



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE
MÉXICO
INSTITUTO DE NEUROBIOLOGIA**

“Caracterización del proceso de cicatrización
en organismos adultos en
Drosophila melanogaster”

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

JEANS FERNÁNDEZ PALACIOS

DIRIGIDA POR

Dr. JUAN RAFAEL RIESGO ESCOVAR

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis se realizó en el laboratorio de Genética y Transducción de Señales perteneciente al Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología del Instituto de Neurobiología, UNAM, Campus Juriquilla, bajo la tutoría del Dr. Juan Riesgo. Para la realización de este proyecto se contó con el apoyo del CONACyT y de la UNAM.

Todo mi agradecimiento al Instituto de Neurobiología, especialmente al Departamento de Neurobiología del Desarrollo y Neurofisiología.

Mi más sincero e infinito agradecimiento al Dr. Juan Riesgo Escovar por abrigarme en el Laboratorio de Genética y Transducción de Señales y aceptar ser el tutor de este trabajo.

A mi Comité Tutorial, a la Dra. Rocio Salceda, Dra. Carmen Clapp mil gracias por hacer crecer mi trabajo de investigación a través de sus valiosas aportaciones.

A los miembros del Jurado: Dra. Rocio Salceda, Dra. Carmen Clapp, a mi revisor y amigo Dr. Victor Ramírez Amaya, gracias a todos por su tiempo, observaciones y comentarios.

Mi más afectuoso agradecimiento a la Dra. Tere Peña y a Claudia por su apoyo técnico.

A la Unidad de Enseñanza, a la Quím. Leonor Casanova mil gracias por todo su apoyo, a Magda y Yola por tener al día mis trámites y documentos.

Un especial agradecimiento a la Unidad de Microscopía.

A María del Pilar Galarza, Rafa y Nacho responsables de la Biblioteca.

ÍNDICE GENERAL

Contenido	Página
ÍNDICE GENERAL.....	i
ÍNDICE DE FIGURAS	iv
ÍNDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS.....	v
Introducción.....	1
1- Antecedentes.....	3
1.A- La biología del proceso de cicatrización.....	3
1.A.1- Formación de la costra.....	5
1.A.1.a- Componentes celulares de la hemolinfa.....	5
1.A.1.b-Lamelocitos.....	5
1.A.1.c-Plasmatocitos.....	6
1.A.1.d-Células cristal.....	7
1.A.1.c- Proceso de coagulación y melanización en <i>D. melanogaster</i>	9
1.A.2- Reepitelización.....	11
1.A.2.a- Descripción del cerrado dorsal.....	13
2- Hipótesis.....	17
3- Objetivos Generales.....	17
3.A- Objetivos Particulares.....	17
4- Material y Métodos.....	18
4.A- Realización de la herida torácica.....	18
4.B- Microscopía electrónica de barrido.....	19

Contenido	Página
4.C- Prueba de difusión de colorante fluorescente a través del sitio de la herida.....	19
4.D- Análisis externo de la formación de la costra.....	20
4.E- Histología.....	20
4.E.1- Histología de tejidos embebidos en parafina.....	21
4.E.1.a- Fijación del tejido.....	21
4.E.1.b- Inclusión del tejido en parafina.....	22
4.E.2- Histología de tejidos embebidos en resina.....	23
4.F- Análisis de cortes.....	24
5- Resultados.....	25
5.A- Cambios morfológicos de la parte externa de la herida.....	25
5.B- Prueba de difusión de colorante fluorescente a través del sitio de la herida.....	27
5.C- Estudio temporal del proceso de cicatrización en heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> ..	29
5.D.- Cambios morfológicos en la parte interna de la zona dañada.....	31
6- Discusión.....	41
6.A- Cambios en la parte externa durante la cicatrización de heridas en adultos de <i>D. melanogaster</i>	41
6.B- Estudio histológico del proceso de cicatrización en adultos de <i>D. melanogaster</i>	43
6.B.1- Estudios de cortes histológicos de material embebido en parafina.....	43
6.B.2- Estudios de cortes histológicos de material embebido en resina.....	44
6.C- Modelo del proceso de cicatrización en adultos de <i>D. melanogaster</i>	47

7- Conclusiones..... 50

8- Perspectivas..... 51

9- Referencias..... 54

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Página
• FIGURA 1. Tipos celulares de la hemolinfa	8
• FIGURA 2. Imágenes de heridas comparadas con el cerrado dorsal.....	12
• FIGURA 3. Micrografías tomada por microscopia confocal de las etapas sucesivas del cerrado dorsal en embriones de <i>D. melanogaster</i>	14
• FIGURA 4. Apariencia externa de la costra.....	26
• FIGURA 5. Bloqueo de la herida por componentes de la hemolinfa.....	28
• FIGURA 6. Estudio temporal del proceso de pigmentación de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i>	30
• FIGURA 7. Análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> , inmediatamente después de la punción.....	33
• FIGURA 8. Análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> , a 24 horas de recuperación.....	34
• FIGURA 9. Análisis histológico de material embebido en resina. Heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> con menos de 1 hora de recuperación.....	36
• FIGURA 10. Análisis histológico de material embebido en resina. Heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> a 24 horas de recuperación.....	39
• FIGURA 11. Análisis histológico de cortes de muestras embebidas en resina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de <i>D. melanogaster</i> a 168 horas de recuperación.....	40

ÍNDICE DE ESQUEMAS Y TABLAS.

Contenido	Página
• ESQUEMA 1. Esquema de rearrreglos temporales del citoesqueleto de células de la hilera guía en el cerrado dorsal.....	15
• ESQUEMA 2. Modelo del proceso de cicatrización de heridas realizadas en el tórax del organismos adultos de <i>D. melanogaster</i>	47
• TABLA 1. Mediciones del tamaño celular y nuclear de los diferentes tipos de hemocitos de la hemolinfa de <i>D. melanogaster</i>	9
• TABLA 2. Prueba de dos tipos de fijadores a diferentes tiempos.....	21

INTRODUCCIÓN

Entender el proceso de cicatrización tiene implicaciones clínicas evidentes, por lo que existe un gran número de líneas de investigación enfocadas a descifrar y caracterizar las diferentes etapas de este proceso. En esta caracterización se han empleado diversos modelos de heridas realizadas en embriones de pollo, ratón y cerdo. El parecido en la organización de los tejidos epiteliales que conforman los sistemas tegumentarios de estos organismos con los del humano, aunado a la similitud de los sistemas circulatorios, hacen que éstos sean viables para el estudio de la cicatrización de heridas en vertebrados (Clark, 1997; Clark, 1999, Harden, 2005; Martín, 1997). De hecho, la mayoría de las descripciones de las diferentes etapas del proceso de cicatrización en vertebrados como la cascada de coagulación, el proceso inflamatorio y la reepitelización, han sido estudiadas en estos modelos.

En la actualidad las investigaciones también están orientadas a caracterizar los mecanismos de regulación de estas etapas a nivel celular y molecular, por lo que se utilizan ensayos *in vitro* de heridas hechas en cultivos celulares (Farooqui, 2004; Clark, 1999). La fisiología del proceso de cicatrización en vertebrados resulta compleja de estudiar ya que participan varios tipos celulares, que actúan sinérgicamente. Por lo anterior, en los ensayos *in vitro* se pierde la posibilidad de entender a la cicatrización de manera integral.

Para salvar estas limitaciones se ha propuesto a *D. melanogaster* como modelo para el estudio del proceso de cicatrización. Este modelo presenta varias ventajas. Una de éstas es que se pueden seguir los cambios en la coagulación y la reepitelización durante la reparación de heridas en organismos mutantes para un gen en particular. Además se han descrito analogías en los cambios celulares que se dan en una de las etapas de la cicatrización, la reepitelización, con uno de los estadios del desarrollo embrionario de *D. melanogaster*, el cerrado dorsal. Esta similitud permite considerar mecanismos comunes de regulación para el estudio y la caracterización de genes involucrados en la cicatrización (Noselli y

Agnes, 1999; Harden, 2002). Los movimientos morfogenéticos del cerrado dorsal son activados por la vía de la cinasa de Jun, lo que ha permitido iniciar la caracterización por medio de alteraciones en los genes que componen la vía de la cinasa de Jun y conocer la participación de dicha vía en el proceso de cicatrización (Galko y Krasnow, 2004; Ting, 2005); aunque la mayoría de los estudios de la cicatrización en *D. melanogaster* se han realizado en etapas larvarias.

Por lo anterior, los experimentos de este trabajo se enfocaron a caracterizar un modelo de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*, para así poder establecer los controles adecuados con los cuales se puedan comparar, categorizar y/o contrastar estudios futuros bajo diferentes condiciones y fondos genéticos.

ABSTRACT

One function of the skin is to form a dynamic, protective barrier against environmental assaults. When skin integrity is interrupted, a process called wound healing ensues. This process is characterized by two general aspects: clot formation and, subsequently, epithelial regeneration. In view of the diversity of these responses in vertebrates it has been difficult to elucidate the mechanisms that regulate wound healing at the genetic level. Studies in *Drosophila melanogaster* have identified phylogenetically conserved genes that mediate wound healing processes. Moreover, it has been proposed that the early developmental process that takes place during *D. melanogaster* embryogenesis known as “dorsal closure” is analogous to wound healing. Several genes operating during dorsal closure are also involved in wound healing. The morphogenetic movements of dorsal closure are activated by the Jun kinase pathway, a pathway elucidated through genetic analysis in flies, and later shown to be implicated in wound healing. Prior to the work presented in this thesis, wound healing had only been studied during embryonic and larval stages in *D. melanogaster*. Here, we present a study of wound healing in the thorax of the adult fly. We have characterized the different steps in healing following septic injury by histological techniques and scanning electron microscopy. Our studies do not reveal reepitelización, just formation of a crust. If this is case, adult wound healing might well provide a simple model in which to elucidate the contribution of different genes to clot formation without the contribution of epithelial regeneration.

RESUMEN

Una de las funciones de la piel es formar una barrera protectora dinámica a las agresiones del medio. Cuando la integridad de esta se ve afectada se lleva a cabo el proceso de cicatrización, que se caracteriza por dos aspectos generales: la formación de la costra y la subsecuente reepitelización. En mamíferos se ha descrito la participación de diferentes tipos celulares y la secreción de varias proteínas señalizadoras que regulan y controlan la velocidad del cerrado de la herida. La diversidad celular ha dificultado la dilucidación de los mecanismos de regulación de la cicatrización a nivel genético. Se han encontrado sin embargo genes homólogos involucrados en la cicatrización que se conservan a lo largo de la escala filogenética. Por ello el artrópodo *Drosophila melanogaster* es un buen modelo para caracterizar los genes necesarios para la cicatrización, así como su regulación. Además, se ha propuesto al cerrado dorsal de *D. melanogaster* como un proceso análogo a la cicatrización, lo que resulta útil para el estudio y la caracterización de genes involucrados en la misma. Los movimientos morfogenéticos del cerrado dorsal son activados por la vía de la cinasa de Jun, lo que ha permitido iniciar la caracterización de esta vía por medio de alteraciones en la dosis génica de los componentes de la vía de la cinasa de Jun, y caracterizar la participación de dicha vía en el proceso de cicatrización. Sin embargo, el proceso de cicatrización en *D. melanogaster* no ha sido del todo caracterizado en adultos.

La mayoría de las investigaciones de la cicatrización se ha realizado en estadios embrionarios y larvarios. En este trabajo estudiamos la cicatrización en adultos de *D. melanogaster*. Caracterizamos las etapas de la cicatrización en el tórax de animales adultos después de una punción usando microscopía electrónica de barrido y óptica. Nuestros estudios no muestran un proceso de reepitelización, solo la formación de la costra. De ser cierto a nivel ultraestructural, esta particularidad puede ser útil para analizar la contribución de los genes que se requieren durante la formación de la costra sin la complicación del proceso de reepitelización. Cabe destacar que este modelo sentará las bases para futuras

investigaciones usando mutaciones de posibles genes involucrados en estos procesos.

1- ANTECEDENTES

1.A- Biología del proceso de cicatrización

Una vez que ha ocurrido un corte en la continuidad de la piel, se llevan a cabo una serie de cambios temporales en los componentes de los sistemas tegumentarios. Dichos cambios se han clasificado en dos etapas generales:

1. Formación de la costra
2. Reepitelización

Aunque estas etapas se pueden distinguir temporalmente una de otra, éstas se dan de forma continua, ya que durante la formación de la costra los elementos de los fluidos internos bloquean la herida y también inducen a los epitelios que conforman el borde de la herida a una reepitelización del sitio de la herida. La velocidad en la que ocurren estas etapas también varía. Los procesos que dan lugar a la formación de la costra ocurren con mayor velocidad para evitar la pérdida de fluidos y mantener la hemostasis del organismo, mientras que los procesos de la reepitelización se llevan a cabo de manera más lenta. La descripción anterior es el resultado de diversas investigaciones de heridas hechas en diferentes modelos de investigación (Martin, 1997).

Uno de los modelos más convenientes para el estudio de los mecanismos de regulación de las etapas del proceso de cicatrización es la mosca de la fruta (*D. melanogaster*). Sin embargo, es importante destacar que este modelo presenta la desventaja de tener un sistema circulatorio abierto y carecer de vasos sanguíneos, por lo que está limitado para el estudio del proceso inflamatorio en vertebrados, aunque dicho proceso es considerado como una etapa independiente a la formación de la costra y la reepitelización (Clark et al., 1996). Además, en este insecto la fuente del oxígeno es proporcionada por el sistema traqueal y no por las células sanguíneas (Meister, 2004).

Sin embargo, este modelo ha permitido la disección genética *in vivo* de la fase migratoria de los macrófagos y leucocitos en la respuesta inflamatoria. Esto es

clínicamente relevante ya que perturbaciones en dicha fase provocan falta de afluencia de leucocitos al sitio de la herida en vertebrados, dando lugar a patologías como el síndrome Wiskott Aldrich y la trombocitopenia (Redd et al., 2004; Stramer et al., 2005). Aparte de la implicación clínica anterior, el modelo de la migración de los hemocitos hacia el sitio de la herida en etapas embrionarias de *D. melanogaster* se ha utilizado en estudios *in vivo* de la movilidad celular para conocer los genes que regulan dicha migración celular. De esta forma se ha podido estudiar la función de proteínas que pertenecen a la familia de las GTPasas como Rho, Rac, y Cdc42 durante la migración celular *in vivo* (Stramer et al., 2005).

Por otra parte, se ha descrito una gran convergencia evolutiva entre las enzimas que forman las cascadas de coagulación en la sangre y en la hemolinfa (Scherfer et al., 2004; Minakhina y Steward, 2006; Meister, 2004). También se han descrito similitudes en la morfología y en la funcionalidad de los componentes celulares que participan en la formación de la costra (Jiravanichpaisal et al., 2006). Se sabe que al menos parte del andamiaje molecular en el proceso de reepitelización es semejante entre vertebrados y *D. melanogaster*. Por todo esto, *D. melanogaster* se ha convertido en un modelo útil para estudiar la cicatrización de heridas. La siguiente sección resume lo que se conoce de este proceso en la mosca.

1.A.1- Formación de la costra

La primera etapa que se da durante el proceso de cicatrización es la formación de un tapón en el sitio de la herida, que eventualmente se convertirá en una costra. La función de este tapón es evitar la pérdida de los fluidos internos. Esto es de gran importancia para mantener los procesos homeostáticos de los organismos. Para la formación de dicho tapón se requiere de un tipo celular especializado contenido en la sangre en vertebrados y en la hemolinfa de invertebrados. De este modo, resulta prioritario hacer una descripción de los tipos celulares en la hemolinfa de *D. melanogaster*, para poder establecer cuales de ellos participan en la formación de la costra durante el proceso de cicatrización.

1.A.1.a- Componentes celulares de la hemolinfa

Uno de los componentes del sistema circulatorio de *D. melanogaster* es la hemolinfa. Este fluido es análogo a la sangre de los vertebrados ya que comparten algunas funciones. Una de ellas es la distribución de nutrientes a todos los tejidos y colaborar en el mantenimiento de la homeostasis de los organismos.

La hemolinfa está compuesta de un líquido incoloro (plasma) y células libres conocidas como hemocitos. La facilidad con la que se obtiene la hemolinfa de larvas de tercer estadio de *D. melanogaster* facilitó que en este estadio se realizaran las primeras descripciones morfológicas e histológicas de estos componentes celulares. Se han caracterizado tres tipos celulares que componen la hemolinfa de *D. melanogaster* como: lamelocitos, plasmotocitos y células cristal (Meister y Lagueux, 2003).

1.A.1.b-Lamelocitos

Este hemocito se ha descrito como el de mayor tamaño pues mide de 16 a 24 micras. Estas células se caracterizan por tener una forma aplanada y regular y rara vez presentan extensiones membranales. No muestran inclusiones citoplasmáticas y sus estructuras poliribosomales son numerosas en comparación con su retículo endoplasmático, que está poco desarrollado (panel D de la figura 1). Los lamelocitos no están presentes en condiciones normales. Se presentan solo en el momento en que las larvas son parasitadas y son privativos de estos estadios. La función de tipo celular es encapsular y neutralizar materiales extraños y de gran tamaño, lo que explica que estos hemocitos sean igualmente de gran tamaño. En el momento en que un patógeno ingresa al interior de la larva los lamelocitos tienen la propiedad de encapsularlo. Ya inmovilizados en el interior del lamelocito son recubiertos progresivamente con melanina. Existen evidencias de que los patógenos no son degradados. Los lamelocitos forman parte de los mecanismos de defensa contra ataques de parásitos durante las etapas larvarias de *D. melanogaster* (Ribeiro y Brehelin, 2006).

1.A.1.c-Plasmatocitos

Se ha determinado que estos hemocitos en *D. melanogaster* son diferentes tanto en su tamaño como en su morfología en comparación con los plasmatocitos observados en otras especies de otros órdenes de insectos, especialmente de los lepidópteros (Jiravanichpaisal et al., 2006). Se ha reportado que la mayoría de los hemocitos de la hemolinfa de organismos adultos de *D. melanogaster* son plasmatocitos, los cuales tienen actividad fagocítica. Se menciona que existe un aumento en el número de plasmatocitos durante la etapa de metamorfosis ya que es necesario que se digieran los tejidos larvarios para formar las nuevas estructuras adultas. Esto requiere de una gran actividad fagocítica de los plasmatocitos (Stramer et al., 2005). Este tipo celular se caracteriza por tener un aparato de Golgi bien desarrollado así como un abundante retículo endoplasmático rugoso, además de un número alto de vesículas pinocíticas. Ensayos *in vitro* han mostrado que estos hemocitos presentan lamelopodia y filopodia así como un incremento en volumen dependiente de su actividad fagocítica (paneles de E-F de la figura 1).

1.A.1.d-Células cristal

Las células cristal se encuentran en una proporción menor al 5% del total de hemocitos (Meister, 2004). Estas células miden entre 10.0 y 12.2 μm , son de forma regular, con un núcleo excéntrico e inclusiones citoplásmicas irregulares. Estas inclusiones cristalinas en el citoplasma son las que le dan el nombre de células cristal; dichas formaciones cristalinas nunca están limitadas por una membrana y están compuestas de agregados de la enzima fenoloxidasa (Karlsson et al., 2004). La liberación de los componentes citoplasmáticos de las células cristal es crítica para la formación de la costra ya que en ella están contenidos componentes enzimáticos, como la pro-fenoloxidasa y la fenoloxidasa. La función de esta enzima es catalizar la última reacción para la formación de un polímero formado por quinonas llamado melanina. La acumulación de este polímero se evidencia por la pigmentación oscura en el sitio de la herida. A este proceso se le conoce como melanización (Shrestha y Gateff, 1982; Lavine y Strand, 2002; Karlsson et al., 2004).

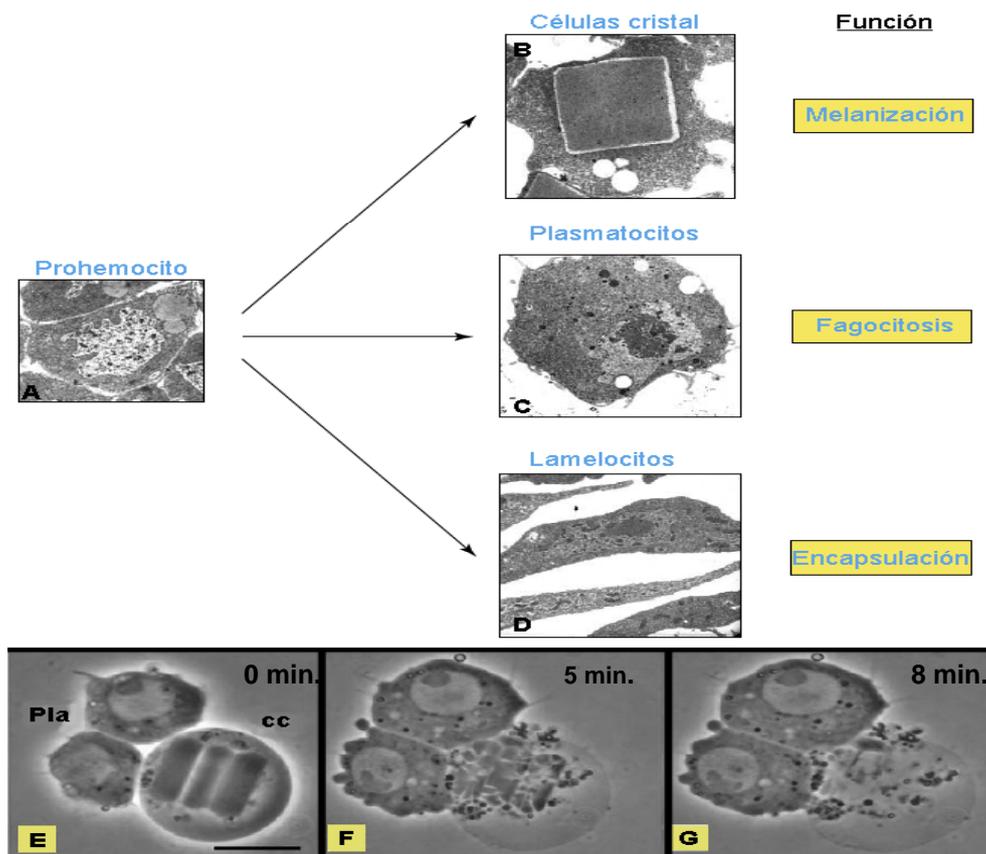


Figura 1. Tipos celulares de la hemolinfa. En las imágenes A-D se muestran micrografías de un prohemocito (A) tomadas con el microscopio electrónico de transmisión. Este linaje dará origen a los linajes celulares que constituyen a la hemolinfa: B células cristal; C Plasmátocitos; D Lamelocitos. (Tomado y modificado de Meister, 2004).

En las imágenes E-G se muestran células de la hemolinfa vistas con el microscopio de contraste de fases, observadas a diferentes tiempos de incubación. Transcurrido 5 minutos se empiezan a disolver las inclusiones de la célula cristal, a los 8 minutos se libera su contenido citoplasmático. Pla: Plasmátocitos, cc: Células cristal (Tomado y modificado de Ribeiro y Brehelin, 2006). En este experimento, las condiciones del cultivo inducen un cambio osmótico, puesto que se observa un aumento en el volumen de los plasmátocitos y es probable que las cc sean más sensibles a esta variación osmótica, dando como resultado su lisis.

Una característica notable de las células cristal de *D. melanogaster* es que son un tipo celular frágil (Bidla et al., 2005). Se ha reportado que poco después de la colección de la hemolinfa y en la ausencia de fijador estas células se lisan fácilmente liberando su contenido citoplasmático (Ribeiro y Brehelin, 2006) (Figura 1, paneles E-G).

TABLA 1. Mediciones del tamaño celular y nuclear de los diferentes tipos de hemocitos de la hemolinfa de *Drosophila melanogaster*.*

TIPO DE HEMOCITOS	TAMAÑO CELULAR (μm)	TAMAÑO NUCLEAR (μm)
Lamelocitos	16.0 - 24.0	4.0 - 5.0
Plasmátocitos	8.0 - 10.0	3.4 - 5.6
Células cristal	10.0 - 12.2	3.5 - 5.0
Prohemocitos	4.8 - 7.4	2.6 - 4.5

* Las mediciones fueron obtenidas de micrografías tomadas con microscopía electrónica y corroboradas con mediciones hechas con muestras tomadas con microscopía de contraste de fase. (Tomado y modificado de Shrestha y Gateff, 1982).

Se han descrito una serie de reacciones enzimáticas que participan en la etapa de coagulación y melanización de la costra, las cuales se describen a continuación.

1.A.1.f- Procesos de coagulación y melanización en *D. melanogaster*

Las heridas en *D. melanogaster* y en general en los insectos pueden provocar una pérdida importante de la hemolinfa. Como consecuencia, si esta herida no es sellada inmediatamente se pone en riesgo la supervivencia del organismo. Uno de los mecanismos que evita la pérdida de hemolinfa en *D. melanogaster* es la coagulación. Los mecanismos celulares y moleculares que regulan este proceso no son del todo claros. Además, estos varían durante la ontogenia del organismo. Se han caracterizado por medio del análisis proteómico de la hemolinfa a 65 tipos diferentes de proteínas presentes, de las cuales, por homología, 11 participan en la coagulación (Karlsson et al., 2004). Una de las limitaciones de este estudio en particular es que no se tomó en cuenta el proceso de coagulación, pero describe la homología estructural y funcional de las proteínas identificadas. Un claro ejemplo de lo anterior es la enzima fenoloxidasa (PO) que se expresa en las células cristal junto con sus sustratos (Minakhina y Steward, 2006). Esta enzima es activada en el momento en que se presenta una herida y ha sido caracterizada en diferentes

modelos de cicatrización en invertebrados. La función de la fenoloxidasa es catalizar la última reacción enzimática para la formación de un polímero de quinonas llamado melanina. La acumulación de este polímero se evidencia por la pigmentación oscura en el sitio de la herida. A este proceso se le conoce como melanización y ocurre de manera conjunta con el mecanismo de la coagulación para asegurar el sellado de la herida. La melanina también actúa como desinfectante matando organismos oportunistas, debido a su alta citotoxicidad (Sugumaran, 2002).

La melanización de la costra está controlada por una cascada de proteasas de serina que tiene como sustrato final a una forma inactiva de la fenoloxidasa llamada pro-fenoloxidasa. Esta pro-fenoloxidasa se activa por un ataque proteolítico y una vez activada cataliza la oxidación de fenoles para transformarlos en quinonas, que se polimerizarán de forma no enzimática para formar la melanina (Karlsson et al., 2004).

Como se mencionó anteriormente, se piensa que la melanización es un mecanismo de sellado rápido del sitio de la herida. Lo anterior se corrobora con observaciones de heridas hechas en mutantes para la fenoloxidasa. Los organismos mutantes presentaron una pérdida mayor de hemolinfa y una baja tasa de supervivencia (Ramet et al., 2002). A pesar de esto no es del todo claro cual es la relación que guardan las proteínas de la hemolinfa que participan en la coagulación y los mecanismos moleculares que se llevan a cabo durante la melanización (Meister y Lagueux, 2003; Meister, 2004).

1.A.2- Reepitelización

El estudio de esta etapa del proceso de cicatrización es complicada en mamíferos, ya que al igual que en la etapa de la formación de la costra, hay un aumento en el número de estructuras que participan en el proceso. La piel de los mamíferos está constituida por varias capas epiteliales poli-estratificadas; en comparación, el tegumento de los invertebrados está conformado de un solo epitelio monoestratificado simple. Este epitelio secreta los componentes estructurales de la cutícula en la parte externa y la lámina basal en la parte interna. A pesar de estas diferencias, en el proceso de reepitelización se han caracterizado cambios morfológicos similares en las células del borde de la herida.

En estos cambios morfológicos se ha observado la formación de filamentos de actina y la unión de estos filamentos para dar lugar a un cable de actina. Estos cables eventualmente se contraen para reducir la circunferencia de la herida alargando las células del borde de la herida. Este cambio de forma se acompaña de la formación de filopodia, que son extensiones de la membrana celular en forma de dígitos con citoesqueleto de actina. A esta serie de cambios se le conoce como “cierre de bolsa” y se ha descrito este proceso en heridas hechas en monocapas de epitelios *in vitro* de la línea celular Caco-2_{BBE}.(collagen coated) derivada de adenocarcinoma de colon humano (Bement et al., 1993) (Figura 2). También se ha observado este fenómeno en heridas hechas en la córnea de conejos y en embriones de ratón y de pollo, así como en cultivos *in vitro* de fibroblastos y de células de la línea MDCK (Madin-Darbin Canine Kidney) (Farooqui y Fenteany, 2005; Clark, 1999).

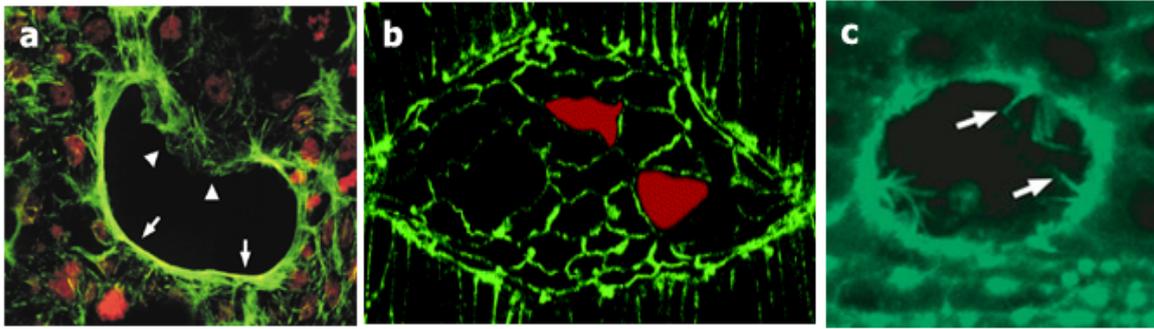


Figura 2. Imágenes de heridas comparadas con el cerrado dorsal.

En a se muestra una herida hecha en una monocapa de epitelio estomacal del tipo celular CaCo-2_{BBE}, en la cual se puede observar la formación tanto de cables de actina (flechas) como la formación de los laminopodia (cabezas de flecha). La tinción fue realizada con fluoresceína acoplada a un anticuerpo anti-actina (verde). En b se muestra la extensión de los filopodia en una etapa final del cerrado dorsal en embriones de *D. melanogaster*. La técnica empleada para este caso fue la expresión de una proteína fusión, GFP- α catenina para evidenciar las estructuras formadas por actina. En c se muestra la reparación de una herida hecha en larvas de tercer instar (L3) de *D. melanogaster*, también con una tinción específica para actina en donde se puede observar la formación de los filopodia (flechas) en los bordes de la herida. (Las imágenes fueron tomadas y modificadas de diferentes fuentes: a, Jacinto et al., 2001. b, Martin-Blanco y Knust, 2001 y c, Martin y Parkhurst, 2004).

Las evidencias arrojadas por los estudios antes mencionados indican que la formación y contracción del cable de actina y la formación de filopodia es un proceso altamente conservado filogenéticamente. Por lo tanto es posible postular que los mecanismos moleculares que regulan dichos cambios estructurales deben ser similares. Lo anterior se demostró explotando una de las ventajas de *D. melanogaster* como modelo experimental: la facilidad para realizar experimentos genéticos, ya que este modelo se ha utilizado ampliamente para caracterizar la participación de genes involucrados en procesos celulares o fisiológicos. En particular, en los 70s y 80s se utilizó también como modelo de cicatrización y regeneración de heridas hechas en regiones epiteliales que crecen en el interior de la larva, a partir de las cuales se desarrollan los órganos de la mosca adulta, denominados discos imagales. Estudios recientes de heridas hechas en discos imagales han demostrado la participación de genes de la vía de cinasa de Jun en la generación de cambios en el citoesqueleto de las células del borde de los epitelios dañados del disco imagal durante la reepitelización (Bosch et al., 2005).

La reepitelización durante la cicatrización en la mosca se ha comparado con una etapa del desarrollo embrionario de *D. melanogaster* conocida como cerrado dorsal

(Noselli, 1998; Martin y Parkhurst, 2004). Esta comparación se estableció debido a que en ambos procesos se han observado la formación de los filopodia y cables de actina. Los avances en el conocimiento de los componentes de las vías de regulación del cerrado dorsal ha permitido demostrar que existen estos componentes homólogos en los mecanismos moleculares que regulan el proceso de cicatrización durante la reepitelización de heridas (Noselli, 1998). Además se sabe que la vía de la cinasa de Jun (JNK) y de TGF- β (vía de *dpp* en *D. melanogaster*) se requieren para ambos procesos. Esto último es relevante ya que en mamíferos se ha descrito que el TGF- β 1 es la citocina con el espectro más amplio de actividad durante el proceso de cicatrización juntamente con la vía también activan (Clark et al., 1996). Aunque no se han descrito todos los componentes de las vías JNK y *dpp*, estudios de la cicatrización han identificado componentes de estas vías en este proceso (Noselli, 1998). Por ejemplo, ahora se sabe que la expresión de *dpp* en la cicatrización y el cerrado dorsal depende de la activación de JNK (Harden, 2002). El cerrado dorsal se ha caracterizado en detalle, no así la cicatrización de heridas. Dado que el cerrado dorsal sirve como modelo de reepitelización, se describe brevemente el proceso del cerrado dorsal en *D. melanogaster* y la vía de la cinasa de Jun.

1.A.2.a- Descripción del cerrado dorsal

Se ha descrito la participación de tres grupos celulares en el cerrado dorsal. Las células que conforman la hilera más dorsal del epitelio lateral del embrión conocidas como células del borde, o "leading edge" (LE), las células del epitelio lateral y las células de la amnioserosa. Estos grupos se movilizan en cuatro etapas para lograr el cerrado dorsal. La fase de iniciación ocurre justo al inicio de la retracción de la banda germinal y culmina con el inicio de la contracción de las células de la amnioserosa.

Durante la segunda fase se da el alargamiento de las células del borde. Estas células cambian de forma por la acumulación de filamentos de actina, mismos que se unen para formar cables de actina, con el fin de llevar a cabo una constricción apical por medio de un mecanismo de arrastre laminopodial; este rearrreglo del

citoesqueleto y la contracción de los cables de actina en las células del borde provoca una elongación de las células en su eje dorso ventral.

La tercera fase, conocida como cerrado en "zipper", consiste en la aproximación de las láminas epiteliales, a ambos lados del embrión, y el alineamiento correcto de las células del "LE" de cada lado, mientras se inicia y lleva a cabo el alargamiento de las células de todo el epitelio lateral (Figura 3).

La fase de terminación se da con la integración de las dos capas epiteliales en la parte media del embrión por medio de uniones adherentes (Esquema 1). Harden hizo una revisión de los mecanismos de señalización que dirigen los movimientos durante el cerrado dorsal (Harden, 2002). Se ha demostrado que este proceso es señalizado por la vía de la cinasa de Jun como ruta central.

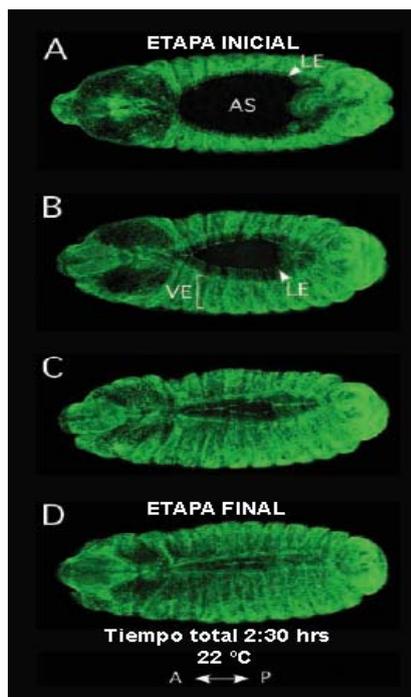
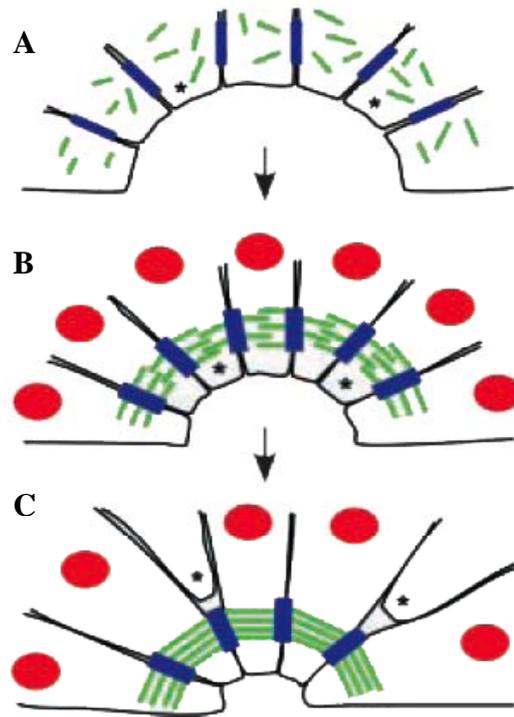


FIGURA 3. Micrografías tomadas por microscopia confocal de las etapas sucesivas del cerrado dorsal en embriones de *D. melanogaster*.

Se muestran cuatro fases del cerrado dorsal usando la expresión de una proteína fusión de GFP- α catenina. En A la fase de iniciación, en B el estiramiento del epitelio, en C el cerrado en "zipper" y en D la fase de terminación. La cabeza de flecha señala las células de borde o LE, "leading edge"; VE, ectodermo lateral y AS, amnioserosa.

El tiempo total es de 2:30 hrs. a 22°C. La flecha bidireccional señala la parte anterior A y la parte posterior P.

(Tomado y modificado de Martin y Parkhurst, 2004).



ESQUEMA 1. Esquema de rearrreglos temporales del citoesqueleto de células de la hilera guía en el cerrado dosal.

En A-C se ilustran filamentos de actina en verde, las uniones adherentes en azul y los núcleos en rojos.

En A se muestra la etapa inicial.

En B se esquematiza la formación de cables de actina en la parte apical de las células del borde al inicio del cerrado dosal.

En C se muestra la reducción de la circunferencia dada por la contracción de los cables de actina, así como la redistribución de las uniones adherentes.

Los asteriscos indican las células sufren apoptosis y dejan de formar parte de la hilera guía (Tomado y modificado de Martin y Parkhurst, 2004).

La participación, en los procesos de cicatrización, de la vía de la cinasa de Jun se ha demostrado mediante la generación de heridas en larvas mutantes de dos componentes de la vía: *msn* (*misshapen*) y *bsk* (*basket*). Con estos trabajos se pudieron discriminar dos eventos, al parecer independientes, en el proceso de cicatrización en los que la activación de la vía de la cinasa de Jun es esencial:

a).- El proceso de reepitelización.

b).- El cambio de forma de las células del borde de la herida (Galko y Krasnow, 2004).

El estudio de cicatrización de heridas hechas en adultos de *D. melanogaster* se ha estudiado muy poco y en el único trabajo reportado se realizaron heridas en condiciones de expresión ectópica de algunos de los componentes de la vía de la cinasa de Jun (Ramet et al., 2002). En dicho trabajo observaron una cicatrización deficiente de heridas hechas en alelos hipomorfos del gen (*kay*) *kayak* el cual codifica para el factor de transcripción Dfos, lo que afecta la expresión de genes blanco de la vía JNK.

Por ello este trabajo está encaminado a caracterizar a detalle el proceso de cicatrización en adultos silvestres de *D. melanogaster*, identificado las diferentes etapas que se dan durante la cicatrización:

A. La coagulación

B. La melanización

C. La reepitelización

Y aunque estas etapas se sobrelapan parcialmente, es posible acotarlas, definiendo las diferencias en cuanto a la temporalidad y a los cambios estructurales que se dan en cada una de ellas.

Es importante definir estas etapas puesto que las alteraciones, ya sea en el tiempo o en la morfología, podrían ser una forma indirecta de evaluar los mecanismos moleculares y las vías de señalización que regulan el proceso de cicatrización en adultos. Esto se podría investigar también realizando heridas en tejido mutante para los componentes de la vía JNK, y comparando los cambios morfológicos y temporales de cada una de las etapas que se dan durante el proceso de cicatrización con experimentos en animales silvestres.

2- HIPÓTESIS

El proceso de cicatrización de heridas hechas en el tórax de individuos adultos de *D. melanogaster* se puede dividir en diferentes etapas y es distinta a la que ocurre en larvas y embriones.

3- OBJETIVOS GENERALES

- Caracterizar la morfología del proceso de cicatrización en adultos silvestres de *D. melanogaster*.

3.A- Objetivos Particulares

- Optimizar las técnicas histológicas para analizar el proceso de cicatrización en el tórax adulto de *D. melanogaster*.
- Estudiar el curso temporal del proceso de cicatrización, observando los cambios morfológicos en la cutícula y los tejidos subyacentes al tegumento del tórax de *D. melanogaster*.

4- MATERIAL Y MÉTODOS

Las heridas fueron realizadas en organismos adultos silvestres de *D. melanogaster* de la cepa Oregon y fueron cultivadas a 25 °C en un ciclo de 12 horas de oscuridad por 12 horas de luz.

4.A- Realización de la herida torácica

Las heridas se hicieron en zonas dorsales del tórax en individuos previamente anestesiados con una atmósfera enriquecida de CO₂ y así anestesiados se orientaron los animales, bajo el microscopio estereoscópico, en un soporte que tiene un canal de 3.5 mm de largo por 0.6 mm de ancho dejando libre acceso a la zona del tórax dorsal. Con una aguja de tungsteno para microdissección de 0.15 mm de diámetro y 10 mm de largo (Fine Science Tools, modelo 26002-10), se hicieron punciones a una profundidad aproximada de 100µm en el dorso de cada animal y se dejaron recuperar de 10 a 25 min. y en diferentes tiempos post-punción se fijaron las moscas en Bouin durante una hora. Para la realización del análisis histológico de material impregnado de parafina; se empleó una solución fijadora compuesta por glutaraldehído al 2 % y tetraóxido de osmio (OsO₄) al 1%, ambas disueltas en una solución amortiguadora a pH 7 de cacodilatos y posteriormente se procesó para su inclusión en resina.

4.B- Microscopía electrónica de barrido

Las moscas ya punzadas se anestesiaron con éter y se montaron en el soporte metálico para microscopía de barrido. Se utilizó pintura conductora para asegurar el contacto eléctrico entre la mosca y la base metálica. Se colocó entonces el soporte con la muestra en la cámara del microscopio electrónico de barrido (Zeiss). Se hizo vacío en la cámara y se localizó el sitio de la herida y se tomaron micrografías a diferentes aumentos.

4.C- Prueba de difusión de colorante fluorescente a través del sitio de la herida

Para la realización de esta prueba se llevó a cabo previamente un ensayo de sobrevivencia de las moscas con el fin de determinar la letalidad del colorante. Este resultó inocuo para los propósitos del estudio ya que los organismos inyectados sobrevivieron por más de 5 horas posteriores a la microinyección del colorante.

Con el fin de determinar el momento en que el tapón bloquea por completo la salida de la hemolinfa a través del sitio de la herida, se realizaron microinyecciones, en la parte ventral del abdomen de moscas adultas, de una solución al 1% de dextrán acoplado a rodamina diluido en PBS 1x. La parte ventral del abdomen de la mosca es mucho más blanda y fácil de inyectar y no altera la zona de la herida en estudio.

Para asegurar que el colorante difundiera completamente en todo el hemocele de las moscas, se realizó la microinyección de dextrán-rodamina dos horas antes de cumplir el tiempo de estudio excepto en los animales utilizados para el ensayo con menos de una hora de realizada la punción, los cuales se inyectaron inmediatamente después de haberse realizado la herida, antes de ser observadas al microscopio. Las observaciones se realizaron bajo un microscopio de fluorescencia a una de longitud de onda entre 570 y 590 nm. En este ensayo se utilizaron organismos a tres tiempos posteriores a la punción: 0, 24 y 48 horas posteriores.

4.D- Análisis externo de la formación de la costra

Se realizaron punciones en el tórax de moscas adultas de tipo silvestre y se colocaron en un soporte montado en un portaobjetos, y se observaron al microscopio óptico con el objetivo de 10x. Se tomaron fotografías de la herida y se regresaron las moscas al tubo de cultivo. Esta acción se repitió a diferentes horas de recuperación.

4.E- Histología

Para el estudio de los cambios morfológicos que se dan debajo de la cutícula durante el proceso de cicatrización se emplearon técnicas histológicas de dos tipos:

- Cortes histológicos de material embebido en parafina.
- Cortes histológicos de material embebido en resina.

Ambas técnicas se describen a continuación:

4.E.1- Histología de tejidos embebidos en parafina

El material embebido en parafina se tiñó con hematoxilina-eosina.

4.E.1.a- Fijación del tejido

En experimentos preliminares se probaron dos tipos de fijadores a diferentes tiempos, como se muestra en la siguiente tabla:

TABLA 2. Prueba de dos tipos de fijadores a diferentes tiempos.

FIJADOR	TIEMPOS DE FIJACION			
Bouin	1 hora*	6horas	8 horas	12 horas
Glutaraldehido al 4% en PBS	1 hora	6horas	8 horas	12 horas

*Tratamiento de fijación utilizado en los experimentos.

La composición del fijador Bouin es: 20% formaldehído, 5% ácido acético y 75% ácido pícrico (Electron Microscopy Sciences). El glutaraldehido (Fluka) se tomó de una solución a 25% y se hizo una dilución con una solución amortiguadora de buffer de fosfatos (PBS), a una concentración final de 4%. Se realizaron cinco pruebas de fijación para los dos tipos de fijadores a los diferentes tiempos indicados en la tabla 2. El tratamiento seleccionado para los experimentos fue el Bouin a 1 hora de fijación. Si se aumenta el tiempo de exposición de las muestras en este fijador el tejido se endurece y se dificulta la realización de los cortes. Las muestras tratadas con glutaraldehido al 4% presentaron una buena preservación de los tejidos internos, fibras musculares y estructuras del sistema digestivo, pero una baja preservación de los elementos del sistema tegumentario. En los cortes histológicos de tejido fijado con glutaraldehido se observó la ruptura continua de la cutícula, lo que dificultaba la localización de la zona de la herida (datos no mostrados).

4.E.1.b- Inclusión de tejido en parafina

Después de la fijación, se separaron las cabezas de las moscas del resto del cuerpo y se transfirieron éstos a cartuchos de inclusión. Se colocaron en una solución de etanol al 70% en una unidad de procesamiento automatizado (Leica TP 1020 Tissue Processor) y se deshidrataron con un programa de 1 hora para cada paso, terminando con cera de inclusión. La deshidratación consistió en sumergir a las muestras en baños de concentración crecientes de etanol, pasando dos veces por cada solución de alcohol. Las diluciones de alcohólicas utilizadas fueron al 70%, 80%, 90% y alcohol absoluto. Terminando el tratamiento de deshidratación se aclararon las muestras en dos baños de xilol al 100%. Por último se colocaron las muestras en parafina fundida a 60°C. Terminado el programa de deshidratación se embebieron en la estación de inclusión (Leica) con parafina. En este punto se orientaron los cuerpos en posición vertical, con la parte anterior hacia el fondo de la cápsula de inclusión. Se enfriaron los bloques a una temperatura de -6 °C y se retiraron de las cápsulas de inclusión. Los bloques se montaron y se alinearon para hacer los cortes en el microtomo (Leica) a un grosor de 5 µm. Se utilizaron navajas desechables (Leica). Los cortes se transfirieron entonces a un baño de flotación a 50°C en una solución diluida de grenetina. De éste último se tomaron los cortes en portaobjetos de 76 x 26 mm, los cuales habían sido tratados previamente con una mezcla de albúmina y glicerol 1:1, tratamiento que mejora la adhesión de los cortes. Estos se desparafinaron en una incubadora a 60 °C. Los residuos de parafina se removieron con xilol, como parte de la fase inicial del tren de tinción para hematoxilina eosina (H/E) (Bancroft et al., 1996). Después de la tinción los cortes se montaron en un portaobjetos con Permount y se cubrieron con una laminilla cubreobjetos.

4.E.2- Histología de tejidos embebidos en resina

Para esta técnica se disecó el tórax del resto de la mosca y se transfirió a una solución Ringer. Después se sustituyó el Ringer por una solución fijadora de glutaraldehído al 2 % y tetraóxido de osmio (OsO_4) al 1%, ambas disueltas en una solución amortiguadora de cacodilatos al 0.1M, pH 7.0. El tiempo de fijación fue de 30 minutos. Los tejidos fueron fijados después en solución de OsO_4 al 2 % disuelta en la misma solución amortiguadora de cacodilatos durante 2 horas. Estas fijaciones se realizaron en hielo. Transcurrido este tiempo se procedió a la deshidratación del tejido. La secuencia de deshidratación se realizó en un equipo automatizado (Leica EMTP) empezando con una solución de acetona al 30 % hasta llegar a una solución de acetona absoluta; el tiempo de deshidratación en cada paso fue de 5 minutos, excepto los dos pasos finales de acetona 100%, de 10 minutos cada uno. Las diluciones de acetonas utilizadas fueron 30%, 50%, 70%, 90%, 96% y 100%. Al término de la deshidratación se transfirieron las muestras a una solución compuesta por medio de inclusión (Spurr), la cual es una resina compuesta por 7.5g de dióxido de vinilciclohexano, 19.5 g de nonenil succínico anhidro, 3.75 g de propilengliol diglicil éter y 0.3 g de dimetilaminoetanol. Esta resina se diluyó con acetona absoluta en una proporción 1:1. Las muestras se dejaron en esta solución por aproximadamente 13 horas. Posteriormente se cambiaron a Spurr 100% por cuatro horas, y finalmente se transfirieron los tejidos a los moldes de inclusión y se rellenaron con medio de inclusión Spurr y se dejaron solidificar en el horno a 65 °C por un periodo de 18-70 horas.

Para la realización de cortes semifinos, los bloques se montaron en un microtomo (Leica RM2265) y se hicieron cortes con un grosor de 1000 ó 1500 nanómetros. Para este procedimiento se utilizaron cuchillas de vidrio. Los cortes obtenidos se colocaron en un portaobjetos y fueron teñidos con azul de metileno, montados en Permound y cubiertos con una laminilla cubreobjetos. Las observaciones de estos cortes se realizaron en el microscopio óptico, al igual que los cortes de tejidos embebidos en parafina.

4.F- Análisis de cortes

Las preparaciones se observaron bajo el microscopio óptico (Nikon) a diferentes aumentos (40x-inmersión en aceite y 60x). En un primer análisis se seleccionaron los cortes que presentaron una cutícula íntegra en las preparaciones histológicas. En una segunda revisión se seleccionaron los cortes que presentaban heridas y cicatrización. Los cortes seleccionados fueron observados a mayor aumento (con objetivos 60x y 100x). Se digitalizaron imágenes de cortes que presentaron cicatrización con una cámara (Roper Scientific) y las imágenes fueron capturadas con un programa de digitalización de imágenes (IP LAB). Las imágenes capturadas fueron ajustadas a un tamaño uniforme. Sin perder la proporción original se hicieron ajustes de contraste para realzar la nitidez de la zona de interés y además se adicionaron elementos de referencia como: cabezas de flechas, líneas punteadas, etc. (Photoshop).

5.-RESULTADOS

5.A.-Cambios morfológicos en la parte externa de heridas

La primera etapa del análisis del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*, consistió en la observación bajo el microscopio electrónico de barrido de cambios morfológicos de la parte externa del tapón que bloquea la salida de hemolinfa en el sitio de la herida. Para este estudio se utilizaron animales silvestres de la línea Oregon en dos grupos:

- A. Moscas adultas fijadas a tiempos menores a una hora de haberse realizado la punción en el tórax (paneles a-c de la figura 4)
- B. Moscas adultas fijadas a tiempos mayores o iguales a 24 horas posteriores a la punción en el tórax (paneles d-f de la figura 4)

Los paneles a y d de la figura 4 son micrografías tomadas con el microscopio electrónico de barrido de la zona del tórax a un aumento de 100x. La zona en donde se realizó la punción se indica con el recuadro rojo.

A mayor aumento de la zona de la herida fue posible analizar a detalle los cambios morfológicos de las costras en las dos condiciones antes descritas; imágenes b-c y e-f de la figura 4. La costra formada a menos de una hora de la punción adquiere una forma con superficie lisa (imágenes b y c de la Figura 4), mientras que la costra a 24 horas tiene superficie rugosa (imágenes e y f). Después se analizaron los cambios internos en el proceso de cicatrización.

0 Hrs.

24 Hrs.

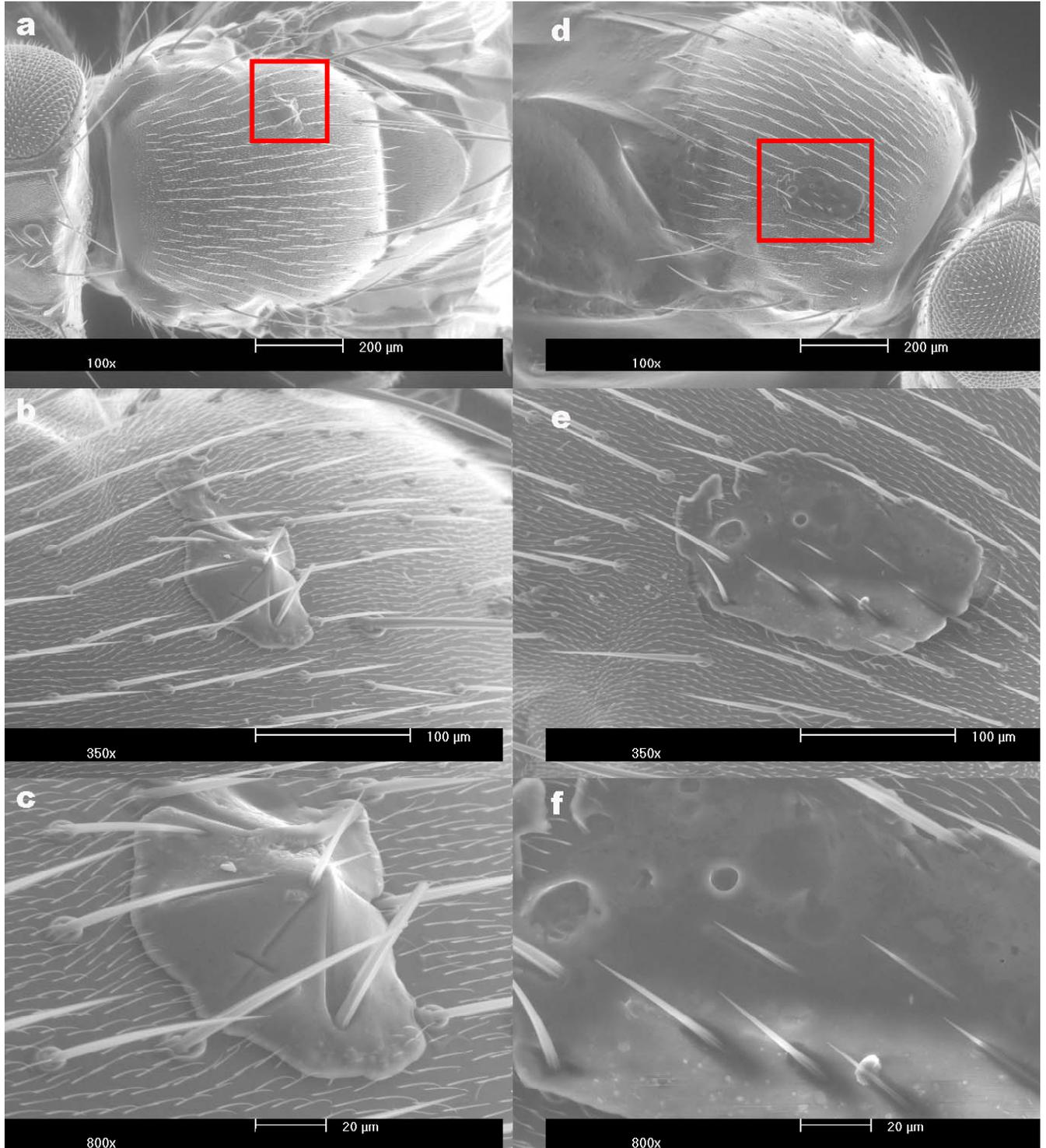


Figura 4. Apariencia externa de la costra

Imágenes tomadas con el microscopio electrónico de barrido. Los recuadros rojos en **a** y **d** indican la zona donde se realizó la punción. Las imágenes de la columna izquierda corresponden a heridas a 0 horas de recuperación, mientras que las imágenes de la derecha corresponden a heridas a 24 horas de recuperación. La amplificación de los recuadros va en aumento de arriba hacia abajo. La amplificación en **a** y **d** es de 100x, **b** y **e** de 350x, en **c** y **f** de 800x.

Con la obtención de estas imágenes se pudieron contrastar las diferencias en la apariencia externa de la costra a 0 hrs. con respecto a la de 24 hrs. de recuperación. Esta última adquiere una superficie más rugosa, en comparación con la costra a 0 hrs. de recuperación (**Paneles b y e**).

5.B.-Prueba de difusión de colorante fluorescente al sitio de la herida

En este ensayo se utilizaron animales adultos silvestres de la cepa Oregon, en tres grupos experimentales:

- A. Moscas adultas estudiadas antes de tener una hora de haberse realizado la punción en el tórax (paneles a-d de la Figura 5)
- B. Moscas adultas a 24 horas de haberse realizado la punción en el tórax (paneles e-h de la Figura 5)
- C. Moscas adultas a 48 horas posteriores a la punción en el tórax (paneles i-l de la Figura 5)

Los animales utilizados en este ensayo fueron microinyectados con dextran acoplado a rodamina y observadas al microscopio de fluorescencia. En las heridas estudiadas a menos de una hora de realizada la punción, se observó acumulación del compuesto fluorescente en el sitio de la herida. Se observó una pérdida de la señal fluorescente en el sitio de la herida a tiempos más posteriores a la punción. (paneles a-i de la figura 5). Esta pérdida de señal fluorescente es probable que esté relacionada con la acumulación de pigmento en el sitio de la herida (paneles g y k de la Figura 5).

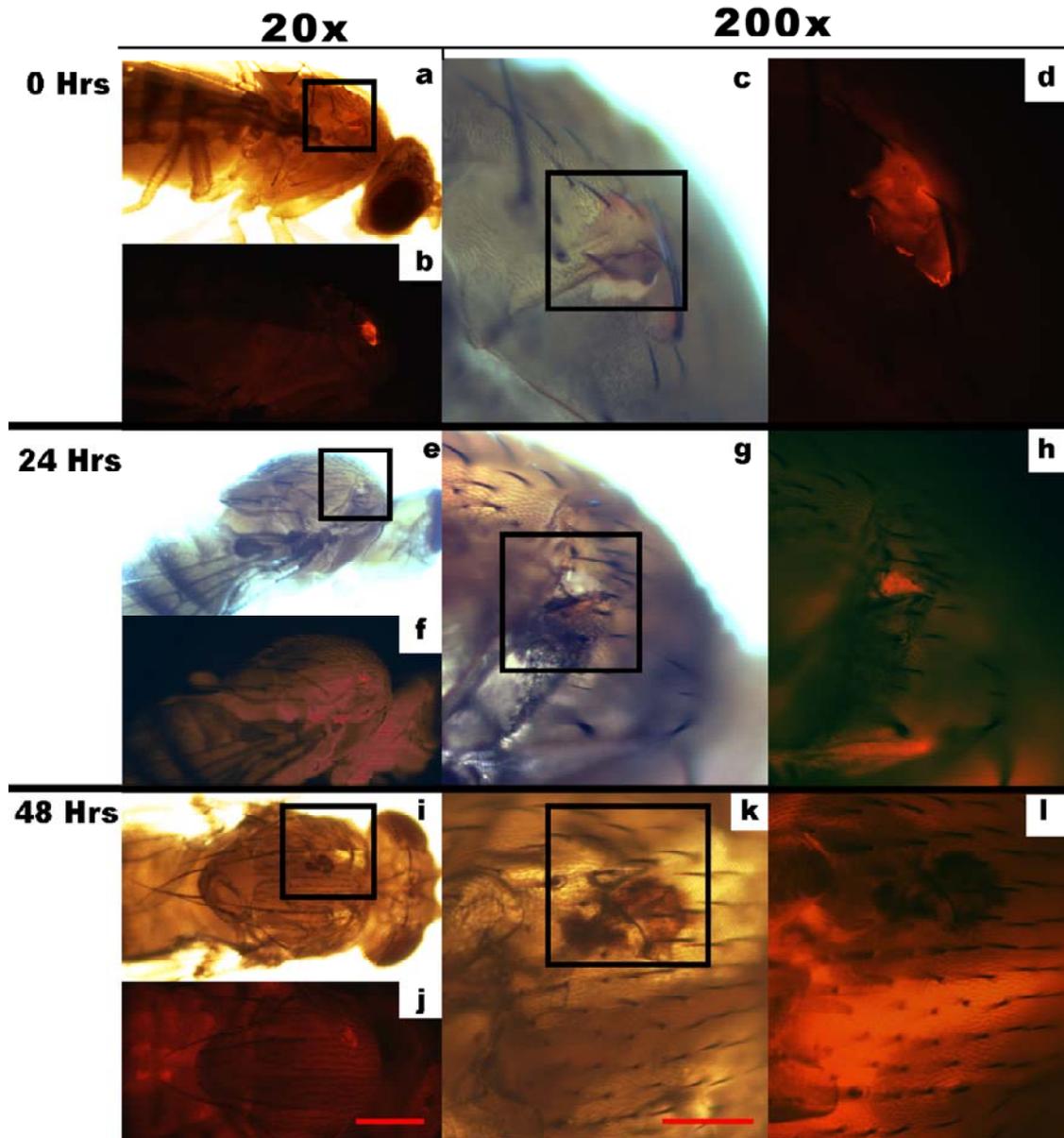


Figura 5. Bloqueo de la herida por componentes de la hemolinfa.

Las fotografías b, d, f, h, j y l se realizaron exponiendo a las muestras a luz fluorescente para observar la localización del colorante. Se localizó el sitio de la herida en las mismas muestras (recuadros negros de las imágenes a, c, e, g, i y k) con luz transmitida. Las dos columnas de la izquierda corresponden a las ampliificaciones a 200x, tomadas con fluorescencia y luz transmitida, respectivamente. Las zonas amplificadas se marcan en las imágenes de la derecha, las cuales fueron tomadas a una ampliificación de 20x.

En la figura 5 se analizaron los procesos de coagulación a 1, 24 y 48 horas de recuperación. Se inyectó dextrán-rodamina en la parte ventral de las moscas dejando que los organismos se estabilizaran después de este procedimiento. Se observó la acumulación de señal fluorescente en la herida. A 48 hrs. posteriores a la punción, el dextrán-rodamina no está ya acumulado de la costra (Panel l). En cambio, a 0 y 24 hrs. se observó acumulación del dextrán-rodamina debajo de la costra (Paneles d y h) lo que demuestra la continuidad del espacio subyacente a la costra con la hemolinfa. Nótese la pigmentación creciente de la costra a 24 y 48 horas. La barra de escala en k es de 50 μm y en j es de 100 μm .

5.C.-Estudio temporal del proceso de cicatrización en heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*

En este estudio se observaron los cambios de coloración de la herida en moscas adultas silvestres de la cepa Oregon (en el panel a de la Figura 6 se indica con la línea punteada en rojo la extensión de la costra y con la flecha roja el sitio en donde se realizó la herida). Se observó un oscurecimiento progresivo en la zona de la herida a partir de las 12 horas de haber realizado la punción (paneles a-e de la Figura 6). Después de las 24 horas no aumenta la pigmentación; es decir, los cambios se dan en las primeras 24 horas (paneles f-j de la Figura 6). El área estudiada está indicada con las líneas puntadas en azul en los paneles a y j de la Figura 6.

La segunda fase de nuestra investigación se enfocó en determinar cuales eran los cambios morfológicos en la parte interna de la zona dañada, y si se podrán correlacionar con cambios observados en la parte externa de la herida.

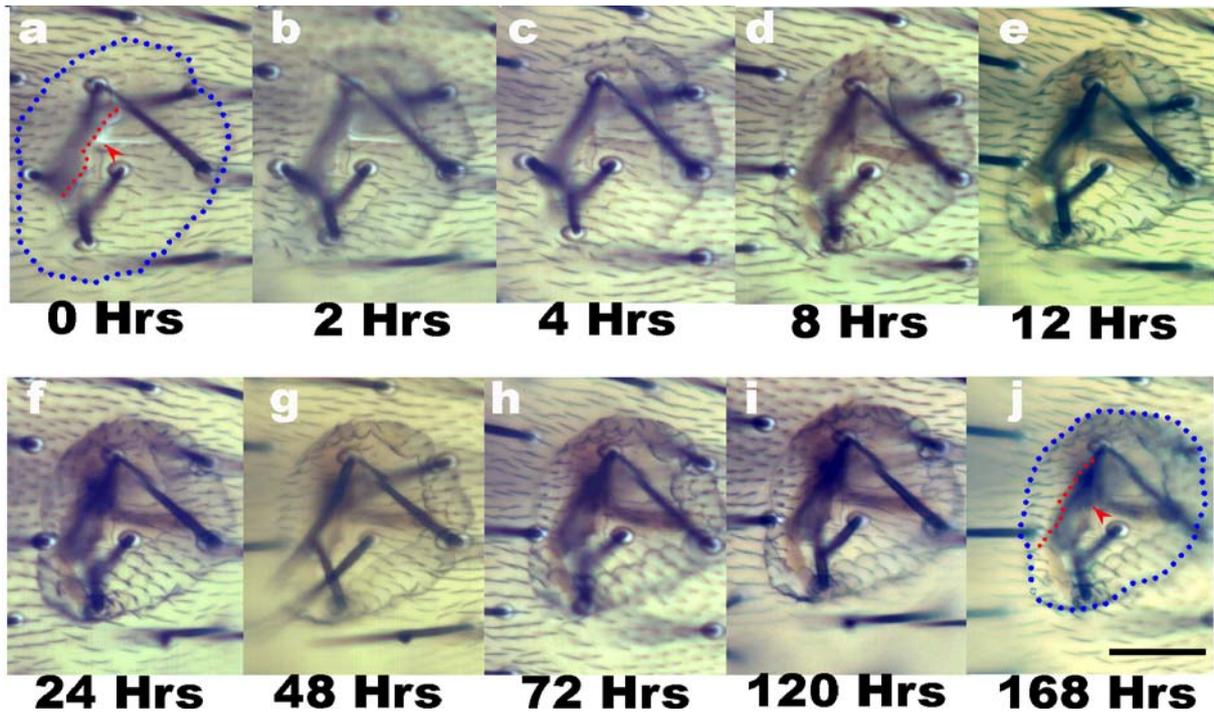


Figura 6. Estudio temporal del proceso de pigmentación de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*.

Se muestra el aspecto exterior del sitio de una herida realizada en el tórax de un organismo adulto de tipo silvestre. Las imágenes fueron tomadas a diferentes tiempos de cicatrización de 0 a 168 horas posteriores a la punción, con un objetivo de 20x (paneles a-j). En este estudio progresivo se pudieron observar cambios en la consolidación de la costra (línea punteada azul, paneles a y j) y la melanización progresiva de la costra (línea punteada roja, paneles a y j). La flecha roja indica el sitio en donde se realizó la punción (paneles a y j). Cabe notar que existe una reducción en el tamaño del área total de la costra, conforme aumenta el tiempo de cicatrización. En j la barra de escala es de 100 μm .

5.D.-Cambios morfológicos en la parte interna de la zona dañada

Para estudiar la morfología se hicieron cortes transversales de tórax de moscas adultas silvestres de la cepa Oregon. Los intervalos de tiempo en que se realizó este estudio morfológico fue menos de una hora de cicatrización y de 24 horas posteriores a la realización de la herida.

En la Figura 7 se muestran los resultados del análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*, inmediatamente después de realizada la punción. En la Figura 8 se muestran los resultados del análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*, a 24 horas de haberse realizado la punción.

Se utilizó la tinción de hematoxilina-eosina para identificar estructuras del sistema tegumentario de *D. melanogaster*. Se detectaron las zonas en donde se realizó la punción usando tres características morfológicas distintivas:

- A. La interrupción de la continuidad de la cutícula en el sitio donde se realizó la punción
- B. La formación de un tapón ó costra en el sitio de la herida (indicadas con las líneas punteada en azul de los paneles a de las Figuras 7 y 8)
- C. Alteraciones en el arreglo de las fibras musculares subyacentes a la zona de la heridas (paneles a y b de la Figura 7)

Se observó un cambio en la coloración de las costras en las heridas a 24 horas posteriores a la punción (paneles a-f de la Figura 8), en comparación con el tapón formado en heridas realizadas inmediatamente después de la punción, las cuales carecen de pigmentación (paneles a-f de la Figura 7). Otro cambio destacable son los arreglos de las fibras musculares las cuales tiene una apariencia más desorganizada en heridas realizadas inmediatamente después de la punción en comparación con las fibras musculares de heridas a 24 horas posteriores a la punción.

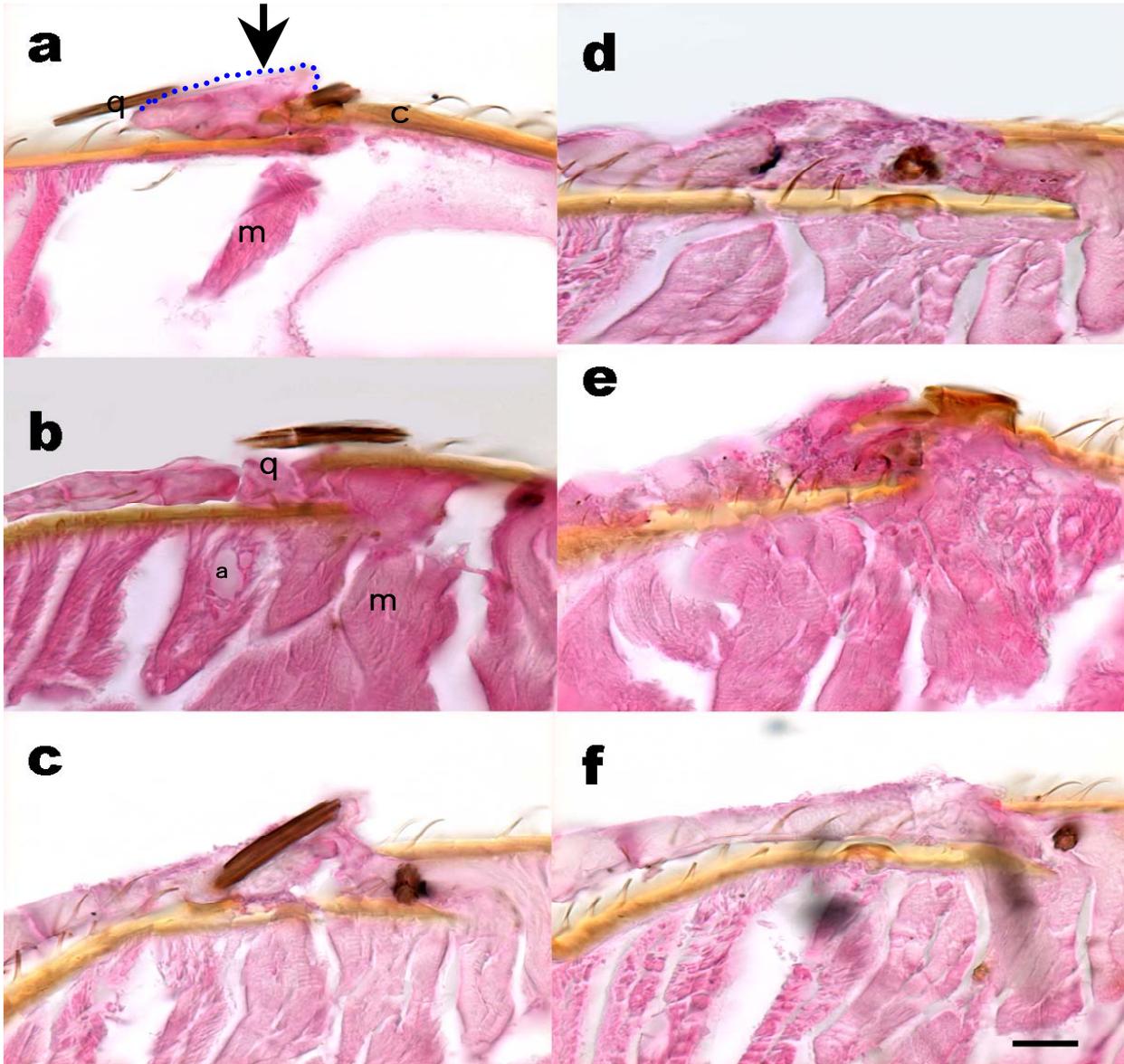


Figura 7. Análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*, inmediatamente después de la punción.

En esta figura se muestran micrografías de cortes transversales seriados del tórax de un organismo adulto, teñido con hematoxilina/eosina (H/E). Las micrografías fueron tomadas con el objetivo de 60 x (a-f). En el panel a se indica el sitio en donde se realizó la punción (flecha). La línea punteada azul denota la formación de un tapón en la parte externa en el sitio de la herida. Se puede ver la discontinuidad de la cutícula (c) y una sección de una queta (q). En la parte interna se puede observar la interrupción de fibras musculares (m), tanto en el panel a como en el b. En este último se observa lo que podría ser un adipocito (a). Cabe remarcar que la costra carece de pigmentación, lo que indica que no se ha melanizado. La barra de escala en el panel f es de 20 μm .

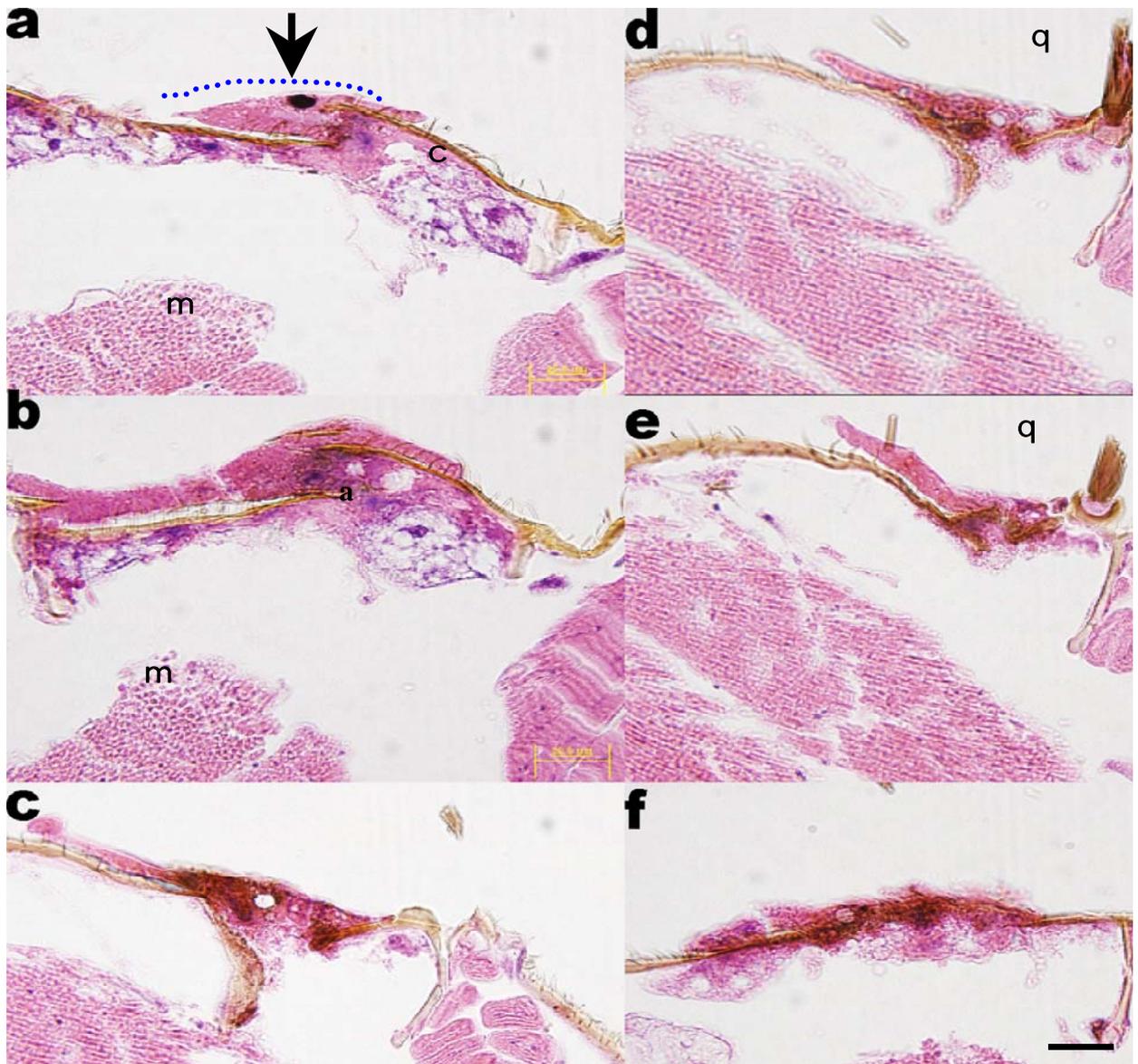


Figura 8. Análisis histológico de cortes en parafina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*, a 24 horas de recuperación.

En esta figura se muestran micrografías de cortes transversales seriados del tórax de organismos adultos, teñidos con hematoxilina/eosina (H/E). Las micrografías fueron tomadas con el objetivo de 60x (a-f). En el panel a, se indica con la línea punteada azul la formación de la costra en el sitio de la herida (flecha). Se puede ver la discontinuidad de la cutícula (c), así como una sección de una queta (q), paneles d y e. En la parte interna se pueden observar fibras musculares (m) marcadas en los paneles a y b. En b se observa posible tejido adiposo (a). Nótese el oscurecimiento de la costra (paneles c y f) en comparación al tapón formado inmediatamente después de la punción (paneles c y f de la figura 7). Esto indica que a las 24 horas de recuperación ya existe un proceso de melanización. La barra de escala en el panel f es de 20 μm .

Para hacer más robusta nuestra investigación y obtener más información de los cambios morfológicos que se suceden durante el proceso de cicatrización realizamos cortes semifinos de material embebido en resina. Los resultados de este análisis se muestran en las Figuras 9, 10 y 11. Para la realización de esta técnica se emplean otros fijadores, que preservan mucho mejor el tejido y permiten examinar con más detalle las estructuras. Esta técnica nos dio la posibilidad de observaciones con mayor definición, además de obtener cortes seriados de mucho menor grosor, lo que permitió obtener mayor número de preparaciones y rastrear los cambios morfológicos de toda el área en donde realizó la punción.

Identificamos una banda de pigmentación localizada en la interfase subyacente a la costra a 24 horas de haberse realizado la punción. Esta banda se indica con unas llaves en los paneles 3, 8 y 13 de la Figura 10. Esta banda no se observó en las moscas con menos de una hora de haber sido heridas (Figura 9).

Las imágenes de la Figura 11 muestran los resultados del análisis histológico de la herida mostrada en la Figura 6. En las imágenes se identificaron las bandas de pigmentación descritas en la Figura 10. La formación de estas bandas es probable que se deba a la acumulación progresiva de melanina.

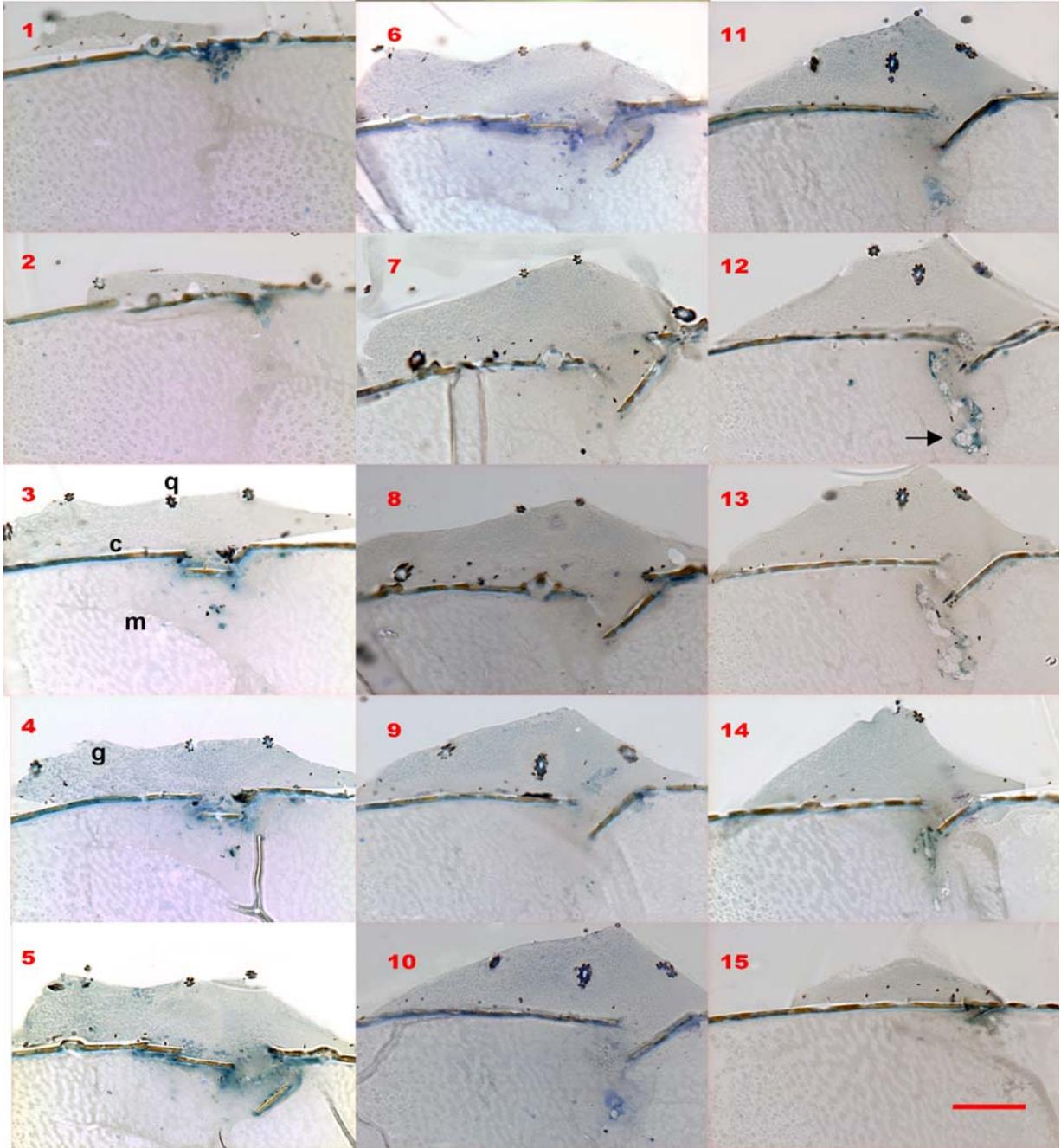
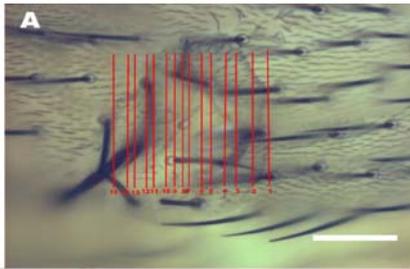


Figura 9. Análisis histológico de material embebido en resina. Heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *Drosophila melanogaster* a 0 horas de recuperación.

El panel A es una vista externa de la herida, tomada con el objetivo de 20x; cada línea roja indica un nivel del corte presentado abajo en la figura. Los paneles 1 a 15 son micrografías de cortes de una micra de espesor tomadas con el objetivo 60x. La numeración corresponde a la seriación con que fueron colectados los cortes, indicado en el panel A. En la figura se pueden identificar las diferentes estructuras que conforman a los sistemas tegumentarios de *D. melanogaster*, como lo son quetas (q), músculos (m) y cutícula (c), indicados en el panel 3. En el panel 12 se indica con una flecha una posible acumulación de tejido adiposo. Esta serie de imágenes nos permiten ver un aumento progresivo de la zona de la herida, así como el inicio y el fin del tapón. Se observa en el interior del tapón estructuras granulares (g) marcadas en el panel 4; comparar con las Figuras 6 y 7. La barra de escala en el panel A es de 100 μm y en el panel 15 es de 20 μm .

0 Hrs.

24 Hrs.

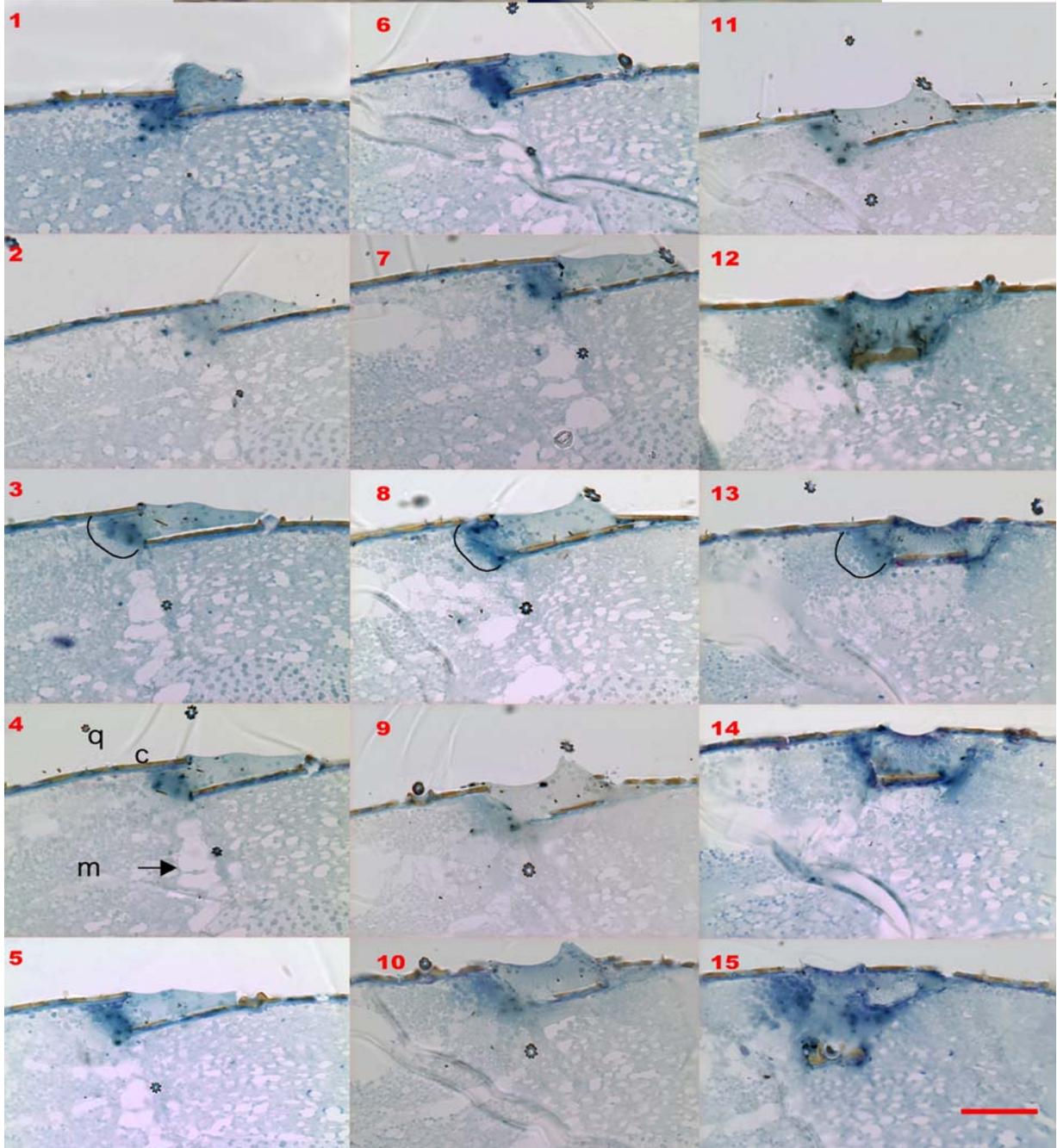
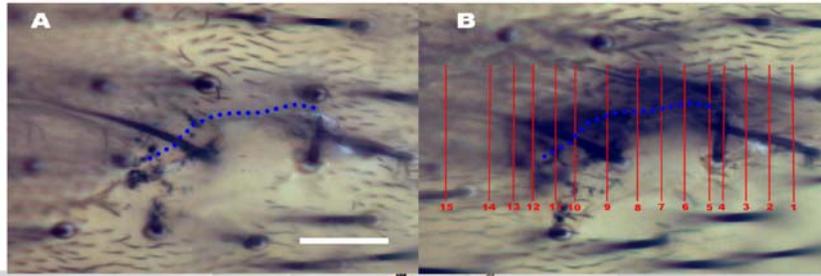


Figura 10. Análisis histológico de material embebido en resina.

En esta figura se muestran micrografías de vistas externas de la herida con menos de una hora de cicatrización (panel A) y de la misma herida a 24 horas posteriores a la punción (panel B). Ambas micrografías fueron tomadas con el objetivo de 20x. La línea punteada azul indica la zona de la herida. Se observa un aumento en la pigmentación de la zona de la costra en el panel B. En este panel las líneas rojas indican los niveles de corte.

Los paneles 1 a 15 son micrografías de cortes transversales seriados del tórax de una micra de espesor teñidos con azul de toluidina tomadas con el objetivo de 60x. La numeración de los paneles 1-15 corresponde a la seriación en que fueron colectados los cortes. En el panel 4 se pueden identificar las diferentes estructuras que conforman a los sistemas tegumentarios de *D. melanogaster*, como quetas (q), músculos (m), y cutícula (c). En las imágenes de los paneles 7 y 8 se observaron extensiones de fibras musculares localizadas en el sitio de la herida (flecha).

Esta serie de imágenes demuestran que existen cambios en la coloración, así como en la forma del tapón localizado en la parte externa del sitio de la herida, a 24 horas posteriores a la punción, en comparación con las imágenes de la figura 9. Dichos cambios de coloración también son evidentes en las imágenes de la vista externa de la herida (paneles A y B). Es probable que esta acumulación progresiva de pigmento sea el resultado de un proceso de melanización. Además, como se observa en las micrografías de los cortes de los paneles 3, 8 y 13, esta acumulación de pigmento está localizada en la parte basal de la costra formando una banda oscura, probablemente como resultado de un proceso de melanización (localizadas con corchetes en las micrografías). La barra de escala en el panel A es de 100 μm (para los paneles A y B) y para los paneles 1-15 la barra es de 20 μm y está en el panel 15.

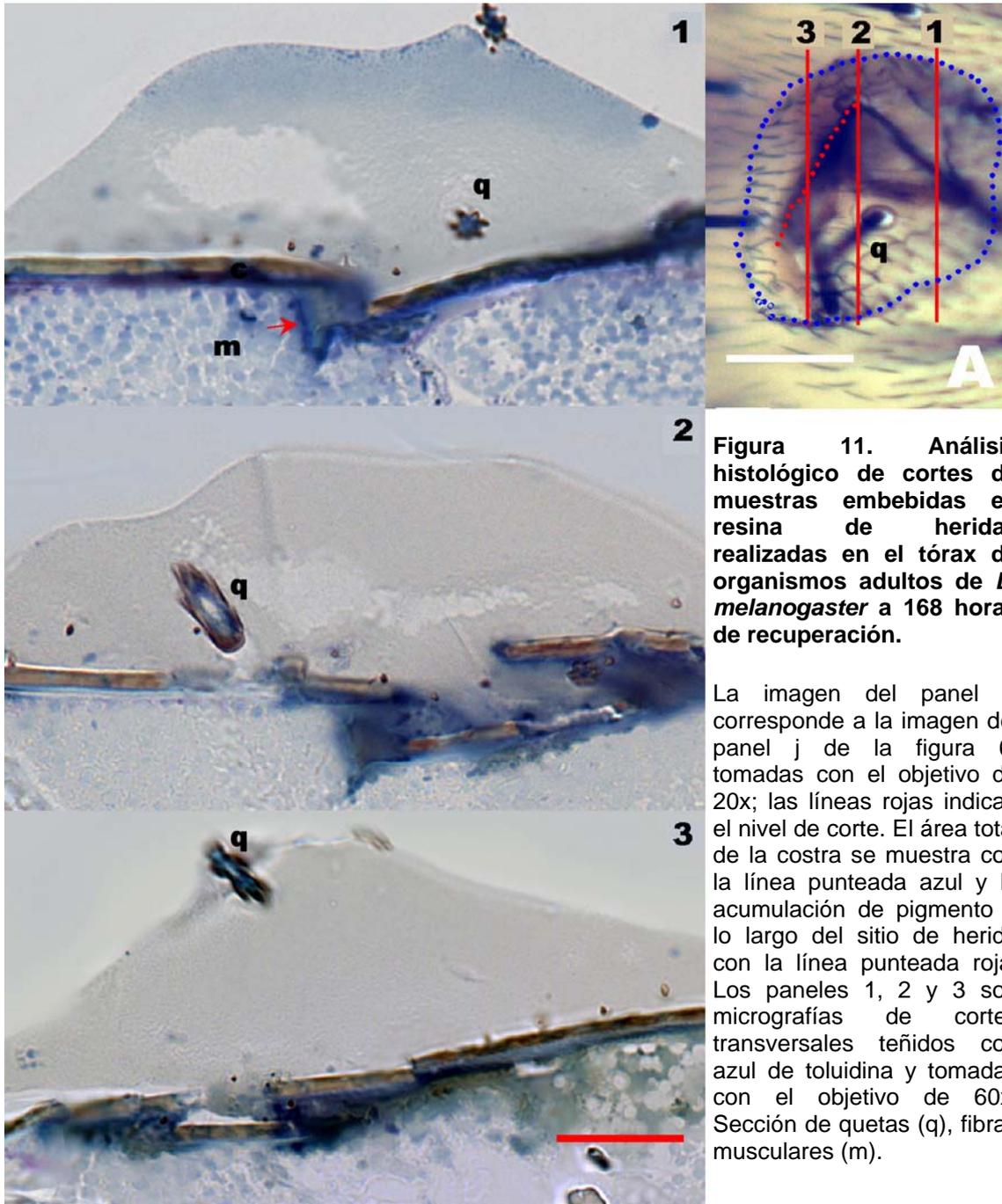


Figura 11. Análisis histológico de cortes de muestras embebidas en resina de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster* a 168 horas de recuperación.

La imagen del panel A corresponde a la imagen del panel j de la figura 6, tomadas con el objetivo de 20x; las líneas rojas indican el nivel de corte. El área total de la costra se muestra con la línea punteada azul y la acumulación de pigmento a lo largo del sitio de herida con la línea punteada roja. Los paneles 1, 2 y 3 son micrografías de cortes transversales teñidos con azul de toluidina y tomadas con el objetivo de 60x. Sección de quetas (q), fibras musculares (m).

En el panel 1 se puede identificar el inicio del sitio de la herida, por la pérdida de la continuidad de la cutícula (c) y una zona melanizada en la parte interna de la herida (flecha roja). En el corte del panel 2 se observa una mayor extensión de la zona de la herida; cabe resaltar que dicha zona se encuentra altamente melanizada. En este tipo de cortes es difícil localizar el epitelio subyacente a la cutícula. En la micrografía del panel 3 se muestra la parte final de la zona de la herida.

La barra de escala en el panel A es de 100 μm y para los paneles 1-3 es de 20 μm , indicado en el panel 3.

6. DISCUSIÓN

6.A- Cambios en la parte externa durante la cicatrización de heridas de adultos de *D. melanogaster*

Con la obtención de las imágenes de la figura 4 se pudieron constatar las diferencias en la apariencia externa de la costra en los animales con menos de una hora de haber sido dañadas con respecto a los animales a 24 horas posteriores a la punción. Si comparamos las imágenes de los paneles b y e, se observa que el tapón tiene una apariencia lisa en comparación con la costra. Este estudio se realizó por duplicado para cada tiempo de recuperación. Este cambio de apariencia debe estar relacionado con cambios internos y la interperización de la misma. Estudiamos después la continuidad entre la hemolinfa y el tapón y costra. Es evidente que existe un intercambio entre la hemolinfa y la costra en las primeras horas de haberse realizado la herida. Después de la punción se forma un tapón de apariencia cristalina y la parte interna de la herida carece de pigmentación.

Para establecer en que momento se interrumpe este intercambio se realizó una prueba de difusión. Antes de analizar como difundía la solución inyectada hacia la zona de la herida, se hicieron pruebas de sobrevivencia para determinar la toxicidad de la solución de dextrán-rodamina inyectada. Se observó que si esta solución se inyectaba 2 horas antes del ensayo, no causaba letalidad y permitía que el colorante se difundiera por todo el cuerpo de la mosca.

Aunque se observó una acumulación de la señal fluorescente en las heridas a 0 horas de haberse realizado la punción (panel d de la Figura 5), no es comparable con los estudios a tiempos posteriores, ya que el tiempo en el que se inyectó el colorante, difiere de los ensayos realizados para heridas a 24 y 48 horas posteriores a la punción, en donde se observa una pérdida de señal a medida que el tiempo de estudio aumenta (paneles d y l de la Figura 5).

A 24 horas de realizada la punción se observó acumulación de señal en la herida, y aunque no se cuantificó la emisión de luz fluorescente (panel h de la Figura 5). En cambio a 48 horas no se observó una señal fluorescente (panel l de la Figura 5), demostrando que el intercambio de fluido queda interrumpido. A pesar de la pigmentación a 24 y 48 hrs. (que teóricamente debe de reducir la señal), se observan diferencias entre 24 y 48 hrs. (ver más adelante). Entre 24 y 48 hrs no parece haber un aumento significativo de la melanización.

La presencia de pigmento en el sitio de la herida está relacionada con la capacidad de bloqueo de la costra. Por eso, nosotros determinamos el momento en que se presenta dicha pigmentación. Realizamos un estudio detallado de los cambios de pigmentación en el sitio de la herida a lo largo del tiempo. Los resultados de estos cambios se pueden ver en la Figura 6. De estas observaciones de este estudio resalta el incremento gradual en la pigmentación en el sitio de la herida de 0 a 24 horas de haberse realizado la punción (paneles a-f de la Figura 6). Después de 24 hrs. el grado de pigmentación permanece constante (paneles g-j de la Figura 6).

Existen evidencias en la literatura de que la pigmentación en el sitio de la herida es resultado de la melanización. Estudios *in vitro* de hemolinfa han demostrado que fibras de melanina forman agregados que se compactan a medida que aumenta la polimerización de ésta. A este proceso de compactación se le conoce como melanización (Bidla et al., 2005). Estas observaciones nos permitieron determinar la ventana temporal para realizar el análisis histológico a 0 y 24 horas de cicatrización.

6.B- Estudio histológico del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*

Se utilizaron diferentes técnicas histológicas para estudiar los cambios morfológicos en las estructuras internas en el sitio de la herida a 0 y 24 horas posteriores a la punción. Una de las técnicas utilizadas fueron cortes de material embebido en parafina; los resultados se discuten en la sección **6.B.1**. La otra técnica empleada para este propósito fue el análisis de cortes de muestras embebidas en resina; los resultados de estas observaciones se discuten en la sección **6.B.2**

6.B.1- Estudios en cortes histológicos de material embebido en parafina.

Se observó una marcada acumulación de pigmentación en los cortes (Figura 8) realizados a 24 horas de recuperación de la herida (paneles b, c y f), en comparación con los cortes realizados a 0 horas de recuperación (Figura 7). En la Figura 7 se puede observar la formación de un tapón de apariencia cristalina en la parte externa de la herida. La diferencia de pigmentación entre los cortes con 0 y 24 horas es congruente con el análisis de los cambios en la parte exterior de la herida mostrados en la figura 6. La pigmentación está limitada al sitio de la herida, acotada a sus bordes (panel c de la Figura 8).

Esta acumulación de pigmento es debida a la actividad enzimática de la fenoloxidasa que da como resultado la producción de melanina. En el presente trabajo no se utilizó ninguna técnica bioquímica o histoquímica para determinar la actividad de esta enzima, pero el producto de la misma es evidente en el material examinado. Datos no mostrados realizando observaciones con intervalos de una hora entre 0 y 24 horas, corroboran estos resultados.

Se ha reportado una formación defectuosa de la costra en heridas de mutantes de la fenoloxidasa, pero no existe en la literatura un trabajo histológico contundente que demuestre este defecto (Galko y Krasnow, 2004). Por esto, este trabajo es un precedente para futuras correlaciones entre los procesos de melanización, coagulación y cicatrización de heridas. A este nivel de resolución no se detectaron cambios estructurales ni formación de nuevo tejido muscular en ninguno de los dos tiempos de recuperación analizados. Sin embargo, se observó la probable aparición de tejido adiposo. Este tipo de tejido se caracteriza por tener gran número de vacuolas y presentar un citoplasma y núcleo restringidos a una pequeña área. La mayoría del espacio celular está ocupado por grandes gotas de grasa. Su estructura histológica es poligonal y alargada (Demerec, 1950). Para corroborar que se trata de este tipo de tejido habría que realizar una tinción específica (paneles b y b de las Figuras 7 y 8).

6.B.2- Estudios en cortes histológicos en resina.

En la imagen de la Figura 9, panel A se muestra una vista externa de una herida hecha a cero horas de recuperación. En ella las líneas rojas indican la zona en la que se realizó el corte, de tal forma que la línea marcada con el número 1 es la parte más anterior de la herida y la línea con el número 15 indica la parte más posterior. Este tipo de análisis seriado nos permitió tener un punto de referencia más preciso y poder seguir los cambios morfológicos en la parte interna del sitio de la herida a todo lo largo de la misma. Como se puede apreciar en los paneles del 1 al 15 el estudio va de extremo a extremo de la herida dado que en esos cortes se puede ver que hay discontinuidad en la cutícula, y presentan parte de la costra en la parte externa.

Si se observan los paneles 3 a 14 de esta figura se percibe un aumento y reducción progresivos del área dañada. Este mismo tipo de análisis lo realizamos en heridas con 24 horas de recuperación (Figura 10). Primero se obtuvieron vistas externas de la herida a 0 horas y 24 horas de recuperación (paneles A y B de la Figura 10).

Si comparamos los resultados obtenidos en la Figura 9 contra las imágenes de la figura 10, se puede observar un aumento en la pigmentación en el sitio de la herida a 24 horas de recuperación en comparación con las muestras a 0 horas de recuperación.

Los resultados obtenidos con las dos técnicas histológicas indican que se pueden identificar en ambas claramente los cambios ocurridos en la zona en donde se realizó la herida. En ambos casos se puede identificar la interrupción de la cutícula, así como la formación de una protuberancia (costra o tapón) en la parte externa del sitio de la herida, y una alteración de los tejidos musculares subyacentes.

Por otra parte se encontraron diferencias morfológicas durante el transcurso de la cicatrización. Algunos autores han identificado la formación de un tapón blando en larvas en las primeras horas de la cicatrización. Este se va oscureciendo progresivamente; es decir, se melaniza (Galko y Krasnow, 2004). Nosotros hemos corroborado este proceso de melanización en heridas realizadas en organismos adultos de *D. melanogaster*.

Es necesario realizar observaciones con el microscopio electrónico, pues es probable que las formaciones granulares observadas en la costra correspondan a restos de células cristal que han liberado su contenido citoplásmico. Esto se ha observado en cultivo. A medida que transcurre el tiempo estas células probablemente se lisan y desaparecen de las costras con melanización avanzada.

Con este método histológico se observaron extensiones de las fibras musculares indicadas con flechas en los paneles 3 y 7 de la Figura 10. Dichas extensiones solo se observaron a 24 horas de recuperación de la herida. Estas estructuras no fueron identificadas en los cortes de material embebido en parafina, probablemente por el hecho de que el grosor de los cortes de las muestras embebidas en parafina es mucho mayor y el conjunto de fibras oculta la observación de estas extensiones.

El epitelio que subyace a la parte interna de la cutícula no se pudo observar con esta técnica histológica; por consiguiente no podemos afirmar, hasta el momento, que la etapa de reepitelización ocurre en organismos adultos. Un hecho claro es que si

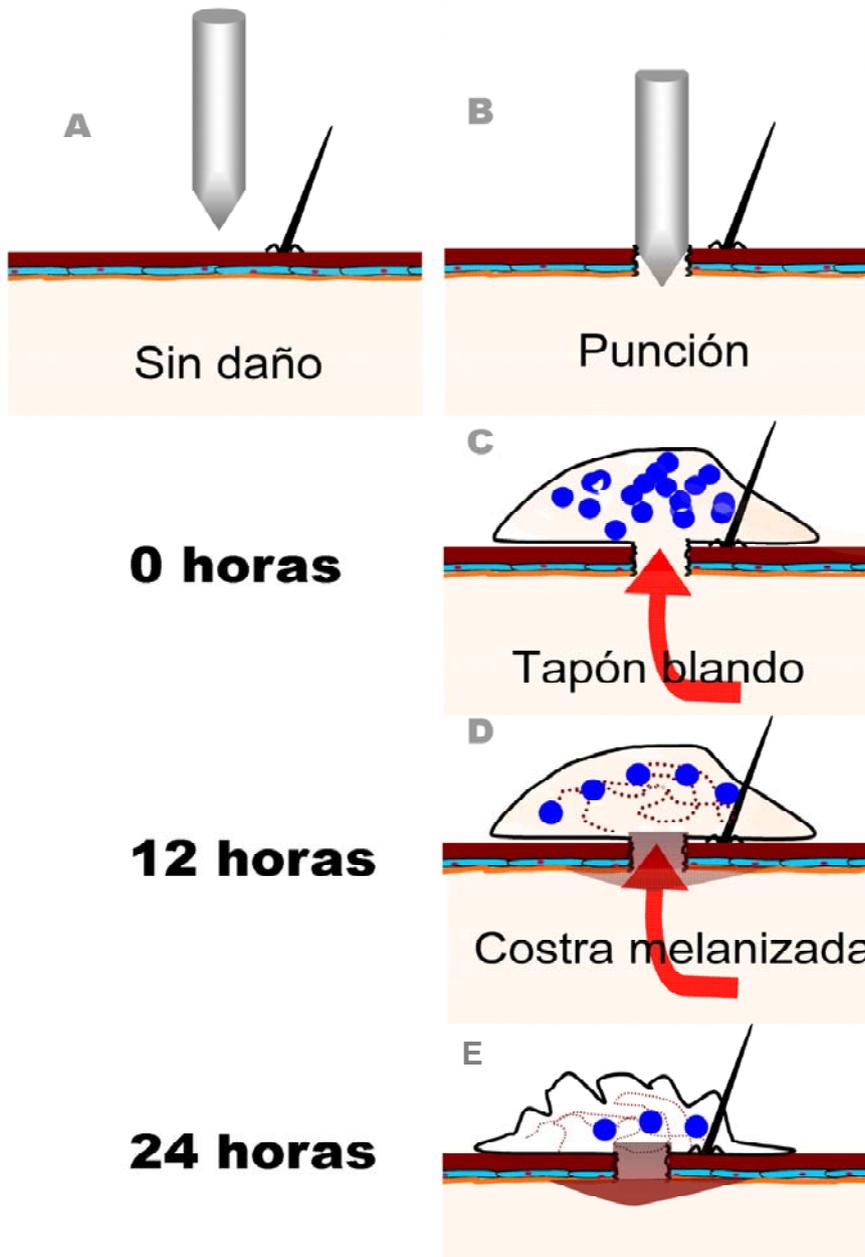
comparamos esta etapa con la reepitelización descrita en heridas realizadas en larvas de tercer estadio encontramos diferencias tanto en su aspecto morfológico como en la temporalidad, ya que la reepitelización en larvas ocurre a las 60 horas de haberse realizado la lesión y es total, así como la regeneración completa de todos los componentes tegumentarios (Galko y Krasnow, 2004). Sin embargo, en nuestro estudio, a las 168 horas no se observaron cambios como los descritos en larvas (Figura 11). Esencialmente, la cicatriz es semejante a las examinadas a 24 horas de recuperación. Esto sugiere la posibilidad de que la reepitelización no ocurre en adultos, a diferencia de la cicatrización observada en larvas y embriones.

6.C- Modelo del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*.

A continuación proponemos un modelo que describe las etapas más evidentes observadas durante el proceso de cicatrización de heridas en adultos de *D. melanogaster*.

- Recién hecha la punción se rompe la continuidad de la cutícula, paneles A y B del esquema 2.
- Salida de la hemolinfa y formación de un tapón blando en el sitio de la herida. La apariencia del tapón es cristalina y con inclusiones granulosas (probablemente células cristal y plasmotocitos; Panel C del esquema 2). Este tapón bloquea en primera instancia la pérdida de hemolinfa. En el presente trabajo probamos, por medio de difusión de dextrán-rodamina, que este tapón bloquea la salida al exterior de hemolinfa, pero la hemolinfa fluye libremente al interior de la costra durante 24 horas. La falta de pigmentación inicial indica que aunque hay un proceso de coagulación al principio seguido de un proceso de melanización.
- Acumulación progresiva de pigmento (probablemente melanina) en el sitio de la herida. Esto ocurre a partir de las 12 horas de recuperación.
- A las 24 horas posteriores a la punción hay una reducción de las formaciones granulosas y se evidencia un cambio gradual de la forma de la costra. Aunado a este cambio de forma de la costra se observa un gran cúmulo de pigmento en la parte interna del sitio de la herida; ver panel E del esquema 2.

El cúmulo de células y/o materiales de secreción que conforman la costra, no son del todo degradadas y permanecen por un periodo mayor de lo que se ha descrito en larvas (Galko y Krasnow, 2004; Ramet et al., 2002). A este nivel de análisis no detectamos cambios en los epitelios del borde de la herida, por lo que no se incluyen en este modelo. De no existir la reepitelización, significaría un cambio importante con respecto a la cicatrización en embriones y larvas.



Esquema 2. Modelo del proceso de cicatrización de heridas realizadas en el tórax de organismos adultos de *D. melanogaster*.

Con base en los resultados obtenidos se pueden describir aspectos temporales del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*:

Se observa la formación de un tapón desde el momento de la punción a 0 horas. Dicho tapón tiene una apariencia homogénea, y contiene elementos granulares en la parte interna. (cuerpos granulares en violeta).

A partir de las 12 horas de recuperación de la herida se observa el inicio de la melanización del tapón (en café, figura 6).

A medida que aumenta el tiempo de recuperación la apariencia de la costra cambia, y se hace irregular y rugosa.

Por otra parte el estudio de difusión y acumulación de dextrán-rodamina demostró que existe comunicación entre la hemolinfa y el interior del tapón ó costra antes de las primeras 24 horas de recuperación. Esto implica que no se ha sellado la herida en la base de la cutícula en las primeras 24 horas.

Otro punto que está fuera del modelo propuesto son los cambios que ocurren en los demás tipos tisulares dañados. Lo que se observó es que a las 24 horas de recuperación aparecen extensiones de fibras musculares, como se pueden ver en el panel 3 de la Figura 10. Dichas estructuras tal vez forman parte de un proceso de regeneración muscular. Para comprobar tal aseveración habría que hacer una caracterización de los cambios morfológicos de las fibras musculares durante todo el proceso de cicatrización en intervalos más cortos y largos de tiempo, utilizando microscopía electrónica.

Como se ha discutido anteriormente también habría que realizar una tinción específica para poder estudiar los cambios morfológicos que ocurren con el tejido adiposo subyacente al sitio de la herida, y caracterizar los cambios que ocurren en este tejido. Esto es de importancia por el hecho de que existen autores que consideran que en este tejido se producen enzimas que forman parte de la cascada de melanización (Meister y Lagueux, 2003) y justificaría su aparición y presencia en el sitio de la herida.

7- CONCLUSIONES

En conclusión, hemos demostrado que la cicatrización de heridas en adultos es un proceso complejo de varias etapas, compuesto al menos de la coagulación y la melanización. La etapa de reepitelización no es del todo clara, debido al bajo grosor del epitelio subcuticular descrita para los sistemas tegumentarios de larvas y embriones (Galko y Krasnow, 2004; Ramet et al., 2002). Este epitelio subyacente a la cutícula no es perceptible fácilmente con los aumentos al microscopio fotónico utilizado en este trabajo. Por otro lado, el hecho de no haber encontrado cambios en los epitelios del borde de la herida, podría ser evidencia de que esta etapa es distinta en adultos, es decir, que varía dependiendo de la etapa de desarrollo en el que se estudie la cicatrización. Para comparar con el proceso de cicatrización en larvas es necesario tomar en cuenta dos aspectos:

- La elevada proliferación celular que se da en las etapas larvarias podría acelerar el tiempo necesario para la reparación de la herida en comparación con el tiempo de cicatrización en organismos adultos.
- Las diferencias estructurales de las cutículas que conforman los sistemas tegumentarios de los embriones, larvas y organismos adultos. La formación de un exoesqueleto distinto en los organismos adultos confiere mayor rigidez al tegumento y podría, por consiguiente limitar el desplazamiento de los epitelios subyacentes a la cutícula. Como ya no mudan más el exoesqueleto, la capacidad de regenerar todo el tegumento podría no existir.

En consecuencia, el proceso de cicatrización en organismos adultos de *D. melanogaster* parece depender en gran medida de las interacciones de las etapas de coagulación y melanización. Además, es posible que la recapitulación de los genes involucrados en los procesos embrionarios durante el proceso de cicatrización y cerrado dorsal (Noselli, 1998; Martin y Parkhurst, 2004), esté limitada y/o alterada en los adultos.

8- PERSPECTIVAS

- Los resultados obtenidos durante el presente trabajo permiten establecer un primer acercamiento a los procesos de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*. Para continuar con este trabajo será importante identificar y estudiar, por medio de microscopía electrónica, los diferentes tipos celulares que están participando durante la coagulación y la melanización de la costra. Otro aspecto que se debe aclarar, por medio de técnicas histoquímicas, es la presencia de los componentes de la melanina y verificar si la acumulación de pigmento en el sitio de la herida, descrito en este trabajo, corresponde efectivamente a melanina.
- Otro tipo de abordaje permitiría estudiar también los mecanismos moleculares que se dan durante el proceso de cicatrización tales como los componentes de la cascada proteolítica que se activan durante la coagulación. En *D. melanogaster*, se pueden utilizar mutaciones en genes involucrados ó que se sospecha están involucrados, y ver las consecuencias fenotípicas. Por ejemplo, algunas enzimas, como la ya descrita fenoloxidasa. Además, faltaría hacer el análisis histológico de heridas realizadas en tejidos mutantes para las vías de señalización involucradas en la cicatrización realizando análisis histológicos en fondos mutantes.
- Un punto que no ha sido dilucidado a tiempos largos en el presente trabajo es la etapa de reepitelización. Para obtener un modelo más detallado del proceso de cicatrización habría que incluir una descripción más puntual de los cambios morfológicos de los tipos tisulares estudiados involucrados en reparación de heridas: tejido adiposo, muscular y tegumento.
- Con todo lo anterior, el presente trabajo pretende establecer las bases para la completa caracterización del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster*, para así poder establecer los controles adecuados con los cuales poder comparar, categorizar y/o contrastar estudios futuros bajo diferentes condiciones y fondos genéticos.

- Estudiar aspectos moleculares del proceso de cicatrización en adultos de *D. melanogaster* abre la posibilidad de realizar una búsqueda de los componentes homólogos (genes y/o moléculas) en otros modelos como cultivos celulares y sistemas embrionarios de vertebrados. En la medida en que se homologuen estos mecanismos de regulación, se podrían escalar las investigaciones a sistemas biológicos más complejos como la cicatrización en vertebrados. Las implicaciones clínicas de lo anterior son de suma importancia, ya que no se conocen por completo los mecanismos de regulación génica de la cicatrización en humanos. Este conocimiento podría servir para, eventualmente, mejorar las condiciones en que se lleva a cabo este proceso complejo.
- El estudio de la cicatrización en adultos de *D. melanogaster* también despliega la posibilidad de entender los mecanismos celulares y moleculares durante la respuesta a stress mecánico y químico, dado que en este tipo de preparaciones experimentales se pueden caracterizar, realizando heridas en organismos sensibilizados genéticamente y en condiciones fisiológicas diversas, los mecanismos de regulación molecular que están presentes durante cualquier agresión mecánica o química que induzca la respuesta al stress.
- El estudio de la cicatrización en *D. melanogaster* también ha sido utilizado en investigaciones en las que el objetivo es caracterizar moléculas que participan en la respuesta inmunológica, homólogas a moléculas de vertebrados (Redd et al., 2004; Stramer et al., 2005). Hasta hoy, dichos estudios no son concluyentes ya que sólo se han descrito los eventos en etapas larvarias de *D. melanogaster*, por lo que es importante determinar si estos mismos mecanismos de defensa existen en la etapa adulta (Galko y Krasnow, 2004; Ramet et al., 2002).

- El proceso de reepitelización en *D. melanogaster* en organismos adultos no es del todo clara, por que lo consideramos necesario estudiar el proceso de cicatrización a tiempos más largos ya que al parecer existen diferencias significativas tanto en la morfología, como en la temporalidad de la etapa de reepitelización de larvas y adultos.

9- REFERENCIAS

1. Bancroft, D., Stevens, A., y Turner., D. (1996). Theory and Practice of Histological Techniques, 4^a. ed (New York: Churchill Livingstone); 99-112.
2. Bidla, G., Lindgren, M., Theopold U., y Dushay M. S. (2005). Hemolymph coagulation and phenoloxidase in *Drosophila* larvae. Developmental & Comparative Immunology 29, 669-679.
3. Bement, W. M., Forscher, P., y Mooseker, M. S. (1993). A novel cytoskeletal structure involved in purse string wound closure and cell polarity maintenance. J Cell Biol 121, 565-578.
4. Bosch, M., Serras, F., Martin-Blanco, E., y Baguna, J. (2005). JNK signaling pathway required for wound healing in regenerating *Drosophila* wing imaginal discs. Dev Biol 280, 73-86.
5. Clark, R. A., Ashcroft, G. S., Spencer, M. J., Larjava, H., y Ferguson, M. W. (1996). Re-epithelialization of normal human excisional wounds is associated with a switch from alpha v beta 5 to alpha v beta 6 integrins. Br J Dermatol 135, 46-51.
6. Clark, R. A., McCoy, G. A., Folkvord, J. M., y McPherson, J. M. (1997). TGF-beta 1 stimulates cultured human fibroblasts to proliferate and produce tissue-like fibroplasia: a fibronectin matrix-dependent event. J Cell Physiol 170, 69-80.
7. Clark, R. A. F. (1999). The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair, 2nd Edition (New York: Klumer); 3-50.
8. Demerec, M. (1950). Biology of *Drosophila*, Facsimile Edition (New York: Cold Sping Harbor); 420-457.
9. Farooqui, R., y Fenteany, G. (2005). Multiple rows of cells behind an epithelial wound edge extend cryptic lamellipodia to collectively drive cell-sheet movement. J Cell Sci 118, 51-63.
10. Galko, M. J., y Krasnow, M. A. (2004). Cellular and genetic analysis of wound healing in *Drosophila* larvae. Plos Biol 2, E239.
11. Glise, B., Bourbon, H., y Noselli, S. (1995). hemiptSerous encodes a novel *Drosophila* MAP kinase kinase, required for epithelial cell sheet movement. Cell 83, 451-461.
12. Harden, N. (2002). Signaling pathways directing the movement and fusion of epithelial sheets: lessons from dorsal closure in *Drosophila*. Differentiation 70, 181-203.

13. Harden, N. (2005). Cell biology. Of grainy heads and broken skins. *Science* 308, 364-365.
14. Jacinto, A., Martinez-Arias, A., y Martin, P. (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol* 3, E117-123.
15. Jiravanichpaisal, P., Lee, B. L., y Soderhall, K. (2006). Cell-mediated immunity in arthropods: hematopoiesis, coagulation, melanization and opsonization. *Immunobiology* 211, 213-236.
16. Karlsson, C., Korayem, A. M., Scherfer, C., Loseva, O., Dushay, M. S., y Theopold, U. (2004). Proteomic analysis of the *Drosophila* larval hemolymph clot. *J Biol Chem* 279, 52033-52041.
17. Lavine, M. D., y Strand, M. R. (2002). Insect hemocytes and their role in immunity. *Insect Biochem Mol Biol* 32, 1295-1309.
18. Martin, P. (1997). Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276, 75-81.
19. Martin, P., y Parkhurst, S. M. (2004). Parallels between tissue repair and embryo morphogenesis. *Development* 131, 3021-3034.
20. Martin-Blanco, E., y Knust, E. (2001). Epithelial morphogenesis: filopodia at work. *Curr Biol* 11, R28-31.
21. Meister, M. (2004). Blood cells of *Drosophila*: cell lineages and role in host defence. *Curr Opin Immunol* 16, 10-15.
22. Meister, M., y Lagueux, M. (2003). *Drosophila* blood cells. *Cell Microbiol* 5, 573-580.
23. Minakhina, S., y Steward, R. (2006). Melanotic mutants in *Drosophila*: pathways and phenotypes. *Genetics* 174, 253-263.
24. Noselli, S. (1998). JNK signaling and morphogenesis in *Drosophila*. *Trends Genet* 14, 33-38.
25. Noselli, S., y Agnes, F. (1999). Roles of the JNK signaling pathway in *Drosophila* morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 9, 466-472.
26. Ramet, M., Lanot, R., Zachary, D., y Manfruelli, P. (2002). JNK signaling pathway is required for efficient wound healing in *Drosophila*. *Dev Biol* 241, 145-156.
27. Redd, M. J., Cooper, L., Wood, W., Stramer, B., y Martin, P. (2004). Wound healing and inflammation: embryos reveal the way to perfect repair. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359, 777-784.

28. Ribeiro, C., y Brehelin, M. (2006). Insect haemocytes: what type of cell is that? *J Insect Physiol* 52, 417-429.
29. Scherfer, C., Karlsson, C., Loseva, O., Bidla, G., Goto, A., Havemann, J., Dushay, M. S., y Theopold, U. (2004). Isolation and characterization of hemolymph clotting factors in *Drosophila melanogaster* by a pullout method. *Curr Biol* 14, 625-629.
30. Shrestha, R., y Gateff, E. (1982). Ultrastructure and cytochemistry of the cell types in the larval hematopoietic organs and hemolymph of *Drosophila melanogaster*. *Development, Growth and Differentiation* 24, 65-82.
31. Stramer, B., Wood, W., Galko, M. J., Redd, M. J., Jacinto, A., Parkhurst, S. M., y Martin, P. (2005). Live imaging of wound inflammation in *Drosophila* embryos reveals key roles for small GTPases during in vivo cell migration. *J Cell Biol* 168, 567-573.
32. Sugumaran, M. (2002). Comparative biochemistry of eumelanogenesis and the protective roles of phenoloxidase and melanin in insects. *Pigment Cell Res* 15, 2-9.
33. Ting, S. B., Caddy, J., Hislop, N., Wilanowski, T., Auden, A., Zhao, L. L., Ellis, S., Kaur, P., Uchida, Y., Holleran, W. M., et al. (2005). A homolog of *Drosophila* grainy head is essential for epidermal integrity in mice. *Science* 308, 411-413.