
ACCION DE LA FITOHEMAGLUTININA EN LA REGENERACION DE LA PLANARIA

Dugesia dorotocephala

BIÓL. PAULA ROMO RUIZ, M. EN C. A. RODRIGO DÍAZ ACOSTA, DR. ALFREDO LAGUARDIA-FIGUERAS
Laboratorio de Genética Animal. Depto. de Biología Experimental Instituto de Biología, UNAM.

INTRODUCCIÓN

La fitohemaglutinina, también denominada Lectina y representada por las siglas P. H. A.. (iniciales del nombre en el idioma inglés), es una mucoproteína parcialmente purificada. Se la encuentra en la mayoría de los vegetales, pero se aísla, principalmente, de las leguminosas como *Phaseolus vulgaris* L., utilizando una modificación del método de Rigas y Osgood (1955). La P. H. A., se ha extraído de 420 especies de leguminosas, y se localiza en todo el vegetal pero en mayor proporción en las semillas.

Por otra parte, esta sustancia ha sido estudiada, tanto en criptógamas como en fanerógamas, encontrándose en una proporción mayor; en la Clase Basidiomicetos (Dubovoy, 1966).

La propiedad de la P. H. A., que la hace importante en citología, es la de aglutinar a los eritrocitos o glóbulos rojos de ciertos animales, incluyendo al hombre, facilitando la separación de los leucocitos (Osgood y Brooke, 1955).

Bird (1963), hizo una diferenciación de los eritrocitos de algunas especies de animales, utilizando extracto de P. H. A. de diferentes semillas, de acuerdo con su afinidad a los diversos tipos de esta sustancia.

Otra propiedad muy importante de la P. H. A., es la de presentar una acción mitogénica. Esta propiedad ha sido descubierta en la P. H. A., extraída de *Phaseolus vulgaris*, la cual ha sido utilizada en diferentes investigaciones, algunas de las cuales han sido realizadas en el cultivo de tejidos humanos.

Zeck (1966), ha empleado la P. H. A., en tres ciliados diferentes, *Bursaris truncatella*, *Stentor coeruleus* y *Paramecium* en donde obtuvo una reducción del período intermitótico.

Agrell (1966a, 1966b), trabajando en *Acanthamoeba*, observó que, añadiendo P.H.A., al medio, se producía un aumento en la multiplicación celular durante más de cinco generaciones. No obstante, al agregar una solución salina, este aumento se observó nuevamente sin el empleo de P. H. A. Sin embargo, este autor considera que la acción mitogénica pudo haber sido debida al resultado indirecto de la P. H. A.

En diversas ocasiones, se ha sugerido que la acción de la P. H. A., es indirecta, debido a que al eliminar los eritrocitos se facilitaría la división de los leucocitos. No obstante, Nowell (1960) demostró que la P. H. A. ejerce su acción aún en los cultivos que han sido agitados con el fin de mantener la sangre completa con todos los elementos figurados suspendidos.

Los estudios realizados por Nowell (1960), sugieren que la acción de la P. H. A., sobre los leucocitos, no estimula directamente la mitosis, sino que propicia la transformación de los monocitos y linfocitos, llevándolos a un estado en el cual son capaces de dividirse, mediante su acción sobre la superficie del leucocito y la posible liberación de sustancias intracelulares. Por otra parte, las células de la médula ósea y los blastos de la leucemia, mostraron un aumento en la actividad mitótica, en pocas horas, bajo las mismas condiciones de cultivo "in vitro". En el caso de las células de la médula ósea, cuya división es muy frecuente, se ha visto que responder a la estimulación en pocas horas. Este hecho no se observa en otras células, por ejemplo, en las del hígado, las cuales no tienen como función primordial la de dividirse, ya que este tipo de células responder solamente después de un período de latencia largo.

Naspitz (1968), utilizó la P. H. A. en cultivos "in vitro" de linfocitos a diferentes concentraciones, observando que durante períodos cortos de 35 días, las concentraciones al 0.1, 0.3 y 0.6 tienen una acción semejante; pero en períodos largos, a concentraciones de P. H. A., al 0.1 v 0.3, el mantenimiento de los linfocitos era más eficaz.

La actividad de la P. H. A., no radica en la liberación de los leucocitos —como células supuestamente preparadas para iniciar la división— mediante la aglutinación de los eritrocitos. Su propiedad mitogénica parece

involucrar un proceso de conversión que modula en las células la "desdiferenciación" necesaria para iniciar la división. Este proceso de conversión requiere de 24 a 48 hs.

Nowell (1961), demostró que las mitosis del cultivo de sangre pueden ser inhibidas, en forma directa, bajo la acción de la prednisolona a una concentración de $0.0002=10$ ug/ml, reduciéndose el índice mitótico $\frac{1}{4}$ de su valor en el grupo control. Parece ser que la prednisolona como sustancia represora de mitosis, ejerce su influencia sobre el proceso de "desdiferenciación" producido por la P. H. A., pero en sentido opuesto.

Los estudios cuantitativos de MacKinney, Stohman y Brecher (1961) y de Elves y Wilkinson (1962), indican que los linfocitos y posiblemente los monocitos son las células afectadas por la P. H. A., mediante su transformación a un estado en el cual son capaces de dividirse. Las células *polimorfonucleadas* no parecen formar parte de la población celular que inicia la división, posteriormente a la acción de la P. H. A. Por esta razón, Cooper y Hirschhorn (1962), eliminan a las células *polimorfonucleares*, utilizando un potente magneto después de que éstas células han ingerido partículas de hierro. MacIntyre y Ebaugh (1962), y Mellman, *et al.* (1962), indican que las células *polimorfonucleares* mueren durante las primeras 48 hs, sin conceder importancia a la separación de dichas células, debido a la eliminación de las mismas mediante la prolongación del cultivo más allá de 48 hs. Sin embargo, lo anterior no es válido cuando la proporción de leucocitos *polimorfonucleares* es muy alta, pues el número de linfocitos y posiblemente monocitos, capaces de dividirse, disminuye en proporción y el cultivo puede ser pobre en mitosis.

Los estudios de MacKinney, Stohman y Brecher (1961), así como los de Bender y Prescott (1962), han confirmado, por medio de la autoradiografía que las células que se dividen eventualmente, posteriormente a la acción de la P. H. A., no son aquellas que se hallaban en la fase G2 —como leucocitos circulantes— en la sangre. La incorporación de la timidina tritiada, se produjo, únicamente, después del proceso de conversión "in vitro".

De acuerdo a lo anterior, se consideró importante investigar la acción de la P.H.A. en la regeneración de la planaria *Dugesia dorocephala*, con el fin de conocer sus efectos sobre los neoblastos del blastema de estos animales.

MATERIALES Y MÉTODOS

Las planarias examinadas pertenecen a la especie *Dugesia dorocephala*. Fueron colectadas en el Jardín Botánico Exterior de la Universidad Nacional Autónoma de México y mantenidas en el laboratorio en recipientes que contenían agua electropura, la cual fue renovada cada tercer día. Se les alimentó dos veces por semana, con hígado de res licuado.

El diseño del trabajo comprende, básicamente, dos grupos experimentales: el primero, sin fitohemaglutinina (P. H. A.) y el segundo, con P. H. A. En este último, se utilizó la sustancia en solución acuosa (agua purificada) al 8%, para lo cual se seleccionaron planarias cuya longitud osciló entre 1.5 y 2.0 cm. Se cortaron transversalmente en la zona comprendida entre la faringe y las aurículas, ya que ésta es de fácil localización y, además, presenta una mayor superficie para la regeneración.

A partir del momento de la separación de los fragmentos cortados, el animal empieza a regenerar la parte mutilada. Al cabo de cierto tiempo, se inicia la formación de una cicatriz característica en la zona del corte, denominada *blastema*, este tejido está formado por células indiferenciadas o neoblastos, las cuales se encuentran distribuidas en todo el parénquima de la planaria y emigran hacia el sitio del corte. Los blastemas utilizados, se forman a expensas de los fragmentos anteriores que dan origen a la región posterior del animal.

La División mitótica de los neoblastos del blastema, fue detenida con colchicina en la etapa denominada metafase. La interrupción de la cariocinesis en la fase señalada, se verificó en diferentes horas a partir del momento en el que se inició la regeneración posterior al corte, estos tiempos fueron: 35.15 hs, 38.0 hs, 40.0 hs, 43.0 hs, 46.30 hs, 50.0 hs, y 55.0 hs, para el grupo control (sin P. H. A.); en tanto que los tiempos para el grupo tratado fueron a 5.0 hs, 15.0 hs, 19.30 hs, 24.0 hs, 38.0 hs, y 45.0 hs, a partir del momento de la disección durante las cuales las planarias permanecieron en la solución de P. H. A. M (Difco Laboratories, Detroit Michigan .0528-56).

Una vez terminado el período de regeneración a cuyo nivel se desea analizar el blastema, las planarias fueron transferidas a una solución acuosa de colchicina al 1% durante tres horas, con el fin de inhibir la formación del huso acromático. Posteriormente, se fijó el material en alcohol acético (3:1) durante un tiempo no menor de 20 min. En este momento, se separó el blastema del resto del animal. Una vez efectuado esto, se quitó el excedente del material y se prosiguió a hidrolizar el material en ácido clorhídrico normal, durante 15 min. a temperatura ambiente.

La tinción se efectuó utilizando las soluciones I y II a base de aceto-orceína verde Janus B. obteniéndose buenos resultados. Para una mejor dispersión del material y facilitar el conteo de las células, se realizó una presión ("squash") sobre la preparación, a la cual se le había añadido, previamente, una gota de ácido, acético al 45%. Una vez que se hubo deshidratado y montado en bálsamo del Canadá, fueron seleccionadas las mejores preparaciones, tomando en cuenta la separación de las células, así como su colocación en un solo plano, para facilitar su conteo.

Se contaron aproximadamente 5 000 células en cada uno de los períodos de formación del blastema, dentro de las cuales se observó un porcentaje de células en metafase, y de este modo se obtuvo un índice mitótico para cada uno de los períodos de observación.

El conteo se efectuó muestreando las preparaciones por medio de líneas imaginarias paralelas, en sentido horizontal, con intervalos de cinco campos entre sí, recorriendo las preparaciones de izquierda a derecha.

RESULTADOS

Los datos obtenidos en el experimento se presentan en el cuadro 1. Para cada hora de observación se calculó el índice de metafases; el cuadro 2 con tiene estos índices expresados en relación a 1 000 células examinadas.

El análisis estadístico mostró que para el grupo control, en promedio, el período de observación en el cual el índice mitótico alcanzó su máximo incremento, correspondió a las 44.25+0.7 hs, en tanto que, para el grupo tratado, el índice mitótico máximo se observó a las 26.90+0.45 hs, la desviación estándar para el primer grupo fue de 6.11+0.40 hs, y para el segundo fue de 4.12+0.44 hs, el porcentaje 44.25 +0.44 hs. El porcentaje de variabilidad del fenómeno fue del 13.8% para el grupo control y del 15.3% para el grupo tratado.

Las discrepancias entre las frecuencias teóricas y las observadas, según la hipótesis de una distribución normal, no fueron estadísticamente significativas, obteniéndose valores para la prueba de la X^2 de 8.31 y de 4.66, ambas inferiores al límite crítico para el 5%. Las funciones que definen al fenómeno en ambos grupos están en la figura 1.

La aplicación de la prueba t-student, cuyo valor fue de 10.98, informa que existe una probabilidad muy alta, de 99%, de que ambos fenómenos discrepen notablemente. En otras palabras, desde el punto de vista estadístico, nos vemos obligados a rechazar la hipótesis nula y aceptar la hipótesis alterna que establece que el período de observación, donde se encuentra el mayor número de metafases representado por el promedio, no es el mismo en los dos grupos, por lo contrario se alejan notablemente.

Por otra parte, la P. H. A., influye en la frecuencia de metafases observadas, ya que mientras en el grupo control a las 44.2 hs, se observó un índice de 16.64, en el grupo tratado, a las 26.90 hs, se observó un índice de 53.83.

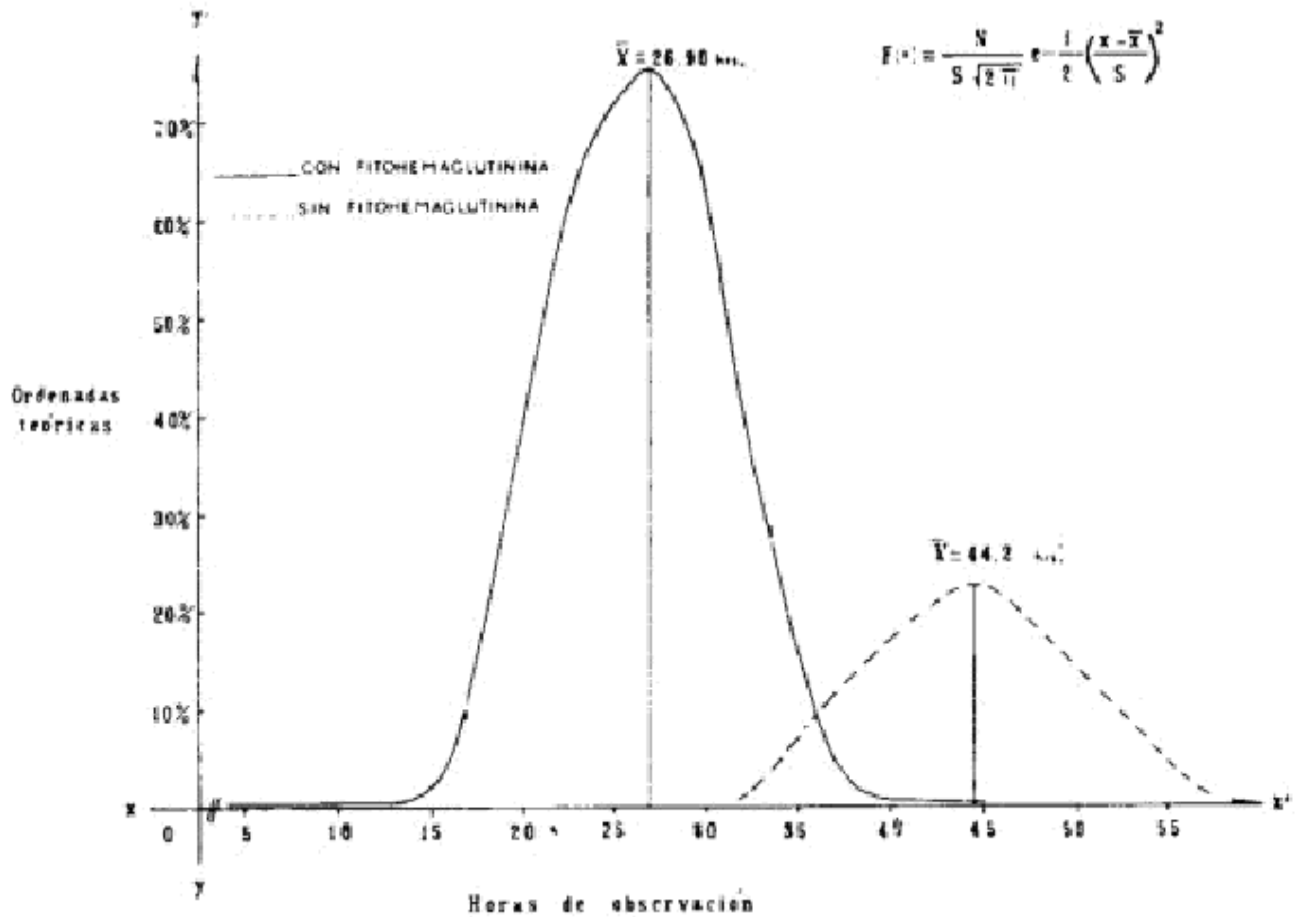


Fig. 1, Índice de metafases en los grupos control y tratado con respecto al tiempo.

En resumen, se observó una reducción de 17.35 hs en el tiempo de regeneración y un incremento en el índice mitótico de 37.19. Esto permite afirmar que la P. H. A., influye tanto en la reducción del tiempo como en la cantidad de mitosis que se obtienen.

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

El análisis estadístico ya expuesto, demuestra que la distribución de los índices mitóticos, observados en los diferentes tiempos de regeneración analizados, se distribuyen de acuerdo con la ecuación que expresa la función de la distribución normal. Por esto, las constantes biométricas utilizadas para la comparación de los resultados obtenidos, en los grupos experimentales con y sin P. H. A., son la media aritmética y la desviación estándar. En el caso del grupo control, en el cual no se utilizó P. H. A., el período donde se obtiene el máximo índice mitótico, fue de 44.15 hs, en tanto que, el mismo óptimo con P. H. A., fue de 26.54 hs. Comparando ambos resultados, vemos que existe un desplazamiento de la media aritmética del grupo tratado, que reduce en 17 hs el tiempo de regeneración.

El siguiente planteamiento estadístico, considera la significación de este desplazamiento en términos probabilísticos: ¿esta discrepancia de 17 hs es debida a fluctuaciones del muestreo o se origina en el efecto producido por la P. H. A.? La inferencia estadística concluye que la diferencia en ambos grupos no se puede justificar argumentando fluctuaciones en el muestreo, sino aceptando un efecto real de la P.H.A. La P. H. A., por tanto, reduce el tiempo de regeneración en la planaria *Dugesia dorotocephala*.

Por otra parte, existe un significativo grado de discrepancia en relación a la curtosis en ambas distribuciones, es decir, la P. H. A. además de influir en las células del blastema de la planaria, incrementa el número de mitosis.

La regeneración de la planaria queda incluida dentro de los fenómenos que son activados por la P. H. A.

RESUMEN

Se investigó la acción de la fitohemaglutinina (P. H. A.) sobre la regeneración de los neoblastos del blastema de la zona localizada entre la faringe y las aurículas de las planarias. La interpretación de los resultados obtenidos se basa en el análisis estadístico de los índices mitóticos.

Este análisis demuestra que la P. H. A., reduce en un 60% el tiempo de regeneración de la planaria e incrementa el número de mitosis. Este resultado incorpora a la planaria en el grupo de organismos en los que la P. H. A. ejerce un efecto mitogénico.

BIBLIOGRAFÍA

- AGRELL, I. P. S., 1966a. Phytohaemagglutinin as a mitotic stimulator on freelifving Amoebae. *Exp. Cell. Res.*, 42: 403-406.
- . 1966b The mitogenetic action of phosphate md phytohaemagglutinin of free living Amoeba. *Exp. Cell. Res.* 43: 691-694.
- ARKIN, H. & COLTON, R. R., 1962. *Tables for statisticians*. McGraw-Hill Book Company Inc., New York, 115.
- BENNAZZI, M., 1938. Ricerche sulla riproduzione delle planarie tricladi paludicole con particolare riguardo alla moltiplicazione asessuale. *Att. R. Acc. Naz. Lincei*, 6.
- . e Pochini, N., 1959. Alcune oseevazioni citologiche sulla planaria *Dedrocoelum lacteum*. *Boll. di Zool.* 26: 435-443.
- . 1966. Cariología della pianaria americana *Dugesia dorotocephala*. *Att. R. Acc. Naz. Lincei.* 40: 999-1005.
- . 1967. Nuovi dati sul differenziamento citologico e genetico di planarie delle isole tirrenche. *Att R. Acc. Naz. Lincei.* 42: 470-472.
- BIRD, G. W. G., 1953. Cold agglutinins in *Glycine soja*. *Current Sci.* 22: 273.
- BOYD, W. C, 1950. Hemagglutinating substances for human cells in various egyptian plants. *J. Immunol.* 65: 281.
- CAZAL, M. & LALAUURIE, M. 1952. Recherches sus quelques phytoagglutinins spécifiques des groupes sanguins AB0. *Acta Haemat.* 8: 73.
- COOPER, H. L. & HIRSCHHORN, K, 1962. Improvement in white cell culture including differential leukocyte separation. *Symposium on Blood-Bone Marrow Tissue Culture and Cell Separation.* *Blood* 20: 101 (Abstract).
- DUBOVOY, R. C. *et al.*, 1966. Investigación de fitohemaglutininas en algunas criptógamas. *An. Inst. Biol.* 37: 9-39.
- ELVES, M. W., & WILKINSON, J. F.. 1962. Effects of phytohemagglutinin on the morphology of cultured leucocytes. *Nature* 194: 1257-1259.
- GRASSÉ, P. P., 1938. *Traité de Zoologie.* Tome IV. Masson & Cie: 87-95.
- JENKINS, M. M., 1966. Note on stalk formation in cocoons of *Dugesia dorotocephala*. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* 85: 158-159.
- HIRSCHHORN, K., *et al.* 1963. Mitogenetic action of phytohemagglutinin. *The Lancet*, 2: 305-310.
- HOLLAND, P., 1965. Haemagglutinating precipitating and lymphocyte-stimulating factors of phytohaemagglutinin.

- Nature 207: 1397-1398.
- IOACHIN, L. H., 1966, Effects of phytohaemagglutinin "in vitro" on cells other than lymphocytes. Nature, 206: 919-921.
- MACKINNEY, R. G., *et al.*, 1961. Kinetics of leucocytes proliferation in vitro. Clinical Res. 9: 163.
- MCINTYRE, O. R., & EBAUGH, F. G. Jr., 1962. The effect of phytohemagglutinin on leukocyte cultures as measured by P incorporation in the DNA, RNA and acid soluble fractions. Blood, 19: 443-453.
- MELLMAN, W. J., *et al.* 1962. Studies on phytohemagglutinin-stimulated leukocyte cultures. Symposium on Blood-Bone Marrow Tissue Culture and Cell Separation, Blood 20: 103 (Abstract).
- NASPITZ, K. C., & RICHTER, M. 1968. The effects of varying concentration of phytohemagglutinating and conditions of incubation on the enhanced survival of human peripheral lymphocytes in vitro. Blood 32: 134-139.
- NOWEL, P. C., 1960. Phytohemagglutinin: an initiator of mitosis in cultures of normal human leukocytes, Cancer Res, 20: 462-466.
- . 1961. Inhibition of human leukocyte mitosis by prednisolone in vitro. Cancer Res, 21: 1518-1521.
- OSGOOD, E. E. & BROOKE, J. H., 1955. Continuous tissue culture of leukocytes from human leukemic bloods by applications of "gradient" principles. Blood 10: 1010-1022.
- RIGAS, D. A., & OSGOOD, E. E. 1955. Purification and properties of the phytohemagglutinin of *Phaseolus vulgaris*. J. Biol. Chem. 212: 507-509.
- SNEDECOR, W. G., 1950. Statistical methods. The Iowa State University Press. Ames Iowa. USA. 5th. Ed.
- VILLALOBOS-PIETRINI, R., 1965. Alteraciones inducidas por los rayos X en los cromosomas de las células meristémicas de la raíz. Bol. Soc. Bot. de México, 29: 178-183.
- ZECK, L., 1966. The effect of phytohemagglutinin on growth and DNA synthesis of some Protozoa. Exp. Cell. Res. 44: 312-320.

CUADRO 1 Resultados obtenidos en el experimento.

Sin fitohemaglutinina			Con fitohemaglutinina		
Horas de observación (1)	Número total de células (2)	Número de células en metafase (3)	Horas de observación (1)	Número total de células (2)	Número de células en metafase (3)
35.15	5082	29	5.00	5049	43
38.00	4824	55	15.00	3534	44
40.00	5029	68	19.30	3053	27
43.00	479	65	24.00	4356	110
46.30	5328	43	38.00	5886	53
50.00	2372	27	45.00	4975	103
55.00	5157	57			

CUADRO 2 Resultados obtenidos en experimento.

Sin fitohemaglutinina		Con fitohemaglutinina	
Horas de observación	IM	Horas de observación	IM
35.15	5.7	5.0	8.50
38.00	11.4	15.0	12.40
40.00	13.5	19.3	8.80
43.00	15.9	24.00	25.20
46.30	8.0	38.00	9.004
50.00	11.3	45.0	20.73
55.00	11.1		