

CICATRITZACIÓ DE LES FERIDES PER CAUTERITZACIÓ DEL TEGUMENT D'*Hirudo medicinalis* L.

M. Molinas, J. Dalmau i G. Huguet

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

RESUM

Aquest treball descriu el procés de cicatrització de les ferides provocades per cauterització del tegument de la sangonera *Hirudo medicinalis* L.

Els exemplars d'*Hirudo* són sotmesos a una cremada superficial mitjançant un filament incandescent. Posteriorment són fixats en períodes seqüencials d'1, 6, 12, 24, 48 hores, una setmana i dos mesos, per ser estudiats al microscopi òptic i al microscopi electrònic de rastreig.

La regeneració mostra un procés de cicatrització ordinari amb algunes característiques pròpies. Sobre la superfície cremada es forma un tap cel·lular que posteriorment és recobert per cèl·lules epitelials migratòries fins a la total reepitelització. Les cèl·lules migratòries formen un epiteli esquamos al principi per tornar després a l'aspecte columnar característic. El tap cel·lular és progressivament reabsorbit.

RESUMEN

Este trabajo describe la cicatrización de las heridas por cauterización del tegumento de la sanguijuela *Hirudo medicinalis* L.

Los ejemplares de *Hirudo* son sometidos a una quemadura superficial y posteriormente fijados y examinados al microscopio óptico y al microscopio electrónico de barrido, en períodos secuenciales de 1, 6, 12, 24 y 48 horas, una semana y dos meses.

La regeneración muestra un proceso de cicatrización ordinario con algunas características propias. Se forma un tapón celular sobre la superficie quemada que posteriormente es recubierto por células epiteliales migratorias hasta su total reepitelización. Las células migratorias forman un epitelio escamoso al principio que progresivamente recupera su aspecto columnar. El tapón celular es reabsorbido progresivamente.

ABSTRACT

This report will describe the healing reactions of a burn wound injury in the integument of the leech *Hirudo medicinalis* L.

Specimens of *Hirudo* are surface burned and sequentially fixed and processed for histological examination with Light Microscopy and Scanning Electron Microscopy, in periods of 1, 6, 12, 24, 48 h, one week and two months.

The repair mechanism consists in the formation of a cell plug beneath the burned cuticle. The plug evolves to a scar, digesting all necrotic tissue. The plug is covered by a new epidermis developing by spreading of existing columnar cells. Migrating epidermic cells are flattened cells showing amoeboid movement, and secrete the new cuticle.

Progressively, the flattened cells return to the typical columnar aspect.

Key words: hirudo, healing, burn injury, epithelialization, leech immunology, *Hirudo medicinalis* L., hirudinidae.

INTRODUCCIÓ

Les ferides per cauterització difereixen dels talls i de les erosions mecàniques perquè, a més de provocar la destrucció de la barrera cutània, són causa de canvis fisiopatològics en els òrgans i teixits de l'animal que les pateix (Panke & McLeod, 1985). Durant el procés cicatricial dels cremats, la presència de teixit necrosat i de cèl·lules de vitalitat compromesa que han de ser eliminats és, juntament amb la possible entrada d'agents infecciosos, el principal factor que s'oposa a l'acció regeneradora dels teixits vius.

El tegument de la sangonera està format per tres capes: cutícula, epidermis i dermis. La cutícula és de naturalesa col·làgena i es troba externament recoberta de moc. L'epidermis és constituïda per l'epiteli secretor monoestratificat poblat de dos tipus de cèl·lules glandulars mucoses (glàndules piriformes i glàndules tubulars). La dermis es troba situada entre l'epidermis i la musculatura. Consisteix en un teixit connectiu molt capil·laritzat, ric en fibres reticulars i amb abundants cèl·lules pigmentàries (Hugué & Molinas, 1985, 1986).

La musculatura de la paret del cos consta de tres capes: la circular externa imbrincada amb la dermis; la transversal de poques fibres de gruix i la longitudinal interna que connecta amb el teixit peridigestiu.

La bibliografia sobre la cicatrització als hirudínids és força incompleta (Sawyer, 1986) i es limita als treballs de Cornec (1984) sobre la regeneració d'amputacions de la ventosa anal i els de LeGore & Sparks (1971, 1973) que descriuen breument la reparació de ferides i cremades a *Piscicola salmositica*.

MATERIAL I MÈTODES

Els exemplars d'*H. medicinalis* utilitzats en aquest treball procedeixen dels estanys de Cantallops (Alt Empordà). S'han aclimatat al laboratori durant un període d'un mes, abans de sotmetre'ls a l'experimentació.

Anestèsia i desinfecció

Els exemplars són anestesiats en una solució d'alcohol etílic al 8 % durant 15 minuts. S'aconsegueix una anestèsia profunda que permet la manipulació còmoda de l'animal durant el procés operator i posteriorment una recuperació del 100 % dels individus intervinguts al cap de 15 a 20 min. Després d'anestesiats, els animals són desinfectats superficialment amb alcohol etílic, al mateix temps que s'arrossega l'abundant capa de moc.

Cauterització i postoperatori

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

La recuperació de l'anestèsia es fa en un mitjà d'aigua clorada durant uns 15 min. A continuació es deixen els animals en recipients estèrils.

Sacrifici

El sacrifici dels animals es fa de manera seqüencial en períodes d'1, 12, 24, 36, 48, 72 h i una setmana i dos mesos. Els exemplars es relaxen profundament mitjançant una anestèsia perllongada d'uns 30 min i a continuació es fixen per immersió en formalina al 4 % en tampó fosfat de Sorensen pH 7.2.

Microscòpia òptica

Els animals fixats pel procediment descrit anteriorment són deshidratats lentament a través de la sèrie etílica. Les mostres són incloses alternativament en parafina o glicol-metacrilat (GMA) (Bonet & Molinas, 1983). Els blocs es tallen amb un micròtom AUTOCUT i les observacions es fan amb un fotomicroscopi NIKON SFM.

Els talls s'han estudiat amb les tècniques generals per a parafina i plàstic: hematoxilina-eosina, blau de toluïdina, tionina i negre de clorazol (Bonet i Huguet, 1985). I s'hi han aplicat també les coloracions específiques: PA-S/ blau d'alcià pH 2,5 per mucopolisacàrids (Bancroft, 1975); i impregnació argèntica de Goromi (Bonet & Huguet, 1985) per a fibres connectives.

Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

Les mostres es procesen sota punt crític, després de la deshidratació prèvia a través de la sèrie etílica i utilitzant l'acetat d'amil com a líquid de transferència. Les mostres, després del seu recobriment amb una capa d'or-paladi, s'observen amb un microscopi Cambridge Stereoscan 120 del Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona.

OBSERVACIONS

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 la coloració més clara i la inflamació. 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 ritme lent. Al cap d'una setmana, l'epidermis està regenerada però la lesió es manté clarament delimitada per la tonalitat més clara i la persistència de la inflamació. Progresivament la cicatriu es va reduint, si bé, al cap de tres mesos, encara s'identifica per una lleugera diferència de color.

Microscòpia electrònica de rastreig (SEM)

L'observació al Microscopi de Rastreig dels animals fixats en l'estadi inicial del postoperatori mostra la persistència de la cutícula sobre la superfície cremada i una inflamació que provoca la desaparició dels petits solcs longitudinals de la paret del cos, però no dels anells (Fig. 1-A).

A les 24 h del postoperatori, la cutícula de l'àrea cauteritzada ha saltat però es mantenen algunes restes unides als marges de la ferida. Per damunt de la superfície descoberta s'inicia l'acumulació de les cèl·lules mòbils que formaran el tap. Els anells encara són visibles (Fig. 1-B).

A les 48 h el tap cel·lular revesteix la superfície i impedeix la visió dels anells. Es tracte d'un tap compacte estès sobre la totalitat de l'àrea afectada (Fig. 1-B). En aquest estadi comença la migració de les cèl·lules epitelials que en alguns punts han d'avançar per sota les restes de la cutícula (Fig. 3-A i B). El front de reepitelització mostra cèl·lules esquàmoses, planes, amb abundants microvellositats i delicats lamel·lipodis (Fig. 2-B). Les cèl·lules es mantenen unides entre elles mentre llisquen sobre el tap.

Passades 72 h del postoperatori una nova cutícula recobreix la ferida, que no difereix de la cutícula del tegument normal.

Microscòpia òptica (OM)

L'observació dels talls corresponents a l'estadi inicial del postoperatori (1 h) permet constatar la inflamació subcuticular. La cutícula es presenta separada de les cèl·lules epitelials i en alguns punts erosionada. L'epiteli columnar presenta un aspecte anormal: les cèl·lules epitelials es mostren inflades i necrosades. La necrosi pot afectar també algunes de les fibres musculars més externes. No s'observa la presència de cèl·lules mòbils a l'entorn de l'àrea afectada.

A les 12 h del postoperatori comença l'acumulació de cèl·lules ameboides en la porció central de la superfície cremada. Acumulació que es fa progressivament palesa fins a esdevenir un tap ben visible a les 24 h. (Fig. 3-A). El tap té un gruix escàs, i queda limitat a una o dues capes de cèl·lules en la zona perifèrica. El teixit necròtic queda englobat en el tap i deixa de ser identificable. Es mantenen les restes de la cutícula trencada adherits a la perifèria.

Quan han trascorregut 48 h del postoperatori comença la migració de les cèl·lules epitelials per a formar el nou recobriment. Les restes de la cutícula han caigut i el nou epiteli s'estén a partir de les cèl·lules columnars perifèriques, que en la seva migració sobre el tap es transformen en cèl·lules planes. Posteriorment s'inicia la reabsorció que porta a la formació d'una escara.

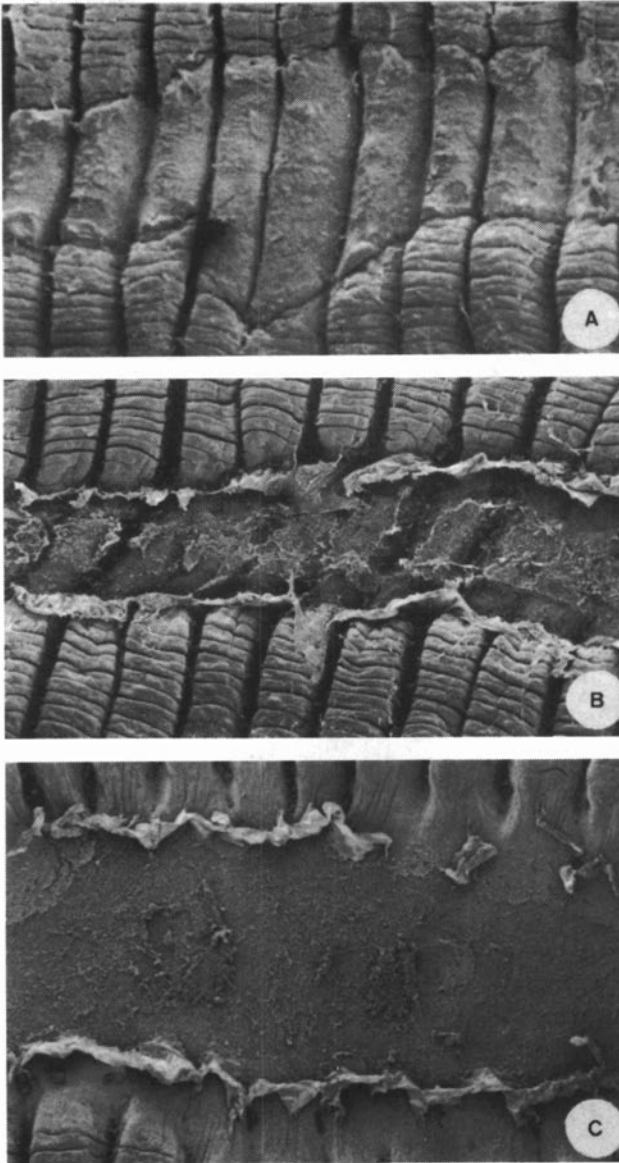


Figura 1. Imatges al microscopi electrònic de rastreig (SEM) de la superfície de les cremades en diversos estadis del postoperatori. A) Al cap de 1 h la cremada és clarament visible per la presència d'una inflamació que amaga els petits solcs longitudinals dels anells. B) A les 24 h del postoperatori la cutícula s'ha trencat i ha deixat alguns restes adherits a la perifèria. Els anells són visibles en la musculatura. Comença la presència de les cèl·lules mòbils que formaran el tap. C) A les 72 h un tap compacte recobreix totalment la cremada per sobre del qual les cèl·lules epitelials inicien la migració.

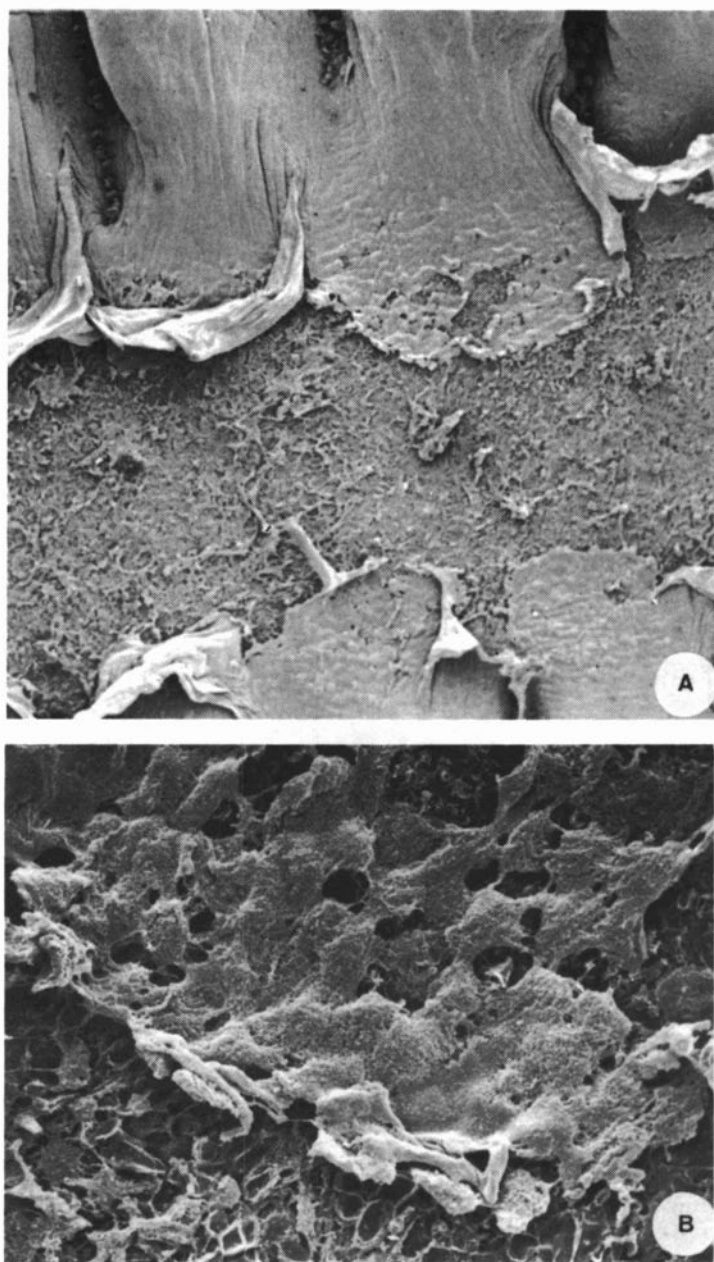


Figura 2. A) Imatge al SEM d'una cremada a les 48 h del postoperatori. L'epiteli avança en un front discontinu, passant, en alguns punts, per sota de les restes de la cutícula. B) Detall de les cèl·lules epitelials migratòries en el front. Les cèl·lules tenen aspecte esquamós, presenten microvellositats i formen lamel·lipodis.

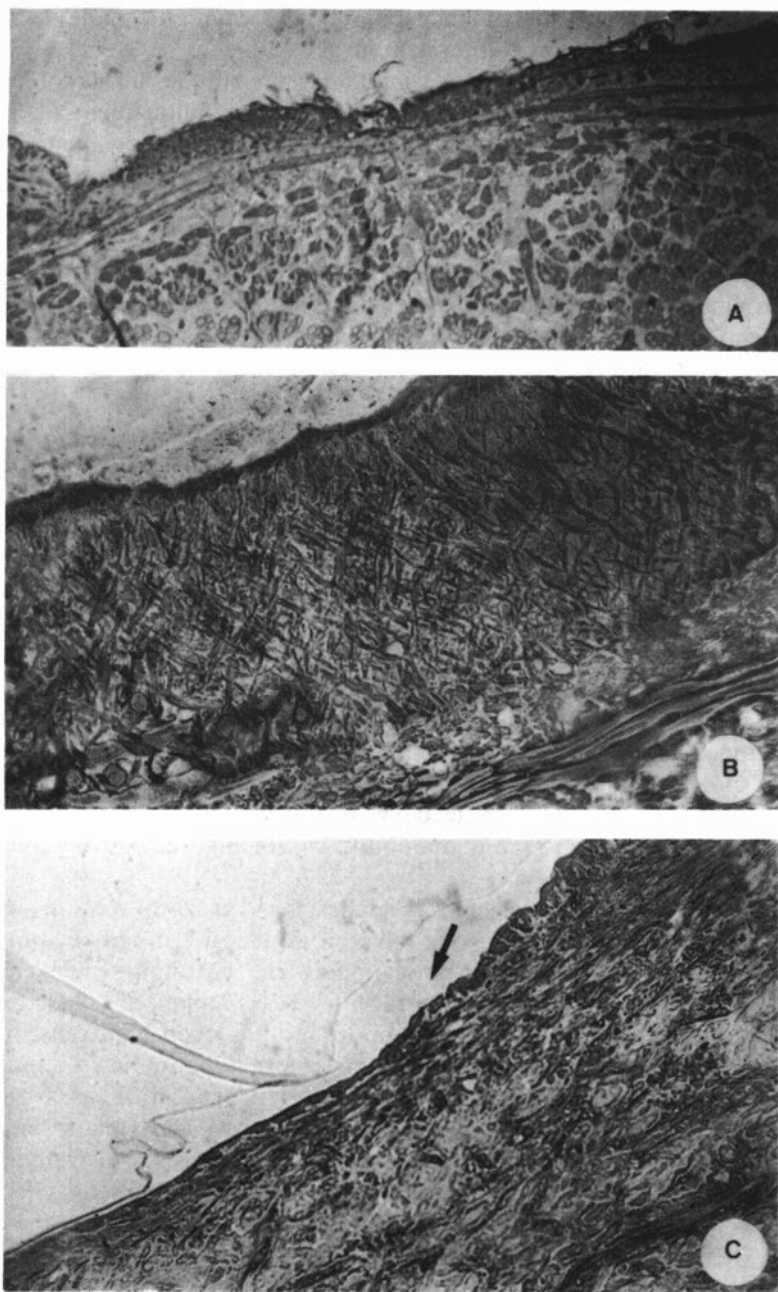


Figura 3. Imatges al microscopi òptic de talls corresponents a diversos estadis del post-operatori: A) estadi inicial; B) formació de l'escara i, C) detall del recobriment del tap per les cèl·lules epitelials (fletxa).

L'escarificació del tap, molt manifesta amb les tècniques d'impregnació argèntica, comença a la porció inferior central.

A les 72 h la formació del tap és molt aparent sobre les fibres col·làgenes necrosades que formen feixos entrecreuats orientats obliquament a la superfície (Figs. 3-B i C). El tap és dens i té tendència a disminuir en extensió fent-se més gruixut en la porció central. Les cèl·lules epitelials continuen avançant donant lloc a la formació d'un epitelí pla monoestratificat on comença la secreció d'una nova cutícula.

Una setmana més tard la re-epitelització és total i les cèl·lules gradulament 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 de l'escara. Posteriorment el nou tegument recupera els petits solcs longitudinals característics dels anells.

DISCUSSIÓ

Les principals etapes del procés regeneratiu d'una cremada superficial a *Hirudo medicinalis* es recullen a l'esquema de la Figura 4. Es tracta d'un procés de cicatricial que no difereix del que LeGore & Sparks (1974) havien observat en *Piscicola salmositica*: sobre la superfície cremada es forma un tap cel·lular que posteriorment es transforma en escara, al mateix temps que té lloc l'eliminació del teixit necròtic. Simultàniament les cèl·lules epitelials inicien la migració sobre la qual es condueix la re-epitelització. Aparentment sembla que l'escarificació no sigui necessària per a induir la migració de les cèl·lules epitelials. Al cap d'una setmana l'epitelí estava totalment recuperat i revestit de cutícula. El procés de cicatrització va acompanyat d'una contractura muscular que determina un grau d'immobilització fonamental per a permetre la recuperació de la ferida.

Hem pogut observar que en les cremades, la cicatrització continua les mateixes etapes que en les ferides per tall o erosió mecànica, però a ritme molt més lent. La formació del tap, molt ràpida en els traumes mecànics, no comença fins a les 6-12 h del postoperatori i no es completa fins passades llargament les 24 h. La re-epitelització no té lloc fins quan han transcorregut quasi 48 h del postoperatori mentre que en les ferides per tall, la re-epitelització es produeix al cap 4-6 h del postoperatori (Huguet & Molinas, 1988).

La utilització del Microscopi electrònic de rastreig (SEM) ha resultat imprescindible per a l'estudi de les diferents etapes del procés i especialment per observar la transformació de les cèl·lules epitelials en els moments inicials de la migració. Aquestes observacions complementen i clarifiquen les que es fan a través dels talls. Les cèl·lules epitelials columnars en condicions normals són cèl·lules estàtiques, adherides fermament sobre la làmina basal per abundants hemidesmosomes (Berchtold, 1985; Huguet & Molinas, 1986). Aquestes cèl·lules únicament adquireixen capacitat migratòria durant els processos cicatricials. Les cèl·lules modifiquen la seva morfologia cilíndrica per adquirir

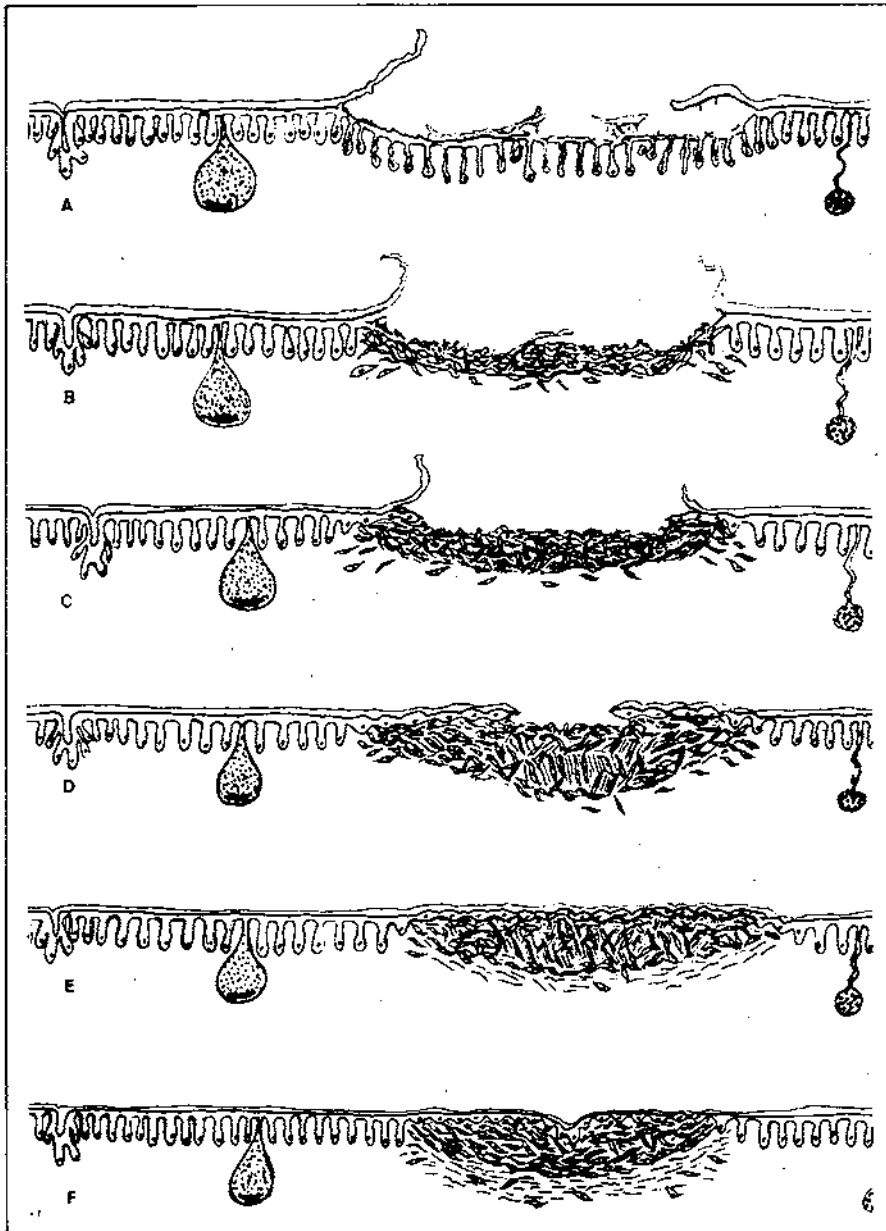


Figura 4. Esquema mostrant les diferents etapes del procés de cicatrització d'una cremada a *Hirudo medicinalis*. A) Etapa inicial del postoperatori mostrant la afectació dels teixits superficials i la cutícula trencada; B) i C) progressió de cèl·lules ameboides per formar el tap que engloba els teixits necròtics; D) escara; E i F) epitelització del tap i recuperació progressiva de les cèl·lules columnars.

un aspecte pavimentós estellat i formen lamel·lipodis. En la seva transformació adquireixen una morfologia similar a la d'altres cèl·lules migratòries com amebes, fibroblasts, neutròfils o monòcits, per exemple. En el conjunt de les cèl·lules migratòries, el moviment s'origina pel flux de material en regions específiques del citoplasma cortical; flux dirigit per la xarxa microtubular (Bray & White, 1988). El poderós citoesquelet propi de l'epiteli columnar (Huguet & Molinas, 1987) es troba probablement involucrat en els canvis de la fase migratòria i en la posterior diferenciació de les cèl·lules per retornar a la forma columnar.

Hem de destacar que en tota l'experimentació realitzada i en les seves repeticions no s'ha observat mortalitat ni cap malaltia dels animals. Aquests superen ràpidament l'estrès produït per la cremada i amb les elementals mesures higièniques preses no es manifesten problemes d'infecció bacteriana o fúngica, fet que posa en evidència uns mecanismes de defensa de provada eficàcia. Possiblement, a més de l'acció dels macròfags hi intervenen les abundants secrecions mucoses de l'animal.

Bibliografia

- BRAY, D., & WHITE, J.C. (1988). Cortical flow in animal cells. *Science*, 239: 883-888.
- BERCHTOLD, J.P., SAUBER, F., & REULAND, M. (1985). Etude ultrastructurale de l'évolution du tegument de la sanguine *Hirudo medicinalis* L (annelide, Hirudinée) au cours d'un cycle de mue. *Int J of Repr and Develop.*, 8: 127-138.
- BONET, S. & MOLINAS, M. (1983). Aplicació del glicol metacrilat a la obtenció de talls semifins per a histologia. *Ann. Sec. Cien. Col. Univ. Girona (UAB)*, 9: 21-29.
- BONET, S. & HUGUET, G. (1985). Tècniques senzilles de coloració per a seccions semifines de material inclòs en Glicol Metacrilat (GMA). *Scientia gerundensis*, 10: 23-32.
- BANCROFT, S. (1975). *Histochemical Techniques*. Ed. Butterworths, London.
- CORNEC, J.P. (1984). Modifications ultrastructurelles après amputation dans le territoire de régénération postérieure de l'hirudineé Rhynchobdelle *Helobdelle stagnalis*. *Arch Anat Micros.*, 73: 769-289.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1985). Estructura i ultraestructura del revestiment cuticular de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774). *Scientia gerundensis*, 11:39-59.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1986). Estructura i ultraestructura de les cèl·lules epitelials de *Dina lineata* (O.F. Müller, 1774). *Scientia gerundensis*, 12: 5-13.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1987). Especialitzacions per a la unió cel·lular del tegument d'*Hirudo medicinalis*. *Scientia gerundensis*, 13:5-14.
- HUGUET, G. & MOLINAS, M. (1988). Estudi estructural del procés de regeneració de ferides a *Hirudo medicinalis*. *Scientia gerundensis*, 14:123-132.
- LEGORE, R.S. & SPARKS A.L. (1971). Repair of body incision in the Rhynchobdellid leech *Piscicola salmositica*. *Jour. Invert. Pathology*, 18:40-45.
- LEGORE, R.S. & SPARKS, A.L. (1973). Repair of body wall burns in the Rhynchobdellid leech *Piscicola Salmositica*. *Jour. Invert. Pathology*, 22:298-299.
- PANKE, T.W. & MCLEOD, C.G. (1985). *Pathology of thermal Injury*. Ed. Grune and Stratton Orlando.
- SAWYER, R. (1986). *Leech biology and behaviour*. Ed. Clarendon Press, Oxford.