

ESTRUCTURA DE LA FIBRA MUSCULAR ESQUELÉTICA EN CULTIVO DE TEJIDOS

W. BUÑO y C. M. FRANCHI *

Los cultivos de músculo, tanto cardíaco como esquelético, presentaron desde los primeros trabajos dedicados a ese objeto, problemas de difícil solución. Por un lado la posibilidad, repetidamente comprobada, de que el explanto cumpla procesos progresivos, es decir, hacia una diferenciación cada vez mayor del tejido. Por otra parte el hecho contrario, frecuentemente observado, de que los elementos musculares sufren una desdiferenciación, perdiendo los caracteres estructurales y funcionales del tejido a que pertenecen.

En lo que al músculo esquelético se refiere, el problema empieza con el descubrimiento de Harrison ¹ (1910) de que somitos de rana cultivados en linfa del mismo animal, se diferencian, dando origen a elementos que poseen estriación transversal. Sundwall ² (1912) y Congdon ³ (1915) lograron cultivar músculo de cobayo y de pollo, respectivamente, comprobando ambos la formación de elementos fusiformes, poligonales y a veces gigantes, sin las características de la fibra muscular estriada. Pero los trabajos fundamentales sobre el tema son los de W. y M. Lewis ⁴ (1917) y de G. Levi ⁵ (1918).

Los primeros autores demostraron que cultivando músculo de embrión de pollo en una época en que presenta ya estriación transversal, ésta se mantiene en el explanto por muchos días; en cambio no aparece en los brotes que, naciendo del explanto, cre-

cen en la zona de invasión del cultivo. Sólo una o dos veces, en un gran número de cultivos, han podido comprobar los autores americanos la existencia de estriación transversal en los brotes, y esto siempre en la zona inmediata al explanto. Las células estriadas, al ser cultivadas, pierden su estriación transversal y adoptan así una condición más embrionaria.

Por su parte Levi ⁵ (1918), en su contribución fundamental al estudio de los tejidos cultivados in vitro, estudia nuevamente la estructura del músculo esquelético en tales condiciones. Sus conclusiones no difieren de las de los Lewis, ya que reconoce la extrema dificultad de comprobar la existencia de miofibrillas con estriación transversal y que, en todo caso, esto sólo se observa en la inmediata vecindad del explanto.

De Renyi y Hogue ^{6, 7, 8} (1931, 1934, 1939) mediante el empleo de técnicas de micromanipulación en cultivos, llega a conclusiones negativas, en cuanto a la existencia de miofibrillas in vitro.

Estos autores analizan también cultivos con fondo oscuro ⁶ (1931), comprobando la ausencia de miofibrillas en las fibras que crecen en la zona de invasión, aun cuando las fibras del explanto poseen estriación transversal bien diferenciada. En el siguiente trabajo de estos autores ⁷ (1934), insisten sobre la ausencia de estriación cuando se examina las fibras vivas y su extrema rareza en material fijado y coloreado, al punto que solamente una vez pudieron comprobar estriación transversal.

* Del Departamento de Histología y Embriología. Facultad de Medicina. Montevideo.

Friedheim⁹ (1931), por el contrario, comprueba la existencia de miofibrillas estriadas, cuando examina las fibras desarrolladas *in vitro*, mediante la luz polarizada. La estriación aparece en las fibras que quedan en el límite del explanto, raramente en las radiales que de él nacen. Esta estriación se perdería por la fijación y coloración. La contracción sería para este autor estrictamente dependiente de la presencia de estriación transversal, hecho no comprobado por la mayoría de los investigadores posteriores. Péterfi y Williams¹⁰ (1934), sin embargo, comprueban las investigaciones de Friedheim. Goss^{11, 12} (1932 y 1933) estudia el problema de la formación de la estriación transversal en el músculo cardíaco. No pudo ver miofibrillas *in vivo*, aunque en ciertas circunstancias la disposición del condrioma le hiciera pensar en la existencia de estriación transversal. Pudo corregir fácilmente el error con el examen a gran aumento. La estriación aparecería en prácticamente todos los cultivos luego de cuatro a cinco semanas del explanto. En un metódico estudio comparativo entre la regeneración muscular *in vivo* y el crecimiento *in vitro*, Mauer¹³ (1939) llega a la conclusión de que en cultivos las fibras no presentan estriación transversal.

Finalmente debemos mencionar el trabajo de Chèvremont¹⁴ (1940) que niega totalmente la existencia de la estriación transversal en las fibras que se forman en cultivos. Este autor llega mismo a negar la existencia de disposiciones miofibrilares, sosteniendo que el aspecto fibrilar, que a veces presentan las fibras, es debido a la disposición longitudinal y rígida que presentan los condriocontos en estos elementos.

Nuestras investigaciones nos llevan a admitir en forma indudable la existencia de una estriación transversal bastante compleja en las células cultivadas *in vitro*, luego de fijadas y coloreadas. Esta estriación no hemos podido comprobarla en células vivas, pero creemos poder explicar este hecho.

MATERIAL Y TÉCNICA.—Hemos empleado cultivos de músculo de embrión de pollo de

siete a catorce días de incubación. El que resulta más favorable para esta clase de estudios es el embrión de once días. El músculo utilizado ha sido ya el músculo pectoral o bien músculos del muslo. Se sembraron pequeños trozos de músculo en la manera habitual en la mezcla de plasma, Tyrode y extracto embrionario en diversas proporciones. Para su estudio se utilizaban explantos de 48 horas. Se estudiaba el explanto *in vivo*, ya sea con el microscopio ordinario o con el diferencial de fases (equipo Zeiss-Winkel). Algunos cultivos se coloreaban vitalmente con verde janus o con rojo neutro. Otros eran fijados y luego coloreados. Como fijadores hemos usado el formol neutro al 10 % para las técnicas de impregnación argéntica. Para las coloraciones se usaron los fijadores de Bensley, Zenker y Helly. Se emplearon las coloraciones con hematoxilina-eosina, hematoxilina férrica de Heidenhain, y hematoxilina fosfotúngstica. Para la coloración de los lípidos se empleó la técnica de fijación y coloración simultánea en formol negro Sudán, según consejo del profesor Levi. Las impregnaciones argénticas se hicieron siempre mediante las técnicas de Río Hortega con carbonato argéntico.

Hemos empleado las variantes núcleoplasma-tica, general, doble impregnación y panóptica (Río Hortega, 1941).¹⁵ Esta última ha sido la que nos ha permitido visualizar en forma más perfecta a las miofibrillas estriadas. También hemos empleado la técnica de Polak¹⁶ para el condrioma, con excelentes resultados.

RESULTADOS

El estudio de los cultivos de 48 horas, con o sin coloración, nos muestra la disposición general que ha sido ya descrita por W. y M. Lewis y por G. Levi y luego confirmada por los autores posteriores. Son cultivos ricos, bien proliferados, en los que se observan fibras radiadas que emergen del explanto en todas direcciones y que alcanzan, a veces, dimensiones muy notables. (Fig. 4.) Es a estas fibras a las que hemos prestado especial atención. También hay gran abundan-

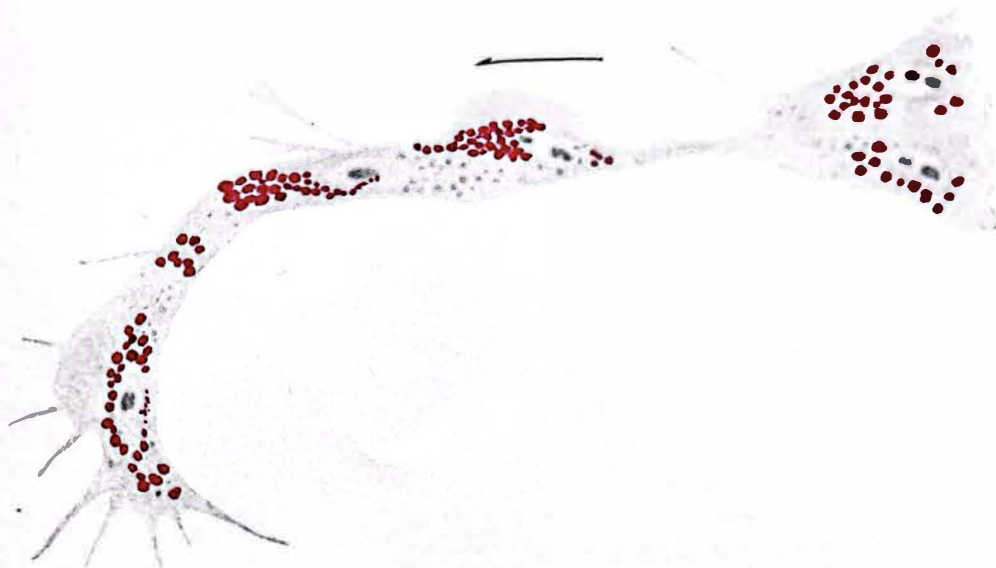


Fig. 1.— Cultivo de 48 horas de músculo esquelético del muslo de un embrión de pollo de 9 días de incubación. Coloración vital con rojo neutro. Obj. 2 mm. Inm. aceite. Oc 12x. La flecha indica la dirección del crecimiento. Se observan las vacuolas teñidas por el rojo neutro situadas en la vecindad de los núcleos. Se observan también granulaciones no teñidas y filamentos.



Fig. 2.— Cultivo de 48 horas de músculo pectoral de embrión de pollo de 10 días de incubación. Coloración vital con verde janus. Inm. 2 mm. Oc 12x. La flecha indica la dirección del crecimiento. Se observa el condrioma en forma filamentosa y granular. Se observan también las miofibrillas lisas no teñidas. Hacia la extremidad de la fibra hay una acumulación de un gran número de núcleos.



Fig. 3.— Tres imágenes del condrioma en brotes de músculo esquelético de embrión de pollo de 9 días, cultivado durante 48 horas. **A:** Porción terminal de un brote. Condriocontos largos y rígidos. **B y C:** Porción intermedia en dos brotes. 1000 diámetros.

cia de otros elementos celulares, en especial fibroblastos y macrófagos. Ha sido descrita la transformación de fibras musculares en macrófagos (Chèvremont, 1940).¹⁴ Las fibras musculares presentan anastomosis entre sí. En ellas es fácil, en general, distinguir dos tipos. Aquéllas en que, a pesar de unirse los elementos celulares, puede reconocerse todavía una diferencia muy neta en la opacidad del citoplasma y en el contenido en gránulos, vacuolas y condriomas. Esto indica que no hay una verdadera fusión entre los elementos musculares. En otros casos, en cambio, no es posible distinguir diferencias entre dos fibras que se han unido y todo hace pensar que existe una real fusión. Sin embargo, De Rényi y Hogue⁷ (1934) negaron esta fusión en base a sus experimentos de microcirugía. Los experimentos de estos autores son convincentes en lo que respecta a la individualidad de las fibras reunidas secundariamente. En algunos de nuestros cultivos, hemos podido comprobar el intercambio de miofibrillas de un modo tal que obligan a aceptar la unidad morfológica de las fibras anastomosadas. (Fig. 11.)

En los cultivos examinados sin fijación ni coloración, ya sea con el microscopio ordinario o con el diferencial de fases, el citoplasma aparece más denso que en los demás elementos del cultivo. En su interior se reconoce la presencia de núcleos, a veces unos pocos, pero a veces en gran cantidad. Esta disposición concuerda con las estructuras que se hallan en la regeneración de la fibra muscular y que han sido denominadas "Muskelnschläuche" por los histólogos alemanes. Las fibras musculares presentan vacuolas, a veces en notable cantidad, que se hallan en general en las regiones del citoplasma vecinas al núcleo. Estas vacuolas se colorean intensamente con el rojo neutro y pueden confundirse, en fresco, con las granulaciones que se hallan en la proximidad, pero que no toman el colorante vital. (Fig. 1.) De estas granulaciones no coloreables por el rojo neutro, algunas no lo son tampoco por el verde janus.

En el examen en fresco, ya sea en la parte media de la fibra o en su extremidad extendida, se comprueba la existencia de elementos condriocónticos largos y rígidos. Por ser poco flexuosos se distinguen de los condriocontos fibroblásticos, notables por su disposición ondulada. Con frecuencia los condriocontos presentan un aspecto granuloso que en el examen sin fijación ni coloración hace la impresión de una estriación transversal. Cuando la coloración vital con verde janus ha sido excesiva y aparece colorante en los núcleos, se observa que, de todos los elementos del cultivo, son precisamente los largos brotes musculares los que toman una intensa coloración difusa de todo el citoplasma. Esta coloración es mucho más intensa que la de cualquier otro elemento celular vecino.

Las miofibrillas son también visibles en fresco, ya sea con el microscopio corriente como con el diferencial de fases. Aparecen como filamentos alargados que pueden observarse hasta en la extremidad misma de la fibra. Nunca estas miofibrillas presentan estriación transversal al examen in vivo, lo que sorprende por su presencia, muy notable en los mismos preparados, luego de fi-



Fig. 4.—Zona de crecimiento de un cultivo de 48 horas de músculo esquelético de embrión de pollo incubado durante 9 días. Impregnación carbonato de plata de Río Hortega. Se observan los brotes de fibras que crecen del explanto. Ya a este aumento puede advertirse la estriación transversal en algunos elementos.

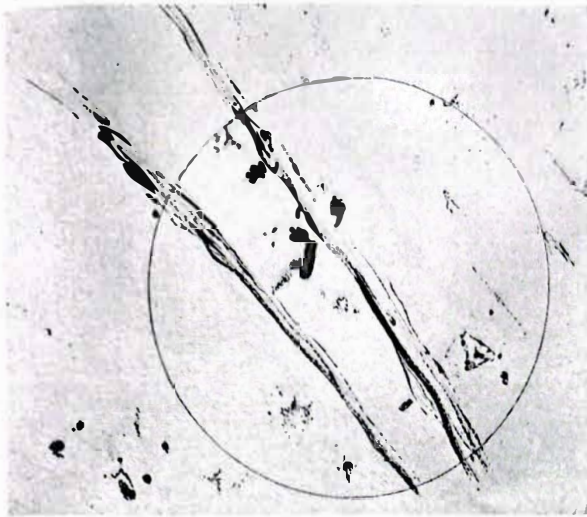


Fig. 5.— La zona rodeada por un círculo de la fig. 4, vista a mayor aumento, nos muestra con mayor precisión la estriación transversal.

jación y coloración. No siempre es fácil, en fibras vivas, distinguir entre miofibrillas y condriocontos largos y rígidos. En general, las miofibrillas pueden seguirse en una larga extensión de la fibra y son menos opacas que el condrioma. Este aparece más oscuro y más grueso y no puede seguirse en una larga extensión de la fibra como a la miofibrilla. No hay estriación transversal en las miofibrillas. A veces, la agrupación de granulaciones, puede simular una disposición estriada, pero es siempre fácil llegar a la conclusión de que no se trata de una miofibrilla estriada.

El condrioma, analizado por la tinción vital con verde janus, o bien después de fijación, con los métodos de la hematoxilina férrica y las impregnaciones argénticas, muestra en todas ellas un aspecto similar. Formas de bastón y granulosas dispuestas todo a lo largo de la fibra, más numerosas en las regiones vecinas al núcleo. (Ver figs. 2 y 3.) Hemos procurado ver si era observable alguna relación entre el condrioma y las miofibrillas en curso de diferenciación. Nuestras observaciones han sido negativas. Mediante las impregnaciones argénticas es posible teñir simultáneamente, con gran nitidez y en la misma fibra, el condrioma y las miofibrillas, mostrándose ambas estructuras

como independientes. A veces puede hallarse un condrioconto y una miofibrilla juntos, pero hace pensar que se trate de una simple relación de vecindad y no de que haya transformación de uno en otra. Según la clásica opinión de Duesberg, los condriocontos se transformarían en miofibrillas, lo que no ha sido confirmado en nuestras observaciones.

Junto a los condriocontos filamentosos se hallan, en número más o menos grande, granulaciones mitocondriales reunidas de preferencia en la vecindad de los núcleos. Tales granulaciones mitocondriales se distinguen muy netamente de las vacuolas, cuando se las colorea vitalmente. Las primeras toman el rojo neutro en tanto que las últimas no se tiñen por este colorante, tomando, en cambio, el verde janus.

En los brotes aparecen numerosas gotitas de grasa, que se hallan situadas en regiones vecinas al núcleo. Pueden coexistir con una buena diferenciación de las miofibrillas, lo que hace inverosímil que se deba a fenómenos degenerativos, y hace más bien pensar que se trate de una estructura normal dentro de la fibra.

Pero los elementos que mayor interés han presentado para nosotros, son las mio-

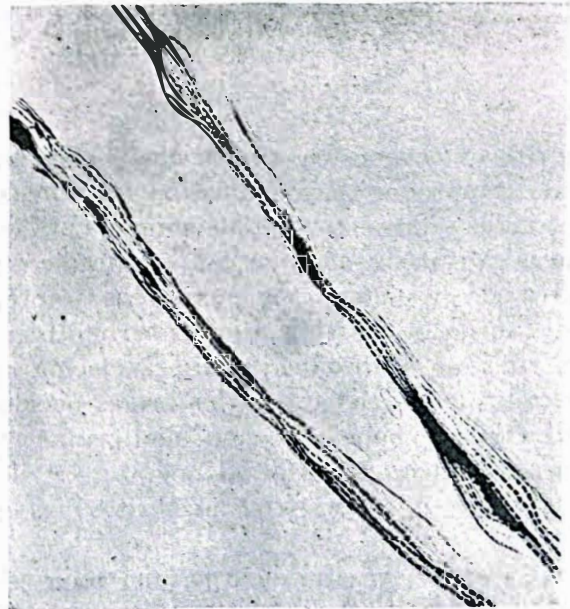


Fig. 6.— La zona rodeada por un círculo de la fig. 5 a inmersión, permite ver la estriación transversal en las fibras en regiones alejadas del explanto.

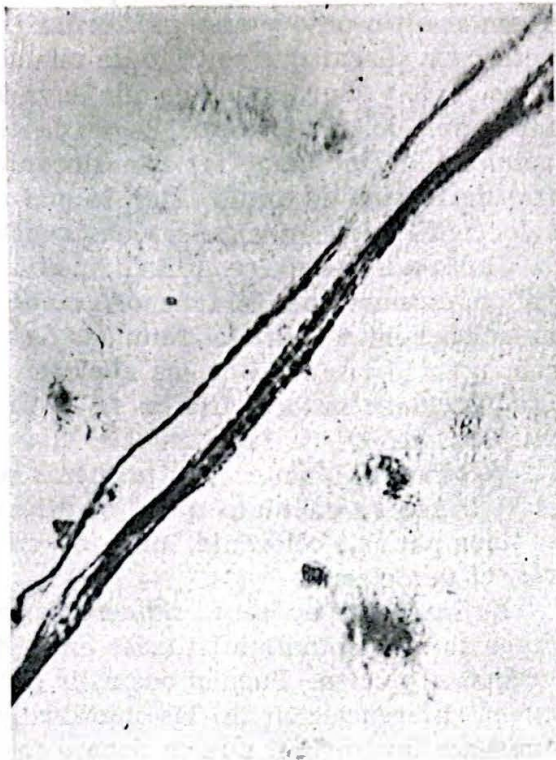


Fig. 7.



Fig. 8.

Fig. 7.—Estricción transversal en dos brotes de un cultivo de 48 horas de músculo pectoral de un embrión de pollo de 11 días. 1000 diámetros. Puede observarse la estricción transversal, incluso en uno de los brotes, muy fino, que posee tan sólo una miofibrilla. Impregnación como los anteriores.

Fig. 8.—Estricción transversal en brotes de un cultivo de 48 horas de músculos esquelético de embrión de pollo de 11 días. 1000 diámetros. Panóptica con carbonato de plata de Río Horta.

fibrillas. En nuestros preparados hemos podido comprobar la existencia de miofibrillas estriadas y presentando una compleja estructura. Naturalmente que esto contradice lo afirmado hasta hoy por numerosos autores, de que en el músculo esquelético cultivado in vitro no se produciría diferenciación de miofibrillas estriadas. En los brotes nacidos del explanto, pueden verse miofibrillas recorriendo toda la longitud del brote y llegando casi hasta su extremo libre. (Figs. 4, 5 y 6.)

En éste hay, sin embargo, una zona privada de miofibrillas y rica en condriocitos ondulados. Las miofibrillas son en número variado en los diferentes brotes, pero en general escasas, llegando a reunir ocho a diez

elementos. Cada miofibrilla presenta en forma muy neta una estricción transversal. Son también visibles, en las impregnaciones argentícas, fibrillas con todas las características de las miofibrillas, pero sin estricción transversal. Corresponden a los elementos vistos por otros autores y visibles en fresco. A veces hemos podido comprobar la continuidad de estas miofibrillas lisas con otras en que aparece la estricción transversal. La estricción está, en la mayor parte de los casos, representada por una alternancia de discos claros y oscuros (figs. 7, 8 y 9), pero pueden presentar aún mayor complejidad. Así hemos podido verificar la existencia de una estria de Hensen, muy neta, que dividía al medio el disco oscuro. (Fig. 12.) Fuera



Fig. 9.

Fig. 9.—Brotos musculares con miofibrillas estriadas en un cultivo de 48 horas de un embrión de pollo de 10 días.

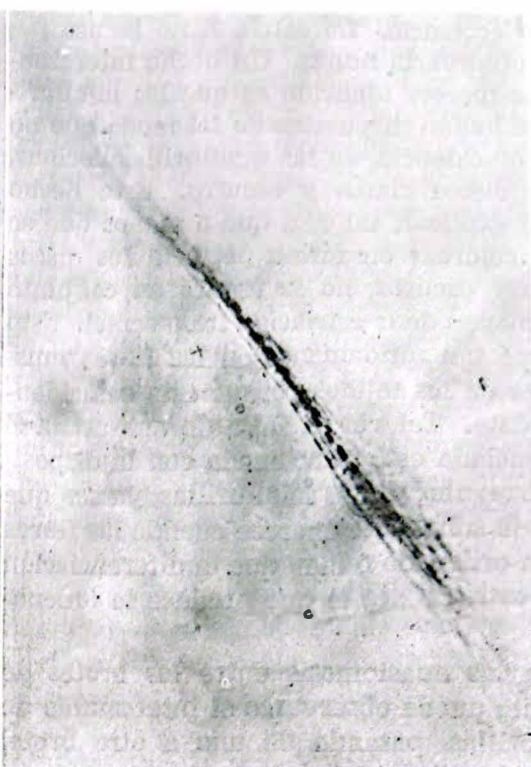


Fig. 10.

Fig. 10.—Otra imagen en el mismo cultivo de la fig. 9.

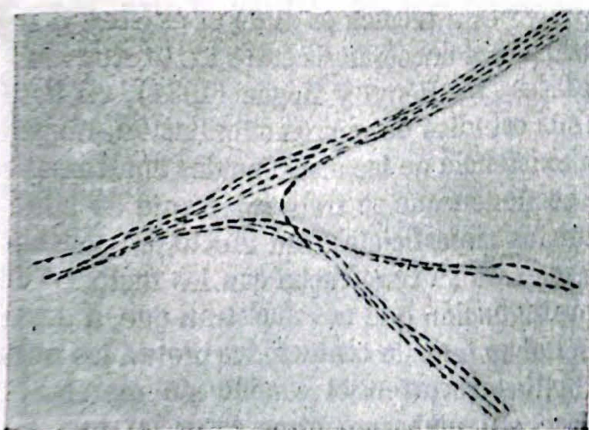


Fig. 11.—Fibras ramificadas que intercambian miofibrillas. Embrión de pollo de 10 días. Explanto 48 horas. Panóptica de Río Hortega.

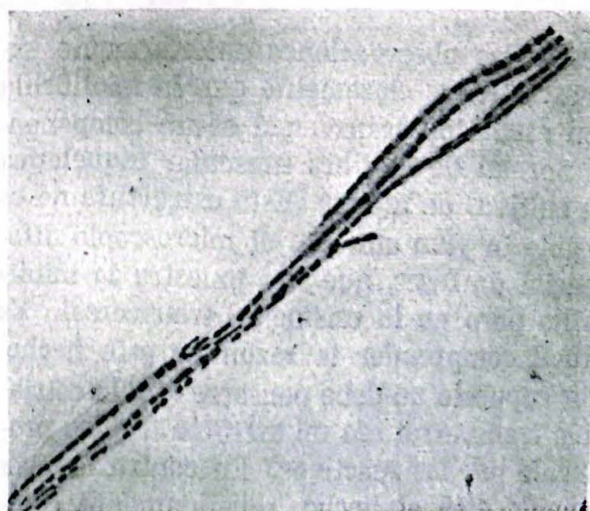


Fig. 12.—Fina estructura de las miofibrillas en que puede verse la estria H. Embrión de pollo de 11 días. Cultivo de 48 horas. Impregnación según Río Hortega.

de esto no hemos comprobado ninguna otra estria accesoria. La estria Z no hemos podido observarla nunca. Un hecho interesante que merece atención es que las miofibrillas se hallan dispuestas de tal modo que no hay coincidencia, en las miofibrillas vecinas, entre discos claros y oscuros. Este hecho puede explicar, tal vez, que a menos que se logre colorear en forma perfecta los discos claros y oscuros, no se tendrá en conjunto una imagen de la estriación transversal. Esto aparece tan nítidamente en las fibras musculares de los tejidos porque esta coincidencia existe. Tal vez la falta de una estria Z diferenciada esté relacionada con la disposición irregular de las miofibrillas, ya sea que la estria solamente aparece cuando las fibras se han ordenado o bien que la diferenciación de la estria Z sea la que produce la ordenación.

En las anastomosis entre los brotes de músculo puede observarse el intercambio de miofibrillas, pasando de uno a otro brote. (Fig. 11.) Otras veces la imagen se presenta como si al contrario, a pesar de reunirse dos brotes, sus miofibrillas presenten independencia y no se mezclen.

En un caso hemos observado una miofibrilla que dentro de la misma célula se contorneaba en 8 y se cerraba sobre sí misma.

DISCUSIÓN

De las observaciones anteriormente expuestas surge claramente que la miofibrilla con estriación transversal es un componente normal de la fibra muscular esquelética en cultivos de tejidos. Esta estructura no es visible in vivo aun con el microscopio diferencial de fases, que nos muestra la miofibrilla pero no la estriación transversal. Es difícil comprender la razón de este hecho. Por supuesto no debe pensarse que la estriación transversal sea un artificio técnico producido por los reactivos. En contra de esta opinión está el hecho, repetidamente comprobado, de que tal estriación es perfectamente visible in vivo, en los tejidos normales. La razón más importante de su invisibilidad

en cultivos, parece ser la falta de concordancia entre los discos claros y oscuros de las miofibrillas. No es posible confundir tampoco miofibrillas con condriocitos largos y rígidos. Tanto in vivo con microscopio de fases, como luego de impregnaciones argénticas, es posible diferenciar netamente unas de otros. Estructuralmente no es posible tampoco hallar una relación entre la histogénesis de las miofibrillas y el condrioma. El origen condriosómico de las miofibrillas fué sostenido por Meves (1907) y Duesberg (1909). Esta doctrina ha sido aceptada por otros autores que posteriormente estudiaron la histogénesis de las miofibrillas: Heidenhain,¹⁷ (1911); Häggquist,¹⁸ (1931); Levi,¹⁹ (1946).

Las comprobaciones realizadas por los autores que han negado la posibilidad de diferenciarse una estriación transversal en el músculo cultivado in vitro, han demostrado ser erróneas. Es posible que las condiciones de cultivo puedan modificar, en algunos casos, los resultados. Así Lewis y Lewis y luego Rényi y Hogue, han empleado líquido de Locke, a veces adicionado con caldo y dextrosa. En estas condiciones han concluido que las miofibrillas eran artificios que no existían in vivo y que sólo aparecían después de fijación y coloración. En otros casos el medio empleado ha sido idéntico al usado por nosotros y no hay otra explicación que atribuirlo al empleo de técnicas de coloración inadecuadas.

Otro hecho a cuyo esclarecimiento contribuye esta técnica es al de si existen o no verdaderas anastomosis entre los brotes musculares. De Rényi y Hogue (1934), en base a sus estudios de micromanipulación, niegan la existencia de las mencionadas anastomosis y sostienen que se trata solamente de adherencias superficiales. En efecto, en muchos casos esto se comprueba con los métodos de impregnación que nos muestran que, a pesar de haber tomado contacto los brotes, las miofibrillas recorren el camino sin mezclarse. Hay, sin embargo, otros casos en que las miofibrillas pasan de un brote al otro, lo que indica la existencia de una verdadera continuidad protoplasmática. (Fig. 11.)

CONCLUSIONES

1º) La fibra muscular esquelética, que se desarrolla en cultivo de tejidos, presenta miofibrillas ya sean lisas o con estriación transversal muy neta. Esta estriación puede incluso ir acompañada del desarrollo de la estría H (estria de Hensen).

2º) No se han podido observar estructuras evidentes que permitan aceptar la teoría de que las miofibrillas derivan de los condriocitos.

3º) La existencia de intercambio miofibrilar entre brotes que se anastomosan permite sospechar que, al menos en ciertos casos, esas son verdaderas anastomosis y no meras adherencias entre los brotes.

RESUMEN

Se ha estudiado la estructura de las fibras musculares esqueléticas de embriones de pollo, de distinta edad, en cultivos de plasma diluido y extracto embrionario. Hemos podido comprobar la existencia de miofibrillas tanto in vivo como luego de fijación y coloración. La técnica más adecuada para su demostración es la impregnación en sales argentícas por el método de Río Hortega. In vivo, ya sea con el microscopio corriente o con el diferencial de fases, se ven como miofibrillas homogéneas. En cambio, luego de impregnación, aparece muy clara la estriación transversal e incluso, en algunos casos, una neta estría de Hensen. Nunca hemos visto la estría Z. La circunstancia de que la estriación, con frecuencia, no coincide en miofibrillas vecinas, puede ser causa de su invisibilidad in vivo.

Las miofibrillas pueden pasar de un brote muscular a otro, lo que permite afirmar la existencia de verdaderas anastomosis que han sido negadas por otros autores.

STRUCTURE OF THE SKELETAL MUSCLE FIBER IN TISSUE CULTURE

SUMMARY

We have studied the structure of the skeletal muscle fibers in chick embryos in dif-

ferent stages of development, cultivated in diluted plasma and embryonic extract. We have verified the existence of myofibrils in vivo as well as after fixation and staining. The most adequate technique to demonstrate this is the impregnation in argentic salts according to Río Hortega's method. Myofibrils appear in vivo as homogeneous longitudinal threads, when observed either with an ordinary or a phase contrast microscope. On the other hand, the transversal striation and even, sometimes, a neat Hensen's line, is quite visible after impregnation. We have never seen the Z line. The circumstance that the striation frequently does not coincide in neighbouring myofibrils, can be the cause of its invisibility in vivo.

The fact that myofibrils can pass from one muscular sprout to another makes us confirm, against other authors' opinion, the existence of real anastomosis.

BIBLIOGRAFIA

1. HARRISON, R. G.—1910. The outgrowth of the nerve fiber as a mode of protoplasmic movement. *J. Exper. Zool.*, 9; 787-804.
2. SUNDWALL, J.—1912. Citado por Lewis y Lewis, 1917.
3. CONGDON, E. D.—1915. The identification of tissues in artificial cultures. *Anat. Rec.*, 9; 343-358.
4. LEWIS, W. H. & LEWIS, M. R.—1917. Behavior of cross-striated muscle in tissue culture. *Am. J. Anat.*, 22; 169-194.
5. LEVI, G.—1918-19. Nuovi studi su cellule coltivate "in vitro". *Arch. ital. anat. e embriol.* 16; 423-599.
6. DE RÉNYI, G. S. & HOGUE, M. J.—1931. Studies made by means of microdissection on skeletal muscle grown in tissue culture. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 11; 304.
7. DE RÉNYI, G. S. & HOGUE, M. J.—1934. Studies on skeletal muscle grown in tissue cultures. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 16; 167-186.
8. HOGUE, M. J. & DE RÉNYI, G. S.—1939. Giant muscle cells in tissue culture. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 23; 122-123.
9. FRIEDHEIM, E. A. H.—1931. Morphologische und funktionelle Untersuchungen an isolierten, in vitro. Gezüchteten Skelettmuskelfasern. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 11; 385-396.

10. PETERFI, T. & WILLIAMS, St. C.—1934. Elektrische Reizversuche an gezüchteten Gewebezellen. II-Versuche an verschiedenen Gewebekulturen. *Arch. f. exper. Zellforsch.* 16; 230-254.
11. GOSS, C. M.—1932. The formation of cross striations in cultures of embryonic heart muscle. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 12; 233-245.
12. GOSS, C. M.—1933. Further observations on the differentiation of cardiac muscle in tissue cultures. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 14; 175-201.
13. MAUER, G.—1939. Die histologischen Vorgänge in verletzten Gewebe Quergestreifter Muskulatur und ihre Klärung mit Hilfe der Gewebekultur. *Arch. f. exper. Zellforsch.*, 23; 125-145.
14. CHEVREMONTE, M.—1940. Le muscle squelettique cultivé in vitro. Transformation d'éléments musculaires en macrophages. *Arch. biol.* 51; 314-333.
15. DEL RÍO HORTEGA, P.—1941. El método del carbonato argéntico. Revisión general de sus técnicas y aplicaciones en histología normal y patológica. *Arch. histol. norm. y pat.*, 1; 165-205 y 329-361.
16. POLAK, M.—1946. Sobre una técnica sencilla y rápida para la coloración del condrioma. *Arch. histol. norm. y pat.*, 3; 365-376.
17. HEIDENHAIN, M.—1911. *Plasma und Zelle*. Jena.
18. HÄGGQUIST, G.—1931. *Gewebe und Systeme der Muskulatur*. En v. Möllendorff Handbuch der Mikroskopischen Anatomie des Menschen, 2, 3ª parte.
19. LEVI, G.—1946. *Trattato di Istologia*. Torino.