

GLANDULAS DURANTE LA REGENERACION DE *DUGESIA DOROTOCEPHALA* (PLATYHELMINTES, TURBELLARIO

POR

IVONNE C. HERMOSILLA

RESUMEN

Estudios histológicos en planarias normales y en regeneración detectan glándulas y sus cambios a través de la regeneración en *Dugesia dorotocephala*. Con las tinciones utilizadas se localizan seis tipos de glándulas, cinco de las cuales han sido descritas en especies afines. Se describe un grupo en estrecha relación estructural con los ganglios cerebroides. Se hace una comparación con las células neurosecretoras de *Polycelis nigra*.

ABSTRACT

Histological methods in normal and regenerating planarians permit the study of the glands types and their changes during the regeneration in *Dugesia dorotocephala*. With the histological methods are detected six glands types. Large gland cells are found around the cerebral ganglia. A parallel is made between them and the neurosecretory cells of *Polycelis nigra*.

INTRODUCCION

Las planarias de agua dulce constituyen un substrato de alto interés para el estudio de procesos regenerativos. Muchas especies han sido descritas en su estructura y citología interna con el afán de comprender la fisiología de la regeneración.

Estudios previos sobre el comportamiento del sistema nervioso en el curso de la regeneración de *Dugesia dorotocephala* (Hermosilla, 1972) evidenciaron el gran número de glándulas existentes en el parenquima de estos animales. Estas glándulas unicelulares han sido descritas entre otros por Hyman (1951), Pedersen (1959, 1963), Skaer (1961, 1965).

Información sobre su conducta en procesos regenerativos existe en un trabajo de Lender y Klein (1961) donde además se evidencia presencia de glándulas neurosecretoras en *Polycelis nigra*.

El presente trabajo pretende dar una visión preliminar de las glándulas en *Dugesia dorotocephala*, donde no se han descrito y su conducta a través de la regeneración.

Atendiendo a la gran diversidad de glándulas, identificadas en la literatura como acidófilas, cianófilas y glándulas rabdites se utilizaron varios métodos de tinción.

MATERIALES Y METODOS

Se utiliza un clon de individuos del triclado *Dugesia dorotocephala*, mantenido en el laboratorio después de 12 meses.

Cuatro a cinco días antes de realizar la operación de corte no se proporcionó alimento a los animales.

En este caso sólo se estudió regeneración de la cabeza. Los ejemplares en regeneración fueron obtenidos por decapitación tratando de realizar un corte transversal a una distancia uniforme de las manchas oculares.

Un número de porciones recién cortadas fue colocado en cubetas con agua de laguna a la temperatura del laboratorio y en lugar oscuro. Estos ejemplares fueron continuamente observados al estereomicroscopio a medida que proseguía la regeneración. A las 0,6, 24, 48, 60, 72, 84, 96, 108 y 120 hrs. después de la decapitación algunos segmentos fueron fijados en Zenker a objeto de estudiar histológicamente el curso del proceso regenerativo.

Posteriormente los especímenes fijados fueron infiltrados en parafina, cortados transversal y longitudinalmente entre 7 y 10 micrones. Los métodos de tinción empleados fueron hematoxilina férrica de Heidenhain y eosina, Giemsa, Mallory, fucsina aldehídica y PAS con hematoxilina de Harris. Estas últimas tinciones se realizaron en ejemplares fijados en FAA (Mossmans).

RESULTADOS

Las glándulas presentes en *D. dorotocephala* resultan ser de seis tipos, de acuerdo a las tinciones utilizadas y las coloraciones obtenidas (Tabla I). Estas corresponden a las células rabdites, a dos tipos de glándulas acidófilas, a dos tipos de cianófilas y finalmente a un grupo de glándulas bastante notorias y en estrecha relación con el sistema nervioso anterior (ganglios cerebroides).

Estas células parecen no haber sido descritas en especies relacionadas por lo que al conocimiento del autor respecta.

Una de las glándulas más conspicuas en los Turbellaria es la célula rabdite llamada así por la presencia de granulaciones alargadas: los rabdites. Frente a las reacciones de tinción empleadas, éstos aparecen intensamente acidófilos. Con la hematoxilina férrica y la eosina son fuertemente teñidos. Con Mallory se tiñen amarillos y con Giemsa,

rosados. Tanto la fucsina aldehídica como el PAS dio resultados negativos para los rabdites (Tabla I).

Estas células se detectan en la epidermis y regiones subepidérmicas de la superficie dorsal y escasamente en la superficie ventral del animal.

La orientación de los rabdites en las células ubicadas en la epidermis es perpendicular a la membrana basal, ocupando el rabdite la mayor parte de la célula. Sin embargo, en aquellas células ubicadas en el parenquima dorsal pueden existir tres o cuatro rabdites en desarrollo con una distribución concéntrica o al azar.

En las planarias en regeneración estas glándulas incrementan abundantemente en el primer y segundo día. Se observó como en la superficie del área de regeneración los rabdites llegan a constituir dos y hasta tres capas compactas. Fue evidente observar estas granulaciones en el interior de células del parenquima lateral y dorsal. Su presencia en el parenquima ventral fue prácticamente nula.

Con respecto a las glándulas acidófilas, una variedad de éstas se distribuye normalmente en el parenquima ventral; la distribución es más o menos constante bajo la membrana basal a lo largo del cuerpo, alcanzando los márgenes laterales del cuerpo. Las células a menudo alargadas, presentan una prolongación dirigida a las células epidérmicas. Estas células contienen gránulos acidófilos que se extienden en los procesos citoplasmáticos dirigidos a la superficie. Frente a las tinciones aplicadas con la hematoxilina de Heidenhain y la eosina, el citoplasma apareció rosado, con Mallory rojo y con Giemsa exhibe gránulos rosados. Con fucsina aldehídica y PAS el citoplasma muestra escasa afinidad, mientras los gránulos son negativos. Otro tipo de glándulas acidófilas en el parenquima cefálico aparece con gránulos de mayor tamaño, tiñéndose de azul brillante con el Giemsa y de rojo intenso con el Mallory.

Durante el proceso regenerativo estas glándulas también incrementan su número durante los dos primeros días.

Las secreciones cianófilas pertenecen a dos tipos de glándulas ubicadas en la región cefálica. Uno de estos tipos presentes en escaso número, son glándulas unicelulares alargadas extendiéndose en la planaria normal lateralmente a las glándulas marginales acidófilas

Estas células mostraron baja afinidad por la hematoxilina de Heidenhain y la eosina. Sus gránulos se tiñeron azul con Giemsa y azul brillante con Mallory. La fucsina aldehídica y el PAS tiñeron estas glándulas intensamente.

El segundo tipo de glándulas cianófilas se distribuye anteriormente en la región prefaríngea ventral; a nivel del primer divertículo

T A B L A I
 REACCIONES DE TINCION PRESENTADAS POR DIVERSOS TIPOS DE
 GLANDULAS EN DUGESIA DOROTOCEPHALA

	Rabbit	actinoflico		cianoflico		Glándulas grandes
		1er. tipo	2º tipo	1er. tipo	2º tipo	
HEMATOXILINA HEI-DENHAIN + EOSINA	negro azulado	rosado	rosado	escasa afinidad	escasa afinidad	púrpura claro
MALLORY	amarillo	rojo	rojo intenso	azul brillante	azul brillante	naranja
GIEMSA	rosado	rosado	azul brillante	azul	púrpura	azul intenso
FUCSINA ALDEHIDICA	sin reacción	afinidad escasa	afinidad escasa	púrpura intenso	púrpura claro	rojo violeta
PAS - HARRIS	sin reacción	afinidad escasa	afinidad escasa	rojo violeta	rojo intenso	negro

gástrico, su distribución se hace dorsal. Pocas veces se observó una conexión distintiva de estas glándulas con la superficie del animal. Las glándulas mostraron escasa afinidad con la hematoxilina de Hiedenhain y la eosina. Con Mallory las células se presentan de azul brillante y son indistinguibles del otro tipo de glándulas cianofílicas. Con Giemsa se tiñeron púrpura.

La fucsina aldehídica dio una coloración tenuemente púrpura. En cambio PAS tiñó intensamente rojo (Tabla I).

Alrededor de las 24 hrs. después de la decapitación, las glándulas cianófilas ubicadas en el parenquima dorsal han incrementado extraordinariamente. Una acumulación de estas glándulas se observó localizada anteriormente a los troncos nerviosos remanentes. Por otro lado numerosos neoblastos rodean esta región glandular y continúan acumulándose durante los dos próximos días.

Al segundo día de regeneración cuando las cuerdas nerviosas remanentes se encuentran desarrollando expansiones lobuladas, las glándulas cianofílicas que prácticamente constituyen un gran acúmulo de masa se dividen en dos porciones, una de éstas se localiza definitivamente sobre cada cuerda nerviosa y una porción anterior crece en el parenquima ventral bajo los ganglios cerebrales en regeneración.

Entre las 24 y 48 hrs., el blastema ha incrementado bastante el número de neoblastos. Es común ver las células en mitosis e incluso ya a las 48 hrs. el inicio de la diferenciación de los neoblastos en células nerviosas y epidérmicas. Hacia las 48 hrs. las regiones ópticas inician su diferenciación celular, substancia de tipo cianofílico se acumuló entre los lóbulos ópticos y las manchas oculares en regeneración.

Las células glandulares grandes detectadas en asociación estructural con el sistema nervioso por su estrecha posición cerca de los ganglios cerebroides y de las cuerdas nerviosas anteriores, parecen ser agrupaciones de grandes glándulas unicelulares.

En la región anterior estas glándulas se distribuyen dorsal y ventralmente a los ganglios cerebroides incrementando posteriormente bajo y entre las primeras porciones de las cuerdas nerviosas (Fig. 1).

Estas glándulas en general tienen forma de botella a veces con largas proyecciones que se extienden hacia la masa nerviosa. No se encontraron conexiones hacia la superficie. El núcleo, irregular en forma, es grande y en general no captó intensamente los colorantes. A menudo éste contiene uno o dos nucleolos grandes y coloreados densamente frente a las tinciones utilizadas. Gránulos muy finos de cromatina se observaron en el núcleo. El citoplasma es rico en gránulos los cuales dentro de la misma célula pueden variar en tamaño y grado de afinidad por algunas de las tinciones usadas. Los gránulos parecen estar más concentrados y son densamente teñidos en la región de la célula que no está en asociación con el sistema nervioso (Fig 2).

Aquellos gránulos cercanos a los elementos nerviosos se observan más grandes, son teñidos ligeramente y aparecen a su vez compuestos de gránulos más finos (Fig. 3). Cuando estos gránulos se ubican en estrecho contacto con las células nerviosas pueden observarse grupos de ellos a menudo rodeados por una fina membrana, grupos similares de gránulos con membrana se encontraron entre las fibras de los cordones y ganglios nerviosos.

Para estas glándulas se obtuvieron excelentes resultados de tinción con el Giemsa, el Mallory y la fucsina aldehídica. Con Giemsa los gránulos individuales se tiñen de azul y son fácilmente distinguidos. Con Mallory la glándula celular completa aparece de color naranja, de ahí sea difícil distinguir los gránulos. La fucsina aldehídica tiñe intensamente los gránulos de rojo violeta. La hematoxilina de Heidenhain y la eosina hace visible gránulos de un pálido púrpura no muy bien definidos. Finalmente el PAS con la hematoxilina de Harris mostró una reacción negativa en estas células, sin embargo, los gránulos se tiñen negros debido probablemente a la acción de la hematoxilina.

Gran parte de estas glándulas desaparece al efectuarse la decapitación; sin embargo, puede observarse su presencia en la vecindad de los extremos remanentes de los cordones nerviosos, inmediatamente después de cortados. Durante el primer y segundo día después de la operación no se detectaron glándulas de este tipo en los cortes. Durante el mismo período en el parenquima de la zona en regeneración aparecen cuerpos redondos granulares, estos cuerpos contienen gránulos cuyas propiedades frente a las tinciones usadas son las mismas que aquellos de las glándulas desaparecidas. Muchos de estos cuerpos se encontraron en la proximidad incluso en el interior de grandes células vacuolares de los divertículos gástricos en regeneración. Estos cuerpos granulares incrementaron durante el tercer y cuarto día, sin embargo en los dos días siguientes desaparecen completamente.

Por otro lado durante el tercer y cuarto día, las glándulas con su contenido granular inician su aparición en torno a los ganglios cerebroides y cuerdas nerviosas, alcanzando una distribución casi normal entre el 6º y 7º día (Fig. 4).

DISCUSION

Cada célula epitelial de la epidermis contiene rabdites. Trabajos en ultraestructura demuestran que en la superficie dorsal de *Polycelis nigra*, éstos son numerosos y tienen un largo promedio de 15 micrones; en la superficie ventral son más escasos y con un promedio de 10 micrones (Skaer 1961).

Los rabdites son intensamente acidófilos, conclusiones de Pedersen (1959), Skaer (1961), lo afirman al parecer por el alto contenido de proteínas combinada a la purina, probablemente adenina. Las tin-

ciones obtenidas en el presente trabajo para *Dugesia dorotocephala* concuerdan con los resultados de los autores mencionados. Las pruebas negativas frente al PAS y fucsina aldehídica también concuerdan con lo obtenido por Pedersen (1959) al analizar el contenido de polisacáridos en *Planaria vitta*. En *D. dorotocephala* los rabdites en muchas ocasiones no mostraron coloración pero, es sabido que el material fijado en Zenker puede vacuolizarse. Es notorio que pese a su fuerte acidofilia, los rabdites se tiñen con hematoxilina férrica, al parecer los iones metálicos se convierten en sulfitos sugiriendo que un complejo debe formarse con las purinas o proteínas presentes en los rabdites (Skaer 1961).

Cuando los rabdites son descargados de las células epidérmicas (irritación, decapitación) que los contienen, forman en torno al cuerpo una capa mucosa protegiendo de esta manera la epidermis remanente. Una gran cantidad de ellos se observó en los dos primeros días después de la decapitación, algunos cortes de ejemplares en regeneración mostraron antes de las 48 horas dos y tres capas constituyendo verdaderas empalizadas; mecánicamente pueden funcionar como un verdadero coágulo otorgando una efectiva protección al animal herido (Pedersen, 1953).

Con respecto al primer grupo de glándulas acidófilas, Hyman (1951) y Pedersen (1963), en especies relacionadas, describen glándulas similares refiriéndose a las glándulas adhesivas marginales. Hyman (1951) reporta que el cuello de estas glándulas perforan la epidermis.

La acidofilia del primer y del segundo tipo de glándulas, se debe en general a grupos amino terminales de cadenas polipeptídicas y a grupos laterales como lisina, histidina y arginina (Singer 1952) no alterado por los métodos de fijación. Skaer (1961) concluye que en *Polycelis nigra* la acidofilia de los gránulos estaría otorgada por la arginina, conclusión que también está de acuerdo con los resultados para *Planaria vitta* Duges y *Dugesia tigrina* (Girard).

Pedersen (1959) informa que los gránulos son completamente negativos a la reacción del PAS.

Las tinciones utilizadas en el presente trabajo concuerdan en mostrar la acidofilia de estas células.

El gran aumento observado desde las primeras horas permiten suponer la necesidad de estas células y sus secreciones en la citoarquitectura y morfogénesis del animal, más aún si se piensa en los aminoácidos propios de las secreciones necesarios a la construcción de proteínas específicas.

Ultimamente ha llamado la atención la gran similitud ultraestructural de los gránulos basófilos de la médula ósea del cuye con los gránulos acidófilos de las planarias (Jamada 1958, Winqvist, 1960).

Con respecto al grupo de glándulas cianófilas, las observaciones realizadas en este trabajo concuerdan plenamente con las referencias

de Pedersen (1959, 1963) para *Planaria vitta* Dugés y *Dugesia tigrina* (Girard). Ocasionalmente se observaron proyecciones de estas glándulas parenquimáticas hacia la epidermis en *Dugesia dorotocephala*. El segundo tipo de glándulas cianófilas, teñidas intensamente de rojo con el PAS concuerda con las glándulas descritas por Hyman (1925) para *Planaria dorotocephala* Woodworth.

Hay acuerdos entre varios autores para atribuir la basofilia a ácidos nucleicos y ácidos mucopolisacáridos que son detectados a bajo pH con colorantes catiónicos. Que las glándulas cianófilas no tienen afinidad por los colorantes aniónicos quedó de manifiesto por la escasa afinidad de la eosina con éstas.

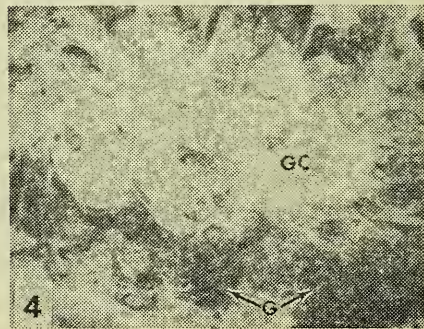
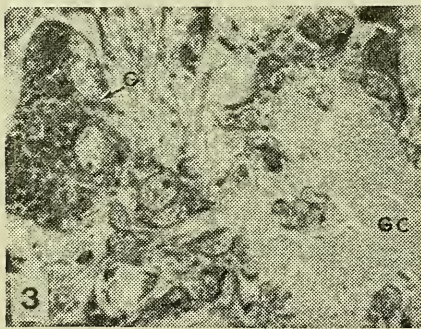
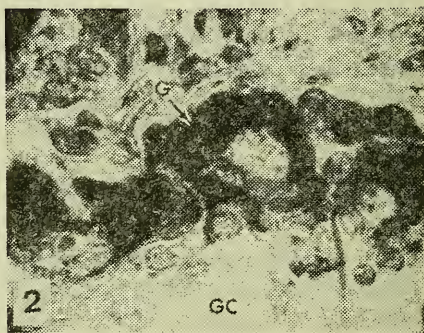
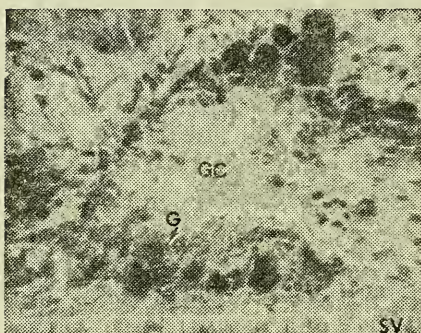


Fig. 1.— *Planaria* normal — sección transversal a nivel del ganglio cerebral derecho (Giemsa x 300) G — Glándulas grandes; GC = Ganglio cerebral; SV = Superficie ventral del animal.

Fig. 2.— *Planaria* normal — Glándulas grandes en torno al ganglio cerebral (Giemsa x 615).

Fig. 3.— *Planaria* normal — sección transversal. A nivel de inicio de troncos nerviosos (Giemsa x 615).

Fig. 4.— *Planaria* en regeneración (6 días). Glándulas y ganglios cerebroides (Giemsa x 615).

Las reacciones intensas obtenidas frente al PAS indicarían presencia de polisacáridos. Pedersen anota en 1963 que es posible se trate de ácidos polisacáridos sulfatados.

Fue notorio que el primer tipo de glándulas tiñó intensamente con fucsina aldehídica y que las glándulas de segundo tipo lo hicieran en menor grado sin embargo esto puede estar relacionado a ciclos de secreción desiguales en estas glándulas no del todo comprendidos.

La abundancia notoria de estas glándulas y su secreción en regiones de alto índice mitótico y diferenciativo permiten suponer la necesidad de ellas en procesos citológicos donde se requiere la presencia de sistemas moleculares energéticos como serían complejos polisacáridos y grupos carboxílicos.

Finalmente la presencia de glándulas encontradas en estrecha cercanía a los ganglios cerebroides e inicio de los troncos nerviosos sugiere una relación posiblemente fisiológica, con los ganglios cerebrales normales. En la literatura examinada en el presente trabajo, no ha sido encontrada una descripción para estas glándulas. Aunque Castle (1928) identifica glándulas que se tiñen de naranja con el Mallory no aporta detalles de las diversas glándulas distribuidas en el parénquima. La reacción positiva del contenido granular de estas células con la fucsina aldehídica, podría indicar una función neurosecretora (Lender y Klein, 1961). Comparada a las células neurosecretoras descritas para *Polycelis*, el tipo de glándula encontrado en *D. dorotocephala* concuerda en su distribución sin embargo se describen células que no diferencian significativamente de las células nerviosas, existe un núcleo pequeño con un nucléolo poco visible a la fucsina paraldehídica de Gabe. En *D. dorotocephala* las células morfológicamente son diferentes a las células nerviosas, su núcleo grande e irregular presenta uno y a veces dos nucleolos no detectados por la fucsina aldehídica, pero sí intensamente coloreados con Giemsa, Mallory y hematoxilina de Heidenhain.

A su vez el producto de secreción como se ha descrito no parece homogéneo.

En cuanto a la conducta de las células neurosecretoras en *Polycelis*, ellas incrementan en los tres primeros días después de la decapitación, para disminuir a partir del 4º día (Lender y Klein, 1961). En *D. dorotocephala* las grandes glándulas no se detectan inmediatamente después de la decapitación. De acuerdo a lo observado en los cortes ellas aparecen al tercer día y continúan incrementando hasta alcanzar una distribución normal en la planaria regenerada.

Aunque fue notorio la presencia de cuerpos granulares redondos exactamente en los días inmediatos a la decapitación, no es posible aún determinar alguna conexión entre éstos y la regeneración de las grandes glándulas en regeneración.

Además es necesario establecer si las células glandulares encontradas en *D. dorocephala* son de tipo neurosecretor como lo sugiere la reacción frente a la fucsina aldehídica. La solución al problema requiere de estudios histoquímicos acoplados a investigaciones funcionales sobre los ciclos de secreción de las diversas glándulas presenten en las planarias.

BIBLIOGRAFIA

- Bacsy, E.; Torok, L. Y. 1962. Contributions to the regenerative capacity of *Dendrocoelum lacteum*. Act. Biol. Hung. 12:313-327.
- Bardeen, Ch. R. 1902. Embryonic and regenerative development in planarians. Biol. 3:262-288.
- Castle, W. A. 1928. An experimental and histological study of the life cycle of *Planaria velata* J. Expt. Zoo. 51:417-477.
- Hermosilla, I. C. 1972. Structure and regeneration of the brain and eye in *Dugesia dorocephala* (Platyhelminthes, Turbellaria). Bol. Soc. Biol. Concepción. XLV:175-188.
- Hyman, H. 1925. The reproductive system and others characters of *Planaria dorocephala* Woodworth. Trans. Am. Micros. Soc. XLIV:(2) 51-89.
- Hyman, L. H. 1951. The invertebrates, Vol. II. New York, Mc Graw-Hill.
- Lender, Th. 1962. Factors in morphogenesis of regeneratins freshwater planaria. Advances in Morphogenesis 2:305-331.
- Lender, Th. 1965. La régénération des planaires. Proc. Regeneration in animals. North Hall, Publ. Co. Amsterdam: 95-III.
- Lender, Th.; Klein, N. 1961. Mise en évidence de cellules sécrétrices dans le cervau de la *Planaria Polycelis nigra*. Variation de leur nombre au cours de la régénération posterior. Seance 311-333.
- Pedersen, K. Y. 1959. Some features of the fine structure and histochemistry of planarian subepidermal gland cells. Z. Zellforsch. 50:121-142.
- Pedersen, K. Y. 1963. Slime-secreting cells of planarians. Ann. N. York, Acad. Sc. 99:424-443.
- Torok, L. Y. 1958. Experimental contributions to the regenerative capacity of *Dugesia lugubris*. Acta Biol. Hung 9:79-98.
- Singer, M. 1952. Factors which control the staining of Fissue sections with acid and basic dyes. Int. Rev. Cytol. 1:211-255.
- Skaer, R. Y. 1961. Some aspects of the Cytology of *Polycelis nigra*. Quart Y. Mic. Science. 102, part 3: 295-317.
- Skaer, R. Y. 1965. The origin and continuous replacement of epidermal cells in the planarian *Polycelis tenuis* (Iijima). Y. Embryol. exp. Morph. 13, part 1: 129-139.
- Winqvist, G. 1960. The ultrastructure of the basophil granulocyte Z. Zellforsch. u. Mikrosop. Anat. 52:475-481.
- Yamada, E. 1958. A particular lamellated body observed in the cells of the pigment epithelium of the retina of the bat, *Pipistellus abramus*. Y. biophys. biochem. Cytol. 4:329-330.