

LA INFLUÈNCIA DE L'EXTRACTE TESTICULAR SOBRE L'EVOLUCIÓ INTRADÈRMICA DELS FLUIDS I DE LES PARTÍCULES INJECTADES

per

B. C. HOFFMAN

F. DURAN-REYNALS

Un de nosaltres ha demostrat (1, 2, 3) que els extractes de certs òrgans tenen un poder exaltant sobre el desenvolupament del virus vacunal i de les infeccions estafilocòciques, i que tots els òrgans estudiats poden classificar-se en tres grups segons l'efecte de llurs extractes. El grup I comprèn el testicle, ronyó, cervell i pell, i llurs extractes tenen sempre un poder exaltant. El grup II inclou les suprarenals, la retina, l'ovari i tot l'embrió i llurs extractes no modifiquen les infeccions. El grup III inclou la sang, la melsa, els nòduls limfàtics i la medul·la òssia, i llurs extractes tendeixen a minvar i àdhuc, en certs casos, suprimir les infeccions.

De tots els òrgans del primer grup, el testicle és, de molt, el més actiu. El poder exaltant dels seus extractes s'ha fet extensiu a altres infeccions, a més de les esmentades, com ha demostrat Hoffman (4) amb els virus de l'herpes, de l'estomatitis vesicular i de la malaltia de Bornà, Thompson (5), en una observació amb el virus de la poliomièlitis, i Pijoan (6), amb vint bacteries dife-

rents. El principi actiu responsable de l'exaltació ha estat denominat per Ledingham i Barratt (7) factor Reynals, i per comoditat usarem aquest terme en aquesta nota.

La naturalesa de l'acció de l'extracte testicular no és coneguda, encara que hi hagi observacions en la literatura que són un aport a la interpretació del fenomen d'exaltació. Així, l'estímul del creixement cel·lular *in vitro* pels extractes de testicle, com de molts altres òrgans i teixits, ha estat ben establert (8, 9, 10, 11). S'ha dit que les polpes de testicle o de ronyó són un medi excel·lent per a la multiplicació de virus *in vitro* (12, 13), però treballs ulteriors han demostrat que els mètodes de preparació de les polpes emprades no eliminaven les cèl·lules vives (14). L'activitat de l'extracte testicular *in vivo* es demostra per la seva acció estimulants sobre la curació de les úlceres cròniques refractàries (15, 16). El teixit limfoide, que sembla tenir l'efecte oposat al de l'extracte testicular sobre les infeccions per virus, se sap que exerceix una influència inhibidora sobre el creixement de les cèl·lules (17).

Treballs anteriors realitzats en aquest laboratori han demostrat que si l'extracte testicular s'injecta intradèrmicament, i el virus vacunal intravenosament, la infecció vacunal es localitzarà exactament en l'àrea de pell en la qual l'extracte testicular s'ha injectat. Insistirem sobre aquest punt més endavant, però hem de dir, en relació amb això, que la localització de diferents substàncies tintòries, especialment blau de metilè i blau de tripan, té lloc també en diversos processos patològics, per exemple, neumònia, encefalitis, tuberculosi experimental i inflamacions causades per revulsius, com mostassa, aleuronat, essència de trementina, etc. (Menkin, Friedheim i altres) (18, 19).

Una observació experimental ha donat una via per a la investigació de la manera d'actuar del factor Reynals. Els blaus resultants de la injecció intradèrmica de barreges que contenen extracte testicular desapareixen més ràpidament que els causats per barreges que no contenen l'extracte. Això suggereix que l'extracte testicular pot produir el seu efecte influint sobre la permeabilitat dels teixits. Aquest treball fou començat per a provar aquesta possibilitat.

MÈTODES I MATERIALS

Els extractes d'òrgans es preparen molent el teixit amb sorra en el seu propi volum de solució de Ringer. La polpa es centrifugava i s'emprava el líquid sobrenedant.

Per a estudiar la velocitat de la difusió després de la injecció intradèrmica d'extracte testicular o de qualsevol altre òrgan, era essencial fer la massa injectada visible a través de les capes epidèrmiques superficials.

Amb aquest objecte empràvem en les proves preliminars una barreja a parts iguals de citrat doble de ferro o amoníac i ferrocianur potàssic, cada un en solució aquosa al 0,5 per 100. Es feren injeccions de 0,5 cc. de barreja, més un volum igual d'extracte testicular de conill, o bé de solució de Ringer com a control, en diverses àrees de la pell afaitada del conill. Després, a intervals de deu minuts, s'anaven ressecant petites porcions de pell i es fixaven en solució de formalina al 10 per 100, amb un 5 per 100 de ClH (tots els animals operats s'eteritzaven). Aquest precipitava en blau de Prússia. Es preparaven seccions microscòpiques en la forma acostumada i es tenyien molt lleugerament amb hematoxilina. En els darrers experiments s'emprà la tinta

xinesa diluïda a 1 : 2 amb solució de Ringer, perquè amb aquella la velocitat de difusió podia seguir-se més curosament.

La tinta diluïda en quantitats de 0,25 cc. es barrejava immediatament abans de la injecció amb la mateixa quantitat d'extracte d'òrgan o amb solució de Ringer, com a control, i s'injectava en diversos llocs de la pell afaitada d'un mateix conill. Una hora després, les àrees en les quals hi havia la tinta es mesuraven i s'apuntaven. Podien discernir-se encara passades vint-i-quatre hores i àdhuc més tard, i inclús podia veure's una taca gris ben definida passades unes setmanes, però no hi havia creixement en l'àrea afectada després d'una hora. En alguns casos el conill es matava en aquest moment i les diverses àrees injectades s'extirpaven i es fixaven per a l'anàlisi histològic. Al començament empràvem el tenyit ordinari amb eosina i blau de metilè. Més endavant trobàrem que la coloració difosa amb àcid pícric a 1 : 100 donava un fons en el qual les partícules de tinta contrastaven vigorosament.

INFLUÈNCIA DE L'EXTRACTE TESTICULAR SOBRE LA DIFUSIÓ DEL CITRAT DOBLE DE FERRO I AMONI I EL FERROCIANUR POTÀSSIC

Es feren cinc experiments com es descriu. En cada un, la bua produïda per la barreja injectada que contenia extracte testicular, s'aplanava i desapareixia molt ràpidament, i als pocs minuts, una difosa coloració blava de la pell era l'únic que quedava. La bua produïda per la injecció del colorant sol persistia en molts casos més d'una hora. L'examen microscòpic demostrava un color blau més difós en els espais intercel·lulars. Hi havia molt

edema, i al tall de la secció, el blau de Prússia havia precipitat en grans quantitats. Solament en molts pocs casos hi havia signes que el colorant hagués penetrat dintre les cèl·lules. Per altra banda, les seccions preses de les àrees que havien rebut la barreja amb l'extracte testicular, presentaven un color blau més pàl·lid, i moltes d'elles tenien grànuls o masses de la substància colorant dintre les cèl·lules del teixit connectiu (fig. 1). Solament en un cas es veieren les partícules blaves dintre del cèl·lules epitelials, però no rarament les cèl·lules endotelials del vasos sanguinis n'estaven plenes. Seccions de pell ressecades trenta o quaranta minuts després de la injecció presentaven la major part del blau de Prússia a l'interior de les cèl·lules. Es notà també que el colorant estava molt sovint adherint a les membranes cel·lulars.

INFLUÈNCIA DE L'EXTRACTE TESTICULAR SOBRE LA DIFUSIÓ DE LA TINTA XINESA

Es feren onze experiments amb extracte testicular de conill i de rata, més tinta xinesa. Com es veu en la làmina I, les barreges de tinta xinesa més extracte testicular, han afectat una àrea molt més gran que el material de control de tinta xinesa i solució de Ringer.

S'agafaren seccions d'ambdues àrees. En les que reberen tinta xinesa més extracte testicular, les partícules de tinta estaven amplament distribuïdes, aprimant-se gradualment cap a les vores, i podien veure's lluny del punt d'inoculació. Les partícules de tinta delimitaven els contorns de les cèl·lules, de vegades semblant estar dintre el protoplasma cel·lular, però això no pot afirmar-se sense mètodes histològics més fins (fig. 2). En les àrees de control la difusió de la tinta es deturava sobta-

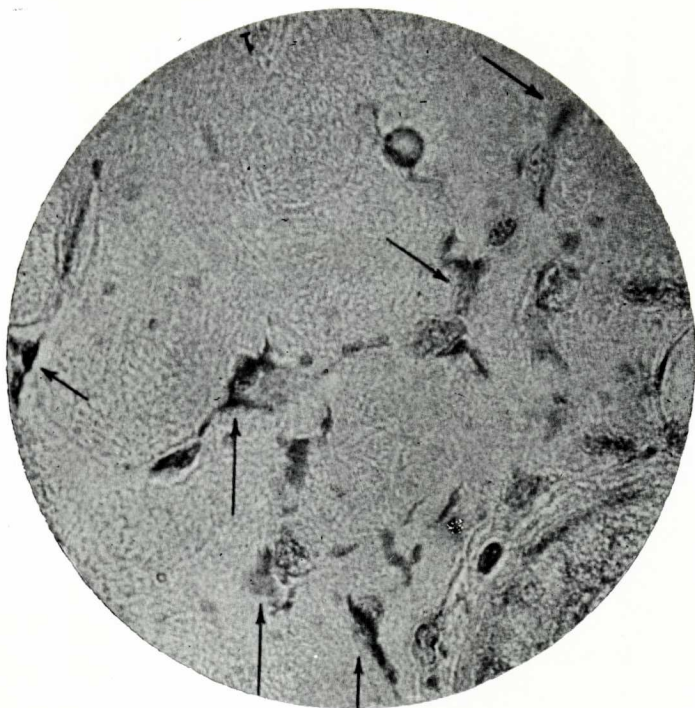
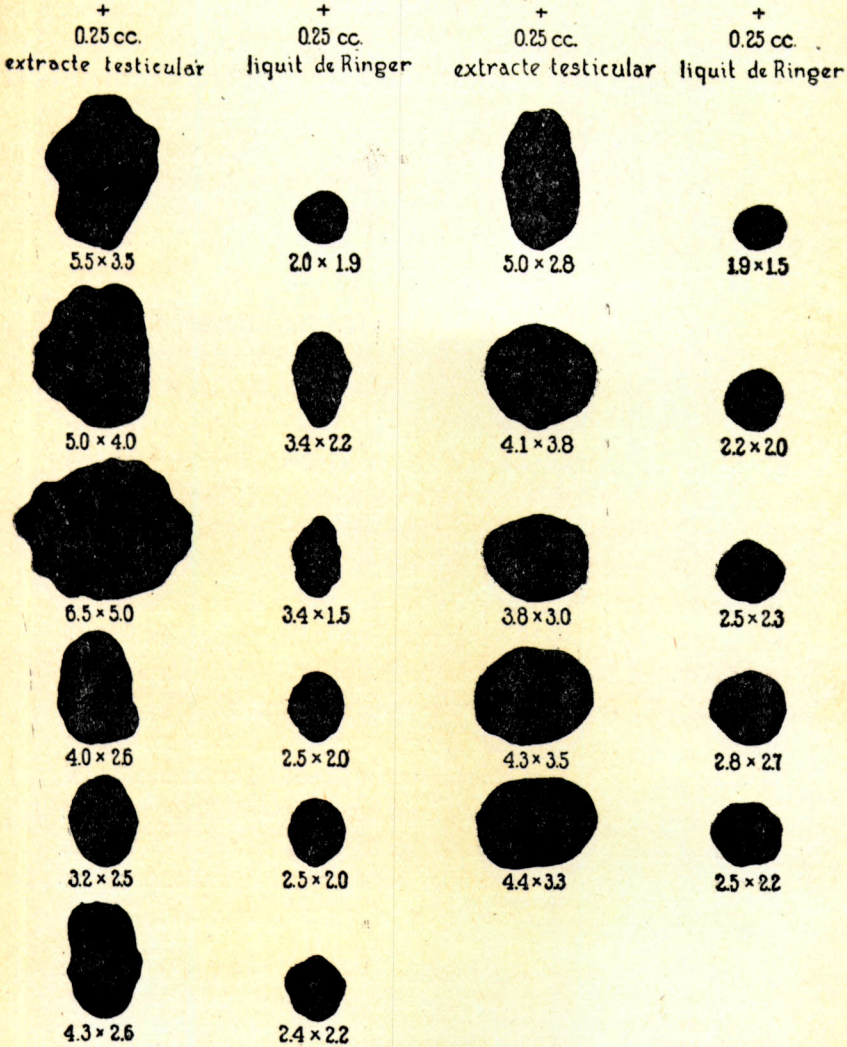


Fig. 1. — Area subcutània i dermis. Extracte testicular més blau de Prússia amb lleuger tenyit per la hematoxilina. S'hi veuen senyals nombrosos grànuls de blau continguts dins de cèl·lules, assenyalats per les sagetes.



Fig. 2. — Area subcutània i dermis. La mateixa amplifi-
cació. Tinta xinesa més extracte testicular i tenyit amb àcid
píric. Mostra el mateix fenomen de la fig. 1, però en una
forma més marcada.

Area de difusio de
0.25 cc de tinta Xina



Làmina I

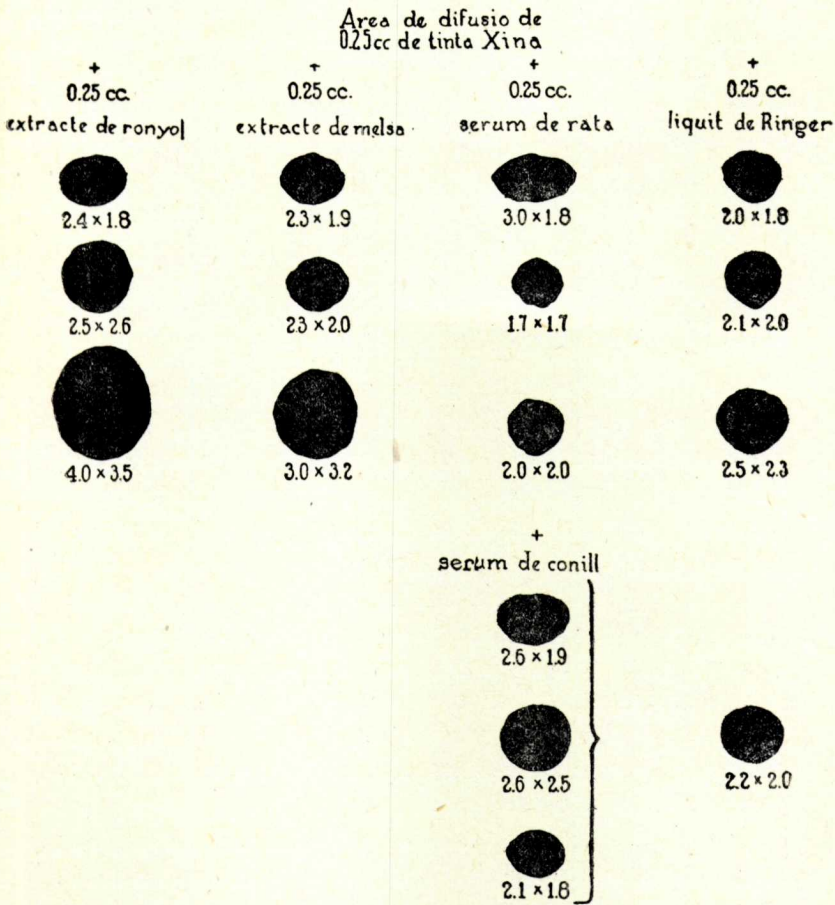
dament a una curta distància del punt d'injecció, i les partícules eren generalment independents de les cèl·lules. En tots dos casos, la tinta difonia solament a través dels espais connectius, i el cos de Malpigi, les fibres musculars i els fol·licles pilosos n'estaven lliures. Solament en alguns rars casos, i on s'havia injectat l'extracte testicular, podien veure's algunes partícules entre les fibres musculars, però no se'n veié cap que hagués travessat el sarcolema¹.

INFLUÈNCIA DELS EXTRACTES DE RONYÓ, MELSA I SÈRUM SANGUINI SOBRE LA DIFUSIÓ DE LA TINTA XINESA

Els experiments anteriors demostren que el factor Reynals augmenta la difusió a través dels teixits dels materials en solució i de les partícules. Aquesta propietat pot ésser responsable, almenys en part, de l'exaltació de les infeccions. El paralelisme entre la difusió i el fenomen d'exaltació fou ben aviat provat per un estudi de la influència d'altres extractes d'òrgans. Els resultats d'aquests experiments poden veure's en la làmina II.

En ella pot comprovar-se que els extractes d'òrgans pertanyents al grup I, el grup exaltant, tenen un efecte similar al de l'extracte testicular, però l'extracte renal causa un grau de difusió inferior i els resultats no són tan constants. El sèrum sanguini de la rata o del conill, que té una influència inhibidora sobre les infeccions, no augmenta la difusió de la tinta xinesa, sinó que àdhuc,

1. En relació amb això, és interessant de fer observar que l'extracte testicular no fa tornar permeable al blau de metilè la conjuntiva sana, quan la barreja de colorant i extracte s'instil·la en l'ull; ni la paret del tub digestiu es torna més permeable a les proteïnes, perquè els animals no es sensibilitzaven en alimentar-los amb proteïnes heteròlogues més extracte testicular.



Làmina II

de vegades, interfereix. L'extracte esplènic, que és també un inhibidor, en una prova donà una difusió lleugerament augmentada, però en les altres fou inactiva en aquest punt. Els resultats comparatius es veuen millor en la làmina III, on es donen les àrees mitjanes de difusió produïdes per extractes de diferents òrgans.

INFLUÈNCIA DE L'EXTRACTE TESTICULAR SOBRE LA LOCALITZACIÓ DEL BLAU DE METILÈ

Com ja s'ha assenyalat, el blau de metilè i el blau de tripan injectats intravenosament tendeixen a localitzar-se en àrees afectades per processos patològics. El fet té una possible relació amb la localització del virus vacunal en l'àrea de pell que ha rebut una injecció d'extracte testicular. En aquets experiments s'injectaren colorants intravenosament a conills que havien rebut en la pell afaitada extracte testicular.

S'injecta intradèrmicament 1 cc. d'extracte testicular en dues àrees separades, a quatre conills; immediatament després se'ls injectà intravenosament de 10 a 20 cc. d'una solució a l'1 per 100 de blau de metilè. Poc després de la injecció de colorant, les àrees tractades es tornaven pàl·lidament blaves, però el color ben aviat desapareixia. Quan s'injectaven 20 cc. del colorant, tota la pell afaitada, junt amb el nas i els llavis de l'animal, presentaven un lleuger color blavós, que era més marcat, no obstant, en les àrees cutànies injectades. En alguns casos, després de pocs minuts, aquestes àrees emblanquien més que la pell dels voltants, segurament degut a la reducció del colorant per part de les cèl·lules vivents. La base d'aquesta suposició està en què quan l'àrea de pell emblanquida s'extirpava i es submergia en una solució

Mitjana de les àrees de difusió
en 11 experiències

amb extracte testicular



4.5 x 3.5

amb líquit de Ringer



2.5 x 2.1

Mitjana de les àrees de difusió
en 3 experiències

amb
extracte de ronyo



2.9 x 2.6

extracte de melsa



2.8 x 2.3

serum de rata



2.2 x 1.8

serum de conill



2.4 x 2.0

amb

líquit de Ringer



2.2 x 2.0

de peròxid d'hidrogen, s'observava una reaparició del color blau. Els punts de control injectats amb sèrum o extracte esplènic no presentaven cap coloració més intensa que la de la pell veïna.

L'EFECTE DEL FACTOR REYNALS SOBRE LES TOXINES I ELS ENZIMES

Provàrem més endavant de determinar l'efecte in vivo del factor Reynals sobre les toxines i les diastases.

Tripsina. — A dos conills se'ls injectà en la pell afaitada 1'5 cc. d'una barreja feta diluint tripsina de Fairchild-Foster a 1:100 i afegint-li el mateix volum d'extracte testicular. Dues altres àrees de control reberen la mateixa quantitat de la solució de tripsina diluïda amb el seu mateix volum de solució de Ringer. Les barreges de tripsina i d'extracte testicular difonien immediatament després de la injecció a través d'una àrea molt més gran que el material de control, com ho demostra la desaparició de la bua. La lesió resultant, no obstant, era de la mateixa extensió en cada una de les quatre àrees.

Toxina tetànica. — En dos experiments en dotze cobais, d'un pes d'entre 200 i 300 gr., s'emprà toxina tetànica d'un M. L. D. de 0,000066 cc. Aquesta toxina es diluí a 1:10000. Aleshores s'injectà subcutàniament en la part interna de la pota posterior en les quantitats consignades en la taula I, junt amb extracte testicular de rata o amb solució de Ringer, com a control. Com pot veure's en la taula I, no solament l'acció de la toxina no fou exaltada, sinó que, en un cert grau, la seva acció fou inhibida.

TAULA I

Número dels cobais	Quantitat de toxina tetànica	Quantitat d'extracte testicular de rata	Solució de Ringer	Tetanus local resultant
	cc.	cc.	cc.	
1	2'64	0'5	—	++++ (mort en 5 dies)
2	1'98	0'5	—	+++
3	1'32	0'5	—	+++
4	1'32	0'5	—	+++
5	0'66	0'5	—	+++
6	0'33	0'5	—	+
7	2'64	—	0'5	++++ (mort en 4 dies)
8	1'98	—	0'5	++++ (mort en 6 dies)
9	1'32	—	0'5	+++
10	1'32	—	0'5	+++ (mort en 24 h.)
11	0'66	—	0'5	+++
12	0'33	—	0'5	+++

Endotoxina del B. coli. — Es filtrà un cultiu de *B. coli* en brou vell de dues setmanes a través d'un filtre Berkefeld V i el filtrat s'injectà en la pell afaitada de tres conills, junt amb extracte testicular de rata. Les barreges de control de les endotoxines amb solució de Ringer s'injectaren igualment. Aquesta endotoxina produí, de les dotze a les vint-i-quatre hores, lesió rogenca, elevada amb bords clarament tallats, fàcilment mesurada i que desaparegué dels tres als quatre dies. Aquest extracte testicular no augmenta les dimensions de la lesió, com pot veure's a la taula II.

Així, els tres agents, tripsina, toxina tetànica i endotoxina del *B. coli*, que són actives per elles mateixes, però són substàncies inanimades, no eren exaltades en llur activitat pel factor de Reynals, malgrat el fet que llur difusió, com pot veure's per la velocitat de desaparició de la bua inicial, era afectada.

TAULA II

Experiment	Toxina del B. coli	Extracte testicular	Solució de Ringer	Dimensions de la lesió resultant
	cc.	cc.	cc.	cm.
1.....	0'5	0'5	—	5 × 3'5
	0'5	—	0'5	5 × 4
	1'0	1'0	—	5'5 × 3'8
2.....	1'0	—	1'0	7'3 × 3'7
	0'5	0'5	—	7'2 × 4'5
	0'5	—	0'5	8 × 3
3.....	0'5	0'5	—	6 × 6
	0'5	—	0'5	6 × 5'5
	1'0	1'0	—	9 × 6
	1'0	—	1'0	5'5 × 4

LA INFLUÈNCIA DEL CALOR SOBRE EL PODER PROPAGADOR
DEL FACTOR REYNALS

Hem determinat prèviament que el poder exaltant de l'extracte testicular sobre el virus vacunal es perd quan es calenta l'extracte a 60° durant mitja hora. No es féu cap prova sobre si l'escalfament interferia en la difusió de la tinta xinesa. A un conill se li injectà, en dues àrees, cada una de les barreges següents : tinta xinesa més el seu volum d'extracte testicular fresc; tinta xinesa amb l'extracte que havia estat escalfat a 60°; tinta amb extracte escalfat a 80° per 30 m. i, com a control, la tinta diluïda en solució de Ringer. Es presentà una difusió de més de quatre vegades l'àrea del control en el punt injectat amb l'extracte testicular fresc, mentre les barreges que contenien els extractes escalfats no donaren una difusió més gran que en el cas del control. Evidentment, l'escalfament a 60° destrueix, no solament el poder d'exaltar el virus, sinó també el d'augmentar la difusió de la tinta xinesa.

RELACIÓ DEL FACTOR REYNALS AMB LES CÈL·LULES ESPERMATOGÈNIQUES DELS TESTICLES

Observacions anteriors han demostrat que solament resulta una exaltació molt petita de les infeccions, quan en resulta alguna, dels extractes preparats a partir de testicles criptorquídics en els quals la funció espermatogènica està pràcticament absent, però que, ja se sap, són rics en teixit intersticial. Els últims experiments, comprenent quatre proves, han revelat que els extractes de l'epidídim de la rata o del conill tenen un poder exaltant tan intens com els extractes testiculars. En una prova, l'esperma de conill presentà una considerable quantitat de factor exaltant. Creiem, doncs, que és justificat relacionar el factor Reynals, en el testicle, amb l'esperma i amb les cèl·lules espermatogèniques, de divisió activa. Que aquest factor no és el mateix que l'hormona sexual del mascle ens ho ensenya l'absència de cap poder exaltant en els lipoides testiculars, tan actius en provocar el creixement de la cresta i les barbes en els galls castrats.¹ Un de nosaltres treballa ara per a determinar la naturalesa i la localització en els teixits del material exaltant.

DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Els experiments de aquesta nota demostren que l'extracte testicular fa que les partícules de tinta xinesa

1. Volem expressar el nostre agraïment al doctor Koch de la Universitat de Xicago per haver-nos donat la seva activa preparació de lipoides testiculars.

i les de blau de Prússia es propaguin molt més extensament a través dels espais intercel·lulars que suspensions similars fetes en solució de Ringer. El blau de metilè inoculat intravenosament es localitza més extensament en àrees prèviament injectades amb extracte testicular que en les àrees de control que rebien injeccions d'extractes de teixits sense poder exaltant. Els extractes renals tenien aquesta propietat en un grau menor, mentre els extractes esplènics i el sèrum sanguini n'eren faltats.

El poder de propagació dels extractes és destruït per escalfament a 60° durant trenta minuts, com ho és el poder d'exaltació d'infeccions. El mecanisme d'acció del factor Reynals no és exactament conegut, però els resultats d'aquests experiments suggereixen que pot dependre, almenys en part, de la propietat per la qual l'extracte testicular augmenta la difusió dels materials injectats i altera la permeabilitat de les cèl·lules dels teixits. No és inconcebible que els canvis en la permeabilitat facilitin el pas del virus vacunal a través de les cèl·lules endotelials dels vasos sanguinis i limfàtics, i portin a la infecció vacunal generalitzada, que és freqüent en els resultats consignats (20).

Ha estat demostrat que els fluids i les suspensions de partícules inertes difonen més amb l'extracte. Les exotoxines tetàniques, les endotoxines del *B. coli* i la tripsina no són exaltades en llur acció, malgrat difondre en un àrea més ampla en els teixits. Els virus, per altra banda, són marcadament influïts, i en aquest punt s'assemblen a les bacteries, no a les toxines ni als enzimes. Sembla probable que una capacitat definida per a multiplicar-se sigui una condició perquè la substància injectada vegi els seus efectes exaltats. Pot concloure's amb reserves que el poder exaltant de l'extracte testi-

cular pot dependre de la propietat que, no solament fa difondre el material injectat, sinó que, a més, fa les cèl·lules més fàcilment penetrables pels agents.

*Laboratoris de The Rockefeller
Institute for Medical Research. New York.*

BIBLIOGRAFIA

1. *Duran-Reynals, F.*, *Compt. rend. Soc. Biol.*, 99, 6, 1928.
2. *Duran-Reynals, F.*, *J. Exp. Med.*, 5, 827, 1929.
3. *Duran-Reynals, F.*, i *Suñer-Pi, J.*, *Compt. rend. Soc. Biol.*, 99, 1908, 1928.
4. *Hoffman, D. C.*, *J. Exp. Med.*, 53, 43, 1931.
5. *Thompson, R.*, *J. Exp. Med.*, 51, 777, 1930.
6. *Pijoan, M.*, *J. Exp. Med.*, 53, 37, 1931.
7. *Ledingham, J. C. Y.*, i *Barratt, M. M.*, *Lancet*, 2, 515, 1929.
8. *Carrel, A.*, *J. Exp. Med.*, 17, 14, 1913.
9. *Carrel, A.*, i *Ebeling, A. H.*, *Compt. rend. Soc. Biol.*, 89, 1142, 1923.
10. *Drew, A. H.*, *Brit. J. Exp. Path.*, 3, 20, 1922; 4, 46, 1923; *Lancet*, 2, 204, 785, 1916.
11. *Zakrewski, Z.*, *Z. Krebsforsch.*, 30, 106, 1929.
12. *Mailland, H. B.*, i *Mailland, M. C.*, *Lancet*, 2, 596, 1928.
13. *Mailland, H. B.*, i *Laing, A. W.*, *Brit. J. Exp. Path.*, 11, 119, 1930.
14. *Rivers, T. M.*, *Haagen, E.*, i *Muckenfuss, R. S.*, *J. Exp. Med.*, 50, 181, 1930.
15. *Rho, F.*, *J. Trop. Med.*, 33, 103, 1930.
16. *Nagell, H.*, i *Langhaus, J.*, *Munch. Med. Woch.*, 77, 450, 1930.
17. *Murphy, J. B.*, *Monografia de The Rockefeller Institute for Medical Research*, n.º 21, New-York, 1926.
18. *Menkin, V.*, *J. Exp. Med.*, 50, 171, 1929; 51, 285, 1930.
19. *Friedheim, E. A. H.*, *Frank. Z. Path.*, 35, 549, 1927.
20. *Stewart, F. W.*, i *Duran-Reynals, F.*, *J. Exp. Med.*, 50, 341, 1929.