

naq-B
R618 p
c.A

**PATRON DE PROLIFERACION EN LINEAS CELULARES
DETERMINADAS DEL EMBRION DE SANGUIJUELA**

T.T.
a julio

Tesis
Entregada a la
Universidad de Chile
en cumplimiento parcial de los requisitos
para optar al grado de
Magister en
Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular

Facultad de Ciencias

por
CARMEN RIVAS LARRAIN
1988



Director de Tesis: Dr. Juan Fernández Hidalgo

Facultad de Ciencias
Universidad de Chile

INFORME DE APROBACION

TESIS DE MAGISTER

Se informa al Consejo de la Escuela de Postgrado de la Facultad de Ciencias que la Tesis de Magister presentada por la candidata

Carmen Rivas Larrain

ha sido aprobada por la Comisión Informante de la Tesis como requisito de Tesis para optar al grado de Magister en Ciencias Biológicas con mención en Biología Celular, en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 22 de Octubre de 1988.

Director de Tesis

Dr. Juan Fernández


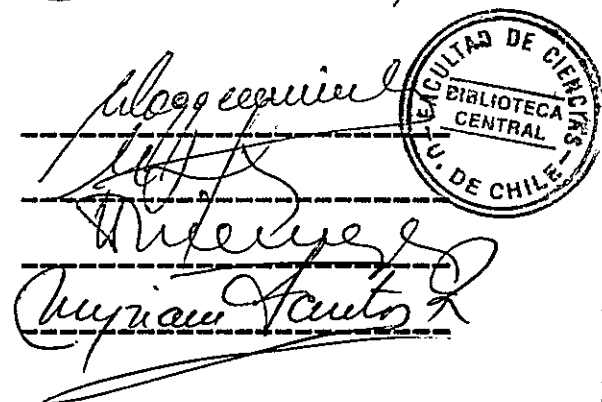
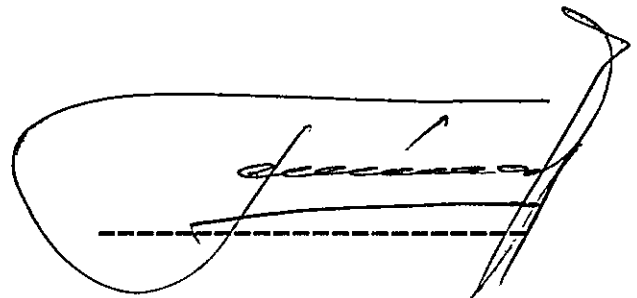
Comisión Informante de Tesis

Dr. Carlos Doggenweiler

Dra. Nelly Lafuente

Dr. Hermann Niemeyer

Dra. Myriam Santos



A la memoria de Rodrigo

A mis hijos



AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Dr. Juan Fernández la dirección de esta tesis. Todo lo que me enseñó, su constante apoyo y valiosa experiencia.

A mis compañeras y amigas de la Sección Biología Celular, especialmente a Nancy Olea por su generosa colaboración y a Verónica Téllez por su inapreciable ayuda.

A Claudio Cheix y Ana Valdés por su dedicada transcripción del manuscrito.

A Víctor Guzmán por su cooperación y ayuda en las salidas a terreno y la mantención del material en el laboratorio.

A Víctor Monasterio por su apoyo técnico en el microscopio de fluorescencia.

A Lilio Yañez por su apoyo técnico fotográfico.

INDICE DE MATERIAS

<i>A. - PAGINAS PRELIMINARES</i>	<i>Página</i>
<i>Página de título</i>	<i>i</i>
<i>Informe de aprobación</i>	<i>ii</i>
<i>Dedicatoria</i>	<i>iii</i>
<i>Agradecimientos</i>	<i>iv</i>
<i>Indice de materias</i>	<i>v</i>
<i>Lista de tablas</i>	<i>viii</i>
<i>Lista de figuras</i>	<i>x</i>
<i>Resumen</i>	<i>xiv</i>
<i>B. - PAGINAS DE TEXTO</i>	
<i>INTRODUCCION</i>	<i>1</i>
<i>MATERIALES Y METODOS</i>	<i>13</i>
<i>1. - Tratamiento con colchicina</i>	<i>13</i>
<i>2. - Preparación de montajes completos</i>	<i>14</i>
<i>3. - Ablación de células</i>	<i>15</i>
<i>4. - Recuento de células detenidas en metafase-c en embriones del estado 7</i>	<i>15</i>
<i>RESULTADOS</i>	<i>17</i>
<i>1. - Características proliferativas de las células del estado 7a (30-45 h de desarrollo)</i>	<i>20</i>

	<i>Página</i>
<i>2.- Características proliferativas de células del estado 7b (45-65 h de desarrollo)</i>	<i>24</i>
<i>3.- Características proliferativas de las células del estado 7c (65-80 h de desarrollo)</i>	<i>28</i>
<i>4.- Características proliferativas de las células de los estados 7a-c de embriones tratados con colchicina</i>	<i>29</i>
<i>4.1.- Teloblastos</i>	<i>29</i>
<i>4.2.- Cintillas no asociadas</i>	<i>29</i>
<i>4.3.- Bandas germinales</i>	<i>31</i>
<i>5.- Recuento de células interfásicas y en división en embriones del estado 7</i>	<i>39</i>
<i>6.- Recuentos celulares mediante planos de disección óptica</i>	<i>42</i>
<i>7.- Reversibilidad de la acción de la colchicina</i>	<i>42</i>
<i>8.- Papel de las interacciones celulares en la regulación de la proliferación celular</i>	<i>42</i>
<i>DISCUSION</i>	<i>50</i>
<i>1.- Teloblastos como células troncales</i>	<i>50</i>
<i>2.- Patrón de proliferación de los teloblastos y</i>	

<i>establecimiento del ensamblaje celular que da origen a un hemisegmento</i>	<i>Página</i> <i>52</i>
<i>3.- Patrón de proliferación de las células blásticas primarias</i>	<i>55</i>
<i>4.- Patrón de proliferación de las células blásticas de las bandas germinales</i>	<i>59</i>
<i>5.- Formulación de un modelo de proliferación celular en las líneas celulares determinadas del embrión de sanguijuela del estado 7 del desarrollo</i>	<i>61</i>
<i>REFERENCIAS</i>	<i>62</i>

LISTA DE TABLAS

	<i>Página</i>
<i>Tabla I</i> Número de células blásticas presentes en las cintillas no asociadas de embriones de los estados 7a-c	21
<i>Tabla II</i> Número total de células blásticas secundarias y sus descendientes presentes en los distintos sectores de las bandas germinales	27
<i>Tabla III</i> Número de células blásticas presentes en las cintillas no asociadas de embriones de los estados 7a-c tratados con colchicina	30
<i>Tabla IV</i> Número de células blásticas secundarias detenidas en metafase-c presentes en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones del estado 7 del desarrollo	35
<i>Tabla V</i> Porcentaje de células blásticas secundarias detenidas en metafase-c en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones del estado 7 del desarrollo	37

	<i>Página</i>
<i>Tabla VI Recuento bajo cámara lúcida de células de las bandas germinales y cintillas no asociadas de embriones del estado 7b</i>	43
<i>Tabla VII Número aproximado de células blásticas superficiales y profundas detenidas en metafase-c en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones del estado 7c</i>	44

LISTA DE FIGURAS

	Página
1. Representación esquemática de los primeros 8 estados del desarrollo de <u>Helobdella triserialis</u>	5
2. Esquema que muestra la disposición de las líneas celulares ecto y mesodérmicas del embrión de <u>H. triserialis</u>	9
3a y 3b. Microfotografía de fluorescencia que muestra dos teloblastos de un embrión del estado 7a del desarrollo	19
4a y 4b. Célula en metafase perteneciente a las bandas germinales de un embrión del estado 7b	19
5. Microfotografía de fluorescencia que muestra dos teloblastos y parte de sus cintillas no asociadas de un lado de un embrión del estado 7c	19
6. Microfotografía de fluorescencia que muestra un embrión del estado 7a del desarrollo	19

	<i>Página</i>
7. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra cinco de las diez cintillas ectodérmicas de un embrión del estado 7c</i>	23
8. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra un teloblasto N y su cintilla</i>	23
9. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra el teloplasma de uno de los teloblastos M y su cintilla m</i>	26
10. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra parte de la cintilla m adyacente a la banda germinal</i>	26
11. <i>Microfotografía de fluorescencia de un embrión completo del estado 7b</i>	26
12. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra el montaje completo de un embrión del estado 7c</i>	26
13. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra el teloplasma de un mesoteloblasto y algunas células de la cintilla m de un embrión del estado 7c cultivado en colchicina</i>	33

	<i>Página</i>
14. <i>Microfotografía de fluorescencia de otro teloblasto M y su cintilla de un embrión del estado 7c cultivado en colchicina</i>	33
15. <i>Microfotografía de fluorescencia de las cintillas o y p de un embrión del estado 7c cultivado en colchicina</i>	33
16. <i>Microfotografía de fluorescencia que muestra dos células en metafase-c pertenecientes a las cintillas qi y qd</i>	33
17. <i>Microfotografía de fluorescencia de un montaje completo de dos ectoteloblastos y sus cintillas de un embrión del estado 7b cultivado en colchicina</i>	35
18. <i>Reproducción bajo cámara lúcida de las cintillas no asociadas y bandas germinales contenidas en una sección de 1 μ de espesor perteneciente a un embrión del estado 7b</i>	41
19. <i>Microfotografía de fluorescencia del montaje completo de las bandas germinales de un embrión del estado</i>	

- 7c cultivado en colchicina* 46
20. *Microfotografía de fluorescencia que muestra las bandas germinales de un embrión del estado 7c cuyo teloblasto Mi fue destruido durante el estado 7b* 46
21. *Microfotografía de fluorescencia que muestra la banda germinal derecha de un embrión del estado 8 temprano operado durante el estado 6b* 46

RESUMEN

En el embrión de sanguijuela del estado 7 del desarrollo las líneas celulares ecto y mesodérmicas se distribuyen en forma bilateralmente simétrica a través de la superficie del hemisferio animal. Cada línea consiste de un teloblasto, una hilera o cintilla no asociada de células blásticas primarias de longitud relativamente constante y una cintilla asociada de células blásticas secundarias, terciarias, etc., que junto con la de otras líneas constituye las bandas germinales. Como los componentes de cada línea celular se distribuyen ordenadamente a lo largo del eje caudorostral del embrión, es posible explorar como cambia el ritmo divisional de una célula al trasladarse a lo largo del referido eje. Como hipótesis se planteó que: (1) las células del embrión de sanguijuela del estado 7 del desarrollo presentan distintos patrones de proliferación, los que dependen de la posición y relaciones de éstas células dentro de sus respectivas líneas y (2) existe un equilibrio entre la producción de células blásticas primarias y su incorporación a las bandas germinales, por lo que las cintillas no asociadas consisten de un número relativamente constante de células.

Con el propósito de estudiar algunos aspectos de la proliferación de las referidas células, se prepararon

montajes completos de embriones de la sanguijuela glossifoniado Helobdella triserialis, teñidos con el colorante fluorescente Hoescht 33258. De esta manera, se pudieron distinguir células interfásicas y mitóticas y se analizó la distribución de éstas en el estado 7 del desarrollo, tanto en embriones normales como tratados con colchicina. Además, se investigó si alteraciones en la relaciones de vecindad entre las células de diferentes cintillas podrían provocar modificaciones de su patrón de proliferación.

Se encontró que a 20 °C los teloblastos se dividen aproximadamente cada 2 h en forma asimétrica. Esto es, mientras el teloblasto queda anclado en su lugar de origen, el producto de sus divisiones, la célula blástica primaria, se aleja de ese lugar para posteriormente integrarse a la banda germinal. La células blásticas primarias mesodérmicas se dividen en espiral dentro de su cintilla y las ectodérmicas lo hacen en forma unidireccional, pero sólo después de incorporarse a las bandas germinales. Una vez formada la banda germinal, el número de células en las cintillas no asociadas se hace más o menos constante. En las cintillas integradas a las bandas germinales inicialmente se establece un gradiente de proliferación caudo-rostral, en que las células de la región caudal muestran una mayor velocidad de proliferación. Tal gradiente se mantiene en el transcurso

del estado 7. Sin embargo, en todos los sectores del embrión, parece haber una disminución de la fracción proliferativa, desde el inicio hasta el final del estado 7 del desarrollo. Los resultados obtenidos sugieren que: a) los distintos componentes de cada línea celular difieren en su velocidad de proliferación, b) la proliferación de los teloblastos está sincronizada con el ingreso de sus descendientes a las bandas germinales, c) la velocidad de proliferación de las células de las bandas germinales varía de acuerdo a su posición en el embrión y d) la fracción de células en proliferación en los distintos sectores de las bandas germinales varía en función de la edad del embrión.

Las variaciones en el patrón de proliferación de las distintas líneas celulares durante el estado 7 del desarrollo del embrión de sanguijuela podrían estar relacionadas causalmente con el proceso morfogénético.

INTRODUCCION

Las sanguijuelas son gusanos segmentados que forman la clase Hirudínea, dentro del tipo Anélidos, y por tanto su plan corporal presenta un alto grado de metamerismo. El huevo de la sanguijuela, al igual que el de otros anélidos, se desarrolla a través de una secuencia estereotipada de divisiones. Para mayor información consultar la revisión de Anderson (1973).

Las descripciones más completas de linaje celular han sido obtenidas en embriones de sanguijuelas de la familia Glossifoniidae, cuyos huevos son de mayor tamaño que el de la mayoría de los otros anélidos y exhiben desarrollo directo, es decir, no presentan un período larvario. El embrión de estas sanguijuelas es un excelente material para el estudio de algunos problemas importantes del desarrollo tales como desarrollo determinado, origen clonal de los tejidos y órganos embrionarios, metamerismo, patrones de proliferación celular, etc. Las células embrionarias de glossifonidos son de gran tamaño y por tanto pueden someterse a variadas manipulaciones experimentales tales como aislamiento, microinyección y destrucción. Por contener gran cantidad de vitelo, embriones completos o blastómeros aislados pueden cultivarse fácilmente en medios

salinos simples hasta alcanzar el estado deseado (Fernández y Olea, 1982). Un análisis de la embriogénesis de la sanguijuela puede encontrarse en la monografía de Schleip (1936) y en los trabajos de Fernández (1980), Fernández y Stent (1982) y Fernández y Olea (1982). Las divisiones celulares más tempranas han sido caracterizadas mediante la observación microscópica directa de embriones (Whitman, 1878; Schleip, 1936; Fernández 1980). Las características de los estados más tardíos del desarrollo, han sido analizadas en más detalle recientemente gracias a la disponibilidad de colorantes nucleares fluorescentes y de trazadores intracelulares de linaje celular (Weisblat *et al.*, 1978 y 1980; Jackson, 1984). Mediante la microinyección de blastómeros con moléculas trazadoras, tales como la peroxidasa de rábano (HRP) o con colorantes fluorescentes conjugados a moléculas transportadoras, ha sido posible marcar selectivamente líneas celulares embrionarias específicas y trazar su destino durante el desarrollo (Weisblat *et al.*, 1980b y 1984; Shankland y Weisblat, 1984). Los trazadores han sido útiles en la descripción de linajes celulares en los estados más tardíos del desarrollo, cuando es difícil visualizar con claridad las células embrionarias (Jackson, 1984).

El nemátodo Caenorhabditis elegans es uno de los pocos animales en el cual ha sido posible describir el linaje de la mayoría de las aproximadamente 950 células que

componen al adulto hermafrodita (Sulston *et al.*, 1983). Comparando este nemátodo con la sanguijuela se advierte que en esta última el número de células es tal vez dos órdenes de magnitud mayor (Stent y Weisblat, 1985). Sin embargo, el análisis de linaje celular en la sanguijuela puede ser simplificado tomando en cuenta que el cuerpo de este animal está compuesto de 32 segmentos, bilateralmente simétricos y similares entre sí, más un prostomio no segmentado. Por tanto, el conocimiento de como se forman algunos de los segmentos corporales puede ser suficiente. En otros animales compuestos de segmentos muy distintos, como en insectos, la situación es más compleja.

En un trabajo reciente sobre desarrollo embrionario de sanguijuelas glossifonidas, Fernández (1980), ha propuesto una tabla de desarrollo y una nomenclatura para designar los diferentes tipos de células embrionarias. Este sistema de notación puede también ser utilizado en otros glossifonidos tales como *Helobdella triserialis* (Weisblat *et al.*, 1980 y Fig. 1).

El huevo indiviso (estado 1) experimenta una serie de divisiones estereotipadas que dan origen a cinco blastómeros voluminosos y algunos más pequeños (estado 4). Los voluminosos son las células SNOFG, precursora del ectodermo, las células SM, precursoras del mesodermo, y las células A, B y C, precursoras del endodermo. Las células pequeñas constituyen "el sombrero de micrómeros", que da

Figura 1. Representación esquemática de los 8 primeros estados del desarrollo del glossifoniido Helobdella triserialis. Los esquemas tienen la misma escala y corresponden a vistas dorsales o ventrales, según se indica, y los lados izquierdo y derecho del embrión corresponden a los lados izquierdo y derecho de las figuras respectivas. El diámetro del huevo indiviso (estado 1) es de 350-400 μm . Para mayores detalles consultar el texto (Reproducido de Weisblat et al., 1980a).

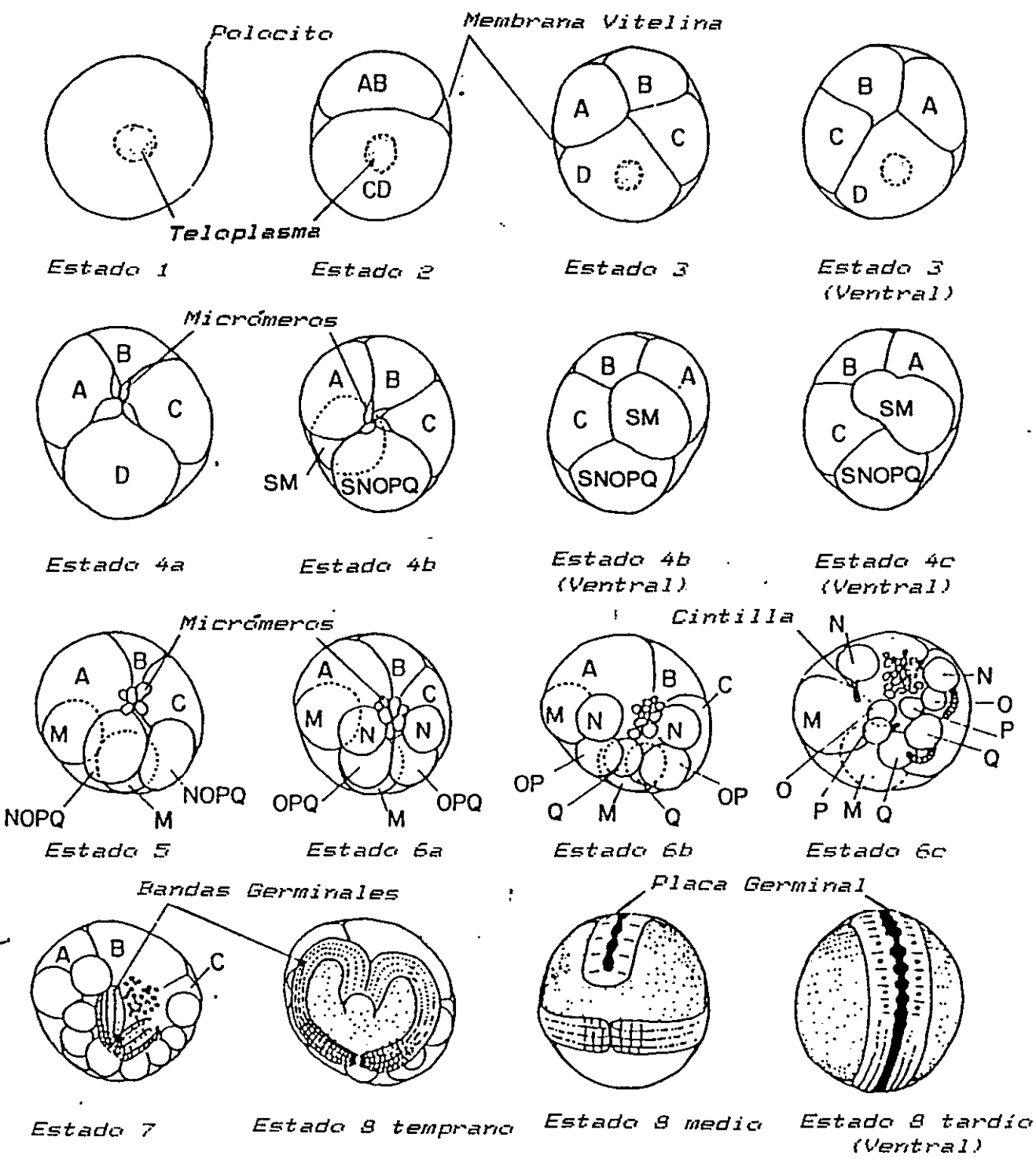


Figura 1

origen al prostomio. Durante el estado 5 la célula SM se divide en el par de mesoteloblastos Mi (izquierdo) y Md (derecho), la célula SNO PQ se divide en los proectoteloblastos NOPQi y NOPQd, mientras las células A, B y C sufren reiterados ciclos de endomitosis, se hacen sinciciales y no modifican su tamaño. Las células NOPQi y NOPQd continúan su programa de proliferación para producir, durante el estado 5, los cuatro pares de teloblastos ectodérmicos designados como células N, O, P y Q.

Los teloblastos son células voluminosas (70-180 μm de diámetro), cuyo citoplasma consiste de teloplasma y viteloplasma. El teloplasma, que contiene el núcleo y gran cantidad de organelos, forma una masa esférica en el polo reproductor de la célula. El viteloplasma, que es rico en plaquetas vitelinas y pobre en organelos, ocupa el resto de la célula. Poco después de su nacimiento, los teloblastos empiezan a dividirse como células de tipo troncal. Esto se manifiesta en la forma de una serie de divisiones desiguales, en las que la célula resultante de mayor tamaño retiene las características de la célula madre y se denomina de la misma manera. Las células hijas más pequeñas y discoidales se llaman células blásticas primarias y constituyen columnas de dirección caudorostral llamadas cintillas germinales. Tanto las cintillas como las células que las constituyen se designan por las letras minúsculas correspondientes a las mayúsculas con que se designan los

teloblastos que les dieron origen (Fig. 2).

Comenzando con las células blásticas de mayor edad las cuatro cintillas ectodérmicas y la mesodérmica del mismo lado del embrión se unen para formar las cintas o bandas germinales izquierda y derecha. Esto marca el fin del estado 6. Cada cintilla consiste de dos partes: una proximal, llamada cintilla no asociada y una distal, llamada cintilla asociada. Esta última está integrada a la respectiva banda germinal. En cada banda germinal la cintilla mesodérmica yace por debajo de las cuatro cintillas ectodérmicas. Las cintillas descendientes de los teloblastos O y P se encuentran ubicadas entre las cintillas n y q. La cintilla que se encuentra al lado de q se denomina p y la que se ubica al lado de n se designa como o (ver Fig. 2).

Las bandas germinales izquierda y derecha se engruesan y alargan por adición proximal de células producidas por los teloblastos y por adición intersticial producto de la división de sus propias células. Así, las bandas germinales se desplazan rostralateralmente sobre la superficie dorsal del embrión, hasta que sus extremos rostrales se ponen en contacto en la línea media. Esto marca el fin del estado 7. Más tarde, las bandas germinales se desplazan circunferencialmente alrededor del embrión coalesciendo en la forma de un "cierre éclair" para formar, en la

Figura 2 . Esquema que muestra la disposición de las líneas celulares ecto y mesodérmicas de un embrión de H. triserialis. Los teloblastos, las cintillas no asociadas, las bandas germinales y la placa germinal ocupan un territorio bien definido de la superficie animal del embrión. (Modificado de Weisblat et al., 1984). Este esquema fué realizado en un computador Apple Mc Intosh.

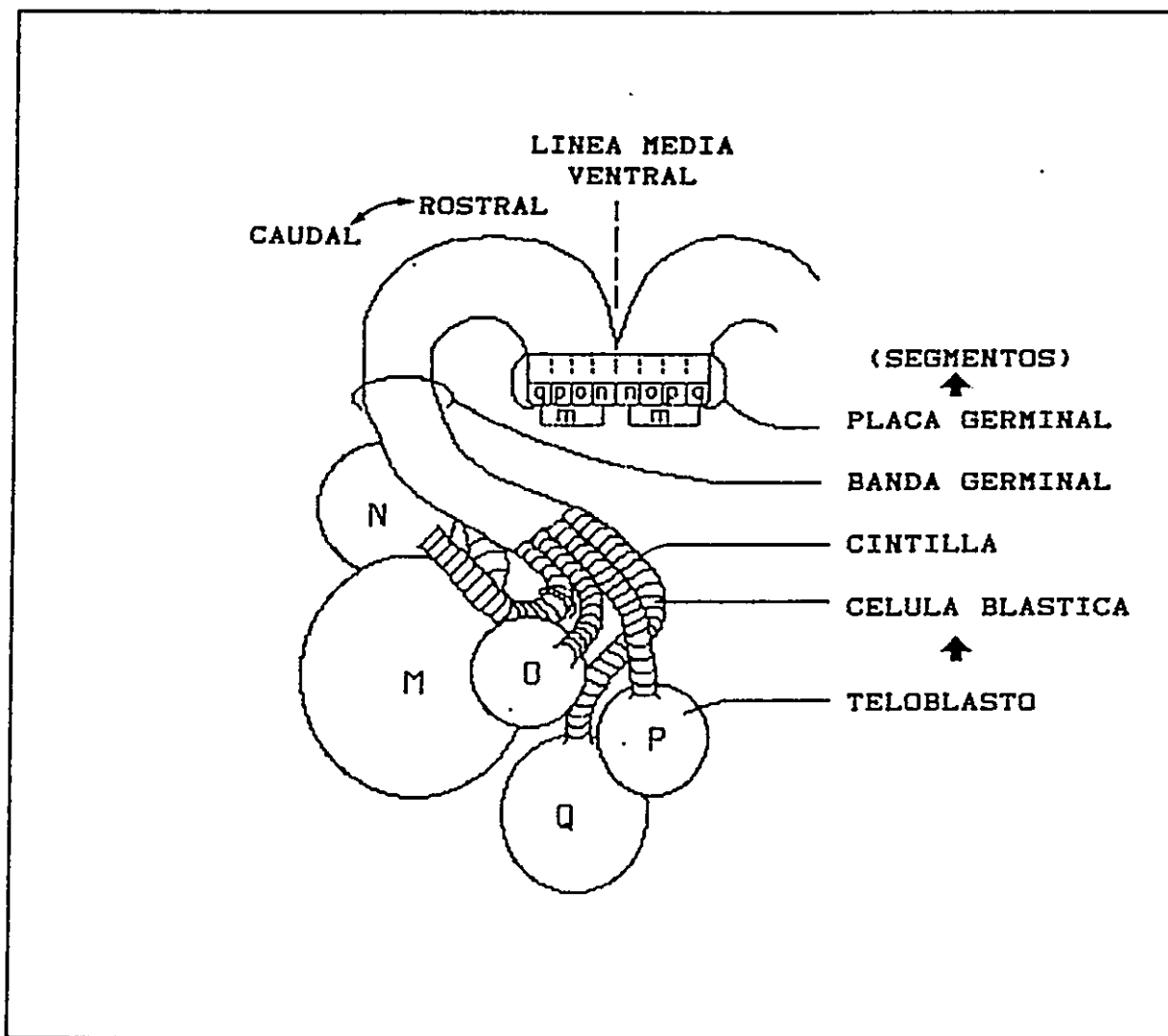


Figura 2

superficie ventral del embrión, la placa germinal. A lo largo de la placa germinal se advierte la formación de una serie iterada de bloques de tejidos ecto y mesodérmicos separados por septos transversales. Cada par de bloques corresponde a un futuro segmento del cuerpo de la sanguijuela adulta.

La inyección de trazadores de linaje celular ha permitido demostrar que cada uno de los blastómeros de la sanguijuela tiene un destino preciso en el desarrollo embrionario. Además, se ha podido determinar el patrón espacio-temporal de las divisiones celulares características de diferentes líneas celulares y la composición celular de los clones (Weisblat *et al.*, 1980b; Zackson, 1984). Así, cada uno de los 32 segmentos del cuerpo de la sanguijuela se forma a partir de clones celulares fundados por un número fijo de pares de células blásticas primarias: un par de células m, o y p y dos pares de células n y q. Por tanto, cada segmento del cuerpo de la sanguijuela incluye la descendencia de 14 células blásticas primarias (Weisblat *et al.*, 1978, 1980b y 1984; Fernández y Stent, 1982).

Durante el estado 7, y previo a la iniciación de la organogénesis, las distintas líneas celulares tienen una posición constante. De esta manera, células homólogas de diferentes líneas celulares ocupan sitios equivalentes de la superficie embrionaria. Además, como los teloblastos y

las células blásticas se dividen en forma espiral o unidireccional (Fernández y Stent, 1982), las células de las cintillas y de las bandas germinales se ordenan una detrás de la otra por edad. Así, los clones producidos por las primeras células blásticas primarias ocupan la posición más rostral, mientras aquellos producidos por las últimas células blásticas primarias ocupan posiciones caudales.

Un embrión en el cual distintas líneas celulares de carácter determinado presentan una distribución tan sistemática permite explorar como cambian las propiedades de sus componentes (teloblastos, cintillas no asociadas y bandas germinales), por ejemplo su velocidad de proliferación, cuando sus células se trasladan de un compartimiento a otro del embrión. Se define como compartimiento embrionario aquel espacio, con límites a veces bien definidos, ocupado por una categoría particular de células. En diferentes compartimientos del embrión las células pueden adquirir relaciones con células de distintas líneas celulares o con sus homólogas de la misma línea celular.

En observaciones preliminares se detectó la existencia de mitosis tanto en los teloblastos como en las células de las bandas germinales de embriones del estado 7 del desarrollo. Sin embargo, no se observaron mitosis en las cintillas no asociadas de estos embriones, las que durante gran parte del estado 7 parecían no cambiar de longitud.

Además, la distribución de células mitóticas a lo largo de las bandas germinales no presentaba un patrón definido. Con estos antecedentes se planteó como hipótesis que los componentes de las distintas líneas celulares, tales como teloblastos, células blásticas primarias, células blásticas secundarias, etc., del estado 7 del desarrollo del embrión de sanguijuela, presentan diferentes patrones de proliferación, lo que podría depender de la posición y relaciones de las células dentro de sus respectivas líneas celulares. Además, si existe un equilibrio entre la producción de células blásticas primarias y su incorporación a las bandas germinales, las cintillas no asociadas debieran contener un número relativamente constante de células.

Los objetivos de este trabajo fueron: a) estudiar la proliferación de los teloblastos, células blásticas primarias, secundarias, etc., y b) investigar si alteraciones en las relaciones de vecindad entre las células de diferentes cintillas germinales podrían provocar modificaciones en su patrón de proliferación.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron sanguijuelas de la especie Helobdella triserialis, colectadas en la localidad de El Monte. Los animales se mantuvieron en agua de estero filtrada que se reemplazaba cada tres días. Los embriones se removieron del interior de los "cocons" adheridos al vientre de la madre y se cultivaron en un medio salino simple (Inase, 1960) cuya composición es la siguiente: NaCl $7,2 \times 10^{-2} M$; KCl $1,4 \times 10^{-3} M$; $CaCl_2 \times 2H_2O$ $6,2 \times 10^{-3} M$; $MgSO_4 \times 7H_2O$ $7,6 \times 10^{-3} M$; pH 6-7. En este medio el embrión puede completar su desarrollo. Los embriones fueron cultivados a una temperatura constante de 20 °C en una cámara climática. Se utilizaron alrededor de 900 embriones provenientes de más o menos 50 hembras.

Tratamiento con colchicina. Para prevenir el curso normal de la mitosis y acumular metafases-c, los embriones se cultivaron por 2-24 h en medio salino conteniendo colchicina en la concentración de $10^{-2} M$. Esta concentración se decidió después de ensayar el efecto de diferentes dosis de la droga y de determinar su capacidad para interrumpir mitosis y la posibilidad de revertir su efecto mediante lavados prolongados en el medio de cultivo. En la

concentración indicada, los embriones pueden rescatarse de la acción de la droga aún después de largas incubaciones de 24 h.

Preparación de montajes completos. La distribución de mitosis en embriones normales, o en aquellos tratados con colchicina, se estudió en montajes completos preparados de la siguiente manera. Los embriones se fijaron en una solución de formaldehído al 10 % y Hoescht 33258 (Calbiochem) al 0,02 %. Este último es un colorante que tiñe los cromosomas y la cromatina al interactuar con los pares A-T del DNA (Sedat y Manuelides, 1977). Con este procedimiento fué posible visualizar claramente los núcleos interfásicos y además identificar células en diferentes periodos de la mitosis. Tan pronto se inicia la fijación, se agregan dos o tres gotas de ácido acético glacial que permite aclarar los embriones (Fernández, 1980). Para mejorar la visualización de ciertos teloblastos, y de sus respectivas cintillas, algunos embriones fueron disecados con microagujas durante el proceso de fijación-transparentación. Embriones completos o incompletos fueron montados entre porta y cubre-objetos con glicerol al 75 % y Hoescht al 0,02 %. Los núcleos y figuras mitóticas se detectaron y cuantificaron en un microscopio de fluorescencia Zeiss, premunido de epi-iluminación y de los filtros apropiados.

Ablación de células. Para investigar si la interacción entre células de diferentes líneas celulares participa en la regulación de la actividad proliferativa, se procedió a la destrucción mecánica de uno o más teloblastos, cuando éstos ya habían iniciado la producción de células blásticas primarias. Con este propósito se utilizaron microagujas y la operación se realizó bajo condiciones adecuadas de asepsia. El instrumental quirúrgico, como el medio de cultivo, fueron esterilizados en autoclave, mientras la cámara quirúrgica fué previamente mantenida con luz ultravioleta por 30 min. Con el propósito de generar anomalías en las relaciones celulares, el embrión operado continuó su desarrollo por 24-72 h en el medio de cultivo conteniendo 80 µg/ml de gentamicina. Luego los embriones operados fueron transferidos a medio de cultivo con colchicina por 4-6 h. A continuación se prepararon montajes completos según lo descrito.

Recuento de células detenidas en metafase-c en embriones del estado 7.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos del recuento de metafases-c teñidas con Hoescht, se procedió a reconstruir dos embriones mediante cámara lúcida. Para esto, embriones tratados con colchicina por 4 y 8 h fueron fijados por 1-2 h a 4 °C en la solución de Karnovsky diluida al 50 % (Fernández et al., 1987). Después de la fijación, los embriones se lavaron en amortiguador

cacodilato 0,05M y se postfijaron en OsO4 al 1% en la oscuridad y a temperatura ambiente. Se procedió luego a deshidratar los embriones en alcoholes de concentración creciente para finalmente incluirlos en Epon 812. Cortes seriados y teñidos con azul de toluidina, de alrededor de 1 μ m de espesor se dibujaron bajo cámara lúcida. En embriones así reconstruidos se pueden realizar recuentos celulares.

RESULTADOS

Durante el estado 7 se pueden visualizar claramente los cuatro pares de líneas celulares ectodérmicas y el par de líneas mesodérmicas extendidos sobre la superficie dorsal del embrión (Fig. 2). Para facilitar el análisis del patrón de proliferación de células de estas líneas, el estado 7 del desarrollo fué subdividido en tres subestados: 7a o temprano, 7b o intermedio y 7c o tardío. A su vez, las bandas germinales de estos embriones fueron subdivididas en tres sectores: rostral, intermedio y caudal.

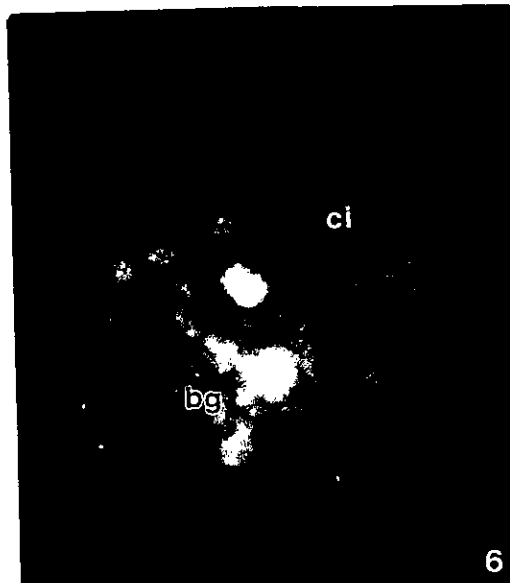
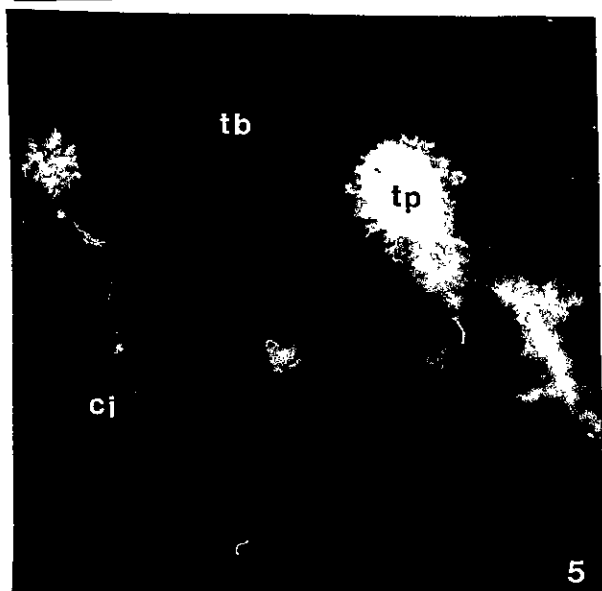
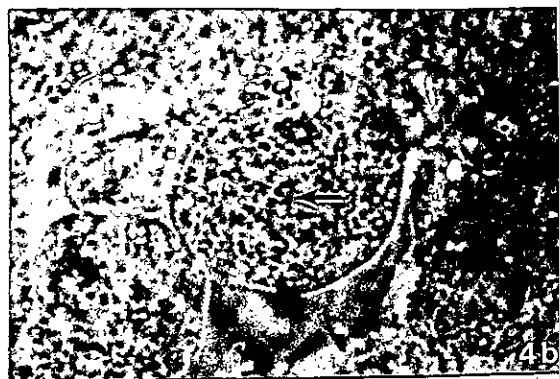
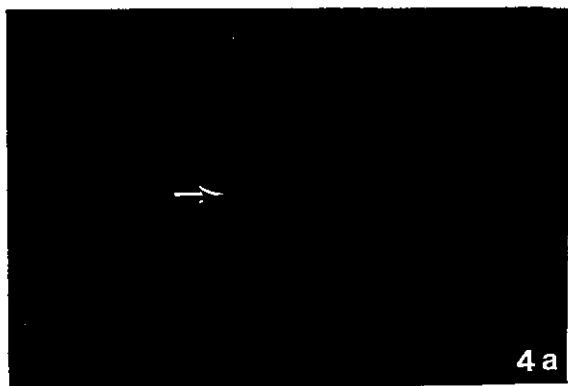
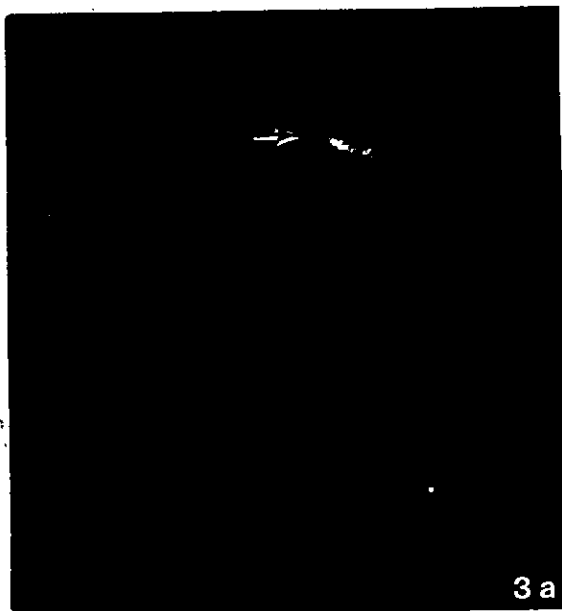
En embriones teñidos con el colorante fluorescente Hoescht, el DNA de los cromosomas de células detenidas en metafase-c es mucho más fluorescente que el del núcleo de células interfásicas y puede distinguirse fácilmente al microscopio de fluorescencia. Dependiendo de la posición de la célula en el montaje completo del embrión, la placa metafásica aparece como una barra o como una corona fluorescente (Figs. 3a y 3b). Para asegurar que en los embriones teñidos el material correspondía a cromosomas, se hicieron observaciones paralelas del mismo material al microscopio óptico. Como se muestra en las figuras 4a y 4b, el material fluorescente acumulado en células detenidas en metafase-c corresponde a cromosomas vistos desde el ecuador o polos de la célula en división.

Figura 3. Microfotografía de fluorescencia que muestra dos teloblastos de un embrión del estado 7a del desarrollo, cuyos núcleos metafásicos aparecen en vista ecuatorial (a) y polar (b). Las flechas apuntan hacia los cromosomas metafásicos. Fijación formaldehído ácido (FA) y tinción con Hoescht 33258 (Ht). x 320.

Figura 4. Célula en metafase perteneciente a las bandas germinales de un embrión del estado 7b fotografiado bajo el microscopio de fluorescencia (a) y bajo iluminación convencional (b). Las flechas apuntan hacia los cromosomas metafásicos. FA y Ht. x 800.

Figura 5. Microfotografía de fluorescencia que muestra dos teloblastos (tb) y parte de sus cintillas (ci) no asociadas, de un lado de un embrión de sanguijuela del estado 7c del desarrollo. Note la diferencia de volumen entre los teloblastos y las células blásticas primarias y la intensa fluorescencia del teloplasma (tp). FA y Ht. x 225.

Figura 6. Microfotografía de fluorescencia de bajo aumento que muestra un embrión de sanguijuela del estado 7a del desarrollo. Se observan los 10 teloblastos (tb) y sus cintillas (ci), que han comenzado a coalescer para formar las bandas germinales (bg). FA y Ht. x 65.



1.- Características proliferativas de las células del estado 7a (30-45 h de desarrollo). Observación de 30 embriones.

a) Teloblastos. La actividad proliferativa de estas células parece ser asincrónica puesto que no se observan teloblastos homólogos (por ejemplo Ni y Nd) ni tampoco teloblastos no homólogos del mismo lado (por ejemplo Ni y Qi), que contribuyen con un número similar de células a la construcción de las bandas germinales, dividiéndose simultáneamente.

b) Cintillas no asociadas. Durante este estado los cinco pares de teloblastos producen un cierto número de células blásticas primarias que constituyen las cintillas no asociadas (Tabla I y Figs. 5 y 7). El núcleo de estas células ectodérmicas es más o menos esférico, mide alrededor de 7 μm de diámetro y ocupa aproximadamente un tercio del volumen celular (Fig. 8). No se detectan células mitóticas en las cintillas ectodérmicas no asociadas. Sin embargo, se observan células en mitosis en el punto en que las cintillas se reúnen para constituir las bandas germinales.

El núcleo de las células blásticas primarias mesodérmicas es de mayor tamaño que el de las células ectodérmicas y mide alrededor de 9 μm de diámetro. Es ovalado y ocupa aproximadamente un tercio del volumen celular. Células en división se encuentran en un lugar preciso de las cintillas no asociadas m, ocupando la posición 10-12 desde el teloblasto

TABLA I

Número de células blásticas presentes en las cintillas no asociadas de embriones de los estados 7a-c.

Estado 7a (promedio de 8 embriones)

CINTILLAS	NUMERO DE CELULAS PRESENTES EN LAS CINTILLAS NO ASOCIADAS
m	16 (10 células blásticas primarias y 6 células blásticas secundarias)
n	16
o y p (*)	10
q	15

Estado 7b (promedio de 10 embriones)

m	16 (10 células blásticas primarias y 6 células blásticas secundarias)
n	19
o y p	18
q	20

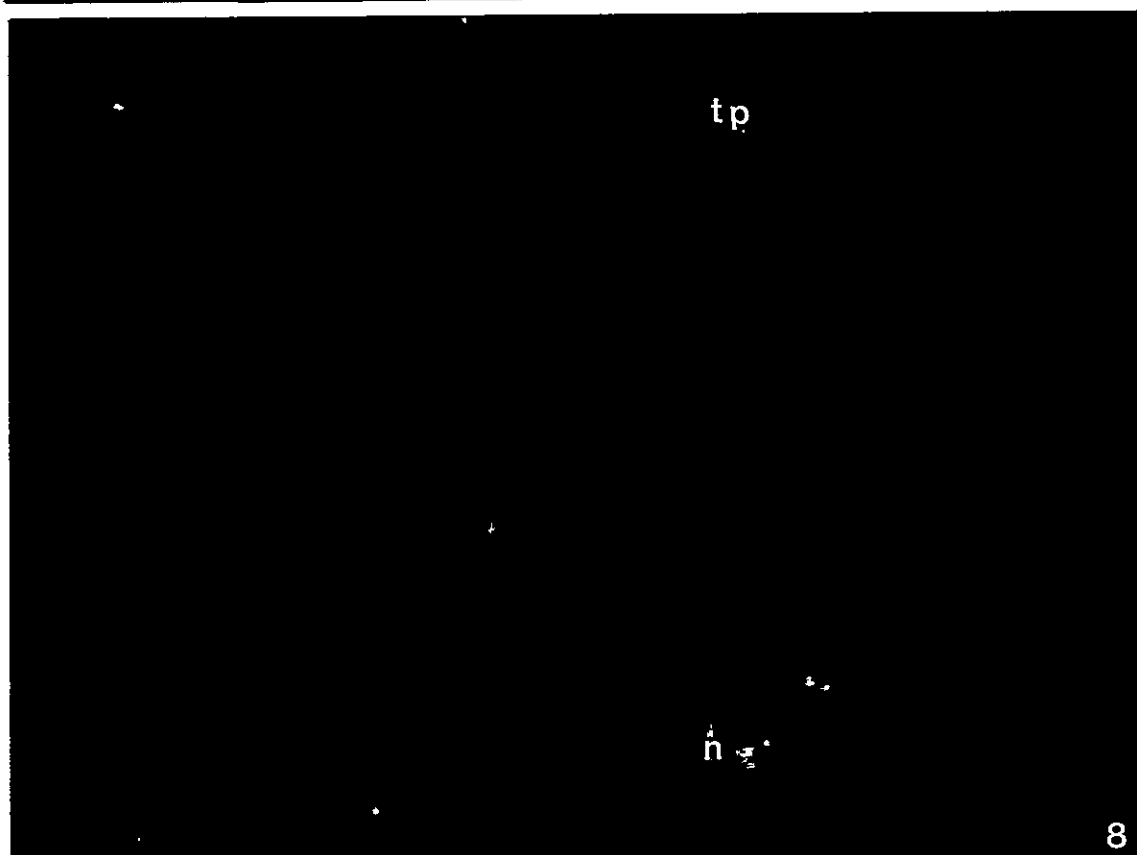
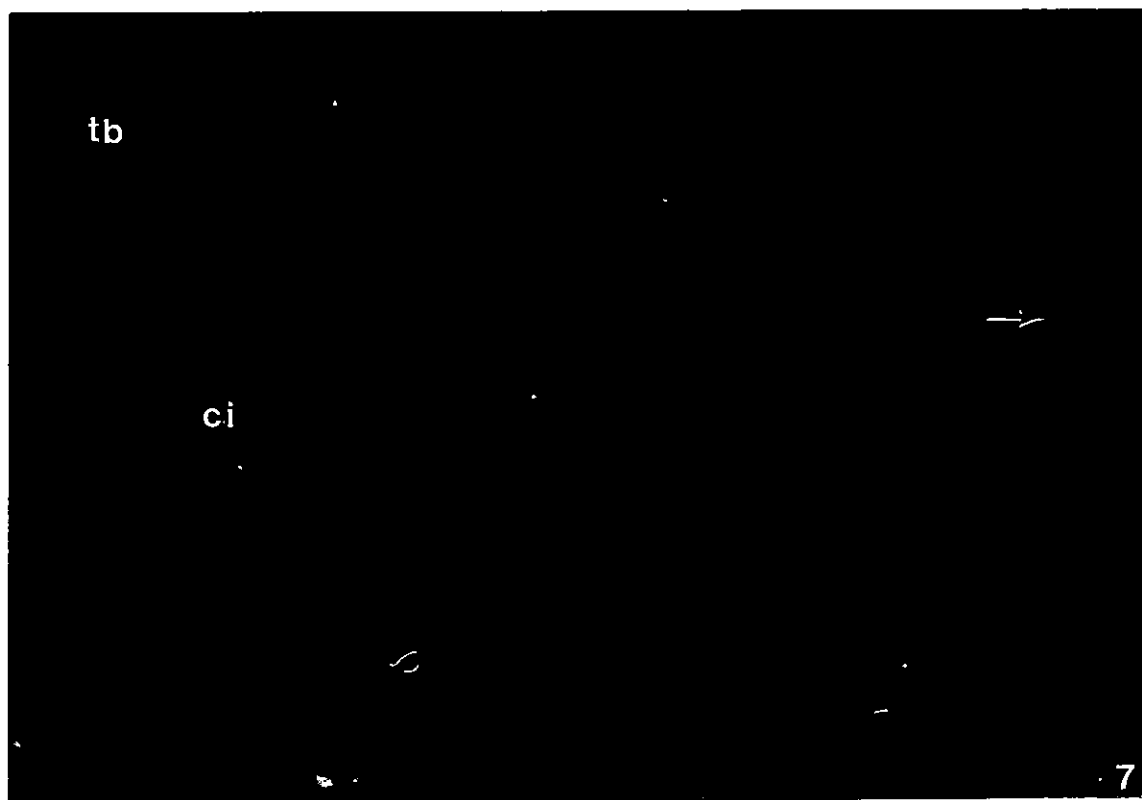
Estado 7c (promedio de 10 embriones)

m	16 (10 células blásticas primarias y 6 células blásticas secundarias)
n	20
o y p	18
q	21

(*) El proteloblasto O/P empieza a producir células blásticas primarias antes de dividirse en O y P. La cintilla naciente puede, por tanto, quedar unida al teloblasto O ó al P. Más aún, las cintillas o y p habitualmente se entrecruzan, formando un quiasma (Fernández y Stent, 1990), y la cintilla que pasa a integrar la banda germinal en la posición o puede ser descendiente de una célula que por su posición podría corresponder al teloblasto P y viceversa

Figura 7. Microfotografía de fluorescencia que muestra tres cintillas ectodérmicas del lado derecho y dos del lado izquierdo de un embrión del estado 7c del desarrollo. La flecha indica un teloblasto en anafase. Note la ausencia de mitosis en las cintillas (ci). (tb), teloblasto. FA y Ht. x 260.

Figura 8. Microfotografía de fluorescencia que muestra un teloblasto N y su cintilla que incluye 16 células blásticas primarias. Nótese que el núcleo de estas últimas células es central, ocupa aproximadamente un tercio del volumen de la célula y su cromatina dispersa es altamente fluorescente. Embrión del estado 7b del desarrollo. (tp), teloplasma. FA y Ht. X 720.



de origen (Fig. 9). Es interesante destacar que el eje del huso mitótico de estas células es oblicuo al eje mayor de la cintilla. Además, cuando se examina la distribución de núcleos más allá del sitio de división se encuentra que éstos alternan a la derecha e izquierda de la línea media. Esto sugiere fuertemente que los planos sucesivos de división son ortogonales entre sí, característica esencial de sistemas de clivaje espiral (Fig. 10). Por tanto, la cintilla no asociada consta de dos regiones: a) una proximal, relacionada al teloblasto de origen y que consta de aproximadamente 10 células dispuestas en tándem y b) una distal, relacionada a la banda germinal y que consta de 6-8 células dispuestas en zigzag.

c) Bandas germinales. Durante el estado 7a se inicia la coalescencia de las cintillas no asociadas para formar las bandas germinales (Fig. 4). Cada incipiente banda germinal tiene alrededor de 50 células (Tabla II), la mayoría de las cuales se considera como células blásticas secundarias. Algunas de las células presentes en las bandas germinales se encuentran en mitosis.

2. - Características proliferativas de las células del estado 7b (45-65 h de desarrollo). Observación de 36 embriones.

a) Teloblastos. La actividad divisional de estas células es semejante a la de sus equivalentes en el estado 7a.

b) Cintillas no asociadas. El número de células blásticas

Figura 9. Microfotografía de fluorescencia que muestra el teloplasma (tp) de uno de los teloblastos M y la cintilla m que consta de : 10 células blásticas primarias, adyacentes al teloblasto, y 8 células blásticas secundarias adyacentes a la banda germinal (bg). La célula que ocupa el lugar número 11 (flecha) se encuentra en metafase. Observe que las células blásticas secundarias se disponen en espiral. Abajo y a la derecha se observa un ectoteloblasto cuya cintilla se incorpora a la banda germinal (*). Embrión del estado 7a. FA y Ht. x 160.

Figura 10. Microfotografía de fluorescencia que muestra parte del segmento de la cintilla m adyacente a la banda germinal. Observe que los núcleos (n) se encuentran en interfase. FA y Ht. x 640.

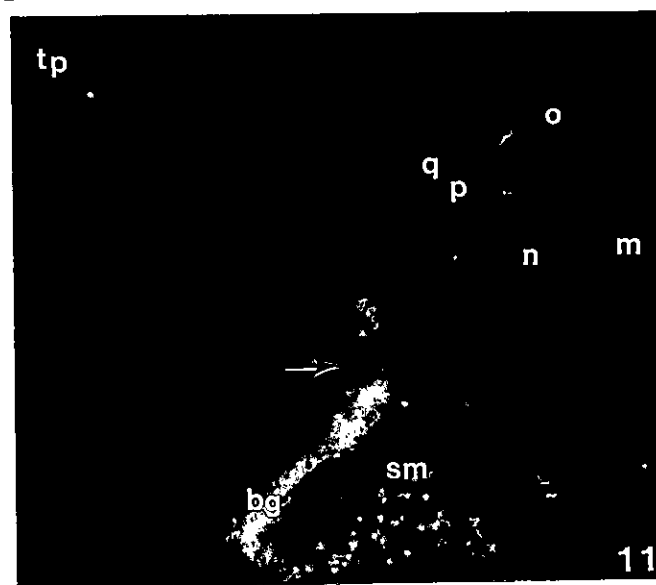
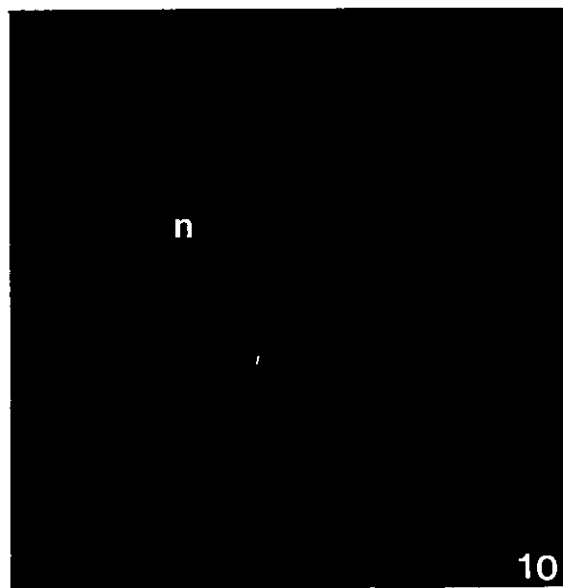
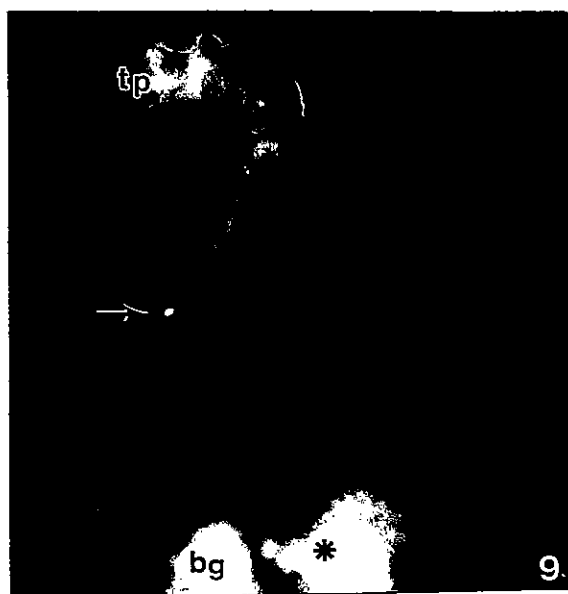
Figura 11. Microfotografía de fluorescencia de bajo aumento de un embrión completo del estado 7b del desarrollo. Se observa lo siguiente: a) el polo reproductor de los teloblastos que contiene teloplasma altamente fluorescente (tp), posiblemente debido al DNA mitocondrial, b) las cintillas no asociadas m, n, o, p y q y c) el punto de coalescencia de las cintillas (flecha) para formar las bandas germinales (bg) y las células del sombrero de micrómeros (sm). Observe que las bandas germinales aún no coalescen en su extremo rostral. FA y Ht. x 75.

Figura 12. Microfotografía de fluorescencia de bajo aumento que muestra el montaje completo de un embrión del estado 7c del desarrollo. Observe que las bandas germinales se han reunido en su extremo rostral. (flecha) FA y Ht. x 100.

TABLA II

Número total de células blásticas secundarias y sus descendientes presentes en los distintos sectores (Sec.) de las bandas germinales izquierda y derecha de embriones completos de sanguijuela del estado 7 del desarrollo, teñidos con Hoescht 33258.

ESTADO	7a (Prom. 6 emb.)	7b (Prom. 5 emb.)	7c (Prom. 5 emb.)
Sec. Rostral	50	250	510
Sec. Inter.	30	180	280
Sec. Caudal	18	100	150
TOTAL	98	530	930



presentes en las cintillas no asociadas exhibe un aumento. En la cintilla n el número de células blásticas aumenta de 16 a 19, en las cintillas o y p aumenta de 10 a 18, mientras en las cintillas q aumenta de 15 a 20 (Tabla I). Sin embargo, no se detecta células en división dentro de las cintillas ectodérmicas no asociadas, indicando que las referidas células probablemente persisten como células blásticas primarias, y su aumento en número podría deberse a un transitorio desequilibrio entre la velocidad de proliferación del respectivo teloblasto y la incorporación de células a las bandas germinales. La región proximal de las cintillas no asociadas mesodérmicas mantiene un número constante de 10-12 células blásticas primarias ordenadas en tándem y en aparente reposo divisional, mientras la región distal presenta 6-8 células blásticas, dispuestas en espiral.

c) Bandas germinales. Durante el estado 7b las bandas germinales aparecen como un par bilateral de estructuras en forma de media luna que aún no se han reunido en su extremo rostral y que incluyen aproximadamente 250 células cada una (Tabla II). Se detecta un número mayor de células mitóticas distribuidas a lo largo de las bandas germinales.

3.- Características proliferativas de las células del estado 7c (65-80 h de desarrollo). Observación de 40 embriones.

a) Teloblastos. La actividad divisional de estas células no parece haber cambiado durante todo el estado 7.

b) Cintillas no asociadas. El número de células blásticas de las cintillas ectodérmicas permanece constante (Tabla I) y no se observan células en división. En las cintillas mesodérmicas no asociadas se sigue observando células blásticas en división en la posición 10-12. La región distal de esta cintillas también exhibe un número constante de 6-8 células dispuestas en zig-zag.

c) Bandas germinales. Durante el estado 7c las bandas germinales han crecido considerablemente y se han asociado en su extremo rostral (Fig. 12). Cada banda germinal tiene aproximadamente 500 células (Tabla II).

4.- Características proliferativas de las células de los estados 7a-c de embriones tratados con colchicina

4.1.- Teloblastos. La proliferación de los teloblastos es detenida por la colchicina y después de dos horas de cultivo en la droga todos los teloblastos aparecen bloqueados en metafase-c. Por tanto, la colchicina bloquea la producción de células blásticas primarias y concomitantemente éstas no son reclutadas al extremo caudal de la bandas germinales.

4.2.- Cintillas no asociadas.

En los estados 7a-c la longitud de las cintillas no asociadas ectodérmicas no es modificada por la droga, indicando que células blásticas primarias no son ni agregadas ni sustraídas de las referidas cintillas (Tabla III). Tampoco ha sido posible reclutar metafases-c en las cintillas

TABLA III

Número de células blásticas presentes en las cintillas no asociadas de embriones de los estados 7a-c. tratados con colchicina.

Estado 7a (promedio de 8 embriones)

Horas de incubación en colchicina	m	n	a, p	q
(Control)	10	16	11	14
4	10	14	10	15
8	11	17	9	14
16	10	16	10	14
20	12	15	10	15
24	10	16	12	16

Estado 7b (promedio de 9 embriones)

(Control)	10	18	18	21
4	11	20	18	20
8	10	20	17	22
16	12	21	16	21
20	11	20	17	22
24	10	20	18	20

Estado 7c (promedio de 11 embriones)

(Control)	11	17	18	22
4	10	17	17	22
8	12	18	17	23
16	12	20	18	21
20	11	20	16	20
24	10	21	18	20

ectodérmicas a pesar de largas incubaciones en colchicina. Como era de esperar, en las cintillas mesodérmicas aparecen células detenidas en metafase-c en la posición 10-12, confirmando las observaciones realizadas en material normal (Figs. 13 y 14). Las primeras divisiones celulares en las cintillas ectodérmicas ocurren en el lugar donde éstas se incorporan a las bandas germinales (Figs. 15 y 16) y el número de células blásticas primarias presentes en estas cintillas fluctúa entre 15 y 22 (Fig. 17).

4.3. - Bandas germinales.

En la Tabla IV se presenta el número de metafases-c que se detecta en cada uno de los tres sectores de las bandas germinales de embriones de los estados 7a-c, tanto normales como tratados por diferentes tiempos con colchicina. En la Tabla V, en cambio, se muestran los mismos resultados pero expresados como porcentajes del número total de células de cada sector.

De acuerdo a estos datos, todos los sectores de las bandas germinales de embriones control del estado 7a presentan un índice mitótico considerablemente mayor que aquellos de los estados 7b y 7c.

Si se analiza los datos de la Tabla IV queda en evidencia que en embriones del estado 7a, el número total de metafases-c que es posible reclutar en cada uno de los tres sectores de las bandas germinales alcanza un máximo después de un

Figura 13. Microfotografía de fluorescencia que muestra el teloplasma (tp) de uno de los mesoteloblastos y algunas de las células blásticas primarias de las cintillas m de un embrión del estado 7c cultivado en colchicina por 8 h. La célula que ocupa el lugar número 11 está en metafase-c (flecha). Observe la disposición en espiral de las células blásticas secundarias. FA y Ht. x 320.

Figura 14. Microfotografía de fluorescencia de otro teloblasto M y de su cintilla, en la cual de nuevo la célula número 11 está detenida en metafase-c (flecha). Embrión del estado 7c cultivado por 8 h en colchicina. FA y Ht. x 210.

Figura 15. Microfotografía de fluorescencia que muestra las cintillas o y p, de un embrión del estado 7c cultivado por 8 h en colchicina, incorporándose a las bandas germinales (bg). Note que células ectodérmicas en metafase-c (flechas) sólo se encuentran dentro de las bandas germinales. FA y Ht. x 480.

Figura 16. Microfotografía de fluorescencia que muestra dos células en metafase-c (flechas) pertenecientes a las cintillas qi y qd incorporadas a las bandas germinales de un embrión del estado 7b del desarrollo, cultivado por 4 h en colchicina. FA y Ht. x 250.

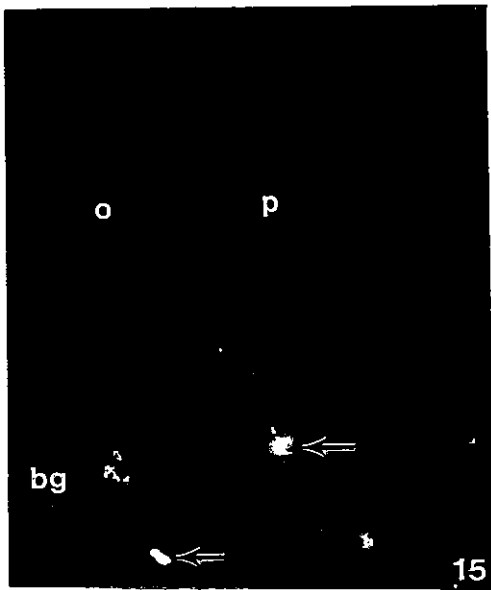
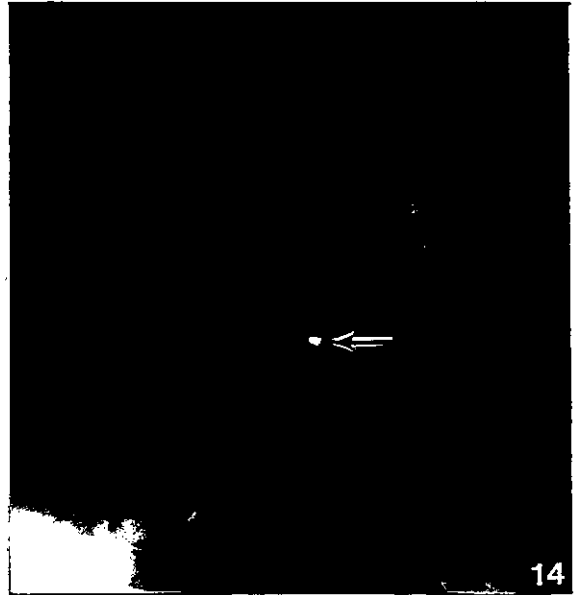
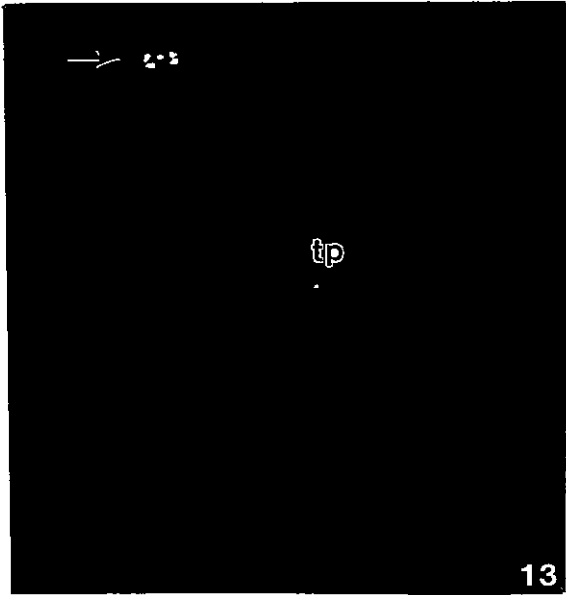


Figura 17. Microfotografía de fluorescencia de un montaje completo de dos ectoteloblastos y de sus respectivas cintillas (ci) de un embrión del estado 7b cultivado por 24 h en colchicina. Observe que una de las cintillas tiene aproximadamente 15 células blásticas primarias. Además, se advierte la ausencia de células en metafase-c. (tp), teloplasma. FA y Ht. x 750.

TABLA IV

Número de células blásticas secundarias detenidas en metafase-c presentes en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones de sanguijuela del estado 7 del desarrollo.

Estado	7 temprano (promedio de 8 experimentos)				7 medio (promedio de 6 experimentos)				7 tardío (promedio 8 experimentos)			
	horas de in- cubación en colchicina.	sector rost.	sector inter.	sector caudal embr. obs.	total embr. obs.	sector rost.	sector inter.	sector caudal embr. obs.	total embr. obs.	sector rost.	sector inter.	sector caudal embr. obs.
Control	4	3	2	18	7	4	2	16	8	5	3	18
2	10	6	4	20	12	8	5	15	15	10	5	18
4	28	20	14	22	36	32	23	18	48	35	29	20
8	32	22	16	16	50	43	24	20	60	42	33	16
15	30	21	17	15	54	46	25	18	76	64	33	15
20	32	24	16	18	52	48	24	16	68	63	32	17
24	31	24	15	21	54	46	24	24	80	65	30	21

Los valores incluidos dentro de un mismo rectángulo no presentan diferencia significativa.

Los valores no encuadrados para un mismo sector de la banda germinal presentan diferencia significativa cuando se comparan entre sí o con los valores incluidos dentro del rectángulo correspondiente.

(P.0.5 test de t)

TABLA V

Porcentaje de células blásticas secundarias detenidas en metafase-c presentes en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones de sanguijuela del estado 7 del desarrollo. Esta tabla se confeccionó con datos incluidos en la tabla IV.

Estado	7 temprano (promedio de 8 experimentos)				7 medio (promedio de 6 experimentos)				7 tardío (promedio 8 experimentos)			
	horas de in- cubación en colchicina.	sector rost.	sector inter.	sector sector total caudal embr. obs.	sector rost.	sector inter.	sector sector total caudal embr. obs.	sector rost.	sector inter.	sector sector total caudal embr. obs.		
0	8	10	11.1	18	2.8	2.2	2	16	1.6	1.8	2	18
2	20	20	22	20	4.8	4.4	5	15	2.9	3.5	3.3	18
4	56	67	78	22	14.4	17.7	23	18	9.4	12.5	19.3	20
8	64	73	89	16	20	23	24	20	12	15	22	16
16	60	70	94.4	15	21.6	25.5	25	18	14.9	22.8	22	15
20	64	80	88.8	18	20.8	26.6	24	18	13.3	22.5	21.3	17
24	62	80	83	21	21.6	25.5	24	24	15.6	23.2	20	21

tratamiento por 4 h en colchicina. Esto mismo ocurre en el sector caudal de las bandas germinales en los estados 7b y 7c. En cambio, en embriones de los estados 7b y 7c este máximo se logra a las 8 h y 16 h, respectivamente, en los sectores intermedio y rostral de las bandas.

Sin embargo, el análisis de los porcentajes de metafases-c en relación al total de células en cada sector (Tabla V), muestra: a) la existencia de un gradiente caudorostral de velocidades de proliferación en las bandas germinales de embriones del estado 7a y b) que comparando distintos sectores de las bandas germinales de embriones de los tres estados, porcentajes equivalentes de metafases-c se logran con tiempos de tratamiento con colchicina cada vez más largos.

Si bien existe esta aparente diferencia en la velocidad de proliferación de las células del sector caudal, comparado con los sectores intermedio y rostral, no se puede descartar la posibilidad que estas diferencias sean el reflejo de la existencia de una fracción proliferativa distinta en cada uno de los sectores. Esta sería mayor en el sector caudal que en los otros dos sectores. En efecto, en la tabla V se observa que en cada uno de los estados, aunque principalmente en el 7a, el porcentaje máximo de metafases-c alcanzado es siempre mayor en el sector caudal que en los otros dos.

En este mismo contexto cabe destacar la diferencia en cuánto a los porcentajes máximos promedio de metafases-c alcanzados en los distintos estados. Este es notablemente

mayor en el estado 7a que en los estados 7b y 7c. En estos dos últimos, los promedios son muy similares. Esto evidentemente se correlaciona con las variaciones observadas en el índice mitótico.

Por lo tanto, durante el estado 7 del desarrollo se observa una franca disminución en la actividad proliferativa de las células de las bandas germinales, que está en directa relación con la edad del embrión y con la posición de sus células. En cierta medida esto sería un reflejo de la edad de la población celular correspondiente.

Estas diferencias, en cuanto a la actividad proliferativa, podrían ser el resultado de variaciones en la velocidad de proliferación (tiempo total de ciclo) y/o en la fracción de células en proliferación en cada sector

5.- Recuentos de células interfásicas y en división en embriones del estado 7.

Como se muestra en la Fig. 18, las cintillas y bandas germinales de embriones del estado 7 del desarrollo presentan dos tipos de células: (a) discoidales y nucleadas y (b) esféricas y anucleadas. Estas últimas miden aproximadamente 20 μm de diámetro y corresponden a células mitóticas. Los cromosomas de estas últimas son muy pequeños y difíciles de detectar en cortes. Los recuentos celulares mediante cámara lúcida en secciones de embriones concuerdan bastante con los datos obtenidos de observaciones de montajes completos de

Figura 19. Reproducción bajo cámara lúcida de una sección de 1 μm de espesor teñida con azul de toluidina, que muestra parte de las bandas germinales izquierda y derecha (bgi y bgd) de un embrión de sanguijuela del estado 7b cultivado durante 4 h en colchicina. Observe las células esféricas sin núcleo (flechas finas), que se interpretan como células detenidas en metafase-c y las discoidales con núcleo central (flechas gruesas), que probablemente corresponden a células en interfase.

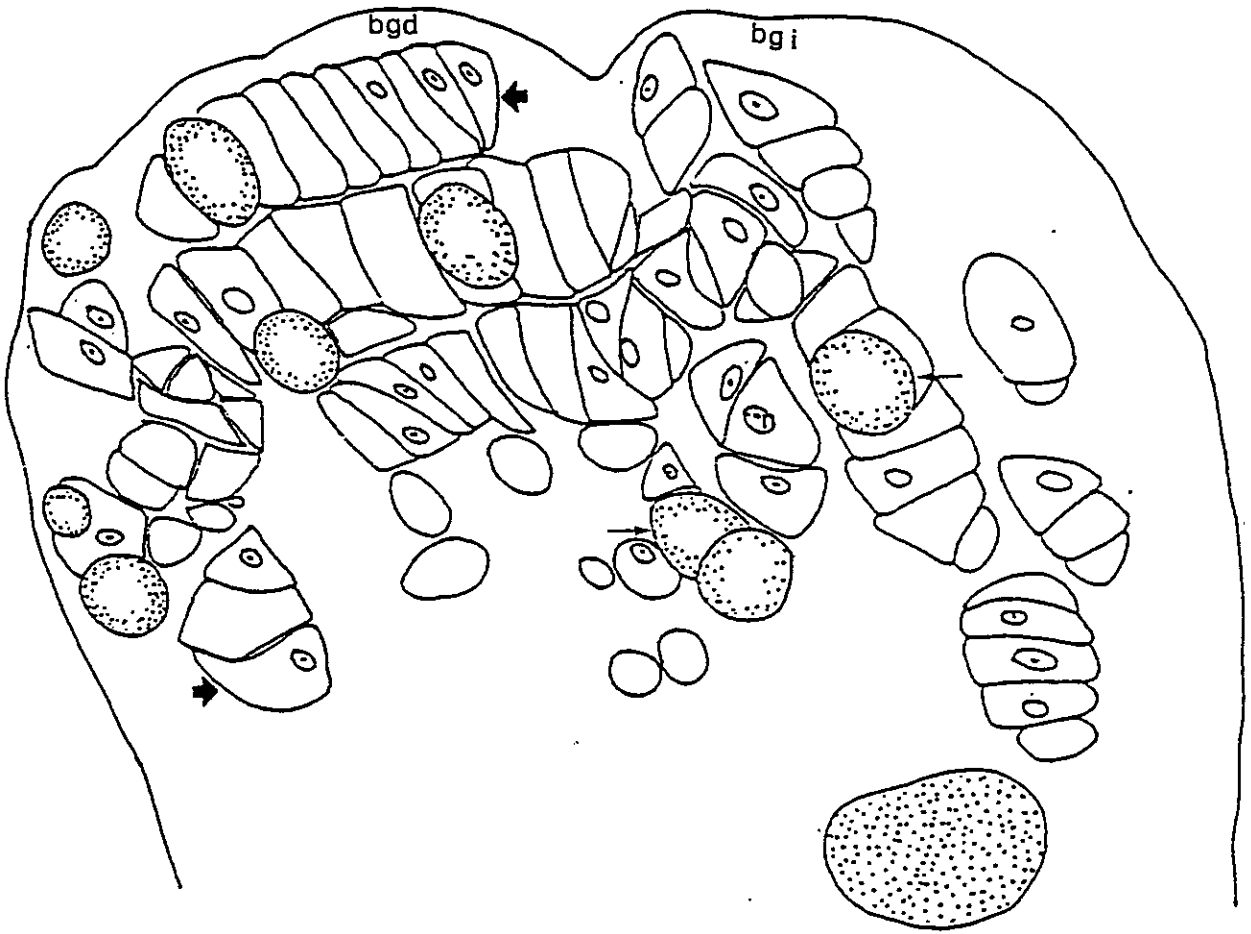


Figura 18

embriones al microscopio de fluorescencia. En un embrión del estado 7b, cultivado por 4 h en colchicina, se contaron 642 células. De éstas 110 correspondían a células en división y 532 a células en interfase. En recuentos celulares realizados en montajes completos de embriones del mismo estado y similarmente tratados con colchicina se contaron alrededor de 500 células en las bandas germinales y de éstas aproximadamente 120 estaban en metafase-c.

Cabe destacar que los recuentos en secciones de embriones incluyen las células de las cintillas no asociadas. Los resultados se resumen en la tabla VI y corresponden a recuentos efectuados en dos embriones.

6.- Recuentos celulares mediante planos de disección óptica.

El estudio microscópico de montajes completos mediante planos de disección óptica permitió determinar que, el número de células detenidas en metafase-c en regiones superficiales (ectoderma) o profundas (mesoderma) de las bandas germinales es bastante similar (Tabla VII). Recuentos celulares indican, además, que el número de células ecto y mesodérmicas es también similar en las dos bandas germinales (Fig.19).

7.- Reversibilidad de la acción de la colchicina.

Después de incubar embriones del estado 7 del desarrollo por 24 h en colchicina, éstos fueron trasladados a medio salino por otras 24 h. Observación de embriones vivos a

TABLA VI

Número aproximado de células blásticas superficiales (1) y profundas (2) detenidas en metafase-c en diferentes sectores de las bandas germinales de embriones de sanguijuelas del estado 7 avanzado. (Promedio de 8 experimentos)

Horas de cultivo en colchicina	sector rostral de las bandas germinales		sector intermedio de las bandas germinales		sector caudal de las bandas germinales		total embriones utilizados
	Región superficial	Región profunda	Región superficial	Región profunda	Región superficial	Región profunda	
0 (control)	4	6	3	3	2	1	18
4	24	26	17	20	15	16	24
8	33	28	19	22	14	15	16
16	38	40	34	32	15	16	15
20	36	38	33	35	17	16	17
24	38	41	34	36	14	17	21
total	230	210	150	140	78	72	

(1) La mayoría de las células de la región superficial se consideran pertenecientes a las cintillas ectodérmicas.

(2) La mayoría de las células de la región profunda se consideran pertenecientes a las cintillas mesodérmicas.

TABLA VII

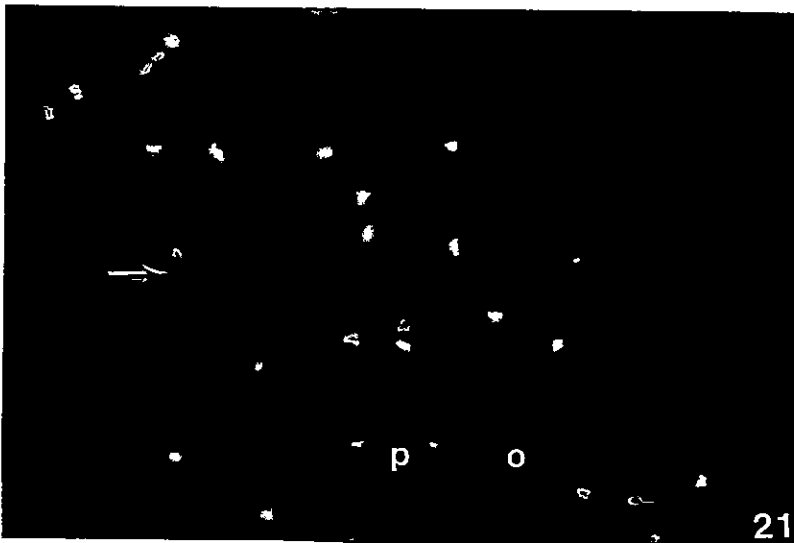
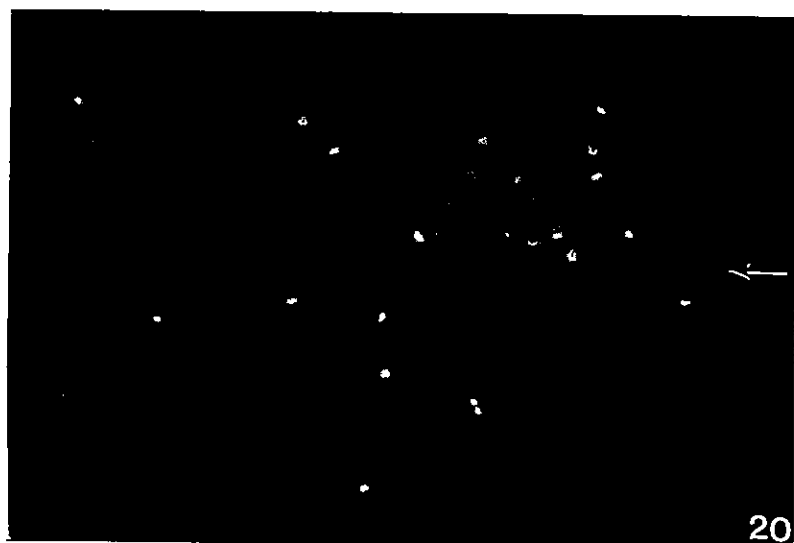
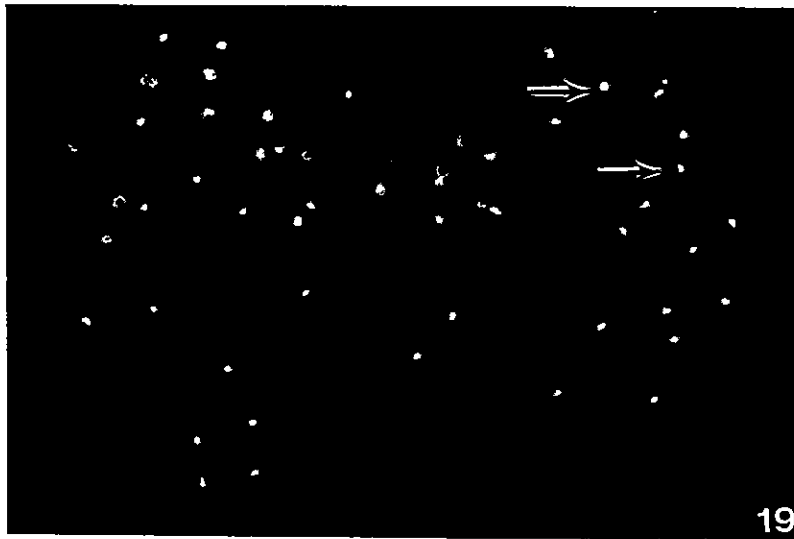
Recuento, bajo cámara lúcida, de células de las bandas y cintillas germinales de embriones del estado 7b, utilizando secciones seriadas teñidas con azul de toluidina (2 embriones).

<i>Horas de incubación en colchicina</i>	<i>Total de Células nucleadas</i>	<i>Total de Células esféricas división</i>	<i>Total de Células</i>	<i>% de Células en división</i>
4	532	110	642	17.13%
8	478	135	613	22.02%

Figura 19. Microfotografía de fluorescencia de un montaje completo de las bandas germinales (bg) de un embrión del estado 7c del desarrollo cultivado por 8 h en colchicina. Observe la distribución de células en metafase-c (flechas) en las bandas germinales izquierda y derecha. FA y Ht. x 250.

Figura 20. Microfotografía de fluorescencia que muestra el aspecto de las bandas germinales de un embrión del estado 7c cuyo teloblasto Mi fué destruido durante el estado 6b. Luego el embrión fué cultivado durante 6 h en colchicina. Observe que la banda germinal izquierda aparece distinta a la derecha. Esta última presenta una banda más fluorescente que corresponde al mesoderma (flecha). Numerosas células en metafase-c se observan en las cintillas ectodérmicas de la banda germinal izquierda. FA y Ht. x 190.

Figura 21. Microfotografía de fluorescencia que muestra la banda germinal derecha de un embrión del estado 8 temprano operado durante el estado 6b. Los teloblastos N y Q fueron destruidos y se permitió al embrión continuar el desarrollo hasta el estado 8 temprano. Luego se cultivó en colchicina por 4 h. Observe que las cintillas o y p incluyen células en metafase-c. Las cintillas n y q parecen estar ausentes y en su lugar se destacan células más voluminosas que por su aspecto se interpretan como células mesodérmicas (flecha). FA y Ht. x 320.



después de fijados y teñidos con el colorante Hoescht 33258, permitieron determinar si el desarrollo había sido reiniciado. Se detectó que el crecimiento del embrión tratado con colchicina puede ser reestablecido y éste adquiere con el tiempo la fisonomía de embrión normal.

8. - Papel de las interacciones celulares en la regulación de la proliferación celular.

a) Ablación de mesoteloblastos

La observación que las células blásticas primarias ectodérmicas parecen experimentar su primera división al pasar a formar parte de las bandas germinales sugiere, que la yuxtaposición de células de distintas líneas provee el estímulo requerido para que estas entren en mitosis. Por esta razón, se procedió a destruir diferentes teloblastos con la intención de generar anomalías en las bandas germinales. Así, se procedió a destruir uno de los mesoteloblastos, por ejemplo el izquierdo, quedando la respectiva banda germinal sólo con las líneas ectodérmicas. La destrucción de Mi o Md se efectuó en el estado 6a o 6b, cuando los mesoteloblastos ya habían empezado sus divisiones desiguales y producido alrededor de ocho células blásticas primarias cada uno. El teloblasto N había producido alrededor de cuatro células, el teloblasto Q dos células y los proectoteloblastos O /P otras dos. Una vez realizada la destrucción quirúrgica de uno de los

mesoteloblastos, el embrión continuó su desarrollo por 24 h en medio salino, para cambiarlo después a medio con colchicina por 4-6 h. En estos experimentos el ectoderma del lado intervenido se desarrolló en ausencia de la línea m. Por tanto la ausencia de M y m por 24 h no previno la proliferación de las líneas ectodérmicas en lugares donde el mesoderma estaba ausente (Fig. 20). El recuento de células ectodérmicas en 10 embriones entregó resultados similares a los obtenidos en embriones control.

b) Ablación de ectoteloblastos.

Las células blásticas primarias de las cintillas ectodérmicas establecen contacto entre sí al pasar a formar parte de la banda germinal. Hay evidencia que contactos del tipo "gap" se establecen entre células de la misma o distinta cintilla a nivel de las bandas germinales (Fernández y Stent, 1982). En este contexto es importante recordar que la formación de tales contactos especializados coincide con el inicio del ciclo proliferativo de las células blásticas primarias ectodérmicas. Fué de interés, entonces, explorar si la falta de alguna o algunas de las líneas celulares ectodérmicas podría afectar el patrón normal de proliferación de las restantes.

Para esto se procedió a destruir algún ectoteloblasto en el estado 6a o 6b del desarrollo, permitiendo luego que el embrión operado alcanzara el estado 7c u 8. Después de cultivar los embriones operados por 4-6 h en colchicina, éstos

fueron fijados, teñidos y montados para su observación al microscopio de fluorescencia.

La sobrevivencia de los embriones intervenidos es relativamente baja y por tanto sólo se pudo analizar cinco de los treinta embriones operados. De las observaciones resulta, sin embargo, que la falta de alguna o algunas de las cintillas no parece afectar la proliferación celular de las restantes.

El teloblasto destruido deja de producir células blásticas y bajo estas condiciones el desarrollo procede con una o dos líneas celulares menos. En la ausencia de la línea Nn, las líneas Dn, Pp y Qq continúan su desarrollo y en la banda germinal quedan algunos espacios vacantes que deberían haber sido ocupados por la descendencia del teloblasto N. Algo similar se observa al destruir los teloblastos D, P y Q.

Cuando se destruyen simultáneamente dos teloblastos, por ejemplo N y Q, la situación es similar. En la figura 21 se muestra las cintillas o y p con varias células en metafase-c. En el espacio adyacente, que debería estar ocupado por las líneas Nn y Qq, se observan células voluminosas que por su tamaño se interpretan como mesodérmicas.

DISCUSION

1.- Teloblastos como células troncales

En el análisis de linaje celular es de alto interés determinar cómo una célula se divide para originar su descendencia clonal. Existen tres modalidades principales de división celular (ver Stent y Weisblat, 1985). La modalidad de tipo diversificante es aquella en la cual una célula de tipo A se divide en dos células desiguales de tipo B y C, ninguna de las cuales originará de nuevo una célula de tipo A. La modalidad proliferativa es aquella en que una célula se divide simétricamente para producir dos hijas iguales, las que a su vez también se dividen simétricamente. La modalidad de tipo célula troncal es aquella en que una célula se divide asimétricamente para originar dos hijas desiguales, por ejemplo una del tipo A y la otra del tipo B. La célula de tipo A se divide de nuevo, tal como lo hizo su progenitora, en una célula de tipo A y otra de tipo B. Así, las divisiones proceden de acuerdo a un patrón de proliferación parental reiterativo.

Los teloblastos, células progenitoras embrionarias descritas principalmente para anélidos (ver revisión de Anderson, 1973), pueden considerarse como células troncales

pues se dividen asimétricamente originando una célula de tipo A, de mayor tamaño, en este caso el propio teloblasto, y una célula de tipo B, la llamada célula blástica primaria. Este proceso divisional dura aproximadamente el tiempo requerido para producir el número de células blásticas primarias necesarias en la fundación de los 32 segmentos del cuerpo de la sanguijuela (Fernández y Stent, 1980; Fernández y Olea, 1982).

Curiosamente, sin embargo, los teloblastos producen un leve exceso de células blásticas primarias, las últimas de las cuales fracasan en formar segmentos que se incorporen al embrión de sanguijuela (Fernández y Stent, 1982). La estrategia divisional de tipo troncal es bien conocida en tejidos como el hemopoiético, testicular y en epitelios de revestimiento. Los teloblastos y las células troncales de vertebrados adultos comparten dos propiedades importantes. Primero, el hecho de permanecer anclados en un cierto nicho histológico mientras uno de los productos de sus divisiones se aleja del lugar de origen y segundo, el hecho que los teloblastos y las células troncales no se diferencian mientras sus hijas si lo hacen. Existen, sin embargo, algunas diferencias importantes de mencionar. Por ejemplo, la longitud de los ciclos generacionales. Las células troncales de algunos tejidos de vertebrados se caracterizan por tener ciclos celulares relativamente largos, del orden de varias horas o días, en tanto que en los teloblastos los ciclos celulares

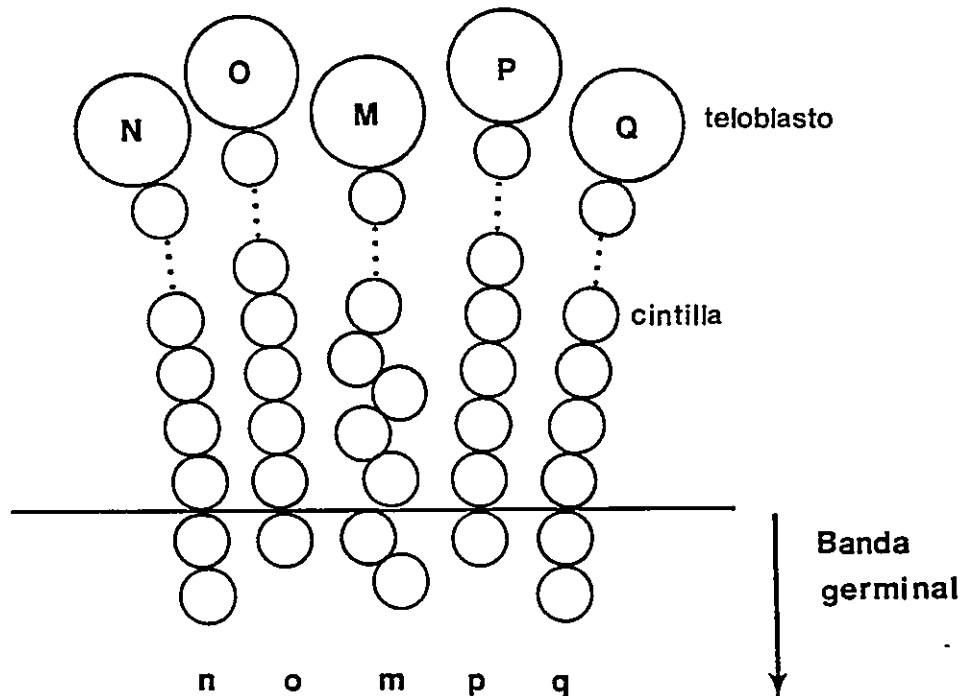
serían de alrededor de 2 h. Además, la división de células troncales de vertebrados es en general bastante simétrica y así las células hijas son de tamaño similar. Estas diferencias no debieran sorprender cuando se comparan células de sistemas en desarrollo, que pueden funcionar por algunas horas o días, con células de sistemas adultos en diferenciación, programadas para funcionar durante años. Para mayor información respecto a las propiedades de células troncales de tejidos adultos se puede consultar el trabajo de Potten y col. (1979).

2.- Patrón de proliferación de los teloblastos y establecimiento del ensamblaje celular que da origen a un hemisegmento.

Los resultados obtenidos indican que los teloblastos parecen no tener ritmos sincronizados de división celular. Además, los experimentos con colchicina sugieren que los teloblastos tendrían ciclos celulares de aproximadamente 2 h.

La evidencia disponible indica que para producir el ensamblaje celular que da origen a un hemisegmento se requiere que las diferentes células blásticas primarias entren en número distinto a las bandas germinales. Así, cada hemisegmento del cuerpo de la sanguijuela adulta está formada por la descendencia de un conjunto de 7 células blásticas primarias: una célula m, dos células n, una célula o, una célula p y dos células q (Fernández y Stent, 1982; Weisblat y Shankland, 1985).

¿Cómo regulan los teloblastos la producción de células blásticas primarias si un número preciso de estas debe ingresar por unidad de tiempo a las bandas germinales? En este contexto cabe recordar que el número de células presentes en las cintillas no asociadas permanece relativamente constante durante gran parte del estado 7 y si suponemos que la duración del ciclo celular de los teloblastos N y Q es t ($t = 1 \text{ h}$) y el de los teloblastos M, O y P es $2t$, ingresarían a las bandas germinales una célula blástica primaria n y q por hora, una célula blástica primaria o y p por cada dos horas y dos células blásticas secundarias m, probablemente hermanas, por cada dos horas. Esto último porque en esta tesis se ha demostrado que las células blásticas primarias mesodérmicas se dividen antes que las células blásticas primarias ectodérmicas. La primera división de las células m ocurre dentro de la respectiva cintilla no asociada. De esta manera, para mantener el referido balance celular debieran incorporarse a cada banda germinal dos células blásticas secundarias m. Esto se explica en el diagrama de la siguiente página.



Fernández y Stent (1982), en su trabajo acerca del desarrollo de la sanguijuela Hirudo medicinalis, demostraron que el ordenamiento segmentario del mesoderma precede al del ectoderma. Las líneas mesodérmicas establecen prometámeros temprano en el desarrollo y cada uno de estos últimos está constituido por la progenie de una célula blástica primaria (relación clonal). Estas propiedades del mesoderma pueden estar relacionadas a la prematura división de las células blásticas primarias m.

3. - Patrón de proliferación de las células blásticas primarias.

Las cintillas ectodérmicas no asociadas tienen entre 15 a 20 células blásticas primarias, número que se mantiene relativamente constante durante gran parte del estado 7. En estas cintillas no se han observado células en mitosis y las primeras divisiones celulares se detectan cuando las células ingresan a las bandas germinales. Este hecho sugiere que las interacciones celulares a nivel de las bandas germinales podrían gatillar la proliferación en las "durmientes" células blásticas primarias ectodérmicas. Sin embargo, esta conclusión no es apoyada por los resultados presentados en esta tesis, y tampoco por los trabajos de Blair (1982), Blair y Weisblat (1982 y 1984) y Zackson (1984). Así, la falta de alguna o algunas de las cintillas germinales parece no modificar en forma importante el comportamiento proliferativo de las células de las cintillas vecinas, aunque no se puede descartar que la presencia de dos líneas celulares sería estímulo suficiente. Mis observaciones sobre la conducta proliferativa de las células blásticas primarias mesodérmicas apoya, también, la idea de que no es el contacto entre células de diferentes cintillas lo que gatilla el inicio de la mitosis. Si no es la interacción o contacto entre células de distintas cintillas el factor que gatilla la división celular, es válido suponer que existe algún otro mecanismo mediante el

cual la célula blástica primaria es inducida a entrar en mitosis.

Al respecto, es importante mencionar que las células eucariontes existen alternativamente en estados de proliferación y de reposo. Pardee (1973), utilizando células normales en cultivo, demostró que las células animales poseen un mecanismo regulatorio responsable del paso de éstas de un estado proliferativo a otro de reposo. Este autor demostró, además, la existencia de un punto en el ciclo ubicado entre M y S, llamado punto de restricción (R), que regula la entrada de la célula recién originada en una mitosis en un nuevo ciclo de proliferación. Su proposición: "que las células eucariontes han desarrollado la habilidad de cambiar de un estado de proliferación a otro de reposo, como un mecanismo de sobrevivencia previo a la diferenciación", podría relacionarse con lo que le sucede a las células de las cintillas no asociadas, que son el producto de la proliferación de los teloblastos y que pasado un cierto tiempo se dividen e inician su diferenciación. Rossow *et al.* (1979), utilizando cicloheximida para detener la síntesis de proteínas, han demostrado que las células normales en cultivo deben acumular una proteína específica muy lábil antes de sobrepasar el punto de restricción. Por lo tanto, el control del crecimiento en el punto R dependería de la habilidad de la célula para acumular una proteína "iniciadora" en una cantidad crítica. Las células de las cintillas podrían sintetizar una proteína

de este tipo que se acumularía durante el trayecto de la célula blástica primaria entre el teloblasto y la banda germinal. En esta región del embrión, o un poco antes (caso de las células m), la proteína alcanzaría la concentración crítica gatillando la salida de la célula del G1 para entrar en S. La síntesis de tal proteína podría resultar de la activación del gen correspondiente de la célula blástica primaria, que hubiese alcanzado una cierta posición dentro de la cintilla germinal.

La explicación de la división de las células blásticas primarias, como resultado de la síntesis y acumulación de una proteína, presenta inconvenientes cuando se analiza el efecto de la colchicina. Si se parte de la base que la colchicina no afecta la síntesis de proteínas, al menos la de aquellas asociadas al control del tránsito a lo largo del ciclo celular (Pardee, 1973), el hecho que después de largas exposiciones a la droga no se detectan metafases-c en las cintillas no asociadas ectodérmicas sugiere que el mecanismo de regulación de la proliferación de estas células es independiente de su edad y sólo se expresa a nivel de la banda germinal. Es posible, que cuando la célula blástica primaria entra a la banda germinal se sobrepase el punto de restricción. Por el contrario, las células de las cintillas mesodérmicas sobrepasarían el punto de restricción antes de entrar a la banda germinal. En este contexto resulta de gran interés determinar en que momento o punto de la cintilla germinal no

asociada se inicia la replicación del DNA.

El patrón de división celular de las células blásticas primarias de las cintillas mesodérmicas difiere de aquel de las ectodérmicas no sólo en cuanto al lugar donde ocurre su primera división celular, sino también en que mientras las primeras se dividen en espiral las últimas lo hacen unidireccionalmente (ver Fernández y Stent, 1982). Así, el patrón de divisiones espirales que caracteriza a los blastómeros precursores de los cinco pares de teloblastos se mantiene en las líneas mesodérmicas. Mis observaciones no aportan evidencia que indique que los mesoteloblastos de H. triserialis se dividen espiralmente. Sin embargo, demuestran que el clivaje espiral de los proteloblastos (ver Fernández, 1980), es rápidamente retomado por las células blásticas primarias mesodérmicas. Parece altamente probable que la formación de somitos en H. triserialis resulte también de divisiones espirales alternadas de las células blásticas secundarias mesodérmicas. El clivaje espiral es, entonces, una propiedad mantenida por largo tiempo en líneas celulares mesodérmicas.

Diferencias en los planos de clivaje, como en el tamaño celular, podrían influir en la longitud del ciclo celular. Jackson (1984) ha demostrado que en la sanguijuela H. triserialis las células de mayor tamaño de las bandas germinales tienen ciclos celulares más cortos que las de menor tamaño.

4. - Patrón de proliferación de las células blásticas de las bandas germinales.

Los resultados de reclutamiento de células en metafase-c sugieren que el patrón de proliferación de las células de las cintillas ectodérmicas cambia local y temporalmente. Los índices mitóticos calculados para embriones normales son considerablemente mayores en el estado 7a que en los estados 7b y 7c. Esto es, a medida que progresa el desarrollo la fracción de células en mitosis disminuye. Esto confirma resultados de otros autores como Parisi *et al.* (1978) que, utilizando embriones de erizo de mar, determinaron una drástica disminución del índice mitótico en el curso del desarrollo temprano. Los índices mitóticos, calculados para células de las bandas germinales de embriones de sanguijuela, son bastante elevados durante el estado 7a, pero están dentro del orden de magnitud de índices mitóticos calculados para otros sistemas en desarrollo tales como el cerebelo del embrión de ratón (Langman, 1966) y el tubo neural del embrión de pollo (Marés, Lodin y Srajer, 1970).

Variaciones en el índice mitótico de embriones de sanguijuela puede correlacionarse con el porcentaje de células en metafase-c. Este último es menor en los sectores rostrales que en los caudales de las bandas germinales y también disminuye a medida que progresa el desarrollo del embrión. Cabe recordar que el desarrollo de la sanguijuela procede

caudorostralmente y por tanto siempre hay un número mayor de células en los sectores rostrales que en los caudales. La disminución del porcentaje de células en metafase-c entre los estados 7a y 7b-c podría deberse a una disminución de las células en división y/o a un aumento del tiempo del ciclo total. Ambos hechos parecieran depender de la edad y posición de las células dentro de las bandas germinales

Relacionado con la formación de patrones de proliferación celular, Jackson (1984) ha demostrado que las primeras divisiones celulares en las líneas ectodérmicas son altamente desiguales. Así, las líneas ectodérmicas n y q tienen dos tipos de células. Las designadas como nf y qf que se dividen tan pronto entran a las bandas germinales, y las designadas como ns y qs que se dividen más tarde. En contraste, las cintillas ectodérmicas o y p tienen células de un solo tipo que se dividen tan pronto entran a las bandas germinales. Así, variaciones en los patrones de proliferación de las células blásticas podrían ser una consecuencia de la diferente velocidad con que se dividen las células de las distintas cintillas en distintos momentos del desarrollo.

Los resultados que muestran que a un mismo nivel de las bandas germinales la fracción de células ectodérmicas y mesodérmicas en división es similar, sugieren la existencia de mecanismos de regulación que sincronizarían la actividad proliferativa de los dos tipos de tejidos. Esto sería de gran

importancia en la preparación de un inventario de células ecto y mesodérmicas destinadas a la construcción de cada uno de los metámeros.

5. - Formulación de un modelo de proliferación celular en las líneas celulares determinadas del embrión de sanguijuela del estado 7 del desarrollo.

Los resultados obtenidos en este trabajo permiten construir un modelo de proliferación de las líneas celulares del embrión de sanguijuela del estado 7 del desarrollo que tiene las siguientes características:

1) Los distintos componentes de cada línea celular difieren en su velocidad de proliferación, 2) La proliferación de los teloblastos está sincronizada con el ingreso de sus descendientes a las bandas germinales, 3) La velocidad de proliferación de las células de las bandas germinales varía de acuerdo a su posición en el embrión y 4) La fracción de células en proliferación en los distintos sectores de las bandas germinales varía en función de la edad del embrión.

REFERENCIAS

- Anderson, D.T. (1973). *Embryology and Phylogeny in Annelids and Arthropods*. Pergamon, Oxford.
- Blair, S.S. (1982). Interactions between mesoderm and ectoderm in segment formation in the embryo of the glossiphoniid leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 89, 389-396.
- Blair, S.S. y Weisblat, D.A. (1982). Ectodermal interactions during neurogenesis in the glossiphoniid leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 91, 64-72.
- Blair, S.S. y Weisblat, D. A. (1984). Cell interactions in the developing epidermis of the leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 101, 318-324.
- Fernández, J. (1980). Embryonic development of the glossiphoniid leech Theromyzon rude: Characterization of developmental stages. *Develop. Biol.* 76, 245-262.
- Fernández, J y Stent, G.S. (1980). Embryonic development of the glossiphoniid leech Theromyzon rude: structure and development of the germinal bands. *Develop. Biol.* 78, 407-434.

- Fernández, J. (1982). Organización y desarrollo del sistema nervioso de la sanguijuela. *Arch. Biol. Med. Exp.* 15, 229-243.
- Fernández, J. y Olea, N. (1982). Embryonic development of glossiphoniid leeches. En: *Developmental Biology of Freshwater Invertebrates* (F.W. Harrison y R.R. Cowden, eds.). Alan R. Liss, N.Y.
- Fernández, J. y Stent, G.S. (1982). Embryonic development of the hirudinid leech Hirudo medicinalis: structure, development and segmentation of the germinal plate. *J. Embryol. exp. Morph.* 72, 71-76.
- Inase, M. (1960). The culture solution of the egg of Tubifex. *Sci. Rep. Tokoku Univ. (Biol.)*. 26, 65-67.
- Langman, J., Guerrant, R.L. y Freeman, B.G. (1966). Behavior of neuro-epithelial cells during closure of the neural tube. *J. Comp. Neur.* 127, 399-412.
- Marés, V., Lodin, Z., y Srajer, J. (1970). The cellular kinetics of the developing mouse cerebellum. I. The generation cycle, growth fraction and rate of proliferation of the external granular layer. *Brain Research.* 23, 323-324.
- Parisi, E., Filosa, S., De Petrocellis, B y Monroy, A. (1978). The pattern of cell division in the early development of the sea urchin, Paracentrotus lividus, *Develop. Biol.* 65, 38-49.

- Pardee, A.B. (1974). A restriction point for control of normal animal cell proliferation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 71, 1286-1290.
- Potten, C.S., Schofield, R. y Latjha, L.G. (1979). A comparison of cell replacement in bone marrow, testis and three regions of surface epithelium. *Biochemica et Biophysica Acta* 560, 282-299.
- Rosow, P.W., Riddle, V.G.H., Pardee, A.B. (1979). Synthesis of labile, serum-dependent protein in early G1 , controls animal growth. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76, 4446-4450.
- Schleip, W. (1936). *Ontogenie der Hirudinen*. In *Klassen und Ordnungen des tierreichs*, vol. 4 (H.G. Bronn, ed.), div. 3, book 4, part 2, pp 2-1117, Leipzig: Akad. Verlagsgesellschaft.
- Sedat, V y Manuelides, L. (1977). A direct approach to the structure of eukariotic chromosomes. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 42, 331-350.
- Shankland, M. (1987). Determination of cleavage pattern in embryonic blast cells of the leech. *Develop. Biol.* 120, 494-498.
- Shankland, M y Weisblast, D.A. (1984). Stepwise commitment of blast cells during the positional specification of the D and P cell lines in the leech embryo. *Develop. Biol.* 106, 326-342.
- Stent, G.S. y Weisblat, D.A. (1985). Cell lineage in the development of invertebrates nervous systems. *Ann Rev. Neurosci.* 8, 45-70.

- Sulston, J.E. y Horvitz, H.R. (1977). Post-embryonic cell lineages of the nematode Caenorhabditis elegans. *Develop. Biol.* 56, 110-156.
- Weisblat, D.A., Sawyer, R.T. y Stent, G.S. (1978). Cell lineage analysis by intracellular injection of a tracer enzyme. *Science* 202, 1295-1298.
- Weisblat, D.A., Blair, S.S. y Stent, G.S. (1980a). Cell lineage analysis in leech neurogenesis by tracer injection of identified embryonic cells. *Neurosci. Abstr.* 6, 495.
- Weisblat, D.A., Harper, G., Stent, G.S. y Sawyer, R.T. (1980b). Embryonic cell lineage in the nervous system of the glossiphoniid leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 76, 58-78.
- Weisblat, D.A., Zackson, S.L., Blair, S.S. y Young, J.D. (1980c). Cell lineage analysis by intracellular injection of fluorescent tracers. *Science* 209, 1538-1541.
- Weisblat, D.A. y Blair, S.S. (1984). Developmental indeterminacy in embryos of the leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 101, 326-335.
- Weisblat, D.A., Kim, S.Y. y Stent, G.S. (1984). Embryonic origins of cells in the leech Helobdella triserialis. *Develop. Biol.* 104, 65-85.
- Whitman, C.D. (1887). A Contribution to the history of the germ-layers in Clepsine. *J. Morph.* 1, 105-182.
- Wordeman, L. (1983). Kinetics of primary blast cell production in the embryo of the leech Helobdella triserialis. B.A. thesis, University of California, Berkeley.

Zackson, S.L. (1984). Cell lineage, cell-cell interaction and segment formation in the ectoderm of the glassiphanid leech embryo. *Develop. Biol.* 104, 143-160.