat el tap cel·lular, tanca definitivament la ferida i inicia el procés de regeneració, tal com succeeix en altres hirudinis (Myers, 1935; LeGore i Sparks, 1971; Cornec, 1984) i oligoquets (Burke, 1974 a i b; Jamieson, 1981).

El procés de reparació de ferides estudiat a *Hirudo medicinalis* presenta diferències i similituds remarcables en relació al dels mamífers. El procés de regeneració en els mamífers, en línees generals, consta d'una fase inflamatòria, formació del teixit de granulació, reepitelització i formació d'una escara fibrosa o regeneració dels teixits (Clark, 1988). A *Hirudo medicinalis* no hi ha un equivalent de la reacció inflamatòria, però hi ha alguns fenòmens que són comparables. No s'observa ni vasodilatació ni un procés de coagulació, i les cèl·lules de la sang no estan implicades en el procés de curació. En canvi, es produeix una forma d'edema, del qual les butllofes que es produeixen en les cremades en són indicatives. A més hi ha migració de cèl·lules del teixit connectiu, les cèl·lules vasocentrals, que són responsables, entre d'altres funcions, de la fagocitosi. La formació d'un teixit, el pseudoblastema, que es relaciona amb la regeneració i amb la contracció de la ferida, és, en certa mesura, equiparable al teixit de granulació. El procés de reepitelització presenta una gran similitut amb el que es dona a molts epitelis monoestratificats de vertebrats, tal com es discutirà més endavant.

## PSEUDOBLASTEMA

### Composició cel.lular

En el cas d'*Hirudo medicinalis* (*Arhynchobdellida*), els resultats indiquen que totes les cèl.lules del pseudoblastema provenen dels grups de cèl.lules vasocentrals del teixit vasofibrós. El conjunt de característiques ultraestructurals del citoplasma de les cèl.lules vasocentrals ha permès identificar aquestes cèl.lules en els seus diferents estadis, desde l'estat de repòs, passant per la fase migratòria, a l'estadi d'acumulació per formar el pseudoblastema (fig. 309). Si be els experiments *in vitro* mostren la capacitat fagocítica dels amebòcits, *in vivo*, aquests no participen en la fagocitosi dels teixits malmesos de la ferida ni en la formació del pseudoblastema. Les cèl.lules encarregades de la fagocitosi són les propies cèl.lules vasocentrals. La presència de cèl.lules amb característiques intermitjes entre les cèl.lules fagocítiques i les cèl.lules ordinaries del pseudoblastema dóna una clara evidència del seu origen comú.



**Fig. 309.** Migració de les cèl.lules vasocentrals desde el teixit vasofibrós a la superfície de la ferida. A l'inici de la migració les cèl.lules vasocentrals se separen les unes de les altres i de les cèl.lules vasofibrós, al mateix temps que es desconnecten les unions amb la matriu. Un cop han arribat a la superfície de la ferida s'acumulen per formar el pseudoblastema i formen unions entre elles i amb la matriu. E: epiteli. P: pseudoblastema. MJ: unió especialitzada amb la matriu connectiva. IJ: unió intercel.lular. VC: cèl.lula vasocentral. VF: cèl.lula vasofibrós.

Fischer et al (1976), en el seu treball sobre el teixit vasofibrós a *Haemopsis sanguisuga* (*Arhynchobdellida*), observen la migració de les cèl.lules vasocentrals després d'una ferida i la presència d'aquestes cèl.lules al voltant del tap cel.lular que es forma al lloc de la ferida. Segons Sawyer (1986), les cèl.lules vasocentrals podrien ser fibroblasts en estat de repòs presents en les sangoneres adultes. Fischer et al. (1976) troben una gran similitud entre les cèl.lules vasocentrals i els fibròcits i creuen que les primeres podrien constituir reserves de cèl.lules indiferenciades que, en un cert moment, es podrien transformar en fibròcits.

En el nostre cas, no s'observa cap similitud entre les cèl.lules vasocentrals i els fibròcits d'*Hirudo medicinalis*. Els fibròcits tenen com a característiques importants la presència de vesícules lipídiques grosses, abundància de ribosomes i grànuls de glicogen, mitocòndries molt grosses i algunes vesícules dilatades de contingut electrolúcid. També és característica la presència de petites evaginacions de la membrana plasmàtica paral.leles a la superfície cel.lular. A excepció de l'abundància de ribosomes, cap d'aquestes característiques és comuna amb les cèl.lules vasocentrals. Alguns trets característics de les cèl.lules vasocentrals, com són la presència d'un citosol molt electrodens i l'abundància de vesícules lisosòmiques i feixos de filaments d'actina, no s'observen en els fibròcits. Tampoc sembla que representin reserves de cèl.lules indiferenciades, ja que en l'estadi de repòs són cèl.lules força diferenciades, i en l'activació no es produeix un procés de diferenciació previ evident.

En canvi, en les altres espècies estudiades, totes del grup *Rhynchobdellida*, en la formació del pseudoblastema hi participa més de un tipus cel.lular (vegeu introducció, pàg. 2).

Les diferències de composició cel.lular entre el nostre model i les altres espècies poden ser degudes a les respectives organitzacions dels dos ordres a què pertanyen: *Arhynchobdellida* i *Rhynchobdellida*, que mostren diferències en la morfologia dels sistemes celòmic i sanguini i en la composició del teixit connectiu. Als rincobdèl.lides, les cèl.lules lliures del sistema celòmic, els celomòcits, són diferents de les cèl.lules lliures del sistema sanguini, els amebòcits. En canvi, als arincobdèl.lides, els dos sistemes estan units en un de sol, l'hemoceloma, on només s'hi troba un tipus cel.lular, que s'anomena amebòcit. A més, el teixit vasofibrós és específic dels arincobdèl.lides. Als rincobdèl.lides no s'hi troba aquest teixit. Els cromatòfors hipodèrmics es podrien correspondre amb les cèl.lules vasofibroses, ja que tots dos tipus cel.lulars duen a terme una funció d'excreció per acumulació (Sawyer, 1986).

No és clar si hi ha un tipus cel.lular equivalent a les cèl.lules vasocentrals. De fet, els opleòcits descrits a *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972), que formen un tap cel.lular i regeneren la matriu extracel.lular, es podrien considerar equivalents a les cèl.lules vasocentrals pel seu origen connectiu i la seva funció en el pseudoblastema, tot i que no realitzen la funció fagocitària que sembla estar relegada només als celomòcits. Cornec (1984), també descriu un tipus cel.lular connectiu, ric amb fagosomes i que anomenem fagocitari per diferenciar-lo de les cèl.lules connectives tipus fibròcit. Aquestes cèl.lules, que migren en produir-se la

ferida cap a l'àrea afectada i col·laboren juntament amb les cèl·lules lliures en la formació del pseudoblastema, possiblement es corresponen amb els opleòcits descrits a *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972). A diferència dels opleòcits, si que fan funcions de fagocitosi, tot i que aquesta està compartida amb els celomòcits (Cornec, 1984) i no s'ha descrit la seva intervenció en la regeneració, la qual es relaciona amb els fibròcits que infiltren el pseudoblastema en els últims estadis (Cornec, 1984).

Cornec (1984) correlaciona les diferències en la composició cel·lular del tap en els diferents grups zoològics amb les variacions en la relació celoma/teixit connectiu. El tap està format per cèl·lules d'origen mesodèrmic. En espècies on el celoma està ben desenvolupat (poliquets, oligoquets i artròpodes), està constituït per cèl·lules lliures: celomòcits i/o amebòcits, i a mesura que es redueix el celoma s'incrementa la importància de les cèl·lules connectives (Cornec, 1984).

Els anèl·lids oligoquets, amb un celoma força desenvolupat, representen un extrem d'aquesta gradació, és el cas d'*Eisenia foetida*, amb taps formats per acúmuls de cèl·lules cel·lòmiques (Chapron, 1964; Burke, 1974 c).

Els hirudinis manifesten una reducció del celoma respecte els altres anèl·lids. Per tant, era d'esperar la presència de cèl·lules connectives a més de les cèl·lules lliures, tal com s'observa en les diferents espècies de rincobdèl·lides estudiades (Myers, 1935; LeGore i Sparks, 1971; Sparks 1972; Cornec, 1984). El grup al qual pertany *Hirudo medicinalis*, *Arhynchobdellida*, representa l'altre extrem en aquesta gradació, amb el celoma modificat i molt reduït, i en què el pseudoblastema està format únicament per cèl·lules d'origen connectiu.

## **Estudi del creixement del pseudoblastema**

Durant el procés d'evolució del pseudoblastema s'observa un creixement que es manifesta especialment en les primeres etapes. Aquest creixement pot ser degut només a una aportació per mobilització de cèl·lules vasocentrals que es trobaven en altres zones del cos, o al fet que, a més d'aquesta aportació, hi hagi proliferació de les cèl·lules vasocentrals en el seu lloc d'origen i/o en el pseudoblastema.

Els experiments realitzats per detectar la proliferació cel·lular no són concloents. Les proves no mostren resultats positius a excepció dels dos exemplars immadurs amb ferides per incisió de 5 dies, un dels quals havia mort durant la incubació amb BrdU. *Hirudo medicinalis* sembla mostrar una notable dificultat en incorporar BrdU. En altres hirudinis i invertebrats d'aigua dolça com les planàries, també s'ha descrit la dificultat en incorporar timina tritiada, tot i observar-se proliferació cel·lular (Baguñà et al, 1989; Cornec, 1990).

L'estat de maduració dels individus i l'història alimentària, pot tenir algun efecte, directe o indirecte, en la incorporació del marcador. Els exemplars marcats havien realitzat un sol àpat a base de sang de granotes i el seu teixit vasofibrós encara no estava desenvolupat. En canvi, els exemplars de la mateixa edat però



que no han estat marcats, havien estat alimentats amb sang de mamífer i l'estadi de desenvolupament era lleugerament posterior. Una explicació possible per al marcatge observat en l'exemplar que havia mort durant el període d'incubació -cèl.lules distribuïdes per tot el teixit connectiu- podria ser que aquestes cèl.lules haguessin continuat proliferant durant un cert temps després de la mort de l'animal, sense cap mecanisme que limités la incorporació de la BrdU.

El marcatge inespecífic de l'anticòs anti-BrdU a nivell de les cèl.lules vasofibroses pot indicar la presència en aquest teixit de compostos semblants a la BrdU. Atès que aquest tipus cel.lular es relaciona amb funcions d'excreció per acumulació (Sawyer, 1986), no es descarta que realitzi una captació de la BrdU dificultant el seu accés a la resta de teixits.

En l'únic exemplar viu que va incorporar la BrdU, el marcatge va quedar localitzat en les cèl.lules intestinals i en el teixit vasofibrós pròxim, fet que podria explicar-se per un millor accés de la BrdU, la qual durant el procés d'injecció s'acumula en gran part al tub digestiu. Donat l'escàs estat de diferenciació de les cèl.lules vasofibroses en aquest exemplar, és difícil determinar si aquest marcatge és a nivell de les cèl.lules vasofibroses o de les vasocentrals, si bé el marcatge de cèl.lules vasocentrals en migració i també en el pseudoblastema fa suposar que les cèl.lules vasocentrals associades al teixit vasofibrós han incorporat el marcador.

La presència en el pseudoblastema d'una zona pròxima a l'exterior amb cèl.lules sense marcar i d'una zona més interna amb cèl.lules marcades, suggereix que la zona no marcada correspon a cèl.lules que havien assolit el pseudoblastema abans d'iniciar-se el marcatge, i que la zona que presenta marcatge reflecteix la nova aportació de cèl.lules vasocentrals que ja arriben marcades, aparentment indicant que la proliferació d'aquestes cèl.lules s'ha donat en els seus teixits d'origen. Els escassos resultats obtinguts en les proves d'incorporació de BrdU no permeten aclarir si les cèl.lules que ja s'han incorporat en el pseudoblastema continuen proliferant o no. Podria ser que només les cèl.lules que han arribat al pseudoblastema durant el període d'incubació, provinents de les proximitats de l'intestí, haguessin pogut incorporar la BrdU, quedant el marcador inaccessible a les que havien arribat anteriorment al pseudoblastema, sense que es pugui saber, per tant, si han entrat en divisió o no.

L'afluència continuada de cèl.lules vasocentrals durant el període de creixement del pseudoblastema, fa pensar que la migració cel.lular és el principal mecanisme del creixement.

En les cremades per nitrat de plata, en que hi ha una migració massiva i molt duradora, el teixit vasofibrós dels segments afectats queda considerablement empobrit en cèl.lules vasocentrals durant els primers estadis de formació del pseudoblastema. L'increment de cèl.lules vasocentrals que s'observa en el teixit vasofibrós en estadis més avançats, es pot atribuir a un procés de proliferació cel.lular que es produiria per satisfer les demandes de cèl.lules vasocentrals durant el llarg procés de regeneració.



## Evolució del pseudoblastema

El procés de formació i evolució del pseudoblastema a *Hirudo medicinalis* segueix el mateix patró general que a la resta dels hirudinis, el qual ha estat descrit per Myers (1935), LeGore i Sparks (1971) i Cornec (1984). Cal fer notar, però, algunes petites diferències. L'inici de la formació del tap al cap de poques hores de realitzada la ferida es comú a les altres espècies estudiades. *Helobdella stagnalis* (Cornec, 1984) segueix un procés semblant a *H. medicinalis*, observant-se una retracció cap als 4 dies i la regeneració d'un teixit connectiu lax cap als 6 dies. El procés seguit a *Placobdella parasitica* en la regeneració de la ferida per fecundació hipodèrmica (Myers, 1935), atès el tipus de ferida realitzada, és difícil de comparar. El fenomen de retracció tal com s'ha descrit en el nostre model, no es pot aplicar en aquest cas, en disposar-se el tap cel·lular al llarg del camí obert per els espermatozous. *Piscicola salmositica* (LeGore i Sparks, 1971) presenta un procés força diferent, en el qual no s'observa el fenomen de retracció. Un altre fet a remarcar a *Piscicola salmositica*, és que, durant el primer dia, el pseudoblastema pren la forma d'un pont entre els marges de la ferida, deixant un espai buit en el fons de la ferida, que no s'omple fins més tard. En aquesta espècie també s'ha observat que, abans de la reepitelització, grans fragments de restes cel·lulars són incorporats al pseudoblastema i portats a la superfície, on són despresos juntament amb porcions externes del pseudoblastema (LeGore i Sparks, 1971; Sparks, 1972). Cap d'aquests fets ha estat confirmat en les nostres observacions.

En el cas del pseudoblastema que es forma en les cremades per cauterització o per nitrat de plata, el procés no difereix substancialment. En ser les àrees afectades molt més grans, hi afluïxen més quantitat de cèl·lules vasocentrals a partir d'altres zones del cos. En les cremades per nitrat de plata, en les que l'àrea afectada és particularment gran i el procés de regeneració dura molt més temps, la migració és molt manifesta.

## Unions cel·lulars durant l'evolució del pseudoblastema

La formació i desorganització d'unions cel·lulars observades en les cèl·lules vasocentrals, en funció del seu estat sedentari o migratori, permet especular el possible paper que les unions juguen en la formació i evolució del pseudoblastema, especialment en la fase de retracció.

El conjunt d'interaccions que manté la coherència de les agrupacions de cèl·lules vasocentrals en el teixit vasofibrós (imbrincació de projeccions citoplasmàtiques, interaccions evidenciades per la presència de material fibril·lar connectant les membranes plasmàtiques de les cèl·lules veïnes i unions cel·lulars especialitzades amb la matriu), es desconnecta abans d'iniciar-se la migració. Després que s'han concentrat en el pseudoblastema, les cèl·lules comencen a

crear noves unions entre elles per donar solidesa al teixit. Aquestes, a diferència de les que es troben en la fase de repòs, són unions intercel·lulars especialitzades visibles en ME. La presència de material fibril·lar que connecta les membranes plasmàtiques de les cèl·lules veïnes a través d'un espai molt estret, de 17-20 nm, es relaciona, com en el cas de les unions de l'estadi de repòs, amb molècules de superfície cel·lular mediadores de l'adhesió.

La transformació d'aquestes unions en la posterior evolució del pseudoblastema i la formació d'unions amb la matriu, es relaciona amb el moviment de retracció. Finalment totes les unions són de nou desconnectades, abans que les cèl·lules deixin el pseudoblastema.

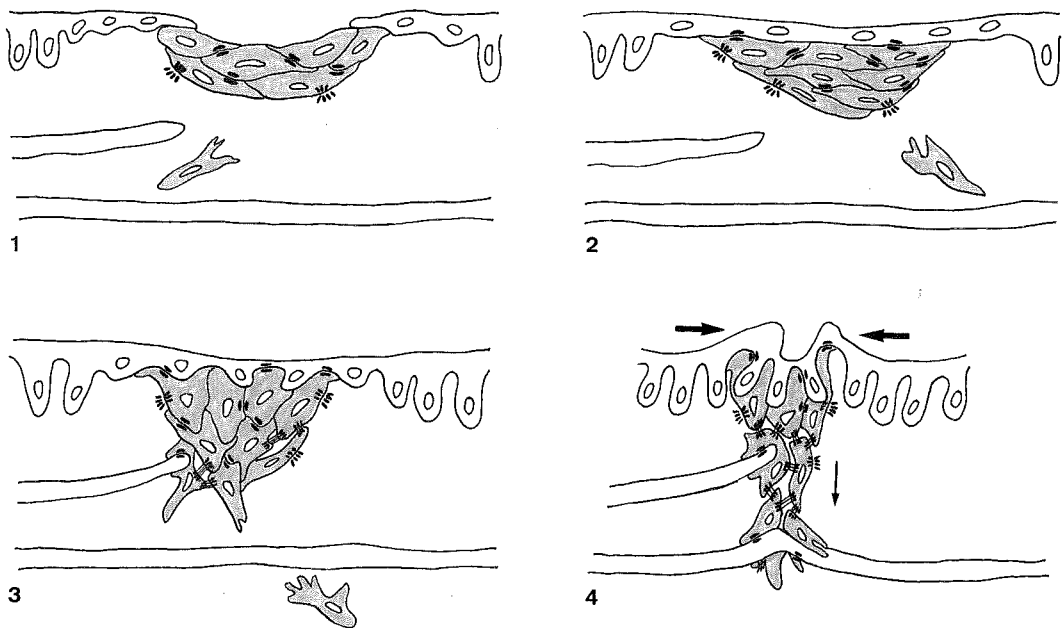
Les unions entre les cèl·lules del pseudoblastema també han estat observades a *Helobdella stagnalis* (Cornec, 1984). En aquesta espècie, les cèl·lules fagocitàries connectives formen una xarxa densa amb unions tipus desmosoma entre els seus cossos cel·lulars i tipus unió septada en les projeccions citoplasmàtiques, mentre que els cel·lòcits, que es troben distribuïts per la perifèria del pseudoblastema, estan agrupats de forma menys compacte, amb unions tipus desmosoma.

Tal com s'ha proposat per les unions de les cèl·lules vasocentrals amb la matriu en l'estat de repòs (vegeu histologia normal, pàg. 125), és raonable pensar que els filaments que connecten les unions cel·lulars del pseudoblastema vistos amb MET i els filaments d'actina vistos amb el marcatge amb fal·loïdina són el mateix. Un fet que dóna suport a aquesta hipòtesi és l'observació en preparacions marcades amb fal·loïdina, de feixos d'actina en el pseudoblastema aparentment més llargs que les propies cèl·lules. Aquest fet s'explicaria fàcilment per la continuïtat dels feixos d'una cèl·lula a altra a través de les unions observada en MET. Per aquests motius sembla que, en el cas d'*Hirudo medicinalis*, aquestes unions serien de tipus *adherens*, o sigui, unions d'ancoratge connectades al citosquelet d'actina, i no desmosomes o hemidesmosomes els quals pertanyen a les unions d'ancoratge connectades als filaments intermediaris. Donades les diferències quant a la constitució cel·lular del pseudoblastema respecte a les altres espècies estudiades, no es pot generalitzar aquesta hipòtesi.

Un altre tipus important d'unions són aquelles que uneixen el pseudoblastema amb les fibres musculars. A pesar que ja Myers (1935) havia observat que les cèl·lules del pseudoblastema resseguien algunes fibres adjacents a *Placobdella parasitica*, no hi ha constància d'unions entre cèl·lules del pseudoblastema i fibres musculars en els hirudinis. En el cas d'*Hirudo medicinalis*, durant la fase de retracció, els contactes entre les cèl·lules del pseudoblastema i les fibres musculars són molt evidents. Els contactes estrets de les membranes plasmàtiques i les unions especialitzades asseguren el manteniment dels lligams entre aquests dos tipus cel·lulars. A més, les cèl·lules del pseudoblastema també estan lligades a la matriu que envolta les fibres per mitjà d'unions col·locades molt aprop dels contactes amb les fibres musculars.

## Contracció de la ferida

Durant la retracció del pseudoblastema es produeix un important tancament de la ferida (fig. 310). El pseudoblastema disminueix la seva amplària i arrossega els teixits contigus provocant el tancament. El fenomen d'acostament dels marges de la ferida durant el procés de regeneració, anomenat contracció de la ferida, és comú en el procés de regeneració de ferides a vertebrats (Skalli i Gabbiani, 1988, Garana et al, 1992) i és important clínicament per reduir la mida de la ferida.



**Fig. 310.** Procés d'evolució del pseudoblastema en relació a la contracció de la ferida. (1) Acumulació de les cèl·lules vasocentrals per formar el pseudoblastema en una ferida oberta. (2) Pseudoblastema madur epitelitzat. Els marges de la ferida encara no s'han acostat. (3) Inici de la retracció del pseudoblastema i dels contactes amb les fibres musculars. S'inicia l'acostament dels marges de la ferida. (4) Fase de contracció de la ferida. El pseudoblastema es troba totalment retractat, observant-se força punts d'unió amb les fibres musculars, mentre que els marges de la ferida ja s'han acostat.

En els vertebrats, aquest fenomen es veu facilitat per la presència de miofibroblasts en el teixit de granulació, que, en contraure's al llarg de línies d'estrés orientades paral·lelament a la superfície, produeixen un considerable tancament de la ferida (McCarthy et al, 1988). Aquests miofibroblasts són cèl·lules afusades que tenen nombrosos feixos de filaments d'actina. Es creu que es diferencien a partir de fibroblasts pròxims a la ferida, tot i que hi ha estudis que

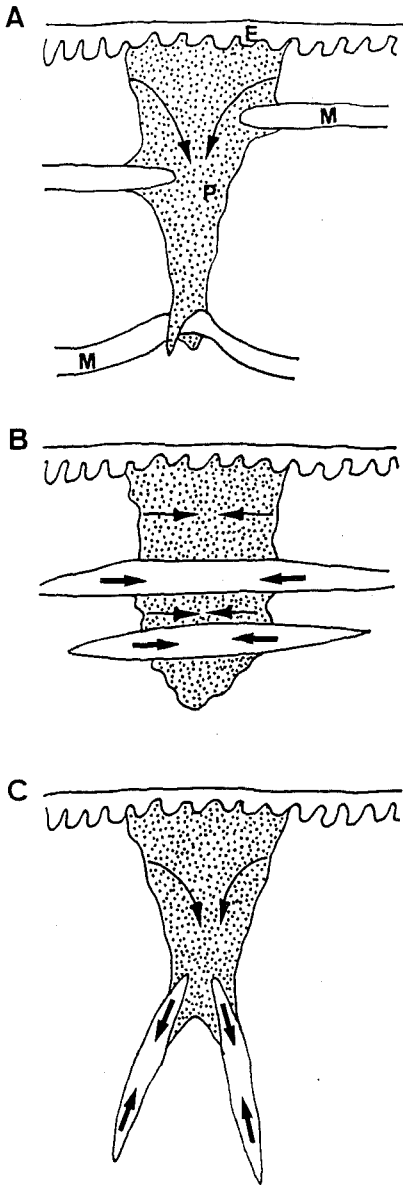
suggereixen que també poden provenir d'altres fonts, com perícits i macròfags (Skalli i Gabbiani, 1988). Coordinen funcions de secreció de la matriu i de contracció (Garana et al, 1992). Els feixos d'actina, que s'anomenen fibres d'estrés, poden mesurar 2  $\mu\text{m}$  de diàmetre, normalment estan disposats paral·lèlament a l'eix major de la cèl·lula i poden radiar de punts focals (Skalli i Gabbiani, 1988).

Les cèl·lules del pseudoblastema durant la fase de retracció presenten feixos de filaments d'actina amb una disposició semblant a les fibres d'estrés dels miofibroblasts.

En el cas de les cèl·lules vasocentrals és de remarcar que els feixos de d'actina hi són presents ja en la fase de repòs. En canvi, les cèl·lules a partir de les quals s'originen els miofibroblasts no tenen fibres d'estrés i han de sofrir un procés de diferenciació.

Els filaments d'actina de les cèl·lules vasocentrals semblen ser els responsables dels moviments durant la migració i, molt probablement, durant els canvis que sofreix el pseudoblastema. Durant aquesta fase els feixos de filaments citoplasmàtics, que com s'ha dit prèviament corresponen molt probablement als feixos d'actina detectats amb la fal·loïdina, esdevenen força més conspicus.

Sembla que l'acció conjunta de les cèl·lules del pseudoblastema i les fibres musculars podria ser la responsable de la contracció de la ferida. Totes les evidències suggereixen que les cèl·lules del pseudoblastema són les forces motrius del moviment de tancament de la ferida i que les fibres musculars actuen com a ancoratges per facilitar el procés (fig. 311, A). Aquesta hipòtesi es basa, d'una part, en la presència en les cèl·lules del pseudoblastema de feixos de filaments d'actina amb una disposició semblant a les fibres d'estrés dels miofibroblasts. D'altra part, la situació de les fibres musculars, bé en els marges del pseudoblastema sense atravesar-lo o bé en la part basal, amb una disposició sovint paral·lela a la superfície i desviades en els punts d'unió, com si haguessin estat arrossegades per la tracció del pseudoblastema (fig. 311, A), fa difícil pensar que siguin aquestes les responsables del moviment de contracció. Perquè aquestes fibres musculars fossin responsables de la força de contracció, haurien d'atraspassar el pseudoblastema i estar disposades paral·leles a la direcció d'acostament dels marges de la ferida (fig. 311, B) o bé estar situades en la base del pseudoblastema en direcció perpendicular a la superfície perquè, en estirar el pseudoblastema cap a l'interior de l'animal, es produís un acostament dels marges de la ferida (fig. 311, C).



**Fig. 311.** Esquema de diferents models possibles del mecanisme de la contracció de la ferida.

(A) Situació observada: el pseudoblastema en retracció s'uneix a fibres musculars de la paret corporal a les que desvia de la seva posició original, al mateix temps que els marges de la ferida s'acosten.

(B) Model en el qual la contracció de la ferida es dóna per contracció de fibres musculars disposades paral·lelament a la direcció del moviment de tancament.

(C) Model en el qual el tancament es dóna per contracció de fibres musculars que estiren el pseudoblastema, el qual, a la seva vegada, arrossega els teixits, produïnt el tancament.

E: epiteli. M: fibra muscular. P: pseudoblastema.

Les forces exercides per aquestes cèl·lules han de ser transmeses als teixits del voltant.

Les unions que formen les cèl·lules del pseudoblastema entre si i amb la matriu podrien tenir un paper important actuant com a punts de connexió dels filaments contràctils, permeten la distribució passiva de forces de cada cèl·lula del pseudoblastema al pseudoblastema com un tot, i del pseudoblastema als teixits adjacents que estan essent estirats.

En els vertebrats s'ha descrit una probable connexió entre els miofibroblasts i la matriu extracel·lular, anomenada fibronexus, que consisteix en una aparent continuïtat entre les fibres d'actina intracel·lulars i les fibres de fibronectina de la matriu extracel·lular (Skalli i Gabbiani, 1988). Les unions entre les cèl·lules del pseudoblastema en fase de retracció d'*Hirudo medicinalis*, amb convergència de filaments, molt probablement d'actina, cap a les unions i presència de material filamentós en l'espai intercel·lular, presenta certa similitud

amb el fibronexus, i podria representar un mecanisme transmissor de les forces de tensió a través de l'espai extracitoplasmàtic cap a les cèl·lules veïnes.

En les cremades per cauterització també es produeix el fenomen de contracció de la ferida, la qual passa d'uns 2-2,5 mm d'amplària en els períodes inicials a una 0,8-1 mm en la fase de retracció del pseudoblastema. La contracció queda també confirmada per la presència de plecs en l'epiteli i per la disposició dels teixits subjacents.

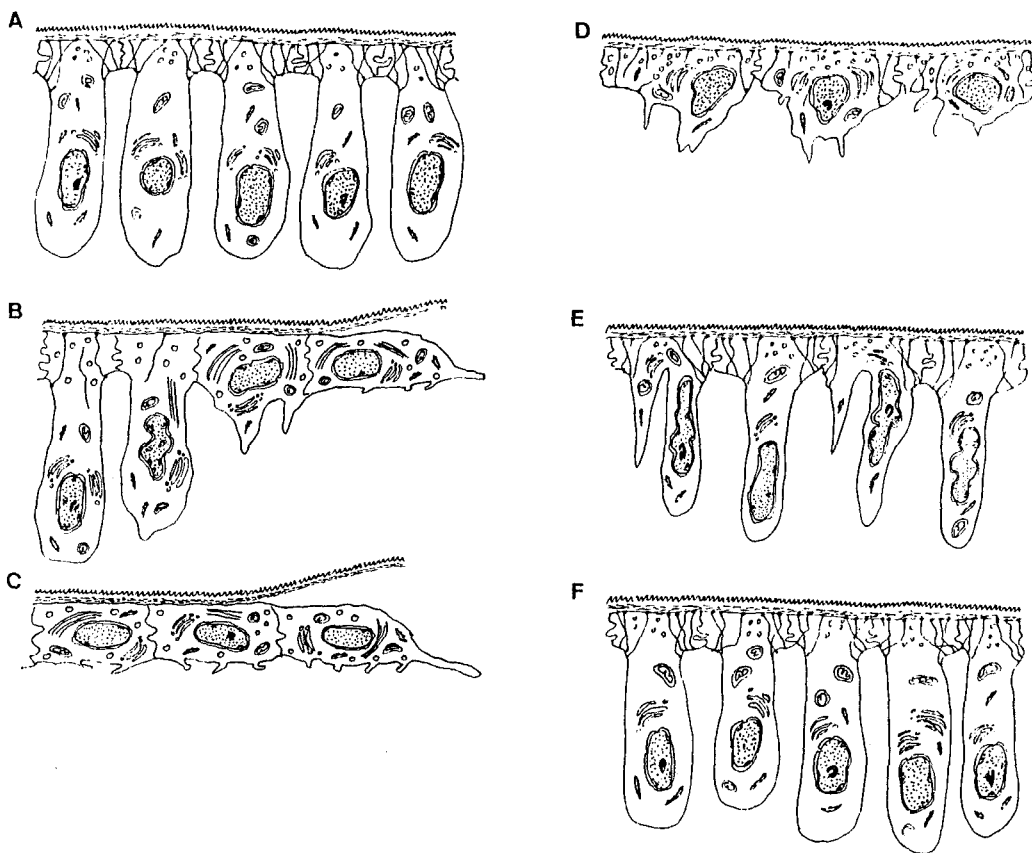
En el cas de la regeneració de cremades per nitrat de plata, no es produeix una retracció tan evident del pseudoblastema. El pseudoblastema, que recobreix una gran àrea, forma en alguns punts petites falques que penetren cap a l'interior del cos, i a diferents llocs presenta contactes amb les fibres musculars. En algun d'aquests punts de contacte es pot observar com es produeix una retracció local que es tradueix amb una invaginació del tegument. En aquestes ferides el mecanisme de retracció també sembla actuar per limitar l'àrea afectada, encara que el resultat és més difícil d'observar, donada la poca homogeneïtat en l'amplària de les cremades practicades.

## REEPITELITZACIÓ

### Procés de reepitelització

El procés de reepitelització descrit a *Hirudo medicinalis* segueix el mateix patró que en altres anèl·lids. L'epitelització comença en els marges de la ferida, i les cèl·lules avancen formant una capa continua per sobre del tap cel·lular previament format (fig. 312).

A diferència dels hirudinis, l'epiteli dels oligoquets té una població de cèl·lules basals a més de les columnars. El paper d'aquests dos tipus cel·lulars en la reepitelització no és gaire clar. Segons Chapron (1964), les cèl·lules basals són responsables de la re-epitelització, mentre que les cèl·lules columnars que es troben al damunt degeneren. En canvi, segons Burke (1974 a, b), les cèl·lules columnars són les cèl·lules migratòries, mentre que les cèl·lules basals actuen només com a substrat amb funcions fagocitàries.



**Fig. 312.** Esquema que mostra el procés d'epitelització. (A) epiteli normal. (B) cèl·lules epitelials aplatant-se, mostrant la translocació del nucli cap a la regió apical i la desorganització del citosquelet. (C) epiteli migrant per sobre el substrat. (D) epiteli reestablert mostrant la reorganització del citosquelet. (E) epiteli recobrant la forma original, per elongació del citoplasma i translocació del nucli a la regió basal. (F) epiteli cicatricial.



*Hirudo medicinalis* presenta algunes diferències respecte a altres hirudinis. L'inici de la reepitelització és molt més ràpid que a *Piscicola salmositica* (*Rhynchobdellida*) en què, segons LeGore i Sparks (1971), en ferides d'aproximadament el mateix ordre, l'epitelització no s'inicia fins als 4 dies. La pauta d'epitelització és més similar a la d'*Helobdella stagnalis* (*Rhynchobdellida*), en la qual, segons Cornec (1984), l'epitelització comença entre les 2 i 6 hores, per obtenir un epitelí cicatricial complet a les 12 hores.

Respecte als canvis ultraestructurals que acompanyen la migració cel·lular, Burke (1974, b), en el seu estudi a nivell ultraestructural de l'epitelització d'*Eisenia foetida* (*Oligochaeta*), menciona només un petit grau de desorganització, consistent en una disminució del nombre d'hemidesmosomes i tonofilaments. Aquest fet contrasta amb les observacions fetes a *Hirudo medicinalis*, en les quals es fa palesa la total desconexió entre els hemidesmosomes i els tonofilaments durant la fase mòbil, desconexió que sembla necessària per a la migració de l'epitelí. En hirudinis no s'han descrit canvis de les unions o del citoesquelet durant aquesta fase.

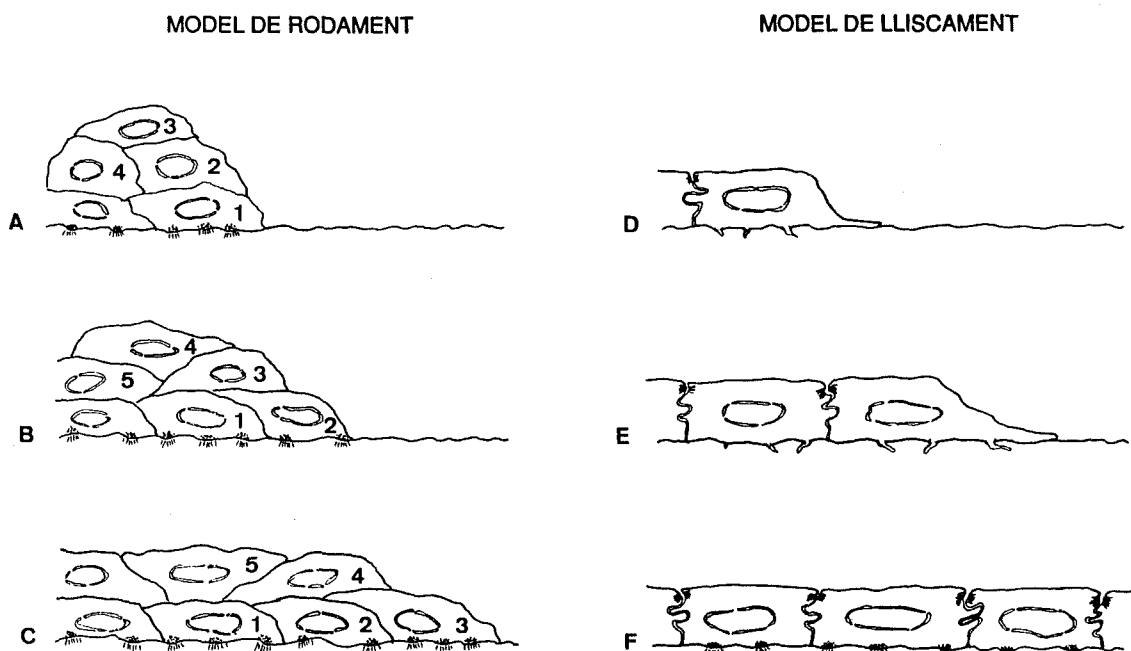
Un cop completat el procés de migració, la reestructuració del citoesquelet i de les unions dèrmiques és el que determina la consolidació de l'epitelí. La recuperació de la forma columnar i la translocació del nucli a una posició basal depenen de si la capa epitelial dóna prou de si (ferides per incisió) o no (ferides per cauterització amb nitrat de plata). En aquest darrer cas les cèl·lules epitelials resten molt disteses.

La formació d'un epitelí cicatricial amb les característiques d'un epitelí normal, però que, almenys durant un cert temps, no s'acompanya d'elements glandulars, és comú amb altres hirudinis (Cornec, 1984) i amb oligoquets (Chapron, 1964; Jamieson, 1981).

### **Mecanismes cel·lulars de la migració**

S'han proposat dos models per explicar el mecanisme cel·lular d'avanç de la capa epitelial: són els anomenats model de rodament i 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'epitelí; els hemidesmosomes basals es regeneren ràpidament en les cèl·lules que successivament van assolint el marge (fig. 313, A). 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 (fig. 313, B). Dins el model de lliscament, els mecanismes d'avanç de la capa epitelial varien lleugerament segons l'organisme estudiat. Vaughan i Trinkaus (1966) descriuen la

migració en cultius de cèl.lules epitelials d'embrions de pollastre, en la qual 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 pla estratificat a la salamandra que es realitza segons el model de lliscament, amb la particularitat que totes les cèl.lules de la capa, i no tan sols les marginals, són adherents al substrat i contribueixen al moviment. En aquest darrer cas, les cèl.lules sovint intercanvien posicions entre si, indicant la pèrdua de les connexions cel.lulars laterals.



**Fig. 313.** Models del mecanisme cel·lular d'avanç de la capa epitelial. Model de rodament (A) la cèl.lula capdavantera (1) està fixa al sustrat, (B) la (2) avança per sobre, entra amb contacte amb el substrat i hi queda fixada. (C) successivament les cèl.lules (3), (4) segueixen el mateix procés. Model de lliscament (D) i (E) la capa epitelial avança de forma unificada. (F) les unions amb el substrat no es reestableixen fins acabada la migració.

Dels dos models proposats, les sangoneres adopten el 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 substrat. Aquest fet és especialment palès en les cremades per nitrat de plata, on grans superfícies s'han de reepitelitzar i l'epiteli migratori, probablement de forma artefactual, sovint queda separat del substrat, observant-se la presència de ponts citoplasmàtics que mantenen els contactes. 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.

Segons Burke (1974 b), a *Eisenia foetida* (*Oligochaeta*), el moviment de les cèl.lules epitelials sobre el substrat seria de tipus passiu, a causa, possiblement, de l'expansió d'un epiteli prèviament comprimit. A *Hirudo medicinalis*, atesa la presència de petits filopodis en les cèl.lules epitelials migratòries i d'un llarg lamelipodi en les cèl.lules capdavanteres, el moviment sembla ser més aviat de tipus actiu. La presència dels filopodis a totes les cèl.lules, independentment de si són capdavanteres o no, fa pensar que totes elles podrien col.laborar en el moviment.

La distribució dels tonofilaments, fortament reagrupats al voltant del nucli durant el procés migratori, els descarta com a responsables de la locomoció. A *Hirudo medicinalis* s'observa, mitjançant el marcatge amb fal.loïdina, la presència d'actina en les cèl.lules epitelials. Tot i que les cèl.lules es veuen molt dèbilment marcades, sense que es pugui observar la distribució dels filaments ni un increment del marcatge durant el procés de reepitelització, els filaments d'actina podrien ser responsables de la locomoció. Hi ha estudis que mostren la relació d'aquests microfilaments en els moviments migratoris de les capes epitelials. Bereiter-Hahn et al (1981), en l'estudi de la locomoció de cèl.lules epitelials aïllades en caps-grossos, han observat la presència d'actina i  $\alpha$ -actinina en el lamel.lipodi que emeten aquestes cèl.lules en la direcció d'avanc i, segons aquests autors, l'actina podria ser responsable de la locomoció.

## Migració epitelial i substrat

La migració cel.lular requereix un substrat que doni un suport consistent a les cèl.lules i una sèrie de canvis en les unions d'aquestes cèl.lules amb el substrat. El substrat sobre el qual descansen les cèl.lules epitelials és la membrana basal, a la qual estan unides per mitjà dels hemidesmosomes i proteïnes integrals de membrana (Bernfield, 1984). La làmina basal, situada en la interfase entre les cèl.lules epitelials i la matriu connectiva, s'ha descrit com una bastida que facilita la reconstrucció del teixit després d'una ferida (Furthmayr, 1988).

En les primeres fases de la migració, mentre el citosquelet es desconnecta dels hemidesmosomes, la membrana basal es desestructura. En mamífers, la reepitelització de ferides per incisió a la pell també comporta que les cèl.lules del marge d'avanc de la capa epitelial que migra en direcció a la ferida perdin les unions basals i que la membrana basal perdi definició (Stenn i DePalma, 1988). A l'oligoquet *Eisenia foetida* no s'observa cap signe de degradació de la membrana basal dels marges de la ferida, on l'epiteli inicia la migració, únicament una certa distorsió (Burke, 1974 b).

Les nostres observacions mostren que les cèl.lules del marge d'avanc migren directament per sobre del teixit connectiu o per sobre de les cèl.lules del pseudoblastema. L'avanc de l'epiteli directament per sobre de la matriu connectiva és un fet usual en la reepitelització de ferides. Estudis *in vitro* sobre la migració de les cèl.lules epitelials de mamífers dissociades en diferents substrats, mostren que

aquestes són capaces de migrar tant sobre constituents de la membrana basal: col.lagen tipus IV, laminina i epibolina, com sobre els constituents de la matriu connectiva: fibronectina i col.lagen tipus I i III. Això suggereix que, *in vivo*, l'epiteli migratori no es mou sobre una làmina basal definida sino que fa servir un substrat diferent de l'epiteli estacionari (Stenn i DePalma, 1988). De fet, durant la regeneració de la ferida en la pell de mamífers, les cèl.lules epitelials adjacents al marge de la ferida deixen la membrana basal i entren en contacte amb les altres molècules de la matriu (Woodley i Briggaman, 1988). Per tant, el marge d'avanç de l'epiteli migratori no té unions basals normals, ja que en la matriu falten els dos principals components de les unions intactes, la laminina i la col.làgena tipus IV (Woodley i Briggaman, 1988).

És notori, però, que en el cas dels anèl.lids, la capa epitelial migra tant per sobre del teixit connectiu com per sobre d'un substrat cel.lular: el pseudoblastema.

A *Hirudo medicinalis*, la membrana basal no es forma immediatament acabada la migració, tal com succeeix en els mamífers (Woodley i Briggaman, 1988), sinó que durant un cert temps les cèl.lules epitelials mantenen contacte directe amb les cèl.lules del pseudoblastema, observant-se en alguns punts unions especialitzades. L'inici de la regeneració d'aquesta membrana basal, però, es dona més aviat (a les dues setmanes) que en el cas de reepitelització de ferides a l'oligoquet *Eisenia foetida*, en el qual no es reforma fins després de 30 dies (Burke, 1974 b).

Igual que succeeix en els mamífers (Woodley i Briggaman, 1988), la restauració de la membrana basal s'inicia als marges de la ferida, pràcticament al mateix temps que el restabliment dels hemidesmosomes dèrmics i la reorganització del citosquelet. El contacte amb el teixit connectiu sembla ser necessari per a la formació de la membrana basal, ja que en l'epiteli de sobre el pseudoblastema no s'en observa neoformació fins que es comença a regenerar el teixit connectiu.

## Activitat mitòtica en l'epidermis

Els diferents experiments realitzats per determinar l'activitat mitòtica de l'epidermis no han donat cap resultat positiu. És possible que, tal com s'ha discutit anteriorment, una baixa incorporació de la BrdU en dificulti la detecció. Els resultats positius han estat molt escassos, limitats a un sol exemplar immadur. En aquest exemplar, amb una ferida per incisió de 5 dies, no s'observava cap marcatge a nivell de l'epidermis.

A l'oligoquet *Eisenia foetida*, que té un nivell basal de mitosis en l'epiteli normal, sembla que no hi ha síntesi de DNA fins després d'un cert temps de completada la migració, moment en el qual el nivell de mitosis s'incrementa per sobre del normal als marges de la ferida (Burke, 1974 a).

A *Helobdella stagnalis*, en comptatges de mitosis fets després del bloqueig amb colquicina, s'ha vist que el nombre de mitosis de l'epidermis creix a partir dels 4 dies (Cornec, 1990).

Els resultats obtinguts per Cornec (1990) mostren la capacitat de proliferació de l'epidermis i també la seva capacitat de resposta a una ferida.

En el cas d'*Hirudo medicinalis*, tot i que no es pot extreure cap conclusió dels experiments per detectar renovació cel·lular, hi ha un fet que, de forma indirecta, pot donar alguna informació. Els resultats observats en les cremades per nitrat de plata indiquen que la capacitat mitòtica de l'epidermis és més aviat escassa. En cicatrius de dos mesos les cèl·lules epitelials mostren la distribució zonal característica, amb una banda d'unió en la part superior i el nucli situat en la porció basal, però la seva morfologia és cúbica i no columnar, presentant una amplària superior a les cèl·lules normals. Molt possiblement, l'epiteli cicatricial d'aquest tipus de cremades no té la morfologia columnar típica a causa de la gran superfície cremada. L'epiteli cicatricial prové de la migració de l'epiteli de la zona no afectada del voltant. Almenys en un període de dos mesos, no sembla que hi hagi hagut una proliferació de cèl·lules epitelials suficient per reparar un epiteli columnar ben constituït.

## REGENERACIÓ DE GLÀNDULES MUCOSES DEL TEGUMENT

### Origen de les glàndules mucoses en la zona cicatricial

Les glàndules mucoses del tegument no participen en el procés migratori de la reepitelització. L'epiteli migratori està format únicament per cèl.lules no glandulars, mentre que les glàndules mucoses degeneren abans que s'iniciï la migració, fet clarament observable en l'epiteli marginal de les cremades per nitrat de plata.

S'ha observat regeneració de glàndules mucoses del tegument en la zona cicatricial. Aquesta regeneració es produeix especialment en els marges de la cicatriu, allà on l'epiteli ha estat estirat per recobrir la ferida, però també en la zona cicatricial, especialment quan la superfície afectada és àmplia, com en el cas de les cremades per nitrat de plata.

Els resultats indiquen que l'origen de les glàndules mucoses són les cèl.lules epitelials columnars.

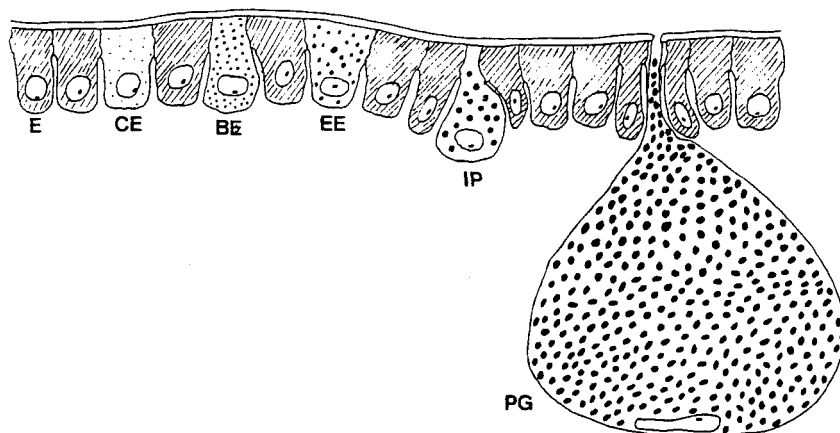
Les observacions fetes mostren estadis intermedis entre les cèl.lules epitelials columnars i les cèl.lules glandulars. A més dels estadis intermedis, hi han diferents trets que mostren la relació entre aquests dos tipus cel.lulars. Les cèl.lules glandulars mantenen complexos d'unió apicals amb les cèl.lules epitelials veïnes, idèntics als que mantenen les cèl.lules epitelials entre si, i la membrana basal és contínua amb la de les cèl.lules epitelials.

En estudis fets en l'oligoquet *Eisenia foetida*, s'observa també regeneració de les glàndules unicel.lulars mucoses del tegument (Chapron, 1964; Burke, 1974 a, b). Burke (1974 a) no observa síntesi de DNA en els elements glandulars del tegument, fet que apunta a un origen per diferenciació a partir d'un altre tipus cel.lular. Les cèl.lules glandulars no participen en el procés d'epitelització de ferides, ja que degeneren abans que s'iniciï la migració i no s'observen en l'epiteli cicatricial fins a un cert temps després de finalitzada l'epitelització (Burke, 1974 b). Aquestes cèl.lules deriven per diferenciació de l'epiteli (Chapron, 1964), en concret de les cèl.lules epitelials columnars (Burke, 1974 b).

A l'hirudini rincobdèl.lide *Helobdella stagnalis*, les dilatacions locals del reticle endoplasmàtic i l'aparició de grànuls de secreció de caràcter mucós en algunes cèl.lules epitelials són signes inequívocs d'una diferenciació glandular a partir de les cèl.lules epitelials columnars (Cornec, 1990).

## Diferenciació dels dos tipus glandulars: piriformes i tubulars

El procés de diferenciació de les glàndules piriformes a partir de les cèl.lules epitelials columnars ha estat ben establert en MO en les cremades per nitrat de plata. En canvi, en el procés de diferenciació de les glàndules tubulars, no s'han pogut observar tots els estadis.



**Fig. 314.** Esquema de la regeneració d'una glàndula piriforme. Es veuen diferents estadis entre les cèl.lules epitelials columnars i les glàndules piriformes, començant per les cèl.lules epitelials clares de fina granulació basòfila, seguint per les de citoplasma granulat, les formes immadures amb grànuls secretors eosinòfils i finalment les formes madures. E: cèl.lula epitelial columnar. BE: cèl.lula epitelial clara amb granulació basòfila. CE: cèl.lula epitelial clara. EE: cèl.lula epitelial clara amb granulació eosinòfila. IP: glàndula piriforme immadura. PG: glàndula piriforme madura.

La presència de formes intermèdies entre les cèl.lules epitelials amb granulació eosinòfila i les glàndules piriformes, identifica a aquestes cèl.lules com a un estadi de diferenciació de les cèl.lules epitelials cap a piriformes (fig. 314).

Les cèl.lules amb granulació basòfila s'identifiquen amb un estadi previ en el procés de diferenciació glandular, en el qual les cèl.lules epitelials columnars incrementarien el seu aparell sintètic. Aquest estadi podria ser comú per als dos tipus glandulars, piriformes i tubulars.

Les dues tipologies de glàndules immadures observades amb ME es distingeixen pels signes evidents d'una gran activitat sintètica.

La ubicació de les de tipus II a diferents nivells de la paret corporal i la presència de dictiosomes com els característics de les glàndules tubulars de *Dina lineata*, un hirudini pertanyent al mateix ordre que *Hirudo medicinalis*, permet identificar-les com a estadis immadurs de les glàndules tubulars.



Les de tipus I són de més difícil identificació. Aparentment i per eliminació, es podrien identificar amb les glàndules piriformes. Tot i trobar-se situades a nivells no molt profunds de la dermis, aquesta situació no concorda amb les observacions fetes amb MO, en què les primeres etapes de la diferenciació cap a glàndules piriformes semblen donar-se al mateix nivell de les cèl.lules epitelials o just per sota. La morfologia tan allargada del cos cel.lular tampoc sembla correspondre's amb les glàndules piriformes immadures. Tot i que aquestes diferències no són tan grans com per poder descartar que siguin glàndules piriformes immadures, sembla més plausible que representin una etapa anterior al tipus II en el procés de diferenciació cap a glàndules tubulars. Atès que amb les tècniques de ME només s'han observat les ferides per incisió i que en aquestes, en afectar una àrea petita, és difícil observar elements glandulars en procés de regeneració, les glàndules piriformes immadures haurien pogut passar desapercebudes.

En l'estudi de la regeneració de ferides per amputació de la ventosa posterior del rincobdèl.lide *Helobdella stagnalis*, s'observa la presència simultània de glàndules piriformes i tubulars en el regenerant i el desequilibri numèric momentani a favor de les primeres (Cornec, 1990). Aquest fet i la presència d'estadis intermedis entre els dos tipus glandulars, porten a l'autor a la conclusió que les glàndules piriformes i tubulars no són dos tipus diferents, sino que són dos estadis de l'evolució d'una mateixa línia. En el cas d'*Helobdella stagnalis*, les glàndules tubulars serien un estadi últim de la diferenciació glandular i les piriformes un estadi intermediari.

Si bé els dos tipus glandulars, piriformes i tubulars, tenen un origen comú en les cèl.lules epitelials columnars, sembla que a *Hirudo medicinalis* la diferenciació seria de tipus dicotòmic, diferenciant-se unes cap a piriformes i les altres cap a tubulars. Per tal que es donés el mateix procés que a *Helobdella stagnalis*, les glàndules tubulars immadures haurien de ser una transició entre l'estat de piriforme al de tubular. En canvi, aquestes cèl.lules presenten un citoplasma molt abundant, amb mostres d'activitat sintètica important però sense encara quasi cap grànul de secreció o restes que indiquin que provenen de glàndules ja madures. Per aquests motius se les identifica més fàcilment amb una diferenciació directa a partir de les cèl.lules epitelials columnars, sense passar per l'estadi de piriforme.

## REGENERACIÓ DE LA ZONA CICATRICIAL

Pel que fa referència als resultats finals del procés de regeneració, resta una cicatriu evident, que es detecta tant en observació directa com en els talls histològics.

### Regeneració de la matriu connectiva

En la regeneració de la matriu connectiva de la zona cicatricial sembla que hi intervenen dos mecanismes.

D'una banda, la síntesi per part de cèl.lules del pseudoblastema en fases avançades del procés de curació, d'un recobriment fibrós força conspicu, visible en MET o en MO amb les tècniques de marcatge amb la lectina PNA i d'impregnació argèntica. Les observacions detallades del reticle endoplasmàtic i de la matriu intercel.lular durant l'estadi de retracció del pseudoblastema, suggereixen que les cèl.lules vasocentrals tenen la capacitat de sintetitzar la matriu.

De l'altre, la infiltració, a partir del marge del pseudoblastema, de matriu connectiva del teixit circundant conjuntament amb perllongacions citoplasmàtiques dels fibròcits al voltant de les quals s'organitzen les fibres.

### Teixit cicatricial

La zona cicatricial es manté diferenciada de la resta del teixit connectiu durant períodes molt llargs, de fins a 8 mesos. Es caracteritza per una matriu on les fibres de col.lagen són lleugerament diferents de les que es troben a la resta del teixit connectiu, i que és colonitzada per cèl.lules connectives.

La presència de capil.lars, nervis i petites fibres musculars dels ànuls en les cicatrius de ferides per incisió, indica que la regeneració, almenys en ferides que no afectin àrees molt importants, és força completa.

En canvi, els teixits que han estat traumatitzats de forma més dràstica, com ara la musculatura de la paret corporal que ha estat seccionada en el tall o eliminada en les cremades per nitrat de plata, no mostren regeneració.

Pel que fa referència als resultats finals del procés de regeneració, el tipus d'organització és equivalent al que es troba a *Helobdella stagnalis* (Cornec, 1984) i contrasta amb la falta de colonització cel.lular descrita a *Piscicola salmositica* (LeGore i Sparks, 1971). La cicatriu descrita a *Placobdella parasitica* en la regeneració de la ferida produïda per la fecundació hipodèrmica (Myers, 1935), ha estat repetidament mencionada com a un únic cas de total regeneració en teixits d'hirudinis adults (LeGore i Sparks, 1971; Dales, 1978; Sawyer, 1986). En aquestes ferides, cèl.lules connectives que colonitzen l'àrea afectada a partir dels tres dies

regeneren el teixit connectiu fins que aquest retorna a l'aspecte normal i no s'observa cap cicatriu (Myers, 1935). En aquest cas, la falta d'una cicatriu conspícua podria ser deguda simplement al fet que les ferides de la inseminació afecten una àrea molt petita, no més gran de 120  $\mu\text{m}$ , i que, en un estudi en MO sense cap tipus de marcatge, és difícil detectar les petites diferències en les fibres connectives.

## CARACTERÍSTIQUES DELS DIFERENTS TIPUS DE FERIDES

Pel que fa referència a la pauta del procés de regeneració, s'han de tenir en compte els diferents tipus de ferides estudiats. Els processos de regeneració de ferides per incisió i de cremades, bé produïdes per cauterització, bé per nitrat de plata, presenten algunes diferències a remarcar. En la taula VI es resumeixen les etapes del procés de regeneració i es comparen les pautes temporals en els diferents tipus de ferides.

tipus de ferida etapa	FERIDA PER INCISIÓ	CREMADA PER CAUTERITZACIÓ	CREMADA PER NITRAT DE PLATA
Comença a observar-se acumulació de cèl.lules vasocentrals	1 h	12 h	24 h
Inici de l'esqueixament dels teixits	/	/	24 h
Pseudoblastema consolidat	4 h	48 h	3 dies
Despreniment dels teixits	/	/	3-5 dies
Inici de la migració epitelial	4 h	48 h	3 dies
Ferida totalment recoberta per l'epiteli	24 h	4 dies	5-6 dies
Recuperació de la morfologia columnar de l'epiteli	6 dies	2 setmanes	4 setmanes (recuperació parcial)
Procés de retracció	de les 48 h als 6 dies	de les 2 a les 4 setmanes	al voltant de les 4 setmanes
Inici de la disgregació del pseudoblastema	10-14 dies	4 setmanes	4-5 setmanes
Presència d'un teixit connectiu cicatricial	cap a les 5 setmanes	? (Posterior a les 4 setmanes i abans dels 3 mesos)	cap als 2 mesos

**TAULA VI.**- Taula comparativa de la pauta temporal de les diferents etapes del procés de regeneració en els diferents tipus de ferides realitzades.

Destaquen la major lentitud dels processos de regeneració dels dos tipus de cremades i l'existència del fenomen d'escisió dels teixits en les cremades per nitrat de plata. Les cremades es diferencien de les ferides per incisió per la important presència de teixit necròtic i per l'absència d'exposició a l'exterior de teixits, amb la pèrdua de líquids tissulars que comporta. Aquests fets presuposen que el taponament de la ferida no sigui necessàriament immediat i que la fagocitosi sigui molt més important. La quantitat de teixit afectat i la grandària de la ferida també són factors determinants en el desenvolupament del procés. D'una banda, si la quantitat de teixit necròtic és molt important es pot dificultar la seva reabsorció, poden ser aquesta la causa de la seva escisió. D'altra part, a major superfície més lent serà el procés de reepitelització.

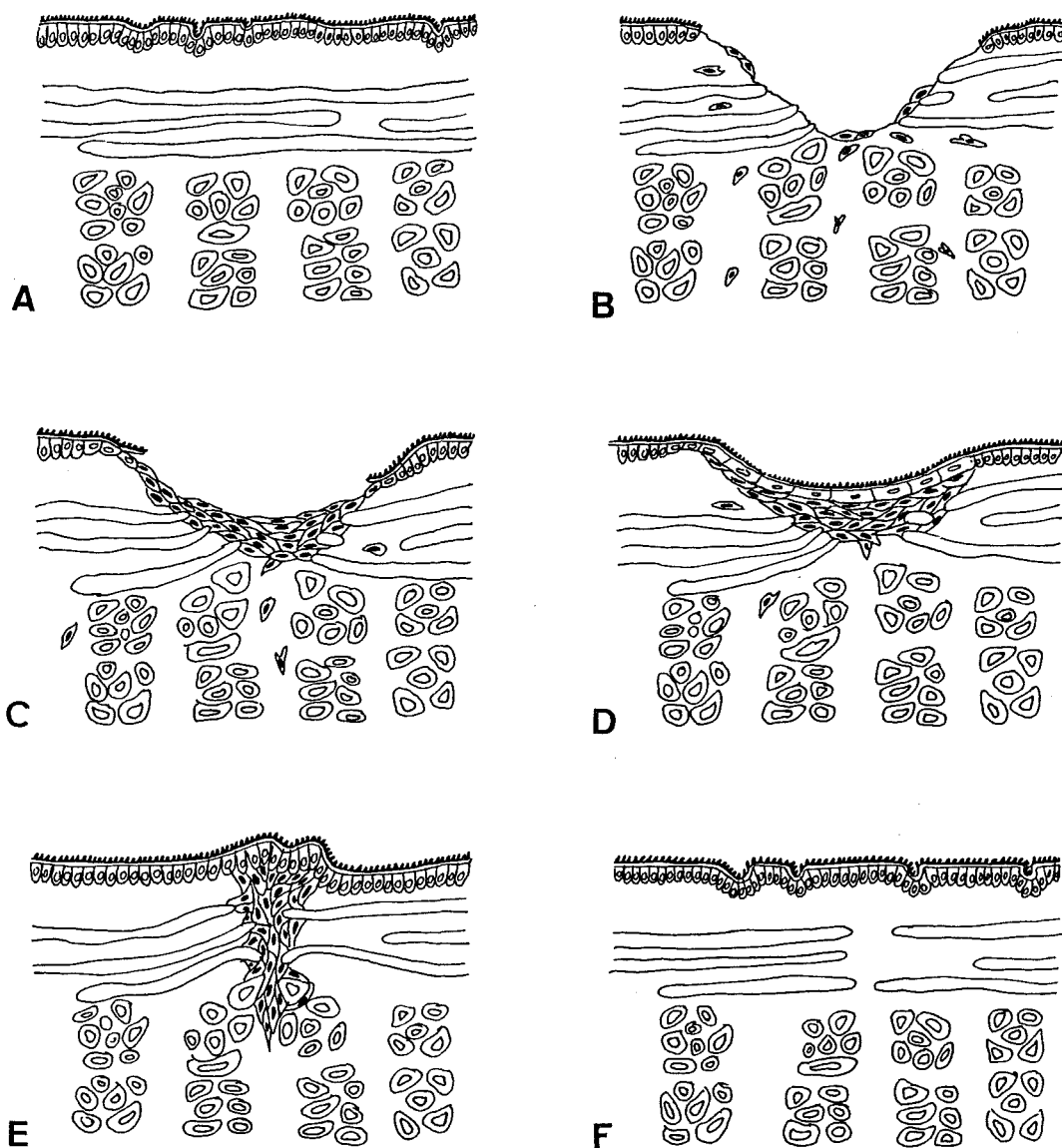
### **Ferides per incisió**

Tot i que en la discussió general s'han integrat les informacions obtingudes de l'estudi de tots els tipus de ferides estudiats, la discussió s'ha basat principalment en les ferides per incisió, ja que aquestes són les que han estat estudiades amb més detall en aquest treball i de les qual es disposa més informació bibliogràfica en grups afins (Burke, 1974 a,b,c; LeGore i Sparks, 1971; Cornec 1984, 1990). Per aquest motiu en aquest apartat no ens referirem al seu procés d'evolució.

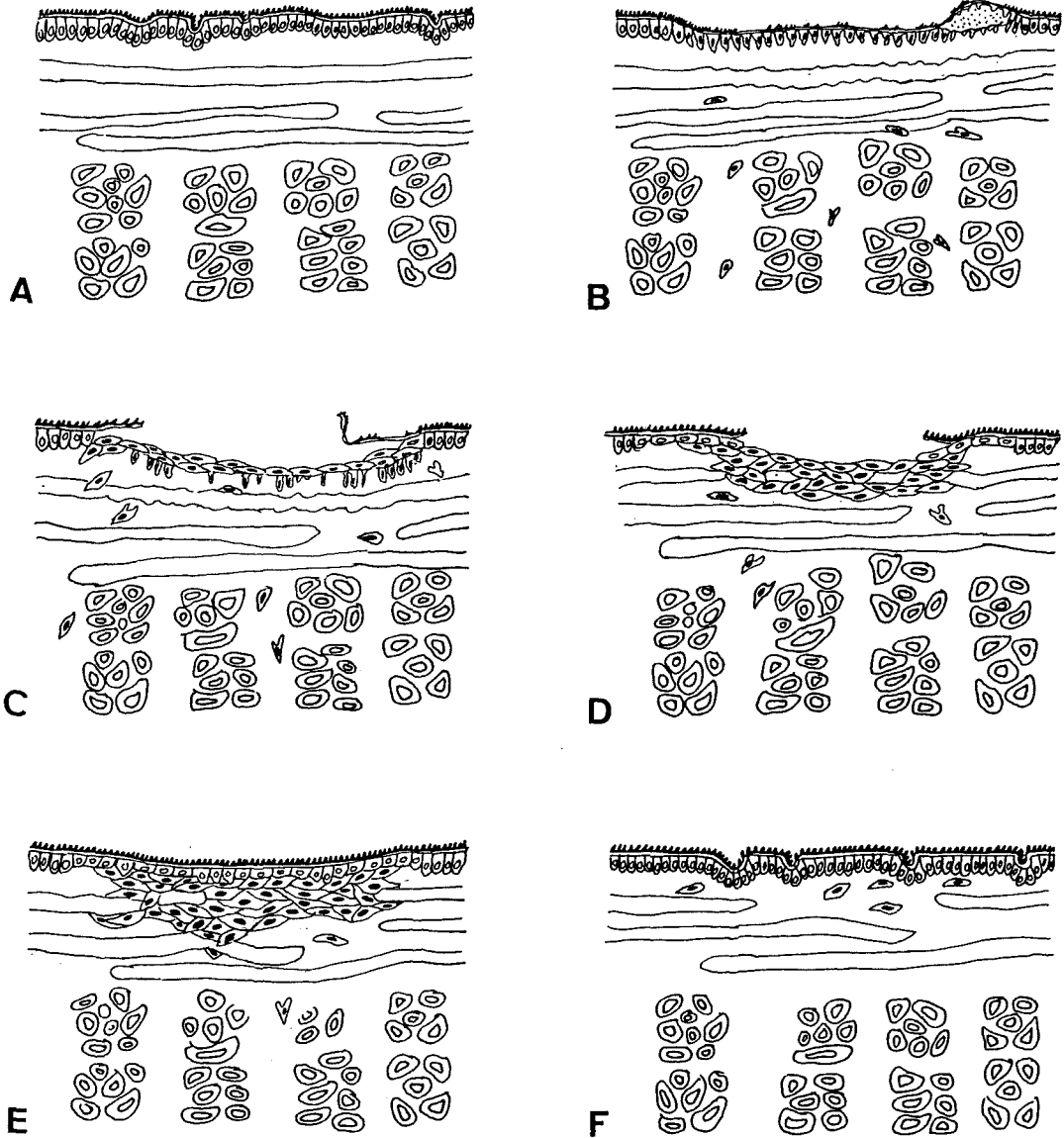
Les característiques diferencials de les ferides per incisió són la presència d'un tall que deixa al descobert els teixits de la paret corporal, amb un mínim de teixit necrosat, i una superfície afectada, en el cas dels talls realitzats, relativament petita. És per això que en aquest tipus de ferides els fenòmens més rellevants són els referents al recobriment i tancament del tall, més que no pas els relacionats amb l'eliminació dels teixits necròtics.

### **Ferides per cauterització**

Les cremades per cauterització presenten una regeneració més lenta que les ferides per incisió. En les primeres fases es produeixen fenòmens de degeneració i d'inflamació amb formació de butllofes. L'acumulació de cèl·lules vasocentrals no es fa palesa fins a les 12 h, força més tard que en les ferides per incisió, en les quals els teixits queden exposats a l'exterior i es fa necessari un taponament de la ferida. Cal remarcar, en aquest tipus de cremada, que les cèl·lules vasocentrals se situen externament a l'epiteli cremat, el qual posteriorment és reabsorbit. L'epitelització és també força tardana, no s'inicia fins a les 48 h, atès que es necessita un pseudoblastema ben constituït sobre el qual migrar.



**Fig. 315.** Esquema del procés de curació de les ferides per incisió. (A) Secció transversal de la paret corporal normal. (B) El tall deixa al descobert els teixits de les diferents capes de la paret corporal i s'inicia la migració de les cèl·lules vasocentrals. (C) Les cèl·lules vasocentrals s'acumulen per formar el pseudoblastema. (D) La ferida és reepitelitzada. (E) El pseudoblastema sofreix una retracció cap a l'interior de l'animal i es produeix una contracció de la ferida. (F) Formació de la cicatriu. No es restauen les fibres musculars de la paret corporal seccionades.



**Fig. 316.** Esquema del procés de curació de les ferides per cauterització. (A) Secció transversal de la paret corporal normal. (B) La cremada provoca la necrotització de l'epiteli i els teixits subjacents. Es formen butllofes en la part marginal i s'inicia la migració de les cèl.lules vasocentrals. (C) Les cèl.lules vasocentrals inicien la seva acumulació per sobre de l'epiteli necrosat i s'acumulen per formar el pseudoblastema. (D) Es consolida el pseudoblastema. (E) La ferida és reepitelitzada i el pseudoblastema forma en varis punts petites falques de retracció cap a l'interior de l'animal, contribuint a la contracció de la ferida. (F) Formació de la cicatriu.



Tot i tenint en compte les diferències del nostre model amb els mamífers, les cremades observades, amb necrosi d'epidermis, dermis i capes musculars externes, es podrien considerar anàlogues amb cremades de tercer grau (necrosi coagulativa que afecta epidermis, dermis i teixits subjacents, sense formació de butllofes (Panke i McLead, 1985). La zona marginal, on apareixen butllofes per separació de cèl.lules epitelials de la làmina basal amb exsudat a l'interior, té les característiques de les cremades de segon grau (necrosi que afecta l'epidermis i la dermis, amb edema que causa separació de les cèl.lules epitelials basals de la làmina basal, portant a la formació de butllofes subepidèrmiques (Panke i McLead, 1985). La resolució de la cremada en els mamífers comporta substancialment les mateixes fases que en el cas de les ferides: inflamació, formació del teixit de granulació i remodelació de la matriu (Panke i McLead, 1985), que, de la mateixa manera que succeeix en les ferides per incisió, es poden assimilar en certa manera al nostre model. La importància que té la fase inflamatòria en les cremades a mamífers (Panke i McLead, 1985), amb dilatació de vasos, extravasació de cèl.lules sanguínies, formació d'edema i afluença de cèl.lules inflamatòries; és molt més reduïda en el cas d'*Hirudo medicinalis*, que es limita a l'edema que forma butllofes en les parts marginals de la cremada i a l'acció fagocitària de les cèl.lules vasofibroses.

El procés de regeneració de cremades descrit a oligoquets (Sparks, 1972) presenta diferències remarcables amb el nostre model. En el cuc de terra s'observa la formació d'un acumul de cèl.lules celòmiques cap a les 6 h, el qual, a diferència de nostre model, se situa just per sota del teixit cremat. Cap als 2 dies, s'observa descamació de teixit necròtic seguida de reepitelització i la superfície afectada queda recoberta per l'epiteli cap als 5 dies. És de remarcar la capacitat regeneradora d'aquests animals, en els quals, cap els 10 dies, la regeneració dels teixits és quasi completa.

El procés de regeneració de cremades per cauterització realitzades a l'hirudini *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972; LeGore i Sparks, 1973) s'assembla més al descrit a oligoquets que al que s'ha observat a *Hirudo medicinalis*. Els opleòcits se situen també per sota dels teixits cremats i cap a les 24 hores tota la massa de teixit necròtic es comença a separar, encara que algunes restes de teixit necròtic queden englobades pel pseudoblastema i són progressivament despreses cap a la superfície. No es poden comparar el processos de regeneració ja que les cremades realitzades a *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972; LeGore i Sparks, 1973) eren molt extenses i provocaven la mort dels exemplars abans que es pogués completar el procés.

El procés descrit a *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972; LeGore i Sparks, 1973), però, sí que s'assembla al que s'ha descrit per a les cremades amb nitrat de plata, en les quals la necrosi dels teixits és també molt extensa. És possible que la menor importància i extensió de les cremades per cauterització realitzades a *Hirudo medicinalis* permeti la migració de cèl.lules vasocentrals per sobre del teixit necròtic i la reabsorció d'aquest.

## Cremades amb nitrat de plata

En les cremades per nitrat de plata hi ha un fet que marca grans diferències amb les cremades per cauterització. El nitrat de plata difon, per la qual cosa l'àrea afectada serà més gran. La seva presència en els teixits provoca un procés de necrotització i escissió de tota la zona afectada. Això representa una pèrdua molt important de teixits i una gran àrea d'exposició a l'exterior. La dificultat en el tancament de la ferida que això comporta sembla ser la principal causant de l'alta mortalitat que es dona en aquest tipus de ferida, tot i que no es descarta que en ocasions ho sigui el fet que el nitrat de plata penetri fins a la zona visceral i afecti seriosament òrgans vitals.

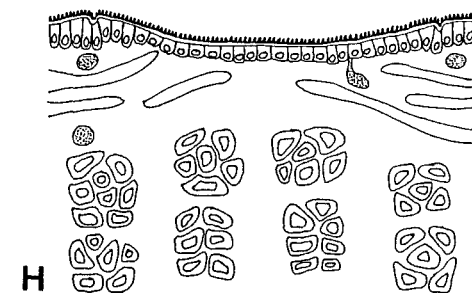
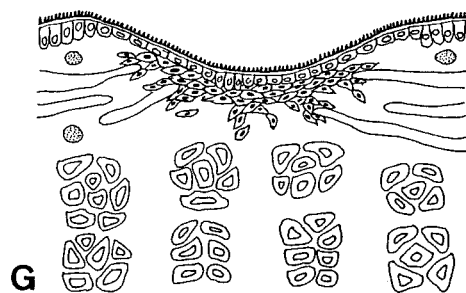
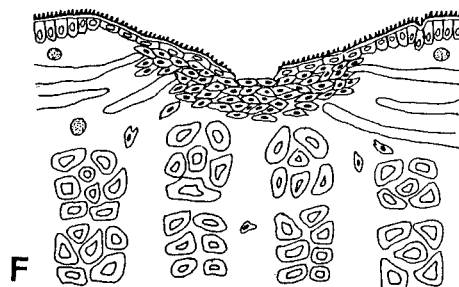
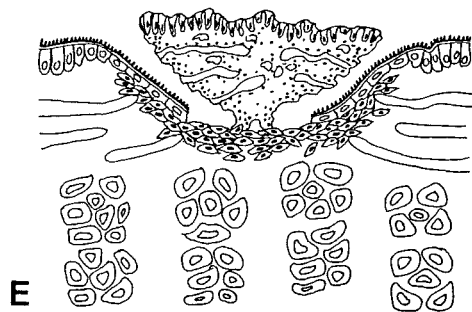
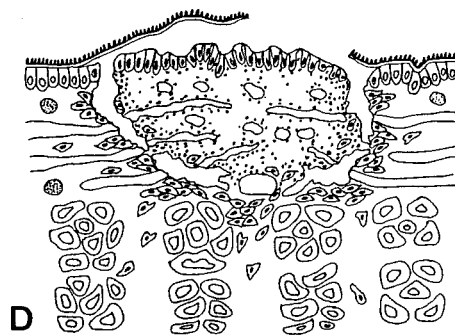
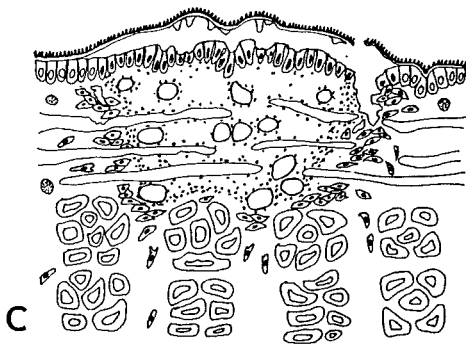
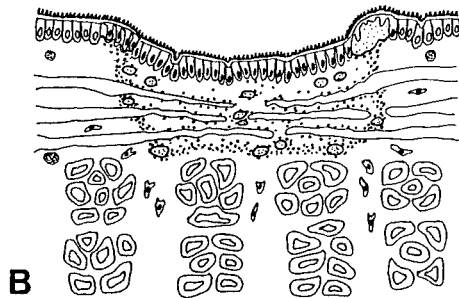
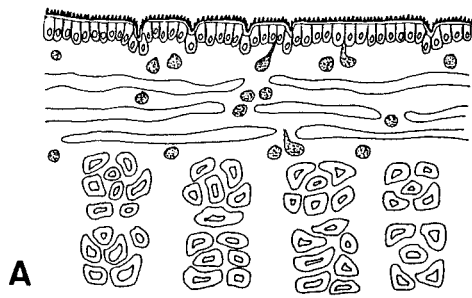
El perill que representa aquesta gran àrea de teixits interns exposats a l'exterior queda parcialment palès pel fet que ja abans que els teixits necròtics s'escindissin, cap a les 24 hores, s'inicia l'acumulació de cèl.lules vasofibroses just per sota de la línia d'escissió, encara que no en forma d'un tap compacte. A més, atès que la massa de teixit cremat s'escindeix de forma centripeta, als marges ja s'ha iniciat l'epitelització quan, cap els 3 dies, tot el teixit acaba de desprendre's.

Tot i que el procés d'epitelització ja ha finalitzat entre els 8 i els 15 dies, el pseudoblastema es manté per un temps molt més llarg, estant als 36 dies encara ben consolidat, i no és fins als 2 mesos que ja s'ha disgregat. Aquest fet pot estar relacionat amb la necessitat de regenerar una matriu connectiva en la zona afectada. Tot i que no s'observa regeneració de gran quantitat de parènquima connectiu, la grandària de l'àrea afectada justifica aquesta llarga permanència.

En l'apartat anterior ja s'ha mencionat la similitud entre aquest tipus de cremades i les efectuades per cauterització a *Piscicola salmositica* (Sparks, 1972; LeGore i Sparks, 1973). La gran quantitat de teixit necrosat en ambdós casos fa difícil la seva reabsorció, i aquest pot ésser el motiu per al qual tota la massa es desprèn després que per sota el teixit necròtic s'han situat les cèl.lules que formen el pseudoblastema, els opledòcits en el cas de *Piscicola salmositica* i cèl.lules vasofibroses en el d'*Hirudo medicinalis*. Aquest procés és també, en aquest aspecte, similar al descrit en cremades per cauterització a oligoquets (Sparks, 1972), discutit també en l'apartat anterior.

---

**Fig. 317.** Esquema del procés de curació de cremades per nitrat de plata. (A) Secció transversal de la paret corporal normal. (B) La cremada provoca la necrotització de l'epiteli i els teixits subjacents i la formació de butllofes en la part marginal. El nitrat de plata penetra en els teixits i forma un front de precipitats. S'inicia la migració de les cèl.lules vasocentrals (C) Les cèl.lules vasocentrals s'acumulen per sota del front de precipitats al mateix temps que s'inicia el tancament dels teixits als marges de la cremada. (D) Progressa l'escissió de la massa de teixits afectats pel nitrat de plata (E) La massa de teixit afectat només s'aguanta per alguns punts a l'animal. El pseudoblastema està ben consolidat i s'inicia el procés d'epitelització als marges de la ferida, en els llocs en que la massa necròtica ja s'ha separat. (F) La massa necròtica ja s'ha separat i la cremada està pràcticament epitelitzada. (G) Finalitza el procés d'epitelització. El pseudoblastema forma en varis punts petites falques de retracció cap a l'interior de l'animal contribuint a la contracció de la ferida. (H) Formació de la cicatriu. S'observa com l'epiteli queda en contacte amb fibres de la musculatura circular per la pèrdua de grans porcions de la paret corporal



## CONCLUSIONS

### CONCLUSIONS GENERALS

El procés de curació de ferides a *Hirudo medicinalis* consta d'una fase de formació d'un tap cel.lular, el pseudoblastema, d'un procés de reepitelització i de la formació d'un teixit cicatricial, com en els altres hirudinis estudiats (Myers, 1935; LeGore i Sparks, 1971 i Cornec, 1984).

Els diferents tipus de ferides realitzats -incisió, cauterització i cremades per nitrat de plata- segueixen el procés general. Presenten, però, diferències relacionades principalment amb la grandària de la ferida i el grau de necrotització dels teixits.

### CONCLUSIONS ESPECÍFIQUES

#### Formació i evolució del pseudoblastema

1- El pseudoblastema, a diferència d'altres espècies estudiades, està format per un sol tipus cel.lular, les cèl.lules vasocentrals, provinents del teixit connectiu, en particular del teixit vasofibrós. Aquestes cèl.lules estan capacitades per realitzar les diferents funcions que en espècies rincobdèl.lides fan diferents tipus cèl.lulars. En concret: taponament de la ferida, fagocitosi dels teixits necrosats i regeneració, almenys, d'una part de la matriu connectiva cicatricial.

2- Tot i que els resultats no són concloents i caldria una altra aproximació experimental, s'ha vist que les cèl.lules vasocentrals tenen capacitat proliferativa durant el procés de curació de ferides. Es desconeix, però, si la proliferació es dona únicament en el teixit vasofibrós o també es dona en les cèl.lules migratòries i en les que formen el pseudoblastema.

3- Totes les evidències indiquen que els feixos de filaments presents en les cèl.lules vasocentrals que connecten amb les unions especialitzades són filaments d'actina.

4- En l'estadi de repòs, al teixit vasofibrós, les cèl.lules vasocentrals formen agrupacions coherents, però no mostren unions intercel.lulars especialitzades visibles en ME.

La coherència del grup queda assegurada per les interdigitacions entre les cèl.lules vasocentrals i, probablement, per unions tipus *adherens* no especialitzades.

Les unions especialitzades amb la matriu són de tipus *adherens*.

- 5- En les primeres fases d'evolució del pseudoblastema, les unions intercel·lulars especialitzades són unions *adherens* típiques.
- 6- La contracció de la ferida es produeix per la retracció del pseudoblastema que arrossega els teixits contigus i provoca un tancament.
- 7- La força motriu que provoca la contracció de la ferida vindria donada pels filaments d'actina de les cèl·lules del pseudoblastema. Les fibres musculars implicades servrien de punts d'ancoratge, sense col·laborar activament en la contracció.
- 8- La presència d'unions especialitzades característiques de la fase de contracció es relaciona amb la transmissió de la força de tensió. Aquestes unions connecten els feixos de filaments d'actina citoplasmàtics amb la matriu o d'una cèl·lula a l'altre. No són unions *adherens* típiques, ja que no lliguen una cèl·lula amb l'altra directament, sinó que estan interconnectades a través d'espais intercel·lulars amplis per material filamentós. Aquest material podria representar un mecanisme transmissor de les forces de tensió a través de l'espai extracitoplasmàtic.

## **Reepitelització**

- 1- L'epitelització s'inicia quan el pseudoblastema està consolidat i segueix el mateix patró que la reepitelització de ferides en epitelis monoestratificats de vertebrats, es a dir, per migració de tota la capa per sobre del substrat, segons l'anomenat model de lliscament.
- 2- La desconexió dels tonofilaments amb els hemidesmosomes i la desestructuració dels hemidesmosomes dèrmics sembla necessària per a la migració de l'epiteli. En canvi, el complex d'unió lateral es manté durant tot el procés, conservant la coherència necessària perquè l'epiteli migri com una capa unificada.
- 3- Les unions basals de l'epiteli amb el pseudoblastema no són similars als hemidesmosomes basals ni estan connectades amb els tonofilaments, sinó que presenten el mateix aspecte que les unions intercel·lulars de les primeres fases d'evolució del pseudoblastema.
- 4- La regeneració de la membrana basal de l'epiteli no s'inicia fins que no s'ha començat a regenerar matriu connectiva i els hemidesmosomes basals no es tornen a formar fins que no s'ha reestablert la membrana basal.

## **Regeneració glandular**

- 1- Les cèl·lules glandulars mucoses del tegument no acompanyen a la resta de l'epiteli en el procés migratori, sinó que degeneren abans que s'iniciï la migració, igualment que en el cas dels oligoquets (Burke, 1974 b).

- 2- Les cèl.lules epitelials clares amb granulació basòfila que es troben disseminades en l'epidermis cicatricial s'identifiquen amb un estadi inicial del procés de diferenciació glandular, en el qual les cèl.lules epitelials columnars incrementen el seu aparell sintètic. Aquest estadi podria ser comú per als dos tipus glandulars, piriformes i tubulars.
- 3- Les cèl.lules epitelials amb granulació eosinòfila són estadis immadurs de les glàndules piriforms.
- 4- Les cèl.lules riques en sàculs del reticle endoplasmàtic rugós i amb dictiosomes característics de glàndules tubulars, s'identifiquen amb glàndules tubulars immadures.
- 5- La presència a les glàndules tubulars madures d'una membrana basal continua amb la de la resta de l'epiteli i l'existència de complexos d'unió apicals idèntics als de les cèl.lules epitelials, indiquen, també per aquestes glàndules, un origen epitelial.
- 6- La diferenciació dels dos tipus glandulars, piriformes i tubulars, és de tipus dicotòmic, a diferència d'altres hirudinis en els que les piriformes són un estadi intermediari i les tubulars l'estadi últim (Cornec, 1990).

## **Regeneració de la cicatriu**

- 1- En la regeneració de la matriu connectiva hi intervenen dos mecanismes. D'una banda, les cèl.lules del pseudoblastema són responsables, almenys, del recobriment fibrós que presenten en l'estadi de retracció. D'altra banda, es produeix infiltració de matriu connectiva i de processos citoplasmàtics dels fibròcits pels marges del pseudoblastema.
- 2- El teixit cicatricial encara es diferencia del teixit normal 8 mesos després de la realització de la ferida.

La matriu connectiva normal presenta diferències segons les regions del cos. Les fibres del teixit perivisceral presenten el còrtex prim, amb les fibril·les organitzades paral·lelament a l'eix de la fibra. En canvi, les fibres de la dermis i teixit connectiu intermuscular tenen el còrtex gruixut, amb fibril·les que s'organitzen paral·lelament en la zona proximal a la medul·la i de forma desorganitzada en la part més distal.

A la cicatriu, tot i trobar-se en la zona dèrmica o intermuscular, les fibres connectives són del tipus prim.
- 3- A la cicatriu es dona colonització per part de fibròcits petites fibres musculars i nervis.
- 4- Durant períodes de 2 a 3 mesos no es regeneren les grans fibres musculars de la paret corporal seccionades o escindides.

## **Tipus de ferides**

1- En les ferides per incisió els fenòmens més importants són el recobriment i tancament del tall.

2- En les cremades per cauterització són importants els fenòmens d'eliminació de teixits necròtics. Els teixits no queden exposats a l'exterior i per tant no és necessari un taponament de la ferida, siguent l'acumulació de cèl.lules vasocentrals força més tardana que en les ferides per incisió. El pseudoblastema se situa externament a l'epiteli cremat que posteriorment és reabsorbit. En tractar-se d'una superfície força gran, la reepitelització, retracció i disgregació són també més lentes.

3- Les cremades per nitrat de plata presenten una quantitat molt important de teixits necrosats, la qual no pot ser reabsorbida, produint-se l'escissió de tota la zona afectada. La formació prèvia d'acumuls de cèl.lules vasocentrals, just per sota del teixit necròtic, evita que en produir-se l'escissió quedi una superfície molt important de la paret corporal exposada a l'exterior. Aquest model de cremades també afecta una gran extensió, per la qual cosa el procés és també força lent.



## BIBLIOGRAFIA

- Archer, R.K. 1966. *Técnicas de Hematología Animal*. Ed. Acribia. Zaragoza.
- Baguñà, J., Saló, E. i Auladell, C. 1989. Regeneration and pattern formation in planarias. III Evidence that neoblasts are totipotent stem cells and the source of blastema cells. *Development*, 107: 77-86.
- Bancroft, J.D. 1975. *Histochemical techniques*. Ed. Butterworth. London.
- Bayliss, O.H. 1984. *Lipid Histochemistry*. Microscopy Handbooks, 6. Oxford University Press. Oxford.
- Berchtold, J.P., Sauber, F. i Reuland, M. 1985. Etude ultrastructurale de l'évolution du tégument de la sangsue *Hirudo medicinalis* L. (Annélide, Hirudinée) au cours d'un cycle de mue. *International Journal of Invertebrate Reproduction and Development*, 8: 127-138.
- 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: 289-31
- Bernfield, M. 1984. *Basement membranes and cell movement*. Ciba Foundation Symposium. Pitman Ed. London.
- Blackshaw S.E. 1981. Morphology and distribution of touch cell terminals in the skin of the leech. *Journal Physiology*, 320: 219-228.
- Bonet, S. i Huguet, G. 1985. Tècniques habituals de coloracions semifines de material inclòs en glicol metacrilat. (GMA) *Scientia gerundensis*, 10: 23-32.
- Bonet, S. i Molinas, M. 1983. Utilitat del glicol metacrilat en l'obtenció de talls semifins per a la histologia. *Ann. Sec. Ciènc. Col. Univ. Girona, (U.A.B.)*, 9: 21-29.
- Bonet, S. i Molinas, M. 1985. Musculatura intrínseca de l'epididim de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774) (Hirudinea, Erpobdellidae). *Scientia gerundensis*, 11: 51-59.
- Bradbury, S. 1956. A Histochemical Study of the Adipose Cell of the Leech, *Glossiphonia complanata*. *Quart. J. of Micros. Sci.*, 97: 499-517.
- Bradbury, S. 1957 a. A Histochemical Study of the Connective Tissue-Fibres in the Leech, *Glossiphonia complanata*. *Quart. J. of Micros. Sci.*, 98: 29-45.
- Bradbury, S. 1957 b. A Histochemical Study of the Pigment Cells of the Leech, *Glossiphonia complanata*. *Quart. J. Micros. Sci.*, 98: 301-314.
- Bradbury, S. 1958. A Cytological and Histochemical Study of the Connective Tissue Fibres of the Leech, *Hirudo medicinalis*. *Quart. J. of Micros. Sci.*, 99: 131-142.
- Bradbury, S. 1959. The Bortryoidal and Vaso-fibrous Tissue of the Leech *Hirudo medicinalis*. *Quart. J. Micros. Sci.*, 100: 483-498.
- Bradbury, S. i Meek, G.A. 1958 a. A study of fibrogenesis in the leech, *Hirudo medicinalis*. *Quart. J. of Micros. Sci.*, 99: 143-148.
- Bradbury, S. i Meek, G.A. 1958 b. The fine structure of the adipose cell of the leech, *Glossiphonia complanata*. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 4: 603-608.

- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248-254.
- Burke, J.M. 1974 a. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta) II. A fine structural study of the role of the epidermis. *Cell. Ins. Res.*, 154: 61-81.
- Burke, J.M. 1974 b. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta) I. Histology and 3H-Thymidine radioautography on the epidermis. *Expt. Zool.*, 188: 49-63.
- Burke, J.M. 1974 c. Wound healing in *Eisenia foetida* (Oligochaeta) III. A fine structural study of the role of the non-epithelial tissues. *Cell. Tiss. Res.* 154: 83-102.
- Burridge, K., Fath, K., Kelly, T., Nuckolls, G. i Turner, C. 1988. Focal Adhesions: Transmembrane Junctions Between the Extracellular Matrix and the Cytoskeleton. *Ann. Rev. Cell Biol.*, 4: 487-525.
- Chapron, C. 1964. Les phénomènes de cicatrisation et les stades précoces de la régénération antérieure chez le Lombricien *Eisenia foetida unicolor*. *C.R. Acad. Sc. Paris.*, 259: 1200-1202.
- Chapron, C. 1970. Régénération céphalique chez le lombricien *Eisenia foetida unicolor*: structure, origine et role du bouchon cicatriciel *Arch.Zool.Exp. Gén.*, 111: 217-227.
- Clark, A.W. 1965. Microtubules in some unicellular glands of two leeches. *Zellforsch. Mikrosk. Anat.*, 68: 568-588.
- Clark, R.A.F. i Henson, P.M. 1988. *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Plenum Press. New York.
- Coggeshall, R.E. i Yaksta-Sauerland, B.A. 1974. The Localization of 5-Hydroxytryptamine in Chromaffin Cells of the Leech Body Wall. *J. Comp. Neur.*, 156: 459-470.
- Cornec, J.P. 1971. Sur le comportement des tissus après amputation chez l'Hirudinée pharyngobdelle *Erpobdella octoculata* *Ann. Embryol. Morph.*, 4: 269-279.
- Cornec, J.P. 1980. Régulation et régénération après amputation de la région postérieure de jeunes Hirudinées de l'espèce *Erpobdella octoculata*. *Arch. Zool. exp. gén.*, 121: 173-181.
- Cornec, J.P. 1981. Comportement des tissus après amputation de la région antérieure chez les jeunes Hirudinées de l'espèce *Erpobdella octoculata*. *Bull. Soc. Zool. Fra.*, 106: 101-110.
- Cornec, J.P. 1984. Modifications ultrastructurales après amputation dans le territoire de régénération postérieure de l'Hirudinée Rhynchobdelle *Helobdella stagnalis*. *Arch. Anat. Microscop.*, 73: 269-289.
- Cornec, J.P. 1990. Etude ultrastructurale des bourgeons de régénération mis en place après amputation de la ventouse postérieure chez l'hirudinée rynchobdelle adulte *Helobdella stagnalis*. *Can. J. Zool.*, 68: 303-312.
- Cornec, J.P. i Coulomb-Gay, R. 1975. Détection par l'histochimie des activités phosphatasiques acides et alcalines normales et de leurs variations après amputation chez l'Oligochète *Eiseniella tetraedra* et les Hirudinées *Erpobdella octoculata* i *Helobdella stagnalis* (L). *C. R. Soc. Biol.*, 169: 86-95.
- Cornec, J.P. i Coulomb-Gay, R. 1982. Mise en évidence d'un pouvoir régénérateur chez l'Hirudinée Rhynchobdelle *Helobdella stagnalis*. *Arch. Anat. Microsc.*, 71: 227-239.

Cornec, J.P., Cresp, J., Delye, P., Hoarau, F i Reynaud, G. 1987. Tissue responses and organogenesis during regeneration in the oligochaete *Limnodrilus hoffmeisteri* (Clap). *Can. J. Zool.*, 65: 403-414.

Dales, R. P. 1978. Defense Mechanisms. A: *Physiology of Annelids*. Editor P. J. Mill. Academic Press. London. pp: 479-507.

Del Rio, J.A. i Soriano E. 1989. Immunocytochemical detection of 5'-bromodeoxyuridine incorporation in the central nervous system of the mouse. *Developmental Brain Research*, 49: 311-317.

Douglas, S. 1970. Origin of the Regeneration Blastema in Polychaete Annelids. *Am. Zoologist*, 10: 101-112.

Edwards, C.A. i Lofty, J.R. 1977. *Biology of Earthworms*. Ed. Chapman and Hall. London.

Elliot, J.M. i Mann, K. H. 1979. *A key to the British freshwater leeches*. Freshwater Biological Association.

Fischer, E., Lovas, M. i Németh, P. 1976. An Experimental Analysis of the Vasofibrous Tissue in the Leech, *Haemopsis sanguisuga* L. *Zool. Anz.*, 197: 289-299.

Franzblau, C i Faris, B. 1982. Elastin. A: *Cell Biology of Extracellular Matrix*. Editor E.D. Hay. Plenum Press. New York. pp: 65-93.

Furthmayr, H. 1988. Basement Membranes. A: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Editors R.A.F. Clark i P.M. Henson. Plenum Press. New York. pp: 525-558.

Gabe, M. 1968. *Techniques Histologiques*. Masson et Cie editeurs. Paris.

Garana, M.R., Petroll, W.M., Chen, W., Herman, I.M., Barry, P., Andrews, P. Cavanagh, H.D. i Jester, J.V. 1992. Radial Keratotomy II. Role of the Myofibroblast in Corneal Wound Contraction. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.*, 33: 3271-3282.

García-Más, I. 1981. Estudio histológico y ultraestructural de los músculos intrínsecos del tracto digestivo de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774) (Hirudinea, Erpobdellidae). *Morfología normal y patológica*, 5: 87-96.

Grassé, P.P., Poisson, R.A. i Tuzet, O. 1976. Invertebrados. A: *Zoología*. Editor P. Grassé. Ed Toray - Masson. Barcelona.

Green, C.R. 1984. Intercellular Junctions. A: *Biology of the Integument I Invertebrates*. Editors J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy i K.S. Richards. Ed. Springer-Verlag. Berlin. pp: 5-16.

Gupta, A. P. 1986. *Hemocytic and Humoral Immunity in Arthropods*. Editor A.P. Gupta. Wiley-Interscience Publication. New York.

Hale, L.J. 1965. *Biological Laboratory Data*. Science Paperbacks. London.

Hayat, M.A. 1989. *Electron Microscopy*. Macmillan Press. London.

Henderson, L.P., Kuffler, D.P., Nicholls, J. i Zhang, R.-J. 1983. Structural and functional analysis of synaptic transmission between identified leech neurones in culture. *J. Physiol.*, 340: 347-358.

Huguet, G. 1985. Estructura i ultraestructura del tegument de *Dina lineata*. Tesina de llicenciatura. Universitat Autònoma de Barcelona.

- Huguet, G. i Molinas, M. 1985. Estructura i ultraestructura del revestiment cuticular de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774). *Scientia gerundensis*, 11: 39-59.
- 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.
- Humason, G.L. 1967. *Animal Tissue Techniques*. W.H. Freeman and Company. San Francisco.
- Jamieson, B.G.M. 1981. Wound-healing and regeneration. A: *The Ultraestructure of the Oligochaeta*. Editor Jamieson, B.G.M. Academic Press.
- Kurpakus, M.A., Stock, E.L. i Jones, J.C.R. 1990. Analysis of wound healing in an *in vitro* model: early appearance of laminin and a  $125 \times 10^3$  M<sub>r</sub> polypeptide durind adhesion complex formation. *Journal of Cell Science*, 96: 651-660.
- Leatherm, A.J.C. i Atkins, N.J. 1983. Lectin Binding to Parafin Sections. A: *Techniques in Immunocytochemistry*. Editors G.R. Bullock i P. Petrusz. Academic Press Inc. London. pp: 39-70.
- LeGore, R.S. i Sparks, A.L. 1971. Repair of body incision in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *J. Invert. Pathol.*, 18: 40-45.
- LeGore, R.S. i Sparks, A.L. 1973. Repair of body wall burns in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *J. Invert. Pathol.*, 22: 298-299.
- Lent, C.M. 1973. Retzius cells: neuroeffectors controlling mucus secretion by leeches. *Science*, 179: 693-696.
- Mahan, J.T. i Donaldson, D.J. 1986. Events in the movement of newt epidermal cells across implanted substrates. *J. Exp. Zool.*, 237: 35-44.
- Malecha, J. 1979. Contribution a l'etude de la biologie de l'hirudinée rhynchodelle *Piscicola geometra* L. Tesi doctoral. Universite des Sciences et Techniques de Lille I.
- Mann, K.H. 1962. *Leeches (Hirudinea): their structure, physiology, ecology and embryology*. Pergamon Press. Oxford.
- Marinkovich, M.P., Lunstrum G.P. i Burgeson, R.E. 1992. The Anchoring Filament Protein Kalinin Is Synthesized and Secreted as a High Molecular Weight Precursor. *The Journal of Biological Chemistry*, 267: 17900-17906.
- Masuda-Nakagawa, L.M., Muller, K.J. i Nicholls, J.G. 1990. Accumulation of laminin and microglial cells at sites of injury and regeneration in the central nervous system of the leech. *Proc. R. Lond. B.*, 241: 201-206.
- McCarthy, J.B., Sas, D.F. i D.F. Furcht D.F. 1988. Mechanisms of Parenchymal Cell Migration into Wounds. A: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Editors R.A.F. Clark i P.M. Henson. Plenum Press. New York. pp: 281-319.
- McClintock Turbeville, J. 1991. Nemertinea. A: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Editors F.W.Harrison i B.J.Bogitsh. Wiley-Liss. New York. pp: 285-328.
- Meglitschs, P.A. 1978. *Zoologia de invertebrados* H. Blume Edicions. Madrid.
- Molinas, M. i Huguet, G. 1993. Ultrastructure and Cytochemistry of Secretory Cells in the Skin of the Leech, *Dina lineata*. *J. of Morph.*, 216: 295-304.
- Molines, M., Bonet, S. i Montoliu, M. 1989. Les sangoneres. A: *Quaderns dels Indiketes*. Editors: J. Sargatal i J. Fèlix. Ed. Carles Vallès. Figueres. pp: 315-320.

- Myers, R.J. 1935. Behavior and morphological changes in the leech, *Placobdella parasitica*, during hypodermic insemination. *J. of Morph.*, 53: 617-653.
- Paniagua, R. i Nistal, M. 1983. *Introducción a la Histología Animal Comparada*. Ed. Labor Universitaria. Barcelona.
- Paniagua, R., Nistal, M., Sesma, P., Alvarez-Uría, M. i Fraile, B. 1993. *Citología e histología vegetal y animal*. Ed. Interamericana, McGraw-Hill. Madrid.
- Panke, T.W. i McLeod, C.G. 1985. *Pathology of Thermal Injury*. Ed Grume and Straton. Orlando.
- Pantin, C. F. A. 1968. *Técnicas microscópicas para zoólogos*. Ed Academia. León.
- Rahemtulla, F. i Lvtrup, S. 1975. The comparative biochemistry of invertebrate mucopolysaccharides. III, Oligochaeta and Hirudinea. *Comp. Biochem. Physiol.* 503: 627-629.
- Richards, K.S. 1984. Annelida. Cuticle. A: *Biology of the Integument I Invertebrates*. Editors J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy i K.S. Richards. Ed. Springer-Verlag. Berlin. pp: 310-322.
- Rieger R.M., Tyler, S. Smith, J.P.S. i Rieger, G.E. 1991. Platyhelminthes: Turbellaria. A: *Microscopic Anatomy of Invertebrates*. Editors F.W.Harrison i B.J.Bogitsh. Wiley-Liss. New York. pp: 7-140.
- Roland, J.C. 1978. General preparation and staining of thin sections. A: *Electron microscopy and cytochemistry of plant cells*. Editor J.L. Hall. Elsevier North-Holland Biomedical Press. Amsterdam. pp: 2-62.
- Rowlerson, A.M. i Blackshaw, S.E. 1991. Fibre types in leech body wall muscle. *J. exp. Biol.*, 157: 299-311.
- Saló, E., Auladell, M.C. i Bagaña, J. 1984. Efecte diferencial de la injecció de neoblastes i cèl.lules diferenciades a planàries irradiades. *Biologia del Desenvolupament*, 2: 257-264.
- Sawyer, R.T. i Fitzgerald, S.W. 1981. Hirudineans. *Invertebrate Blood Cells. Vol 1*. Ed N.A. Ratcliffe i A.F. Rowley. Academic Press. London.
- Sawyer, R.T. 1986. *Leech Biology and Behaviour*. Clarendon Press. Oxford.
- Singhal, R.N., Sarnat, H.B. i Davies, R.W. 1989. Effects of Anoxia, hyperoxia, and salinity on neurons in the leech *Nephelopsis obscura* (Erpobdellidae): RNA redistribution by fluorescence histochemistry. *J. Invert. Pathol.*, 53: 93-101.
- Skalli, O. i Gabbiani, G. 1988. The Biology of the Myofibroblast Relationship to Wound Contraction and Fibrocontractive Diseases. A: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Editors R.A.F. Clark i P.M. Henson. Plenum Press. New York. pp: 373-404.
- Sparks, A.K. 1972. *Invertebrate Pathology, Noncommunicable Diseases*. Academic Press. New York.
- Sperarman, R.I.C. 1973. *The integument*. Cambridge University Press. Londres.
- Stenn, K.S. i DePalma, L. 1988. Re-epithelialization. A: *The molecular and cellular biology of wound repair*. Editors R.A.F. Clark i P.M. Henson. Plenum Press. New York. pp: 321-335.
- Vaughan, R.B. i Trinkaus, J.P. 1966. Movements of epithelial cell sheets in vitro. *J. Cell Sci.*, 1: 407-413.

Vykliky, L. i Nicholls, J. 1988. Specificity of connections formed by nociceptive cells of the leech in tissue culture. *J. exp. Biol.*, 134: 17-26.

Wallace, B.G. 1981. Neurotransmitter Chemistry. A: *Neurobiology of the leech*. Editors Müller, K.J., Nicholls, J.G. i Stent, G.S. Cold Spring Harbor Laboratory. New York. pp: 147-172.

Welsch, U., Storch, V. i Richards, K.S. 1984. Annelida. Epidermal Cells. A: *Biology of the Integument I Invertebrates*. Editors J. Bereiter-Hahn, A.G. Matoltsy i K.S. Richards. Springer-Verlag. Berlin. pp: 269-296.

Werner, A. W., Sawyer, R.T. i Berry, M.S. 1989. Extraglandular innervation of the salivary cells of the leech *Haementeria ghilianii*: neuronal stimulation elicits gland-cell action potentials and secretion. *J. Exp. Biol.*, 143: 389-410.

Woodley, D. T. i Briggaman, R. A. 1988. Re-formation of the Epidermal-Dermal Junction during Wound Healing. A: *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*. Editors R.A.F. Clark i P.M. Henson. Plenum Press. New York. pp: 559-586.

## ANNEX 1

### REACTIUS

### TAMPONS

#### Borat pH 8,5 0,13 M (Hale,1965)

Solució A:

12,404 g  $H_3BO_3$  + 100 ml NaOH 1N / 1 L  $H_2O$ .

Solució B:

HCl 0,1 N.

A 65 ml de solució A s'afegeixen 35 ml de solució B per obtenir 100 ml de tampó borat pH 8,5 0,13 M.

#### Cacodilat 0,1 M i 0,05 M pH 7,2 (Hayat, 1989)

cacodilat .....2,14 g (0,1 M)  
 $Cl_2$  Ca .....58,8 mg (4mM)  
 $Cl_2$  Mg .....81,32 mg (4 mM)  
 Sacarosa.....4 g

S'afegeixen 80 ml de  $H_2O$  Per ajustar el pH a 7,2 s'afegeix ClH 0,1 N i s'enrasa a 100 ml amb  $H_2O$  bidestil.lada obtenint una concentració 0,1 M. Per a la seva utilització es dilueix a la meitat amb aigua bidestil.lada obtenint una concentració 0,05 M.

#### Fosfat de Sörensen pH 7,2 0,05 M (Hale, 1965)

Solució A:

11,876 g  $NaHPO_4 \cdot 2H_2O$  / 1L  $H_2O$

Solució B:

9,078 g  $KH_2PO_4$  / 1L  $H_2O$

A 540 ml de solució A s'afegeixen 210 ml de solució B i 250 ml d'aigua destil.lada per obtenir 1 L de tampó fosfat pH 7,2 0,05 M.

#### Fosfat pH 7,4 0,05 M (En "The cell proliferation kit", Amersham)

$Na_2HPO_4$ .....5,75 g  
 $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ .....1,48 g

Enrasar a 1 L amb  $H_2O$  destil.lada



**Fosfat salí (PBS) 0,1 M pH 7,4 (En "The cell proliferation kit", Amersham)**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....11,5 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....2,96 g  
NaCl.....5,84 g

Enrasar a 1 L amb H<sub>2</sub>O destil.lada

**Fosfat salí (PBS) 0,05 M pH 7,4**

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5,75 g  
NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.2H<sub>2</sub>O.....1,48 g  
NaCl.....5,84 g

Enrasar a 1 L amb H<sub>2</sub>O destil.lada

**Tris maleat pH 7,4 0,01 M (Bancroft, 1975)**

A 0,121 g de Tris (hidroximetil)-aminometano i 0,116 g d'àcid maleic afegir 90 ml de H<sub>2</sub>O. Neutralitzar a pH 7,4 amb NaOH 0,2 N (uns 53 ml) i enrasar a 1 L amb H<sub>2</sub>O.

**FIXADORS**

**Alcohol àcid (En "The cell proliferation kit", Amersham)**

Etanol absolut.....90 ml.  
Àcid acètic.....5 ml.  
H<sub>2</sub>O.....5 ml.

**Formol al 10% creta (Bancroft, 1975)**

Formol al 10% tamponat a pH 7 amb carbonat de calci

**Formol al 10% en tampó fosfat de Sørensen pH 7,2 0,05 M (Bancroft, 1975)**

A 900 ml de tampó fosfat pH 7,2 0,05 M s'afegeixen 100 ml de formol (formalina 40%) per obtenir 1 L de formol al 10%.

**Formol 10% en PBS 0,1 M pH 7,4 (En The cell proliferation kit, Amersham)**

A 900 ml de tampó fosfat salí (PBS) pH 7,2 0,1 M s'afegeixen 100 ml de formol (formalina 40%) per obtenir 1 L de formol al 10%.

**Formaldehid-glutaraldehyd en tampó cacodilat 0,1 M pH 7,2 (Roland, 1978)**

Les solucions de formaldehyd comercials porten metanol i no es poden fer servir directament. Es pot obtenir formaldehyd lliure de metanol a partir de paraformaldehid.

A 20 ml d'aigua bidestil.lada s'afegeixen 2 g de paraformaldehid i es remena energicament durant 5 minuts a 60° C. S'afegeix, gota a gota, una solució d'hidròxid sòdic al 4% 1N fins que el líquid esdevingui ben transparent.

Es deixa refredar completament i s'afegeixen 50 ml de tampó cacodilat 0,1 M. Finalment s'afegeixen 15 ml de glutaraldehyd al 25% i s'enrasa fins a 100 ml amb aigua destil.lada.

**Líquid de Carnoy (Bancroft, 1975)**

Etanol absolut.....	60 ml.
Cloroform.....	30 ml.
Acid acètic.....	10 ml.

**Tetraòxid d'osmi (Roland, 1978)**

A partir de tetraòxid pur es fa una solució al 2% amb aigua bidestil.lada. Es trenca una ampolla de 0,5 g de OsO<sub>4</sub> a dins un pot de vidre amb 25 ml de H<sub>2</sub>O bidestil.lada. Aquesta solució es pot guardar un cert temps molt ben tapada i a les fosques. A l'hora de fer servir es dilueix amb un 50% de tampó cacodilat 0,1 M pH 7,2 per obtenir una solució de tetraòxid d'osmi al 1%.

**SOLUCIONS FISIOLÒGIQUES****Solució fisiològica de Nicholss i Kuffler (Sawyer, 1986)**

NaCl.....	115 mM
CaCl <sub>2</sub> .....	1,8 mM
KCl.....	4 mM

Enrasar a 1 L amb tampó tris maleat 10 mM

**Solució salina 0,6% 0,1 M.****REACTIUS PER A MICROSCÒPIA ELECTRÒNICA****Acetat d'uranil (Hayat, 1989)**

Solució saturada d'acetat d'uranil en aigua bidestil.lada- acetona 1:1

**Citrat de plom (Hayat, 1989)**

Pb(NO<sub>3</sub>).....1,33 g  
Na(C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O<sub>7</sub>).2H<sub>2</sub>O.....1,76 g  
H<sub>2</sub>O bidestil.lada i bullida.....30 ml

Agitar durant 30 minuts i afegir 8 ml de NaOH 1 N. Enrasar a 50 ml amb aigua bidestil.lada bullida.

## ANNEX 2

### COLORACIONS

#### Blau d'alcià - PA-S (Bonet i Huguet, 1985)

##### Reactius:

- Blau d'alcià 1% en solució aquosa.
- Àcid periòdic 1% en solució aquosa.
- Reactiu de Schiff (Merck, 9033).

##### Procediment:

- 1- Tenyir amb blau d'alcià de 24 a 48 hores en una cambra humida.
- 2- Rentar ràpidament amb aigua destil·lada.
- 3- Oxidar amb àcid periòdic durant 20 minuts.
- 4- Rentar amb aigua corrent durant 10 minuts.
- 5- Tractar amb reactiu de Schiff durant 15 minuts.
- 6- Rentar amb aigua destil·lada.
- 7- Assecar en placa calefactora i muntar.

##### Resultats:

Mucopoliscàrids neutres i cutícula.....rosa  
 Mucopolisacàrids àcids.....blau

#### Blau d'alcià (Bradford, 1976)

##### Reactius:

- Blau d'alcià 1% en àcid acètic al 3%

##### Procediment:

- 1- Tenyir amb blau d'alcià de 24 a 48 hores en una cambra humida.
- 2- Rentar ràpidament amb aigua destil·lada.
- 3- Assecar en placa calefactora i muntar.

##### Resultats:

Mucopolisacàrids àcids.....blau

#### Blau de coomasie G (Huguet i Molinas 1985)

##### Reactius:

- Blau de coomasie G
 

Blau de coomasie G	10 mg.
Fosfòric 85%	10 ml.
Alcohol 95%	5 ml.
Aigua destil·lada	enrasar a 100 ml.

Procedimet:

- 1- Desparafinar i portar els tall a alcohol de 70.
- 2- Tenyir amb la solució colorant durant 20 minuts.
- 3- Rentar amb aigua destil.lada acuradament.
- 4- Deshidratar rapidament i muntar amb Entellan.

Resultats:

El blau de coomasie, que en forma aniònica té un tó vermellós, es transforma en blau al unir-se als grups amino de les proteïnes, per la qual cosa les estructures riques amb proteïnes es tenyeixen de blau.

**Blau de Prussia** (Bancroft, 1975)

Reactius:

- Solució A: ferrocianur potàssic al 2% (preparar abans de fer servir).
- Solució B: àcid clorhídric al 2%.
- Solució colorant: Just abans d'utilitzar-la barrejar la solució A amb la solució B al 50%.

Procediment:

- 1- Desparafinar i rehidratar els talls.
- 2- Tenyir amb la solució colorant durant 5 hores.
- 3- Rentar amb aigua corrent.
- 4- Deshidratar i muntar amb Entellan.

Resultats.

Ió ferric.....blau

**Blau de toluïdina** (Humason, 1967).

Reactius

Blau de toluïdina al 2% en aigua destil.lada

Procediment:

- 1- Desparafinar i rehidratar.
- 2- Tenyir amb blau de toluïdina durant un minut.
- 3- Rentar amb aigua destil.lada de 2 a 3 minuts.
- 4- Deshidratar i muntar.

Resultats:

Nuclis.....blau intens  
Mucopolisacàrids àcids.....lila-vermellós  
Citoplasma.....blau-verdós  
Muscul.....blau brillant

**Blau de toluïdina per seccions de G.M.A** (Bonet i Huguet, 1985).

Reactius

- Blau de toluïdina
- |                   |        |
|-------------------|--------|
| Blau de toluïdina | 1 g    |
| Tetraborat sòdic  | 1 g    |
| Aigua destil.lada | 100 cc |

**Procediment:**

- 1- Tenyir amb blau de toluïdina de 10 a 20 segons sota la flama, evitant l'emissió de vapors.
- 2- Rentar ràpidament i acuradament amb aigua destil·lada. Diversos passos seran necessaris per retirar l'exés de colorant retingut pel plàstic.
- 3- Assecar en placa calefactora i muntar.

**Resultats:**

Nuclis.....blau intens  
 Mucopolisacàrids àcids.....lila-vermellós  
 Coloració de fons.....blavosa

**Carmí boràcic (Pantin, 1968)****Reactius:**

- Es fa una solució concentrada de carmí boràcic en una solució de borax al 4% i es deixa bullir durant 1/2 h. Es dilueix a parts iguals amb alcohol de 70%, es deixa reposar i es filtre.
- Alcohol àcid: 4 gotes de ClH conc. en 100 ml d'alcohol de 70%

**Procediment:**

- 1- Posar la mostre a alcohol de 70%.
- 2- Tenyir amb carmí boràcic durant uns 15 min.
- 3- Diferenciar amb alcohol àcid fins que quedi transparent i brillant.
- 4- Deshidratar amb alcohol al 90% durant 10 min.
- 5- Dos canvis d'alcohol absolut de 5 a 30 min. cada un.
- 6- Aclarir amb xilol.
- 7- Muntar amb Entellan.

**Resultats:**

Nuclis ..... vermell

**Giemsa (Archer, 1966)****Reactius:**

- Solució mare de Giemsa (Sigma) diluïda al 50 % en aigua destil·lada.

**Procediment:**

- 1- Assecar a l'aire les preparacions.
- 2- Fixar durant 2 minuts amb metanol absolut.
- 3- Tenyir durant 5 minuts amb la solució colorant.
- 4- Rentar amb aigua fins que l'extensió tingui un color rosa.
- 5- Eixugar amb paper de filtre.
- 6- Examinar per immersió sense montar.

**Resultats:**

Nuclis ..... vermell-púrpura  
 Grànuls basòfils .....púrpura fosc  
 Grànuls eosinòfils .....vermell o vermell taronja  
 Grànuls neutròfils .....vermell marronós o lila  
 Citoplasma .....de blavós a rosa

**Hematoxilina de Delafield-eosina, mètode regresiu (Humason, 1967).****Reactius:****- Hematoxilina de Delafield**

Solució mare:

Hematoxilina	4 g
Alcohol etílic 96%	25 ml
Solució saturada d'alum amoniacal (SO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> Al NH <sub>4</sub> (ca. 60 gr. d'alum)	400 ml
Glicerina	100 ml
Alcohol metílic	100 ml

Es dissold l'hematoxilina en alcohol etílic escalfant al bany maria i s'afegeix gota a gota sobre la solució d'alum. Es deixa reposar de 6 a 8 dies i després es filtra i s'hi afegeix la glicerina i l'alcohol metílic. Es deixa madurar un mínim de 6 setmanes en un recipient que no quedi gaire ple, per afavorir l'airejament. Es conserva llarg temps en una ampolla ben tapada.

Per a la utilització s'ha de diluir en un o dos volums d'aigua destil·lada (segons la quantitat de la solució mare, el temps d'envelliment, i la voluntat de l'operador). Comprovar-ne l'estat tirant una gota de colorant en un vas amb aigua carbonatada, s'ha d'observar un bon viratge del color.

**- Eosina al 2% en alcohol al 70%****- Alcohol àcid:**

etanol al 70 %	1000 ml
àcid clorhídric conc.	1 ml

**- Alcohol amoniacal:**

etanol al 70 %	1000 ml
amoníac conc.	1 ml.

**Procediment:**

- 1- Desparafinació i rehidratació dels talls
- 2- Coloració en hematoxilina fins obtenir una sobrecoloració (mínim 16 minuts).
- 3- Rentar en abundant aigua corrent durant 3 minuts.
- 4- Diferenciar amb alcohol àcid durat uns segons. Parar la diferenciació amb alcohol amoniacal i verificar al microscopi.
- 5- Virar l'hematoxilina amb alcohol amoniacal uns 3 minuts.
- 6- Tenyir de 5 a 7 minuts amb eosina.
- 7- Deshidratar i muntar.

**Resultats:**

Nucli.....blau fosc  
Citoplasma.....vermell

**Hematoxilina de Harris-eritrosina (Bonet i Huguet, 1985).****Reactius:****- Hematoxilina de Harris.**

Hematoxilina	5 g
Alcohol absolut	50 cc
Sulfat alumínic-amonic	100 g
Aigua estil·lada	1000 cc
Oxid de mercuri	2,5 cc
Acid acètic glacial	40 cc



Després de dissoldre l'hematoxilina en alcohol i el sulfat alumínic-amònic en aigua, es barregen ambdues solucions i es fa bullir durant un minut. Tot seguit s'afegeix l'òxid de mercuri, es submergeix el conjunt en un bany d'aigua ben freda i, quan la solució sigui fresca, s'afegeix l'àcid acètic.

- Aigua de Scott.
 

Sulfat de magnesi	10 g
Bicarbonat sòdic	2 g
Aigua destil.lada	1000 cc
  
- Eritrosina 1%
 

Eritrosina	1 g
Aigua destil.lada	100 cc

**Procediment:**

- 1- Tenyir amb hematoxilina 1 o 2 minuts
- 2- Rentar amb aigua destil.lada
- 3- Virar els talls amb aigua de Scott 2 minuts
- 4- Rentar amb aigua destil.lada
- 5- Tenyir amb eritrosina al 1% de 2 a 5 minuts
- 6- Rentar amb aigua destil.lada
- 7- Assecar en placa calefactora i muntar.

**Resultats:**

Nucli.....blau  
 Citoplasma.....rosat

**Impregnació argèntica de Gomori (Bonet i Huguet, 1985).**

**Reactius:**

- Permanganat potàssic a 1% en solució aquosa.
- Metabisulfit potàssic al 2% en solució aquosa.
- Sulfat fèrric amònic al 2% en solució aquosa. (Preparar-la just abans de fer-la servir).
  
- Plata amoniaca:
 

A 10 cc d'una solució aquosa de nitrat de plata al 10% s'afegeixen 2 cc d'una solució aquosa d'hidroxid sòdic al 10%. El precipitat s'ha de redissoldre afegint amoníac gota a gota. Segidament s'afegeixent unes gotes de la solució aquosa de nitrat de plata al 10% fins que l'olor a amoníac desaparegui totalment. Aquesta solució es pot guardar a les forques i s'ha de diluir a la meitat amb aigua destil.lada abans de fer-la servir.
- Formol al 6%.
- Solució aquosa de tiosulfat sòdic al 2%.

**Procediment:**

- 1- Oxidar durant 2 minuts amb permanganat.
- 2- Rentar amb aigua corrent. Posar i treure.
- 3- Blanquejar amb metabisulfit.
- 4- Rentar acuradament amb aigua corrent.
- 5- Tractar amb alum fèrric durant 1 minut.
- 6- Rentar amb aigua corrent durant 5 minuts.
- 7- Rentar acuradament amb aigua destil.lada.
- 8- Impregnar amb plata amoniaca durant 1 minut.
- 9- Rentar amb aigua destil.lada.

- 10- Reduir amb formol durant 3 minuts.
- 11- Rentar acuradament amb aigua corrent.
- 12- Fixar amb hiposulfit de 30 a 60 segons.
- 13- Rentar amb aigua corrent. Posar i treure.
- 14- Rentar acuradament amb aigua destil·lada.
- 15- Assecar en placa calefactora i muntar.

Resultats:

Fibres reticulars.....negre  
Fibres col·làgenes.....taronga  
Nuclis.....gris

**Orceïna acètica** (Saló i Baguñà, 1984)

Reactius

- Solució mare d'orceïna acètica (Enosa)
- Fixador de Carnoy (pàg.)
- ClH 1 N
- Àcid acètic al 5 %.

Procediment:

- 1- Fixar amb Carnoy durant 15 minuts.
- 2- Tractar amb ClH 1N durant 2 minuts a 20° C.
- 3- Tractar amb ClH 1N durant 6 minuts a 60° C.
- 4- Tenyir amb orceïna acètica de 5 a 15 minuts a temperatura ambient.
- 5- Diferenciació amb àcid acètic al 5 % durant uns 20 minuts
- 6- Muntar amb glicerina

Resultats:

Nuclis i figures mitòtiques..... vermell

**Sudà per grasses i fosfolípids** (Bayliss, 1984)

Reactius

- Sudà negre B o sudà vermell IV saturat en alcohol al 70 %, filtrat just abans de fer servir

Procediment:

- 1- Submergir les seccions, procedents de criotomia postfixades amb vapors de formol, en alcohol al 70 %.
- 2- Tenyir amb sudà durant 15 minuts.
- 3- Diferenciar en alcohol de 70 % durant 1 o 2 minuts.
- 4- Tenyir amb orceïna acètica de 5 a 15 minuts a temperatura ambient.
- 5- Diferenciació amb àcid acètic al 5 % durant uns 20 minuts
- 6- Muntar amb glicerina o Aquovitrex

Resultats:

Colesterol insaturat..... negre o vermell  
Esters del glicerol..... negre o vermell  
Fosfolípids.....gris pal·lid

**Sudà per lípids (Bayliss, 1984)****Reactius**

- Sudà negre B o sudà vermell IV saturat en alcohol al 70 %, filtrat just abans de fer servir
- Brom en solució aquosa al 2,5 %.
- Metabisulfit sòdic al 0,5 % en solució aquosa.

**Procediment:**

- 1- Deixar assecar a l'aire les seccions procedents de criotomia postfixades amb vapors de formol
- 2- Submergir les seccions en la solució de brom durant 30 minuts a temperatura ambient dins una campana de fums
- 3- Rentar amb aigua i tractar amb metabisulfit sòdic durant 1 minut per treure l'exés de brom
- 4- Rentar amb aigua destil·lada
- 5- Submergir les seccions en alcohol al 70 %
- 6- Tenyir amb sudà durant 15 minuts
- 7- Diferenciar en alcohol de 70 % durant 1 o 2 minuts
- 8- Muntar amb glicerina o Aquovitrex

**Resultats:**

Colesterol insaturat.....	negre o vermell
Esters del glicerol.....	negre o vermell
Fosfolípids.....	gris
Lecitines.....	negre o vermell
Acids grassos lliures.....	negre o vermell
Colesterol lliure.....	negre o vermell

**Wright (Gabe, 1986)****Reactius**

- Colorant de Wright (Panreac).

**Procediment:**

- 1- Assecar a l'aire les preparacions.
- 2- Tenyir amb el colorant de Wright de 3 a 5 minuts.
- 3- Afegir unes gotes d'aigua destil·lada fins que es vegi un reflex metàl·lic.  
Deixar-ho de 3 a 5 minuts més.
- 4- Rentar amb aigua corrent.
- 5- Eixugar amb paper de filtre.
- 6- Examinar per immersió sense montar.

**Resultats:**

Nuclis .....	blau fosc o púrpura
Grànuls basòfils .....	púrpura fosc
Grànuls eosinòfils .....	vermell o vermell taronja
Grànuls neutròfils .....	vermell marronós o lila
Citoplasma .....	de blavós a rosa

