

LES ESTRUCTURES FIBROSES ARGIRÒ- FILES EN ELS CULTIUS MESENQUIMATOSOS DE DIFERENTS ORÍGENS I DE DIFERENTS VELOCITATS DE CREIXEMENT

per

J. BOFILL I DÉULOFÉU

Si preparem cultius de teixits mesenquimatosos dels més diversos òrgans d'embrions de pollet, al cap d'uns quants replantats no es pot comprovar cap diferència en la forma de les diferents cultures, en la disposició de les cèl·lules o en la manera com aquestes s'uneixen, que pugui recordar llur diferent origen. Debem a R. C. Parker, col·laborador d'A. Fischer, l'observació extraordinàriament important que tals cultius, morfològicament idèntics, provinents de diferents parts del cos (cor, múscul esquelètic, ossos del crani i cartílag esfenoidal del mateix embrió de pollet), que foren replantats deu cops seguits, no acusen el mateix creixement residual ni la mateixa reaccionabilitat enfront de les substàncies excitadores del creixement de l'extret, sinó que segons quin és llur origen, es caracteritzen per aquestes dues propietats fisiològiques.

Es planteja, doncs, la qüestió de si cultius mesenquimatosos de diferent origen, que en el que es refereix

a la forma de cultiu i a la morfologia cel·lular semblen completament idèntics, poden manifestar diferències característiques per producció de productes de diferenciació. És per aquest motiu que en el present treball hem intentat de comprovar com es comporten les estructures fibroses argiròfiles, que són visibles amb la tècnica de Del Rio Hortega, en els cultius mesenquimatosos de diverses parts del cos del mateix embrió de pollet, així com els d'embrions diferents.

Per a aquesta investigació no s'escolliren absolutament els mateixos òrgans que havia adoptat Parker, sinó que partírem dels següents teixits d'embrions de pollet de catorze dies : cor, part mesenquimatososa de l'iris, cartílag articular, frontal. Els motius d'aquest procedir diferents de Parker són els següents : el cor i el múscul esquelètic ens semblen massa semblants; per a l'esfenoides tenem per insegur que plantéssim trossos ossis o cartilaginosa, mentre que en el cas del frontal i del cartílag articular (amb pericondri) això és completament cert.

Per tant, de les parts indicades d'un embrió plantàrem uns divuit trossos, cada un dels quals era gros d'1 mmc. aproximadament. El cultiu es feia en petites plaques de mica com a cultius en cobreobjecte, en una gota de plasma estesa en superfície (d'un diàmetre almenys de 15 mm.) amb una gota d'extracte embrionari. El replantat es feia tres cops a la setmana. Com a extret servia per als cultius de cor el «centrifugat 2», per als altres el «centrifugat 3».¹

Per a preparar l'extracte s'aixafaven embrions de pollet de vuit dies en la premsa de Fischer, la papilla era centrifugada, el líquid d'expressió és el nomenat «cen-

1. Així s'obté la mateixa intensitat de creixement de les quatre races.

trifugat 1». A la papilla que resta un cop extret aquest líquid, s'afegeix el mateix volum de Tyrode; el líquid que queda després de centrifugació reiterada és el «centrifugat 2», dit abreujadament Z 2. Per aspiració, nova addició de Tyrode, i centrifugació, s'obté el «centrifugat 3», o abreujadament Z 3. L'extracte utilitzat no era mai més vell de cinc dies després de la seva preparació.

A cada replantació es cultivaven almenys catorze cultius de cada raça, dividint en general els cultius en dues meitats. Passat un temps les parts components característiques del tros de teixit original (cartílag i os) havien desaparegut, no hi havia escampades més que cèl·lules rodonejades, i la forma cel·lular i la densitat dels dipòsits, així com la intensitat del creixement, eren fins a cert punt iguals. Aquesta constància dels caràcters era obtinguda després de sis a set repicats, i des d'aleshores es podia parlar de «cultius purs». No compremem amb aquest nom idees histogenètiques de cap mena. Així mateix, sense lligar-hi cap mena d'asseveracions histogenètiques, utilitzarem en aquest treball com a denominacions abreujades de les nostres quatre races cel·lulars immadures, mesenquimatoses, que creixen juntes, les següents:

- Cultius del cor = fibroblastes cardíacs.
- Cultius de l'iris = fibroblastes de l'iris.
- Cultius de la bòveda craniana = osteoblastes.
- Cultius del còndil femoral = condroblastes.

Per a conèixer la formació d'estructures fibroses argiròfiles en diferents fases del creixement del cultiu, la fixació tingué lloc en diferents moments, ço és, vint-i-quatre, quaranta-vuit, setanta-dues i noranta-sis hores després del darrer recanvi. De cada una de les quatre

racas s'escollien en aquests períodes indicats, cada cop dos o tres cultius, de forma que tots els cultius, en el que a creixement, forma cel·lular i disposició cel·lular es referia, coincidien tant com era possible. El contingut greixós de la gota dels cultius obtinguts era sempre petit, a excepció de les fixades després de noranta-sis hores d'incubació. Els cultius escollits eren fixats vint-i-quatre-quaranta-vuit hores a la temperatura de l'habitació en formalina al 4 per 100.

Com a tècnica de coloració utilitzarem la dita de «doble impregnació» de Del Rio, perquè dona resultats segurs i idèntics fins en els detalls. De totes maneres, cal obrar amb la màxima exactitud i meticulositat, que jo, com a deixeble del doctor Del Rio, havia tingut ocasió de practicar en talls d'òrgans en el seu laboratori.

DESCRIPCIÓ DELS MÈTODES DE COLORACIÓ UTILITZATS SOBRE ELS CULTIUS EN COBREOBJECTES

1. Fixació en formalina vint-i-quatre - quaranta-vuit hores a la temperatura de l'habitació.
2. Rentat amb aigua destil·lada corrent, almenys durant trenta minuts.
3. Nou rentat amb altra aigua destil·lada.
4. La mica es talla exactament al voltant del cultiu.
5. El trosset de mica amb el cultiu es posa en un vidret rodó amb solució al 2 per 100 de nitrat de plata, estant el cultiu a la banda de dalt. S'escalfa el vidret sobre una placa d'amiant (sobre tres peus per un petit Bunsen o una flama d'esperit, fins a 55-60°). Després de deu-quinze minuts d'escalfar, els cultius prenen un color groc fosc, i la tenyida prèvia és acabada.
6. Rentat breu amb aigua destil·lada.

7. Es posa en un vidret amb 10-15 cc. de solució d'Hortega i 3 gotes de piridina.

Composició d'aquesta solució d'Hortega:

Sol. de nitrat de plata al 10 per 100.....	5 cc.
Sol. 5 per 100 de carbonat sòdic cristal·litzat...	15 cc.

El precipitat que es forma es dissol amb la quantitat mínima possible d'amoniac, i s'afegeixen 55 cc. d'aigua destil·lada.

Es tapa el vas amb un vidre de rellotge. Ha de quedar un espai amb aire suficient per a poder agitar de tant en tant el líquid. Escalfi's com en el n.º 5, fins que els cultius hagin pres un color fort de tabac.

8. Dos a tres minuts en aigua destil·lada. Aleshores es posa cada preparat cosa d'un minut en aigua de piridina (10 cc. d'aigua destil·lada + 3 gotes de piridina); d'aquí, immediatament en formalina, amb la qual cosa té lloc un ombrejament per reducció.

9. Posi's en solució al 2 per 1000 de clorur d'or, primer en fred cosa d'uns cinc minuts, fins que apareix un color lila clar; després, cosa de quinze minuts, escalfi's sobre la placa d'amiant, fins que aparegui coloració lila fosc.

10. Fixació en solució de hiposulfit sòdic al 5 per 100, un minut.

11. Deshidratació en alcohol cada cop més concentrat, xilol; posar en bàlsam de Canadà.

Quan la coloració és reeixida, es veu això següent : el color general és sobretot violeta-negre, però això no és d'importància decisiva; les fibres són negres, principalment les primes, les més gruixudes existents en el centre del cultiu són sovint violeta-rogenques; els nuclis cel·lulars negres, tan aviat difosos com estructurats; els

cossos cel·lulars són la majoria incompletament tenyits, i precisament d'un violeta clar; les perllongacions generalment incolores. Però no és així per a les cèl·lules de les vores del cultiu, en les quals tant el cos cel·lular com les perllongacions són més aviat clarament tenyides. El coàgul és tenyit de violeta i apareix com a completament desprovist d'estructura.

Les nostres recerques es refereixen a cultius repicats diferents vegades, que a partir del setè o vuitè replantat són designats com a «cultius purs». En el que fa referència a les fibres argiròfiles, en aquest treball ens cenyirem a les estructures fibroses fortes dirigides sobretot circularment i radialment. Aquestes estructures són visibles a 100-200 augments, i moltes vegades ja a 40, a la vora del tros central i en la zona de creixement interna (figures 1-4). Les fibres dirigides radialment fan la majoria de les vegades la impressió de rígides o de tenses i tivants.

Les dades que es troben en la literatura sobre les fibres argiròfiles en els cultius de teixits són, gairebé sense excepció, provinents d'experiències de cultiu, la producció i utilitat quantitativa de les quals fins ara no ha estat obtinguda. Per tal motiu no és oportuna una comparació amb els resultats de M. R. Lewis, Maximow, McKinney i F. W. Ludwig. Huzella no dóna dades precises, ja que a ell manifestament el que li interessa són únicament les condicions mecàniques. Solament Momigliano Levi utilitza la tècnica de Carrel. En ell es troba també l'única utilització, fins avui, dels mètodes d'Hortega en cultius de teixits. M. Levi dóna una descripció morfològica minuciosa d'una xarxa de fibres argiròfiles fines, tridimensional, que pot estendre's fins a la vora del cultiu, i nosaltres també observarem la seva aparició en algun cas. Aquesta fina xarxa — Levi en

TAULA I

	Tros central		Zona
	Cèl·lules	Fibres	Cèl·lules
Vivent, sense colorejar	No visibles separatament	—	Fusiformes. Tupides, i per tant no essent visibles perllongacions fines. Disposades radialment
Fixada, colorejada amb alum d'hema-teïna	Quan el nombre de capes no és molt elevat, en forma de creu (particularment els nuclis). La zona més externa amb cèl·lules circulars és designada com a límit del tros central	—	Perllongacions fines, visibles en curtes extensions. Cèl·lules i nuclis dirigits radialment
Fixada i colorejada segons del Rio Hor-tega	La majoria de les vegades no són visibles els detalls	Xarxa (tridimensional) de fibres gruixudes violeta-roges i fines negres. La zona més externa, amb fibres circulars és designada com a límit del tros central	Nuclis sovint tenyits netament; cossos cel·lulars rarament reconoscibles

dóna solament imatges a 800 augments — tal com hem dit, no és objecte del nostre treball, però serà considerada en la tercera part d'aquest article. Les característiques morfològiques més importants de les estructures fibroses argiròfiles perseguides per nosaltres estan resu-

TAULA I

Zona de creixement			Coàgul
interna	Zona externa		
Fibres	Cèl·lules	Fibres	
—	Fusiformes o bifurcades en extrem perifèric. Disposades de clar en clar. Amb, sovint, fines perllongacions i anastomosis visibles	—	Sense cap estructura visible
—	Moltes perllongacions llargues, essent visible sovint llur unió amb altres cèl·lules. Cap més ramificació de les perllongacions provinents de les cèl·lules	—	Blau difòs. En la majoria dues zones tenyides més feblement: a) al voltant del cultiu, b) a nivell de la zona interna de creixement
Fibres radials mitjanes i primes, negres, que passen a fibres del tros central	Nuclis gairebé sempre visibles. Cossos cel·lulars sovint clars en la vora del cultiu	Direcció principalment radial, amb moltes ramificacions laterals fines. Sempre a l'exterior dels cossos cel·lulars	Violeta-roig difús. En la majoria dels casos dues zones menys colorejades o totalment incolores ¹ com en la tinció amb alum d'hemateïna

mides breument en la taula I, on les comparem primerament amb les vivents no tenyides, i segonament amb el preparat fixat i colorejat amb alum d'hemateïna.

1. Kapel ja indica que en cultius tractats amb AgNO_3 acostuma a quedar un halo lliure.

En el que es refereix al tros central és de recomanar distingir les tres següents coses:

1.^a *Explantat* : aquesta denominació la reduïm als trossets de teixit, que són trets immediatament de l'organisme de l'animal o de l'embrió i posats in vitro per primera vegada.

2.^a *Tros central no transformat* : és l'explantat posat en el medi, que ja es troba en les condicions de cultiu, o bé el tros obtingut per tall d'un cultiu ja plantat, sempre que siguin completament clars els seus límits de tall, i no hagi tingut lloc una relaxació o una condensació digna de menció.

3.^a *Tros central transformat* : els límits del tall estan esborrats, existint relaxació o condensació; la vora del tros central és indeterminada en el preparat vivent; en el colorejat es caracteritza per la direcció circular de les cèl·lules — com ja ha establert Olivo — i les fibretes — com hem trobat nosaltres.

Quan en el nostre treball, i particularment en les taules, utilitzem l'expressió «tros central» sense altra addició, ens referim al tros central transformat, ja que totes les lectures de les experiències tingueren lloc vint-i-quatre hores almenys després del repicat, quan el creixement dels cultius era intens.

Entenem per zona de creixement el que és generalment entès per aquesta denominació; el concepte de balanç de creixement serà exposat més tard. En la zona de creixement trobem no solament les cèl·lules, sinó també les estructures fibroses argiròfiles dirigides amb predomini complet radialment. Des del límit del tros central fins aproximadament la meitat de l'amplada de la zona de creixement, parlem de «zona interna de creixement», i d'aquí fins a la vora, de «zona externa de creixement».

Entenem per coàgul el medi desprovist de cèl·lules al voltant del cultiu, quan sols ha de tractar-se d'una caracterització topogràfica. Però al final també tractarem del coàgul que es troba en les malles de la xarxa cel·lular, i ha de tenir-se en compte per a la formació de substàncies intermèdies, però també per al recanvi amb elles.

Els resultats de les nostres investigacions estan reunits en les taules II-V. «Raça» és la designació de l'origen dels cultius d'una determinada regió corporal.

TAULA II

*Formació de fibres en quatre races mesenquimatoses de l'embrió «c».
Replantat n.º 13. Fixat vint-i-quatre hores després del
repicat*

Raça	N.º dels cultius	Contingut en fibres		
		Troc central	Zona interna de creixement	Zona externa de creixement
Fibroblastes car- díacs.....	B 1895 b	+	+	—
	B 1896 b	+	+	—
Fibroblastes de l'iris.....	B 1900 a	±	—	—
	B 1903 a	±	—	—
Osteoblastes.....	B 1908 a	+	±	—
	B 1908 b	+	±	—
Condrioblastes. ...	B 1919 a	+	—	—
	B 1920 a	+	—	—

La caracterització dels cultius per una lletra majúscula i un número correspon als protocols seguits; els cultius amb el mateix número i distintes lletres minúscules, per exemple B 1908 a i B 1908 b, són «cultius germans», obtinguts per la divisió d'un cultiu. En les taules està indicat si existeixen (+) o manquen (—) estructures fibroses en cada zona del cultiu. Hem hagut de prescindir de les dades numèriques de la quantitat de fibres. En els

pocs casos en què existeixen fibres, però molt rares, s'ha posat en les taules el signe (\pm). A més les diferències de quantitat, espessor i disposició són tractades en el text.

Com ja ha establert Momigliano Levi, dins de les vint-i-quatre hores després del repicat poden ésser ja demostrables en la zona de creixement de molts cultius fibres argiròfiles, i inclús repartides, tupides i regulars, sobretot el cultiu, de forma que sols en roman lliure la vora més externa.

TAULA III

Formació de fibres en quatre races mesenquimatoses de l'embrió «c».
Fixat quaranta-vuit hores després del repicat

Raça	N.º dels cultius	Contingut en fibres				
		Tros central	Zona interna de creixement	Zona externa de creixement		
Transplantat 8, 28-V-93I	Fibroblastes cardíacs	B 1717 a	+	+	+	
		B 1722 a	+	+	—	
	Fibroblastes de l'iris	B 1744 a	+	—	—	
		B 1745 b	+	—	—	
	Osteoblastes	B 1724 a	+	—	—	
		B 1724 b	+	—	—	
	Condrioblastes	B 1734 a	+	—	—	
		B 1737 a	+	\pm	—	
	Transplantat 9, 30-V-93I	Fibroblastes cardíacs	B 1754 b	+	+ ¹	—
			B 1755	+	+ ¹	—
Fibroblastes de l'iris		B 1780	+	+	—	
		B 1782	+	+	—	
Osteoblastes		B 1773 b	+	+	—	
		B 1774 a	+	+	—	
Condrioblastes		B 1765	+	+	—	
		B 1764	+	+	—	

1. Les fibres aquí són considerablement més gruixudes que en les altres races.

TAULA IV

Formació de fibres en quatre races mesenquimatoses de l'embrió «c».
Fixat setanta-dues hores després del repicat

Raça	N.º dels cultius	Contingut en fibres		
		Tros central	Zona interna de creixement	Zona externa de creixement
Fibroblastes cardíacs.....	B 1855	+	+ ¹	—
	B 1856 b	+	+ ¹	±
Fibroblastes de l'iris.....	B 1869 a	+	—	—
	B 1869 c	+	—	—
Osteoblastes.....	B 1889 b	+	—	—
	B 1890 a	+	—	—
Condrioblastes. ...	B 1876	+	+	—
	B 1878	+	+	—

1. Fibres considerablement més gruixudes que en els condrioblastes.

És molt digne de menció que de les nostres quatre races a les vint-i-quatre hores sols mostren estructures fibroses els fibroblastes cardíacs en la zona de creixement. Les altres tres races en aquest període de temps malgrat de la mateixa intensitat de creixement, solament presenten fibres en el tros central. No s'ha de pensar que per motius de tècnica algunes fibres existents en la zona de creixement hagin quedat sense tenyir, ja que en el tros central tots els cultius mostren estructures fibroses netes, que serveixen en certa manera de control del tenyit. A més, com ja indicàrem, sempre fou sotmès, al mateix temps, al tenyit, un grup dels quatre cultius : un de cada raça.¹ Però sobretot es comprova la conducta particular dels fibroblastes cardíacs en re-

1. A aquells lectors que tinguin un mal concepte dels mètodes argèntics, i que no coneguin la bondat del mètode de Rio Hortega, els recomanem que vegin un tall d'òrgan (pulmó, fetge o semblant) per congelació tenyit amb aquest darrer, perquè es convencin de la claredat i la uniformitat amb què es veuen les fibres en tots els talls.

lació amb la formació d'estructures fibroses, sense excepció, inclús en els cultius fixats després de quaranta-vuit, setanta-dues o de noranta-sis hores : sempre en els fibroblastes cardíacs la formació fibrosa era la més intensa, sigui que les fibres eren molt més extenses cap a la vora que en les altres races, sigui que les fibres avançatgessin les altres races en espessor, com a la taula III

TAULA V

Formació de fibres en quatre races mesenquimatoses de l'embrió «A-M», novè i desè replantat. Fixat noranta-sis hores després

Raça	N.º dels cultius	Contingut en fibres		
		Tros central	Zona interna de creixement	Zona externa de creixement
Fibroblastes cardíacs.....	M 3515 b	+	+	+
	M 3516 b	+	+	+
	M 3518 b	+	+	+
Fibroblastes de l'iris.....	A 10777 b	+	+	±
	A 10789 b	+	+	±
Osteoblastes.....	A 10783 b	+	+	—
	A 10784 b	+	+	—
	A 10787 b	+	+	—
Condroblastes. ...	M 3523 b	+	+	—
	M 3521 b	+	+	—

de la novena repicada. El segon lloc, en la producció fibril·lar el tenen els condroblastes, mentre que queden en darrer lloc els osteoblastes i els fibroblastes de l'iris. Això no és visible en l'exposició tabular purament topogràfica, però sí en les microfotografies de la figura 4. Hem de considerar solament com a completament segura la formació fibril·lar molt més intensa dels fibroblastes cardíacs en relació amb les altres tres races. Aquesta diferència es féu així mateix clarament manifesta quan es cultivaren i es compararen les quatre races d'un segon embrió.

Com a resultat d'aquesta sèrie d'investigacions, podem, doncs, concloure el següent. Les races cultivades del cor, de l'iris, de la bòveda craniana i del cartílag articular, que d'altra manera són indiferenciables morfològicament, posseeixen una capacitat desigual de produir estructures fibroses argiròfiles. Pel contrari, les races cultivades dels mateixos llocs de diferents embrions concorden. Aquestes diferències es deuen, doncs, a la diferent història fisiològica i ontogènica de les quatre races.

Després de tot el que queda indicat, vaig creure interessant l'estudi de la interpretació exacta de les estructures fibroses argiròfiles. Un fet hem d'inferir del que ha estat fins avui obtingut : que precisament aquestes estructures representen un indicador de determinades funcions de les cèl·lules vivents. Com que en els cultius de teixits destaquen en primer terme els fenòmens de creixement, es planteja la pregunta de si existeix, i fins a quin punt, una relació entre la producció d'estructures fibroses i la intensitat del creixement. I aquesta pregunta és tant més lògica quan A. Fischer i R. C. Parker han trobat en cultius mesenquimatosos una oposició entre la velocitat de proliferació i determinades diferenciacions, com formació de substàncies fonamentals de tipus cartilaginós i fibres colàgenes.

El balanç del creixement de tot un cultiu, segons Edmund Mayer, es resum en sis factors : emigració cel·lular cap a la vora, augment de volum i multiplicació cel·lular són els positius; mort cel·lular, disminució de volum i regressió cap al centre són els factors negatius.

Actualment per a estudis quantitius ens hem de reduir a la medició d'aquest balanç sense poder comprendre els factors particulars de què es compon. Quan, en con-

seqüència, es parla de creixement, es tracta realment del *balanç* de creixement dels cultius. La medició d'aquest balanç té lloc segons el procediment d'Ebeling amidant les variacions de superfície dels cultius, ja que el gruix del cultiu en general pot ésser negligit (vegeu en Edmund Meyer els límits i l'eficiència d'aquest mètode). Prenent la superfície diàriament (en mil·límetres quadrats) com a ordenada, i el temps com a abcisa, s'obtenen corbes de creixement. Afegint substàncies excitadores del creixement, tals com extracte embrionari, es pot governar fins a un cert punt tal creixement. Per als fibroblastes cardíacs, en particular, la corba de creixement puja ràpidament amb l'elevada concentració de l'extracte, mentre que segueix més baixa per a les concentracions baixes. Per aquest motiu, i perquè els fibroblastes cardíacs manifestaren la producció més intensa d'estructures fibroses argiròfiles escollírem aquests fibroblastes cardíacs per a les recerques que segueixen.

A) *Cultius en ampolles*. — Per a graduar el creixement variant les concentracions dels extractes resulta especialment apropiat el cultiu en ampolles de Carrel; perquè, primerament, amb elles es treballa amb quantitats de líquid més grosses que en els cultius en cobreobjectes; segonament, resulta possible un canvi parcial del medi sense repicat del cultiu, amb la qual cosa es poden obtenir períodes de creixement més perllongats i acció més persistent de la concentració corresponent d'extracte. La taula VI ensenya l'acció de la concentració de l'extracte sobre el creixement.

TAULA VI

Formació de fibres en fibroblastes cardíacs («B») en cultius en ampolles, de diferent intensitat de creixement. Replantat n.º 40, fixat als set dies de fet

N.º dels cultius	Concentració de l'extracte	Dimensions dels cultius en mmc. després de		Fibres	
		0 hores	7 dies	Tros central	Zona de creixement
I202 a	0'1	1'7	41'4	+	+ ¹
I203 a	0'1	1'2	39'2	+	+ ¹
I205 a	0'3	1'4	49'4	+	+ ¹
I205 b	0'3	1'2	45'0	+	+ ¹
I206 a	0'4	1'2	76'1	+	+ ¹

i. No es jutja de la quantitat ni de l'extensió de les fibres.

Els medis nutritius de les ampolles de 3'5 c. de diàmetre tenien la següent composició: la fase sòlida (1'5 cc.) era sempre la mateixa, a saber: 0'5 cc. de plasma de pollet + 0'9 cc. de Tyrode i 0'1 cc. d'extracte (centrifugat I). La fase fluida (0'5 cc.) variable en la forma següent:

Tyrode	Extracte	Expressat en % del centrifug I	Inscripció a les taules
0'45	0'05	10	0'1
0'4	0'1	20	0'2
0'35	0'15	30	0'3
0'3	0'2	40	0'4

Els cultius eren dipositats, abans d'omplir-la del medi de cultiu, en el fons de la ampolla amb una petita gota de plasma. Al final dels set dies, durant els quals la fase fluida havia estat renovada dues vegades, es procedia a fixar el cultiu + el medi en l'ampolla. Després de dos dies de fixació es treien els cultius, i el coàgul que voltava al cultiu era retallat.

L'elaboració histològica ulterior era com segueix:

en la platina del microtom de congelació es provocava la formació d'un petit trosset de glaç, i la seva superfície es tallava ben llisa amb el microtom : al damunt d'aquesta superfície es deixava gelar amb molta cura el cultiu, i aleshores es tallava.

Procedint d'aquesta forma obteníem talls de gruix uniforme, en els quals la coloració de les estructures fibroses segons el mètode de Rio Hortega s'efectuava molt bé. Però es comprovà que cap tall havia agafat exactament el cultiu per complet, i que això tampoc no era possible obtenir-ho amb cap artifici. Com que precisament la part més externa del cultiu era la que es perdia sempre, no pot jutjar-se del límit fins al que s'estenen les fibres. En aquesta avinentesa, observem que tampoc altres investigadors no han assolit encara englobar tot el cultiu en un tall, i, així, la solució de problemes d'índole histotopogràfic en tals preparacions és, ara per ara; possible solament d'una manera limitada.

Per a poder jutjar de les condicions existents en la zona interna de creixement, en certs casos n'hi ha prou amb talls parcials o amb els sectors dels cultius que amb aquesta tècnica s'obtenen. Però per al nostre problema això no ens és suficient, ja que tampoc no poden obtenir-se els sectors de cultius amb la regularitat que és necessària per a una comparació dels de creixements diferents. Haguérem de renunciar, doncs, a les experiències en ampolles.

B) *Cultius en cobreobjectes*. — Passarem, doncs, per a obtenir preparacions totals, als cultius en cobreobjectes, i ens contentarem amb ells per tal d'obtenir diferències marcades de creixement amb dues diferents concentracions d'extracte. De les dues cultures germanes obtingudes per divisió d'un cultiu, una d'elles era cultivada amb centrifugat 2, segons la tècnica descrita a la

pàgina 181 (inscrit a la taula VII com a concentració de l'extracte 1'0), mentre que l'altra sols rebia el 10 per 100 (o sigui 1 part de centrifugat 2 + 9 parts de Tyrode, inscrit a la taula com o'1).

TAULA VII

(Es refereixen a ella les corbes figs. 5 i 6). Formació de fibres en fibroblastes cardíacs («B») cultivats en cobreobjectes, i amb diferent intensitat de creixement. Transplantat n.º 59. Fixat a les quaranta-vuit hores

N.º dels cultius	Concentració de l'extracte	Dimensions dels cultius en mmc. després de			Fibres	
		0 hores	24 hores	48 hores	Tros central	Zona de creixement
1783 a	1'0	2'7	11'6	27'0	+	+
1783 b	0'1	2'1	6'1	11'5	+	—
1784 a	1'0	2'0	10'2	22'7	+	+
1784 b	0'1	1'8	5'4	10'1	+	—
1785 a	1'0	2'5	11'2	25'9	+	+
1785 b	0'1	1'9	8'9	14'0	+	—
1786 a	1'0	2'4	11'7	24'1	+	+
1786 b	0'1	2'0	6'2	14'4	+	—
1787 a	1'0	1'3	10'3	21'8	+	+
1787 b	0'1	1'2	5'3	9'8	+	—
1788 a	1'0	0'9	8'0	17'5	+	+
1788 b	0'1	1'0	4'5	9'4	+	—

El creixement era seguit per dibuix de la projecció, cada dia, en la forma coneguda, i a la taula VII es donen els valors absoluts amidats planimètricament. Quan la diferència de la intensitat de creixement després de quaranta-vuit hores era prou neta, els cultius eren fixats. A la taula 7 hi ha els resultats d'una sèrie d'experiències segons aquest mètode. En alguns casos, degut a què les diferències eren massa reduïdes, es repicava de nou en les mateixes condicions, amb la qual cosa la diferència de creixement era, a les quaranta-vuit hores després, sempre clara, i podia resultar la fixació. La coloració de les pre-

paracions totals fou, com més amunt, pel procediment de Rio Hortega.

Per a donar una idea del creixement intens per concentració elevada de l'extracte, i del creixement feble per concentració inferior d'extracte, reproduïm les corbes de

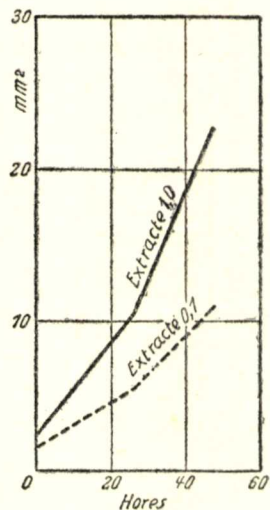
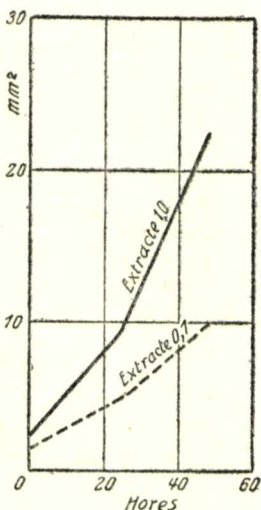
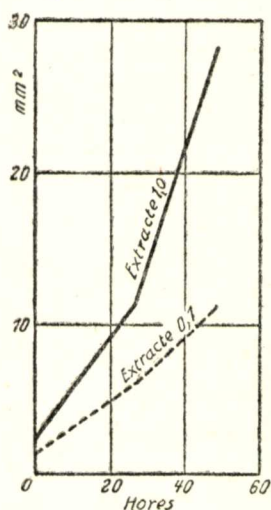


Fig. 5

Fig. 6

Fig. 5 (taula VII). — Corbes de dos parells de cultius. Intensitat de creixement directament proporcional a la concentració de l'extracte. A l'esquerra, cultius 1783 a i b, a la dreta 1784 a i b.

Fig. 6 (taula VII). — Corbes dels valors mitjans de totes les parelles de cultius. Valors mitjans dels cultius a — i dels b, - - - -.

dues experiències (fig. 5), així com les corbes mitjanes de totes les experiències (fig. 6). A la taula VII pot veure's el comportament de les fibril·les en les diferents intensitats de creixement.

Com a resultat, veiem que els cultius de creixement

ràpid formen més estructures fibroses argiròfiles que els que creixen lentament.

Aquest resultat sorprenent és remarcat en el paràgraf quart; i allí es tracta de la naturalesa de les estructures fibroses, que ha d'ésser discutida primerament.

L'aparició de les estructures fibroses argiròfiles ha d'estar en relació amb determinades capacitats de les cèl·lules vivents, ja que l'extensió d'aquestes estructures en la zona de creixement ha resultat funció de la velocitat de creixement. Aquests resultats són independents de la naturalesa de les estructures fibroses argiròfiles. Malgrat això, s'imposa naturalment la pregunta de quin significat cal acordar a aquestes estructures.

Fins ara les estructures fibroses argiròfiles han estat joguina de diferents concepcions : òptiques, mecàniques, histogenètiques, químiques, coloidoquímiques, es barreja-ven en confusió.

Hem de dir abans que tot, que gairebé totes les estructures histològiques són apreciables per mètodes nitro-argèntics, inclús per qualsevulla modificació dels mètodes d'Hortega, i que, finalment, poden també contenir sistemes fibrosos argiròfils, fins formacions inorgàniques, tals com gels sabonosos, segons van Herwerden. El fet de l'afinitat argèntica per si sol, doncs, no prova res. Però la gran regularitat amb la qual es poden fer patents les estructures fibroses — tots els cultius (quasi 200) les presentaven almenys en el centre — parla en absolut en pro de l'existència regular d'estructures preformades en els cultius vius.

Ara bé ¿és que les estructures ja existeixen en els cultius vius exactament iguals que com els veiem en el preparat segons Hortega? Podria tractar-se d'ordenacions micelars lliures, que per la impregnació argèn-tica o per la fixació s'ajuntessin prenent forma fibrosa.

A aquest respecte cal fer dues menes d'observacions : primerament, que les fibres fines de la zona de creixement passen insensiblement a constituir les fibres gruixudes de la zona central (fig. 7). Segonament, que des del punt de vista coloidoquímic, els límits entre una ordenació de micles lliures i una estructura fibril·lar estan salvats per les experiències i recerques d'Ettisch i Szegvari, que comprovaren micles túpides i de forma allargada com a elements de les fibril·les del teixit conjuntiu.

A penes si hem de considerar altres estructures transformades. Seria anar massa lluny si es volgués estigmatitzar com a «producte artificial»¹ una variació eventual de la distància intermicelar deguda al nostre mètode.

Quant a la significació de les estructures fibroses argiròfiles des del punt morfològic quedem, doncs, reduïts a considerar-les com a límits cel·lulars, fibrina, o fibres de teixit conjuntiu (fibres reticulars).

Les estructures fibrinoses argiròfiles es deixen diferenciar fàcilment des del punt de vista morfològic dels límits cel·lulars i de les perllongacions cel·lulars, per dues propietats. Primerament, les fibres, com pot veure's a la figura 8, estan situades entremig dels cossos cel·lulars i estan dividides diverses vegades. En oposició a això, les perllongacions cel·lulars en els cultius de teixits mesenquimatosos no són mai ramificades (fig. 9), i sovint s'uneixen amb les cèl·lules veïnes. El terme «unió» és conside-

1. El terme «producte artificial» no ha d'ésser un pretext per a prejudicis, sinó que més aviat li cal en cada cas una justificació (Magnus Cohn). Per altra part, inclús les estructures que sols poden ésser produïdes pel mètode utilitzat, tenen un valor indicador considerable, si es poden obtenir amb regularitat. De forma molt instructiva pot veure's l'aparició de les noves estructures en els estudis sobre vels de gels de Grassberger, en els quals les diferents bactèries produeixen en cultius per picat de gelatina, segons que s'hi afegeixi àcids, gasos, colorants, etc., formes completament rares de vels, canelobres i flors. Aquests «productes artificials» ens obren noves perspectives sobre la vida bacteriana.

rat aquí estrictament en sentit òptic; no hem de discutir si es tracta de fusió o de simple contacte (veure a aquest respecte les investigacions detingudes de G. Levi). Segonament, ha de fer-se remarcar que les fibres grosseres de la part central semblants a un enreixat de cristall, no seran preses mai per ningú com a límits cel·lulars, i aquestes fibres passen a constituir estructures fibroses de la zona de creixement absolutament sense interrupció, com pot veure's a la figura 7.

La demostració efectiva que les nostres estructures fibroses argiròfiles no són límits o perllongacions cel·lulars la dóna la següent experiència de digestió amb la tripsina. Els cultius fixats amb formol foren sotmesos durant períodes de temps diferents a la digestió trípica (una punta de ganivet de tripsina, 10 cc. d'una solució al 0'3 per 100 de K_2CO_3) a 39°. Després de vuit hores de digestió, el coàgul comença a tornar-se més tou, els cossos cel·lulars ja no són visibles, però els nuclis són encara feblement reconeguts amb la coloració d'Hortega. Després de divuit hores el coàgul i el cultiu són tan destruïts, que ja no és possible de trobar sobre la mica cap resta de cultiu. En el període intermedi de dotze hores, el coàgul està molt reblanit, però no completament liquificat. Els nuclis cel·lulars ja no són posats de manifest amb la coloració d'Hortega, i amb coloració a l'alum d'hemateïna; encara són feblement tenyits un cert nombre. Però les estructures fibroses argiròfiles, després d'aquesta digestió de dues hores, persisteixen exactament (fig. 10) com en els preparats no digerits. No pot tractar-se, doncs, de límits cel·lulars.

Queda encara la qüestió de si es tracta de fibres del teixit conjuntiu — fibres reticulades — o de fibrina. L'experiència de digestió que acabem d'indicar parla en pro de fibres conjuntives, ja que la fibrina del coàgul

seria destruïda, i malgrat tot, les fibres segueixen conservades. Per altra part, sembla que a penes existeixen investigacions sistemàtiques de la resistència de les fibres del teixit conjuntiu, particularment en comparació amb les de fibrina. Indiquem solament una observació de Policard, segons la qual les fibres reticulades, a diferència de les colagenes, són molt resistents enfront d'accions químiques i fermentatives (*Histologia fisiològica*, 2.^a ed., pàg. 249). Pel contrari, com és sabut, la fibrina es té com a molt fàcilment digerible.

Podria pensar-se encara que una fibrina transformada donés les estructures fibroses argiròfiles. Arribem amb això al problema general del naixement eventual de fibres conjuntives a partir de fibrina.

Baitsell ha intentat de demostrar que tal formació de fibres conjuntives té lloc sense la col·laboració cel·lular. Declara que en cultius de teixits apareixen fibrilles conjuntives en el coàgul acel·lular, a partir de la «xarxa de fibrina»; que en ferides en via de curació es formen fibrilles conjuntives de la crosta, abans que hi hagin emigrat fibroblastes, i que es produeixen fibres grosses per accions mecàniques sobre el plasma que coagula (introducció d'un fil de seda), colorejables segons Mallory. A nosaltres ens interessa solament la primera part de la demostració, que deu basar-se en els cultius de teixits. En contradicció amb Baitsell, en el coàgul acel·lular que es troba en la part externa de la zona de creixement, ni Momigliano Levi ni nosaltres no poguérem descobrir estructura fibrosa argiròfila de cap mena. Les cultures de Baitsell de totes maneres no són exactament comparables amb les de M. Levi i les nostres, perquè no s'hi ha obtingut una proliferació digna de menció del trosset explantat. Finalment, les poques fibres que hi ha, que segons Baitsell han de representar en el preparat

vivent les fibres conjuntives — visibles en la part clara —, són molt més gruixudes que els nostres sistemes fibril·lars argiròfils de la zona interna de creixement. La xarxa de fibrina, que ha d'ésser representada a les figures 7, 9 i 10, segons Baitzell, no és visible malgrat el gran augment.

Però inclús prescindint d'aquest treball de Baitzell, la «xarxa de fibrina», que d'un punt de vista general ha de servir com a bastida a les cèl·lules mesenquimatoses en els cultius de teixits segons investigacions del nostre laboratori, es basa únicament en suposicions errònies.

Amb la tècnica de Weigert (aigua d'anilina-violeta de genciana) representàrem les estructures fibroses grosses i més fines en el coàgul greixós del cor de cadàver humà, així com les xarxes de fibres més fines dels alveols pulmonars d'una neumònia fibrosa. Pel contrari, la coloració de Del Rio Hortega sols donava en aquest mateix coàgul cardíac grànuls en desordre, i de cap manera estructures fibril·lars. En el mateix pulmó neumònic, la coloració segons Rio Hortega fou positiva per a les fibres reticulars de la paret alveolar, mentre que en les llums hepatitzades no aparegueren estructures fibroses de cap mena.

A la vegada que aquests preparats d'òrgans, es colorejaren preparats totals de cultius de teixits segons la tècnica de Weigert, però no donaren cap estructura en xarxa. A més, es conservà durant molts dies en el termostat, coàgul de plasma + extracte (sense cultiu), i aleshores es fixà i es colorejà, perquè, segons una observació de Ricker i Regendanz (pàg. 138), en moltes formes de fibrina sols resulta positiva la coloració de Weigert després d'estada perllongada del coàgul. La coloració, però, resultà també negativa en els nostres coàguls «envellits». Per a poder utilitzar la tècnica que es considera

com la més segura del mètode de Weigert per a la fibrina, s'obtingué un coàgul sense tros de teixit en una ampolla de Carrel, es fixà amb alcohol, s'incloué en parafina, i es tallà. Tampoc aquí no pogueren trobar-se estructures fibroses de cap mena amb la coloració de Weigert.

Així, doncs, no podem reconèixer una ordenació en xarxa visible de la fibrina en el coàgul dels cultius de teixits. Amb això es treu el fonament a la hipòtesi de Bait-sell, de la producció de fibril·les conjuntives a partir de la «xarxa fibrinosa dels cultius de teixits». El mateix succeeix per a les recerques de Huzella, almenys les dirigides en aquest sentit.

Cal preguntar-se com ha estat que la doctrina de la «bastida de fibrina» en els cultius de teixits ha arrelat tant, malgrat que ningú no l'ha vist mai. Tres fets semblen haver cooperat al tal fi: 1.^o El que en les formes millor conegudes de coagulació plasmàtica apareixen estructures fibroses macroscòpiques o microscòpiques (fibrina filamentosa). 2.^o L'observació que les cèl·lules tisulars mesenquimatoses, quan es prescindeix de plasma en el medi, necessiten d'un reforç sobreafegit com flocs de cotó o tela d'aranya per a poder créixer. 3.^o Potser la tendència fibril·lar del plasma incompletament coagulat, que també s'observa en produir-se el coàgul per a cultius de teixits.

Tots tres punts poden ésser refutats. No cal la floculació del fibrinogen per a conduir a una xarxa perfecta. Segons noves investigacions d'Albert Fischer en el medi desproveït de plasma, també s'han acreditat com a suports plaquetes de celofan i de mica, que es posen en les ampolles de Carrel. L'estat de viscositat amb tendència fibril·lar no ha d'ésser equiparat amb les fibres visibles microscòpicament; segons les investigacions de Paul Weiss, més aviat són estructures ultramicroscòpiques

produïdes per tensions en el coàgul, les que serveixen com a esquelet conductor de les cèl·lules que van creixent. Weiss parla singularment, encara, d'una «xarxa de fibrina», malgrat que les seves preparacions no mostren més que estratificacions de làmines grosseres, però cap xarxa.

Així, doncs, les estructures fibroses argiròfiles apareixen en un coàgul plasmàtic que no conté cap xarxa microscòpica de fibrina, sinó solament estructures ultramicroscòpiques preformades.

Seria potser cosa a cercar si altres mecanismes de coagulació també ofereixen distintes condicions prèvies per a la producció de fibres argiròfiles. Actualment, però, la sola modificació que es pot associar amb un bon creixement de cultiu és l'adició d'heparina. Segons Albert Fischer, la primera fase de la floculació del plasma amb extracte té lloc molt diferentment segons que s'hi afegeix heparina o no. Foren preparades, doncs, cultures en plasma heparínic + extracte i es cercaren les fibres argiròfiles.

A 1 cc. de plasma s'afegiren 6 gotes d'una solució a l'1 per 1,000 d'heparina. Una gota d'aquesta barreja + una gota d'extracte formaren el coàgul del cultiu en cobre-objecte. La coagulació fou molt retardada. Triàrem com a cultius la raça de fibroblastes cardíacs que ja coneixem per la seva producció fibril·lar, de la taula VI i VII, que aleshores es trobava en el seu 80^e replantat.

El resultat, després de quaranta-vuit hores de creixement, fou, així mateix, de nombroses i fortes fibril·les argiròfiles en la part central i en la zona interna de creixement, com en els cultius fets sense heparina.

Si es confirma la hipòtesi de Momigliano Levi, que també en cultius en sèrum sense plasma es produeixen estructures fibroses, ja no caldria més cap relació amb la fibrina.

Per a la formació de fibres argiròfiles ha d'atribuir-se el paper principal a les cèl·lules vives, proliferants. És imprescindible la col·laboració de les cèl·lules, perquè en el coàgul desprovist de cèl·lules no apareix cap fibra. Si les cèl·lules condueixen a la formació de fibres per ferments del plasma, o del sèrum del medi, com admeten Policard i M. Levi, o bé si l'acció recíproca entre cèl·lules i medi condueix a espessaments mecànics en el medi, o bé si les fibres són precisament secrecions cel·lulars, ha de quedar avui enlaire. La diversitat de les races mesenquimatoses en relació amb la producció de fibril·les, és compatible amb els tres mecanismes.

Queda encara per a ventilar la nostra observació que els fibroblastes cardíacs, quan creixen fortament, produeixen moltes fibres en la zona interna de creixement, i no en produeixen quan el creixement és feble. Aquesta observació està en contradicció amb el que han trobat altres autors, i de bell antuvi sembla també contradir determinades concessions teòriques ben fonamentades.

Així, encara fa poc von Möllendorf deia que en cultius de teixits solament s'havia observat una formació de fibres en condicions de creixement molt dolentes, però no quan el creixement era bo, i que, per tant, la diferenciació fibril·lar anava junta amb una disminució del poder de creixement.

Però actualment, de les diferents publicacions en les quals podria recolzar-se aquesta manera de veure, solament en el treball d'A. Fischer i Parker es donen de manera inequívoca, tant les condicions del cultiu com les intensitats del creixement, i també la tècnica histològica, i és per això que ens reduïrem a una comparació entre aquest treball i els nostres resultats. Fischer i Parker obtenien amb llur procediment del creixement perllongat, sense extracte, en ampolles de Carrel, un creixement neta-

ment més lent que en el cultiu amb extracte. En aquests cultius amb creixement retardat es formaren fibril·les en proporció molt diferent de la que havien vist aquests autors en els altres cultius. Les dades es refereixen a la part central i a la zona interna de creixement; les fibril·les foren posades de manifest, en preparats tallats, per la coloració de Mallory. Fischer i Parker — junt amb altres arguments — dedueixen d'aquestes observacions un antagonisme fonamental entre proliferació i diferenciació.

Com que nosaltres poguérem servir-nos ja de les suggerències i les experiències de Fischer i Parker, poguérem millorar en alguns punts la disposició de l'experiència per a la nostra investigació. Prenguérem les fibres argiròfiles com a criteri de diferenciació, perquè la seva presentació no depèn de la tècnica de coloració com en el cas de les fibres colàgenes. Ja exposarem abans, que els preparats totals de cultius en cobreobjectes ens donaren una visió millor de la formació de fibres que els preparats en tall de cultius en superfície. La comparació de la formació de fibres en el creixement fort i en el feble, el duguérem a cap immediatament en cultius partits. Finalment, per a aquesta investigació triàrem, en lloc dels condroblastes de Fischer i Parker, fibroblastes cardíacs perquè — com diguérem anteriorment — formen fibres argiròfiles amb la màxima intensitat, i perquè, variant la quantitat d'extracte, són molt fàcilment influenciables en llur creixement.

En tals circumstàncies podem considerar els nostres resultats com a tan segurs com els que més puguin avui ésser-ho. És possible, però, que en relació amb la relació entre creixement i la formació de fibres, els condroblastes es comportin diferentment que els fibroblastes cardíacs. Potser també el període de creixement, que dura setma-

nes, dels cultius en flascons sense extractes, fa de mal comparar amb els períodes de creixement de pocs dies dels cultius en cobre-objectes.

Malgrat els nostres resultats aparentment en contradicció, considerem des del punt de vista teòric l'antagonisme admès per Fischer, com a un postulat molt interessant, pel que hom es veu obligat a analitzar el problema amb més cura.

Sols es podria assegurar un paral·lisme entre proliferació i diferenciació, si les cèl·lules, que es troben precisament en partició mitòtica, cedissin al mateix temps al medi substàncies formadores de fibres. Però si el poder de formar fibres per cada cèl·lula sols és exercit en el moment en què precisament canvia de forma i de situació, i amb això coopera a la configuració de la zona de creixement, però que no es divideix aleshores, existeix de fet un antagonisme entre la fase de diferenciació i la de proliferació.

Però el destí de cada cèl·lula queda en obscuritat en les experiències de cultius de teixits aquí aportades. Tant Fischer i Parker com nosaltres mateixos, hem mesurat solament el balanç de creixement de tots els cultius en el qual — com ja fou dit abans — l'augment cel·lular sols constitueix un factor.

Partint de les nostres investigacions podem, doncs, dir tan sols que quan creix molt el balanç de creixement, la formació de fibres és més intensa que quan el creixement és lent, però que el mecanisme d'aquest procés encara és completament desconegut.



Fig. 1. M 3515 b (taula V). — Fibroblastes cardíacs, novè repicat, fixat noranta-sis hores després, i colorejat segons del Rio Hortega. Vegeu la part central completament fosca, zona interna de creixement clara amb fibres argiròfiles; radials; les estructures fibroses més fines de la zona de creixement més externa no són visibles a aquest augment. Augment trenta-sis vegades.



Fig. 2. B 1724 b (taula III). — Osteoblastes, al novè transplantament, fixat quaranta-vuit hores després, i colorejat segons del Rio Hortega. A la vora del tros central fibres argiròfiles predominantment circulars. Augment cent deu vegades.



Fig. 3. M 3523 b (taula V). — Condroblastes, al desè repicat, fixat a les noranta-sis hores, i colorejat segons del Rio Hortega. En la zona interna de creixement, prop del tros central, fibres argiròfiles predominantment radials. Cent deu augmentes.

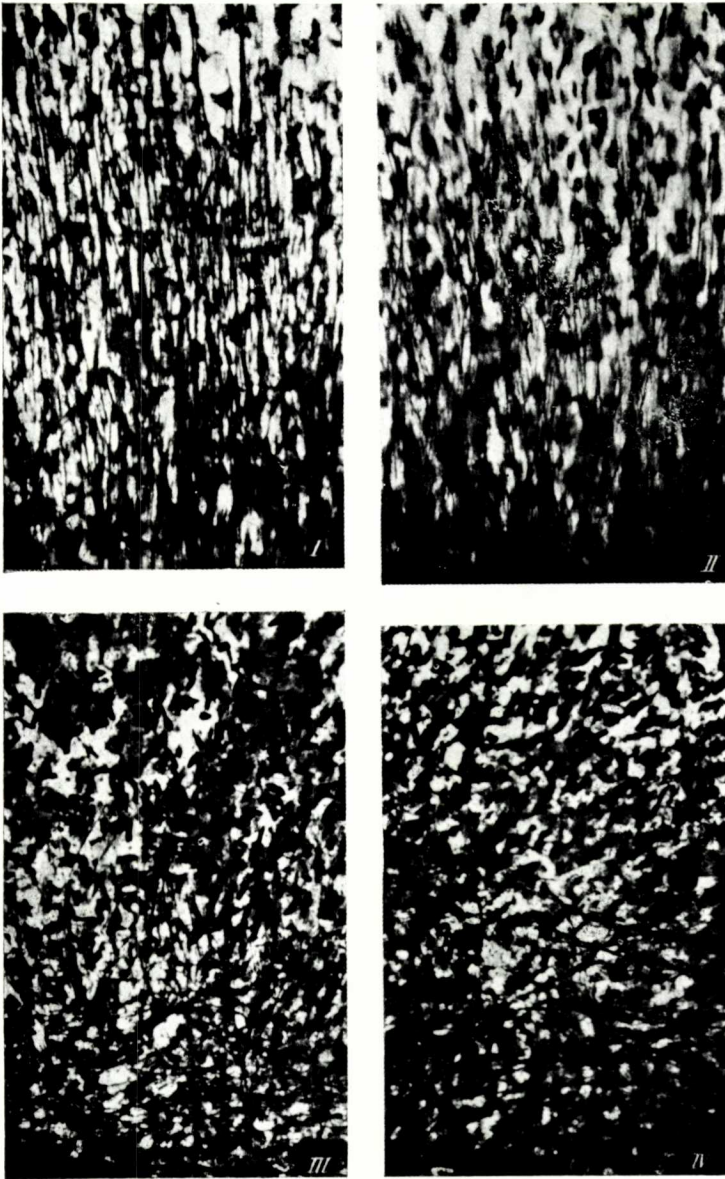


Fig. 4 (taula III).—I : fibroblastes cardíacs (B 1722 a); II : condroblastes (B 1737 a); III : osteoblastes (B 1724 a); IV : fibroblastes de l'iris (B 1745 b). Tots del mateix embrió, transplantat vuitè, fixat quaranta-vuit hores després, i colorejat segons del Rio Hortega. Les parts centrals dels cultius corresponen a la part inferior dels clixés. En les zones internes de creixement es veuen fibres radials amb la major intensitat en I, amb menor a II, i gairebé manquen en III i en IV. Cent vuitanta augments.

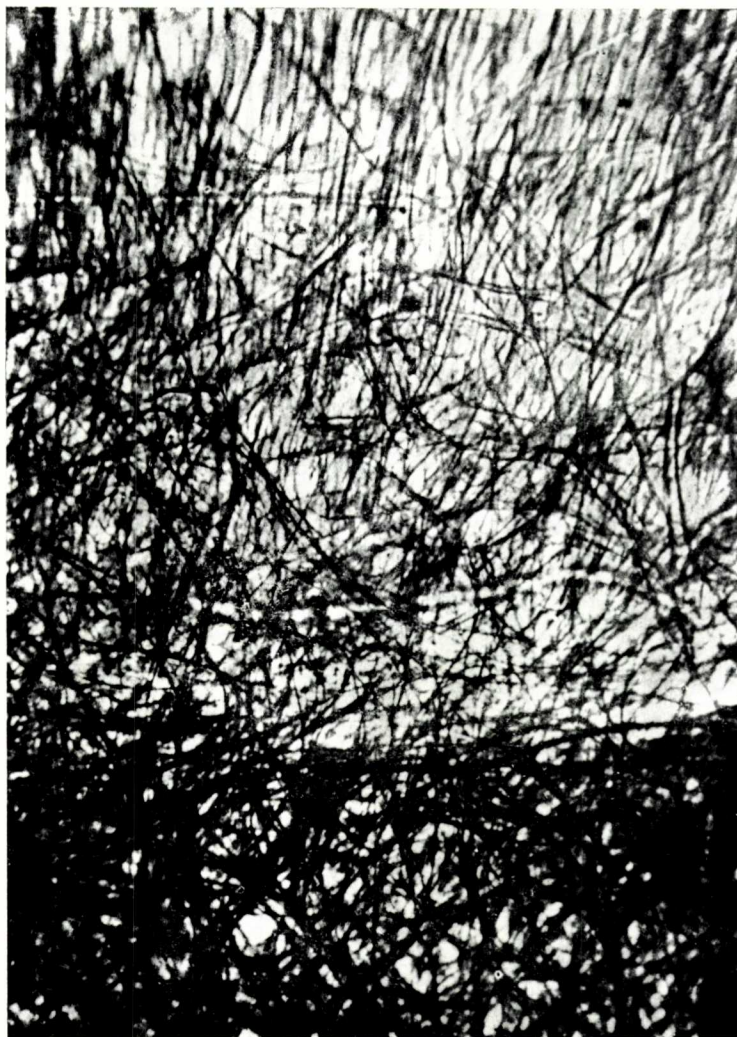


Fig. 7 W 3818 b. — Fibroblastes cardíacs al quart transplantat, fixats quaranta-vuit hores després, i colorejats segons del Rió Hortega. Pas de les estructures fibroses grosseres en entrellat de cove de la porció central (part inferior de la figura) a les més fines de la zona interna de creixement. Augment cent seixanta vegades



Fig. 8. M 3516 (taula 5). — Fibroblastes cardíacs al novè repicat, fixat a les noranta-sis hores i colorejat segons del Rio Hortega. Tros de la vora a gran augment (l'aspecte global d'aquest cultiu s'assembla al de la figura 1) : fibres argiròfiles finament ramificades es troben entre les dues cèl·lules visibles com a taques fosques, sense relació amb els límits cel·lulars. Nou-cents augments.

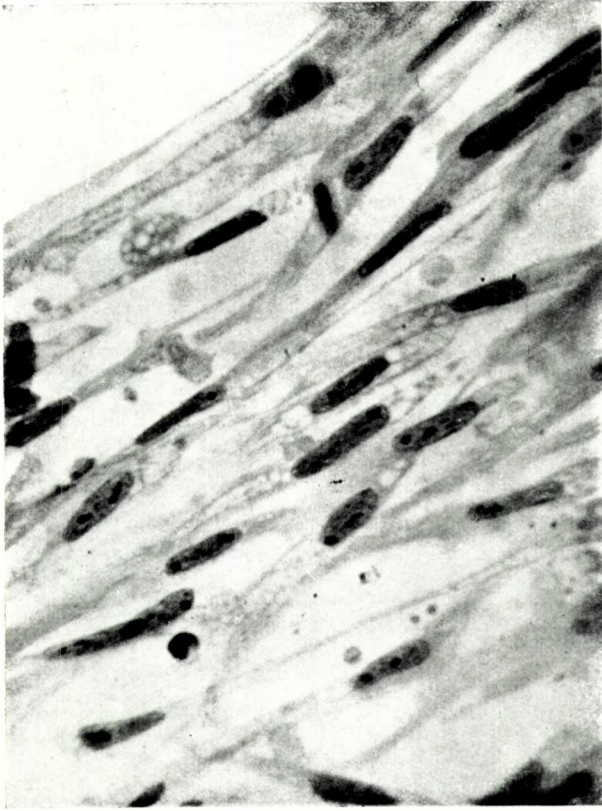


Fig. 9. M 3517 b. — Fibroblastes cardíacs de la mateixa raça que en la figura 8, transplantat novè, fixat a les noranta-sis hores de canviar el medi. Tenyit amb alum d'hemateïna. Les perllongacions protoplasmàtiques llargues de les cèl·lules (regió de la vora, com en la figura 8) no estan ramificades i no tenen cap semblança amb les estructures fibroses argiròfiles. Sis-cents augments.



Fig. 10. B 1959 b. — Fibroblastes cardíacs, repicat n.º 15, fixat a les setanta-dues hores de canviar el medi; digerit després, durant dotze hores, amb tripsina, i llavors colorejat segons del Rio Hortega (zona interna de creixement) : cossos cel·lulars destruïts, nuclis no colorejats, però fibres argiròfiles colorejades exactament com en els cultius no digerits. Cent deu augments.

RESUM

1. Amb el mètode de Del Rio Hortega poden comprovar-se estructures fibroses argiròfiles en els cultius de teixits mesenquimatosos, sempre en la part central.

2. En la zona interna de creixement apareixen les estructures fibroses argiròfiles molt fortament en els fibroblastes cardíacs, més feblement en els condroblastes, i gairebé gens operant amb osteoblastes i fibroblastes de l'iris.

3. Les estructures fibroses argiròfiles fortes de la zona de creixement apareixen solament en els fibroblastes cardíacs que creixen intensament, però no en els que ho fan lentament.

4. Les estructures fibroses argiròfiles són un producte de les cèl·lules vivents; encara és insegura la participació i les condicions d'aquesta participació del medi.

5. Les estructures fibroses argiròfiles no poden néixer d'un reticle de fibrina microscòpic, perquè no existeix aquest en el coàgul dels cultius de teixits.

6. De les experiències que antecedeixen no pot treure's cap conclusió immediata sobre la relació quantitativa entre l'augment cel·lular (proliferació) i la formació de fibres (diferenciació), perquè sols es pogué determinar el balanç de creixement, no la proliferació cel·lular pura.

*Laboratori per l'Estudi del Creixement de Teixits.
Institut de Patologia del Städtischen Krankenhaus
Am Urban. Berlin.*

BIBLIOGRAFIA

- G. A. Baitsell, The origin and structure of a fibrous tissue which appears in living cultures of adult frog tissues. *J. of exper. Med.*, XXI, 455; 1915. — The origin and structure of a fibrous tissue formed in wound healing, XXIII, 6; 1916. — A study of the clotting of the plasma of frogs blood and the transformation of the clot into a fibrous tissue. *Amer. J. Physiol.*, XLIV, 2; 1917.
- H. Magnus Cohn, Die morphologische Abgrenzung unreifer Karzinome und Sarkome unter Berücksichtigung der neueren Anschauungen über Zellen und Gewebe. *Virchows Arch.*, CCLIX, 30; 1926.
- A. H. Ebeling, Measurement of the growth of tissues in vitro. *J. of exper. Med.*, XXXIV, 231; 1921.
- G. Ettisch i A. Szegvari, Der Feinbau der kollagenen Bindegewebsfibrillen. *Protoplasma (Berl.)*, I, 214; 1927.
- Albert Fischer, Gewebezüchtung. *Handbuch der Biologie der Gewebezellen in vitro*, 3; München; 1930.
- Albert Fischer i R. C. Parker, Proliferation und Differenzierung. *Arch. Exper. Zellforschg.*, VIII, 297; 1929.
- R. Grassberger, Mikroplastik. *Kolloidchemie der Bakteriennährböden. Abh. Gesamtgeb. Hyg. Viena*, 1929.
- Van Herwerden, Diskussionsbemerkung zum Vortrage von Huzella: «Beziehungen zwischen Blut und Bindegewebe in der Milzkultur». *Verh. II. Internat. Zellforscherkongress. Amsterdam*, 1930. *Arch. Exper. Zellforschg.*, XI, 177; 1931.
- Th. Huzella, Über histologische Gerüstbildung im Vergleich der Organisation der Gewebekultur mit der des Tierkörpers. *Ergeb. Anat. Anz.*, LXVII, 36; 1929.
- O. Kapel, Einige Untersuchungen über das Verhalten des Epithels. *Arch. Exper. Zellforschg.*, VIII, 91; 1929.
- Giuseppe Levi, Conservazione e perdita dell'indipendenza delle cellule dei tessuti. *Elementi liberi, sincizi e plasmodi nelle colture in vitro. El mateix* I, 1; 1925.
- Momigliano Levi, Ricerche sulla istogenesi delle fibre collagene e reticolari nelle colture in vitro. *El mateix* XI, 190; 1931.
- M. R. Lewis, Development of connective tissue fibers in tissue cultures of chick embryo. *Contrib. to embryology*, n.º 17 (Carnegie Inst.), 1917.
- F. W. Ludwig, Beobachtungen am explantierten Bindegewebe, mit besonderer Berücksichtigung der Fibrillenbildung. *Arch. Exper. Zellforschg.*, IX, 4; 1930.

-
- R. L. *McKinney*, Studies on fibers in tissue culture III. The development of reticulum into collagenous fibers in cultures of adult rabbit lymph-nodes. *Arch. Exper. Zellforsch.*, IX, 14; 1930.
- A. *Maximow*, Über die Entstehung von argyrophilen und kollagenen Fasern in Kulturen von Bindegewebe und von Blutleukozyten. *Zbl. Path.*, XLIII, 145; 1928. — Über die Entwicklung argyrophiler und kollagener Fasern in Kulturen von erwachsenem Säugetiergewebe. (Nach dem Tode des Verfassers herausgeg. von W. Bloom.) *Zeits. mikrosk.-Anat. Fors.*, XVII., 625; 1929.
- Edmund Mayer*, Die Grundlagen der Wachstumsmessungen an Gewebekulturen. *Arch. Exper. Zellforsch.*, X, 221; 1930.
- Wilh. von Möllendorff*, Lebenskraft und Wachstum innerhalb und ausserhalb des Körpers. Festschrift zur Reichsgründungsfeier. Freiburg, 18 gener 1930.
- O. *Olivo*, Sui caratteri morfologici di un ceppo di elementi del miocardio embrionale di pollo, coltivati «in vitro» per sei mesi. *Monit. Zool. Ital.*, XXXVI; 1925.
- R. C. *Parker*, Physiologische Eigenschaften mesenchymaler Zellen in vitro. *Arch. Exper. Zellforsch.*, VIII, 340; 1929.
- A. *Policard*, Précis d'Histologie physiologique, 2.^a edició; 1928.
- G. *Ricker i P. Regendanz*, Beiträge zur Kenntnis der örtlichen Kreislaufstörungen. *Virchows Arch.*, CCXXXI, 1; 1921.
- P. *del Rio Hortega*, Varias técnicas selectivas para la tinción del tejido conectivo-reticular. *Bol. Soc. Española Hist. Nat.*, abril de 1925.
- Paul Weiss*, Erzwingung elementarer Strukturverschiedenheiten am in vitro wachsenden Gewebe. *Roux' Arch.*, CXVI, 438; 1929.