

LOS MASTOCITOS TISULARES: REACCIONES HISTOQUÍMICAS Y FUNCIONALES

WASHINGTON BUÑO *

En 1879, Ehrlich,¹ describió los "mastzellen" (mastocitos; MC), reconociendo sus dos características más importantes: 1º) la gran afinidad de sus granulaciones para los colorantes básicos y 2º) su tinción metacromática. Posteriormente se han ido agregando nuevas contribuciones al estudio morfológico y funcional de estos elementos, sin que, hasta la fecha, se haya registrado un verdadero progreso en el conocimiento de sus funciones. La contribución tal vez más fecunda, fué la realizada por Jorpes y colaboradores^{2,3} quienes identificaron la metacromasia de los granos de los mastocitos, con la que ofrece "in vitro" la heparina, y emitieron la hipótesis de que las granulaciones de los mastocitos contenían heparina. La importancia de la heparina en el mecanismo de la incoagulabilidad sanguínea, y su acción, reconocida en los últimos tiempos, como antihialuronidasa, hacen entrever la importancia de los MC en la funcionalidad general del tejido conjuntivo. Al mismo tiempo sus reacciones frente a hormonas, y especialmente frente a la cortisona, permiten sospechar su participación en las reacciones endocrinas del tejido conjuntivo.

1º) REACCIONES HISTOQUÍMICAS DE LOS MASTOCITOS

La reacción histoquímica más importante de los mastocitos es, indudablemente, la me-

tacromasia de sus gránulos frente a los colorantes básicos. Esta propiedad, que es compartida por otros elementos de los tejidos, ha sido estudiada muy en detalle en los últimos tiempos y parece posible interpretarla actualmente en términos bioquímicos. Los colorantes más utilizados para la obtención de la metacromasia son: el azul de toluidina, el azul B y la tionina.

En una serie de estudios realizados analizando la metacromasia en soluciones "in vitro", se llegó a la conclusión de que las sustancias capaces de provocar el viraje metacromático en solución pura son, ante todo, los polisacáridos macromoleculares que poseen una función ácida y sus sales.^{4,5,6} Los más activos en esta función de viraje metacromático, serían los polisacáridos macromoleculares que encierran uno o varios radicales ester-sulfúricos o sus sales.

De ahí la capacidad metacromática del ácido controitín-sulfúrico, del ácido mucoitín-sulfúrico y de diversos otros elementos. De ahí también la propiedad metacromática, que nos interesa, de la heparina, la cual es precisamente un poli-ester-sulfúrico de un polisacárido.

Los polisacáridos macromoleculares ácidos en los cuales la función ácida es un carboxilo, generalmente de los ácidos glicurónico o galacturónico son también metacromáticos. Al contrario los polisacáridos macromoleculares que no poseen función ácida, no son metacromáticos.^{4,5} La extracción del radical sulfato de polisacáridos ácidos, por medio de una hidrólisis controlada, suprime las

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

propiedades metacromáticas de esos polisacáridos; por otra parte, la introducción de uno o varios radicales sulfato en los polisacáridos macromoleculares, no metacromáticos, como el glucógeno, el almidón, la celulosa o la quitina, les confiere propiedades metacromáticas enérgicas.⁶

Según otra interpretación distinta de la significación de la metacromasia, ésta sería debida a la formación de polímeros del colorante empleado, cuyo espectro de absorción difiere del colorante original.^{7, 8} Según esta opinión, la forma monomérica del colorante es azul o violeta y los polímeros son progresivamente más y más violetas, hasta alcanzar un color rojo. La polimerización del colorante, sería debida a una polimerización del sustrato con el cual el colorante se combina.

En el momento actual, las investigaciones sobre la metacromasia de los carbohidratos altamente polimerizados, y de los polímeros superiores del metafosfato,⁸ parecen indicar que la segunda interpretación está más próxima a la realidad, que la que había sido indicada por Lison. El azul de toluidina tiene un espectro de absorción con tres bandas que son la alfa, la beta y la gamma. La alfa es azul y corresponde a la forma monomérica del colorante; la beta es violeta y corresponde a la forma dimérica del colorante; y la gamma es roja y corresponde a los polímeros.

La otra característica fundamental de las granulaciones de los mastocitos es su afinidad extraordinariamente intensa para los colorantes básicos; no solamente aquellos que dan coloración metacromática, sino los colorantes básicos que los coloran ortocromáticamente. Uno de los colorantes que posee mayor afinidad para las granulaciones de los mastocitos es, indudablemente, la fucsina básica. La técnica de Gallego, es decir, coloración con fucsina Ziehl diluída en medio acético y luego virofijación con formol, es, según lo hemos podido comprobar, la técnica mejor para la coloración de las granulaciones de los mastocitos.

La basofilia citoplásmica, y la basofilia en general, han sido interpretadas en los últimos tiempos como debidas a la existencia de los ácidos nucleicos. Se podría fácilmente discriminar la basofilia que es debida al ácido-nucleico (RNA) de aquélla que es debida al desoxiribo-nucleico (DRNA) mediante el empleo de las enzimas específicas ribo-nucleasa y desoxi-ribo-nucleasa. La digestión previa de los cortes con desoxi-ribo-nucleasa y subsiguiente coloración con colorantes básicos, como por ejemplo, el azul de metileno o la fucsina, hace que este colorante se fije exclusivamente sobre la basofilia citoplásmica, es decir, aquélla que es debida al RNA. Al contrario, el previo tratamiento de los cortes con ribo-nucleasa, hace que la ulterior coloración con colorantes básicos colore solamente las estructuras que contienen DRNA, esencialmente la cromatina.

Alguno de los colorantes básicos como el verde de metilo, ha sido considerado específicamente un colorante de la DRNA.⁹ Sin embargo, se ha podido comprobar que las granulaciones de mastocitos del tejido conjuntivo de rata, se colorean por el verde de metilo en sus granulaciones citoplásmicas, lo cual no puede ser considerado debido a una DRNA. Se comprobó también¹⁰ que el verde de metilo colora, en condiciones especiales, la sustancia fundamental del cartílago y las granulaciones de los mastocitos. Vemos, pues, que este colorante básico no es específico del DRNA, sino que también colora a las granulaciones de los mastocitos, que ciertamente, por razones que más adelante veremos, no pueden ser consideradas como constituidas por DRNA.

En diversos órganos de rata, luego de fijación en alcohol absoluto, alcohol metílico, susa o formol 10 %, hemos realizado coloraciones con verde de metilo (0,5 %) o con pironina (0,1 %).

Hemos comprobado que los mastocitos, se coloran tanto con verde de metilo como con la pironina. En ambos casos lo hacen con un neto tinte metacromático. El verde

de metilo da una coloración azul; la pironina un tono anaranjado. El concepto de que el verde de metilo sea un colorante específico para DRNA y la pironina para los RNA, debe ser revisado, ya que la basofilia de los MC es igualmente apetente para ambos.

La primera serie de experimentos que realizamos fué conducente a comprobar si la coloración de los mastocitos por la fucsina básica, por el verde de metilo y por la pironina, podían ser atribuibles al contenido de aquéllos en heparina. Para este fin realizamos una serie de ensayos consistentes en emplear la técnica de Coujard,¹¹ a la cual aplicamos los colorantes mencionados. La técnica de Coujard, consiste en escribir sobre un portaobjeto con un líquido constituido por gelatina, o por gelatina y suero, en el cual se incorporan sustancias cuya afinidad para los colorantes se desea probar. Así, por ejemplo, se escribe con gelatina sola, luego con gelatina que contiene heparina en solución, se deja secar el porta, se le fija en los líquidos fijadores habituales, coloreándolo por último, como si fuera un preparado. Se comprueba luego si hay alguna diferencia entre la coloración de la palabra que ha sido escrita con gelatina sola, es decir con el vehículo y la palabra que ha sido escrita con gelatina y heparina.

Mediante esta sencilla técnica, hemos podido comprobar que soluciones diluidas de heparina en gelatina aparecían en rojo, cuando se las coloreaba con la fucsina básica, en tanto que las palabras escritas con gelatina o no aparecían o aparecían de un color mucho más claro. Se demostró así, que la heparina tenía una gran afinidad para la fucsina básica.

El mismo experimento, realizado con verde de metilo o con pironina, mostró que tanto el control escrito con el vehículo solamente, como la palabra escrita con vehículo y heparina, se coloreaban intensamente.

Diversos autores han podido comprobar que la coloración basófila de las granulaciones de los mastocitos por los colorantes bási-

cos habituales, no son impedidas ni por la digestión previa con ribo-nucleasa, ni por la digestión previa con desoxi-ribo-nucleasa. De donde hay que admitir que el elemento intensamente basófilo de las granulaciones de los mastocitos no es ni una ribo ni una desoxi-ribo-núcleo-proteína. Creemos que puede admitirse, en base a los experimentos anteriores, que el elemento activamente basófilo sea también la heparina.

En una serie de estudios sobre las células argentafines realizada en nuestro Departamento,^{12, 13, 14, 15, 16} se comprobó que las granulaciones de los MC, en ciertas condiciones, son argentafines.*

Frecuentemente, ¹⁶ las granulaciones se individualizan con facilidad (Fig. 1), pero, a veces, se observan tan juntas que pueden no distinguirse una de otras y hasta llegan a cubrir una parte o la totalidad del núcleo. Si luego de la impregnación con la técnica de Río Hortega, se sobrecolorean las secciones con fucsina de Ziehl, aparccen dos tipos de células cebadas: uno con granos negros, que reducen las soluciones argentoamoniacales al estado de plata metálica; y otro, con granos fucsínófilos, que no reducen la plata. Entre estos tipos celulares bien definidos, existen formas intermediarias con un citoplasma provisto de ambas granulaciones: fucsínófilas y argentafines; por lo que suponemos que estas dos clases de mastocitos, aparentemente distintos, no son independientes entre sí, sino que corresponden a diferentes estados funcionales de un mismo elemento.¹⁶

La técnica de Coujard, permite comprobar que la heparina, aun a grandes diluciones (1/10.000) reduce las sales de plata, es decir, que es argentafin.

Trabajos anteriores^{17,18} no habían comprobado la existencia de argentafinidad en

* La argentifinidad es la propiedad que tienen algunos elementos celulares de reducir, por sí mismos, las sales de plata y de teñirse, en consecuencia, de negro. La argentofilia es la propiedad que tienen numerosos elementos de los tejidos de retener las sales de plata, que son secundariamente reducidas por un reductor cualquiera (luz, formol, pirogalol, hidroquinona, etc.).

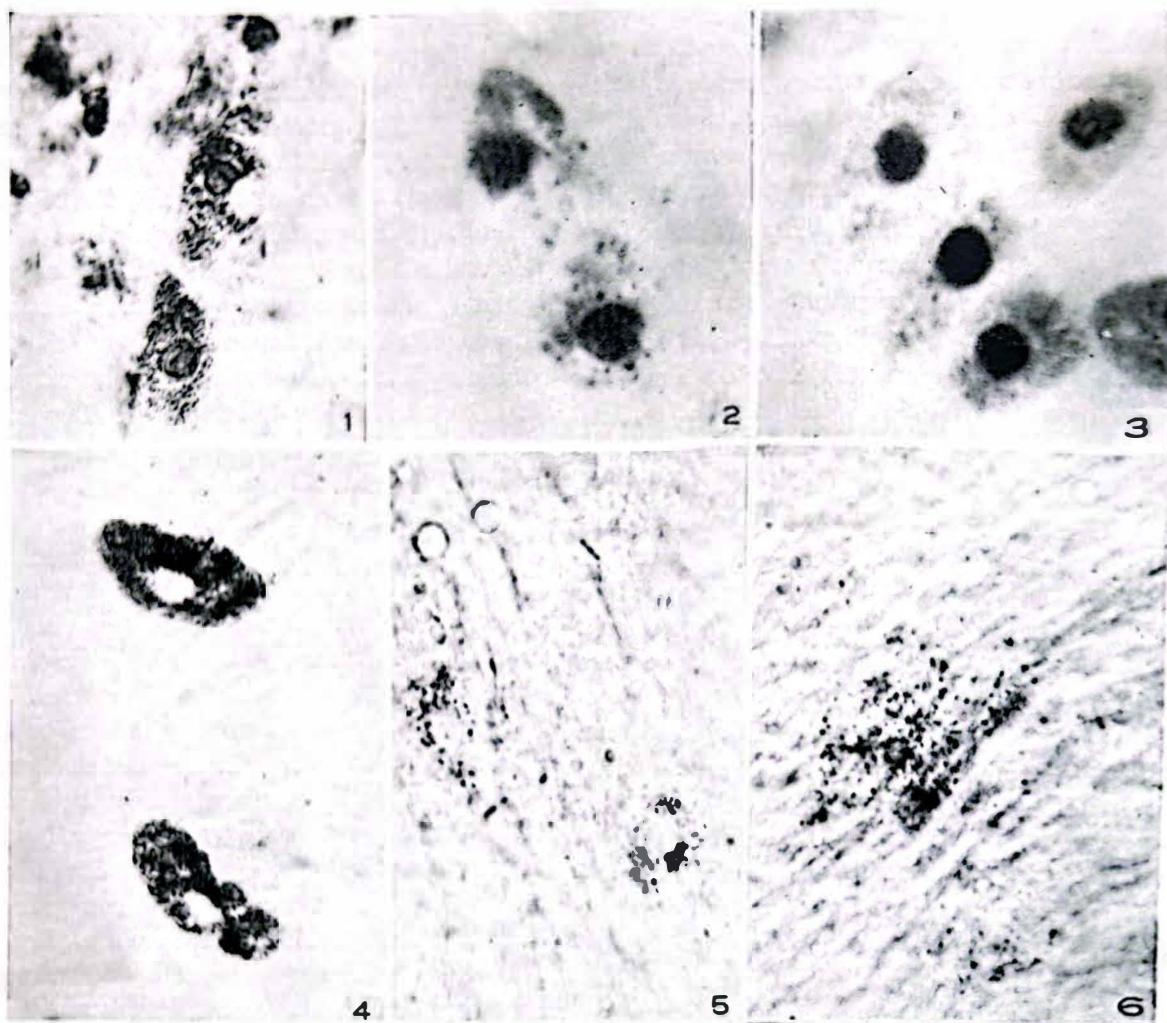


Fig. 1.— Mastocitos del tejido conjuntivo de la glándula submaxilar de la rata blanca. Reacción argentafin de Gomory. Se observa la neta reacción a nivel de las granulaciones de estos elementos. En uno de ellos, una gran vacuola citoplasmática.

Figs. 2 y 3.— Mastocitos del tejido celular subcutáneo de la rata blanca, en el lugar en el cual se le ha inyectado cortisona. Se observa la desgranulación y el aspecto desgastado de estos elementos celulares.

Fig. 4.— Dos mastocitos normales del tejido conjuntivo subcutáneo de la rata blanca, coloreados vitalmente con azul de toluidina. Control de las figuras 5 y 6.

Figs. 5 y 6.— Mastocitos del tejido conjuntivo subcutáneo de la rata blanca después de dos horas de actuar sobre ellos, "in vitro", la cortisona.

los MC de la rata. Los resultados obtenidos en nuestro Laboratorio ponen fuera de duda que las granulaciones de los MC, y la heparina "in vitro" son capaces de reducir las sales argénticas.

Hotchkiss¹⁰ describió una técnica que permite la tinción específica de los polisacáridos. Consiste el proceder (PAS) en oxidar

los cortes por el ácido peryódico y luego tratarlos por el reactivo de Schiff (fucsina decolorada por anhídrido sulfuroso). La oxidación por el ácido peryódico rompe la atadura de los sacáridos en el carbono 2, dejando libres radicales aldehídicos que tienen la propiedad de regenerar la fucsina dando un color rojo. La técnica muestra en

rojo los polisacáridos y los mucopolisacáridos. La digestión con ptialina, que hace desaparecer los primeros y deja intactos los segundos, permite diferenciar perfectamente unos de otros.

La reacción de los MC a la técnica de Hotchkiss, fué considerada como positiva.^{20, 21} En cambio, otros investigadores^{22, 23, 18} obtuvieron resultados negativos o variables. Lillie²² determinó, en primer lugar, mediante la toluidina, la localización de los MC, refiriéndolos a otras estructuras del tejido; luego desmontó los preparados, y realizó en ellos la técnica de Hotchkiss; por último desmontó nuevamente los preparados para teñirlos con verde de metileno, que colora en azul intenso los MC. En esta forma podía tener la seguridad absoluta, de cuáles células se teñían con la fucsina recolorada. Los resultados mostraron que muchos de los MC que habían sido primeramente coloreados con la tionina, no aparecieron con el P. A. S. y volvieron a encontrarse en la tercera recoloración.

Algunos de los MC puestos de manifiesto por la tercera coloración presentaban unos pocos finos granos P. A. S. positivos. Por último, había elementos celulares del conjuntivo que presentaban granos P. A. S. positivos y que no se coloraban, ni por la tionina ni por el verde de metileno.

En nuestras investigaciones hemos podido comprobar que, con cierta frecuencia, aparecen los MC coloreados en rojo por el proceder de Hotchkiss. Esta coloración aparece también en aquellas preparaciones que no han sido sometidas a previa oxidación con el ácido peryódico. Hemos podido llegar a la conclusión de que dicha coloración se debe a cantidades mínimas de fucsina no decolorada que pueden quedar en el reactivo de Schiff. También puede deberse a difusión del colorante proveniente de estructuras vecinas P. A. S. positivas.

Por su parte, la investigación de la reacción de la heparina frente a la técnica de Hotchkiss, realizada por Davies²⁴ con una

técnica similar al de Coujard, le dió resultados intensamente positivos. Hemos repetido ese tipo de experimentos y hemos hallado que la heparina era negativa.

2º) ACCIÓN DE LA CORTISONA SOBRE LOS MASTOCITOS

La acción de la cortisona sobre el tejido conjuntivo, y en especial sobre la inflamación, ha sido observada por diferentes autores, tanto en investigaciones experimentales como en observaciones clínicas. Se comprobó, en primer término, que la artritis tóptica de irritación, experimentalmente provocada por el formol, no se producía si se inyectaba cortisona.²⁵

La formación de tejidos de granulación es netamente inhibida por la inyección de cortisona.^{26, 27} Esta acción se ejerce a dosis mucho menores, cuando su acción es local.^{28, 29} Igualmente se pudo comprobar una definida acción de la cortisona sobre la cicatrización de heridas experimentales, tanto en animales³⁰ como en el hombre.³¹

Se pudo comprobar, asimismo, variaciones en la morfología, y población celular por acción de la cortisona. La inyección de dosis altas de cortisona, en ratas blancas²³ (de 30 a 70 mgr. por animal), distribuidas en períodos diferentes, produce una reducción del número y tamaño de los mastocitos. También observaron que los mastocitos se desintegran y que se encuentran numerosas granulaciones dispersas en la sustancia fundamental.

Se encuentra con frecuencia en el perro, tumores espontáneos constituídos por mastocitos (mastocitomas). A un perro con mastocitomas nodulares múltiples, se le inyectaron 50 mgr. de cortisona durante cuatro días sucesivos, comprobándose que el tamaño de los nódulos se reducía rápidamente.³² El examen histológico demostró que los elementos celulares tumorales, presentaban intensos fenómenos degenerativos. Las células muestran un hinchamiento del citoplas-

ma causado por extensa vacuolización. El citoplasma intervacuolar, presenta escasos gránulos con coloración metacromática atípica. Los bordes citoplasmáticos indistintos e irregulares.

Resultados similares fueron obtenidos en el hombre, conejo, ratón y cobayo, en los que se comprobó vacuolización citoplásmica, desgranulación y fenómenos degenerativos diversos de los mastocitos, después de inyección de dosis varias de cortisona.³²

Por el contrario, otros autores no han podido comprobar ninguna reacción de la cortisona sobre los MC. No se hallaron modificaciones después de "stress" o de inyecciones de ACTH, y cortisona, o tiroxina sobre el tejido conjuntivo del músculo esquelético del corazón y del mesenterio de la rata blanca.^{34, 35} Estos estudios fueron realizados mediante inyección general de las hormonas, no mediante acción directa de las mismas. Los resultados han sido negativos, no habiendo podido comprobar la existencia de variaciones del número de MC después de inyección de hormona. Tampoco encontraron alteraciones degenerativas en los MC, que se diferenciaron de las que normalmente encontraron en los controles. Concluyen, en consecuencia, que sus experimentos han fracasado para demostrar cualquier evidencia de que los MC tisulares son afectados por tiroxina o por la cortisona.³⁴

Todos los hechos anteriormente mencionados, se refieren a la acción general de la cortisona sobre los elementos del tejido conjuntivo. Nuestro interés ha sido el de comprobar si la cortisona actúa directamente sobre los mastocitos, para lo cual hemos realizado dos tipos de experimentos: primero, hemos comparado la acción de la cortisona inyectada en una región del tejido celular subcutáneo con la región simétrica del mismo animal (rata blanca). En otro tipo de experimento hemos estudiado "in vitro" la acción de la cortisona sobre los mastocitos del tejido conjuntivo de la rata.

Para el primer tipo de experimento utilizamos ratas blancas, a las cuales de un lado del cuerpo inyectamos la cortisona y del otro lado, simétrico, se inyectaba un volumen igual del vehículo, pero sin la hormona. La cortisona, inyectada era una suspensión de acetato de cortisona (Merck)* en una mezcla de solución salina fisiológica con 20 % de alcohol. Cada centímetro de la suspensión contenía 20 mgs. de cortisona. Se inyectaba medio centímetro cúbico de esta suspensión, de modo que los animales recibían 10 mgs. de cortisona. Tres horas después de la cortisona, se inyectó, en el mismo lugar, una suspensión de litio-carmín, ya que también se estudió la acción de la cortisona sobre la coloidopexia, y una hora más tarde, es decir, cuatro horas después de la inyección de cortisona, se hizo una bola de edema de cada uno de los lados que se fijó en formol al 10 %. En este material se realizaron las técnicas comunes y además coloraciones con toluidina y la técnica del ácido peryódico-sulfofucsina de Hotchkiss.

Los resultados fueron completamente demostrativos. Del lado inyectado con cortisona los MC aparecieron con muy netas alteraciones. Fundamentalmente las granulaciones estaban muy reducidas (figs. 2 y 3) y en muchos casos habían desaparecido casi totalmente, quedando el citoplasma vacuolado, agranular, con su característica metacromasia, aunque también ésta, muy reducida. Es frecuente la presencia de MC, cuyos límites celulares se vuelven imprecisos y como desgastados. Estas modificaciones no se comprobaron del lado testigo.³⁶

La segunda serie de experimentos para comprobar la acción directa de la cortisona sobre los MC, la realizamos "in vitro". Para esto utilizamos también ratas albinas a las cuales se les hacía una biopsia del tejido celular subcutáneo o del epiplón. Se retiraba

* Agradecemos a Merck y Co., de Rahway, N. Y., por habernos suministrado, por intermedio de su representante en Montevideo, Sr. J. Puig Sánchez, la cortisona empleada en estos experimentos.

un pequeño trozo de tejido conjuntivo que se recibía en líquido de Ringer; otro trozo era llevado a una suspensión de acetato de cortisona, en Ringer, que contenía 2 mgs. de cortisona por centímetro cúbico. Los dos trozos eran mantenidos en la estufa a 38°.

A los quince minutos, treinta minutos, una hora, dos horas y cuatro horas, se retiraban pequeños trozos, tanto del control como del tratado con cortisona, que se extendían sobre láminas portaobjetos con una gota de una solución de azul de toluidina en líquido de Ringer. Se cubría con un cubreobjeto que era cuidadosamente bordeado con vaselina. La observación se realizó siempre con contraste de fases y sobre platina del microscopio calentada a 38°.

En esta forma se comprueba que los únicos elementos del tejido que se colorean por la toluidina son las granulaciones de los MC, que toman un neto e intenso tinte metacromático rojo violáceo. Los núcleos permanecen siempre perfectamente incoloros por varias horas. La coloración nuclear, en cualquier elemento, se consideró como signo de muerte celular y se desechó el experimento.

Pudimos comprobar, así, una neta acción "in vitro" de la cortisona sobre los MC. Esta acción comienza a la media hora, alcanzando su máximo vigor entre la hora y las dos horas de tratamiento.

Los fenómenos observados fueron: 1) aglutinación de los gránulos, formando grupos a veces tan grandes como el núcleo; 2) disolución y dispersión de los gránulos; 3) degranulación celular con pérdida de los límites celulares y aspecto desgastado del elemento; 4) alteraciones de la coloración metacromática que toma un tinte más rosado, como desvanecido, en comparación con el rojo violáceo de los elementos normales; 5) aparición del tinte metacromático en el citoplasma intergranular (figs. 4, 5 y 6).

De las observaciones anteriores creemos poder llegar a la conclusión de que los MC reaccionan en forma muy característica frente a la acción de la cortisona, cuando ésta

llega directamente en contacto con estos elementos.

El elemento más característico de dicha reacción es la pérdida de sus gránulos, la dispersión de los mismos, a veces, al contrario, aglutinación granular, y finalmente, y como última etapa del proceso, los MC aparecen con bordes desgastados, con una gran dispersión granular y con una reducción de sus gránulos, al punto que, cuando este proceso ha alcanzado gran intensidad, los elementos son casi irreconocibles.

CONCLUSIONES

1º) La fucsina básica es uno de los colorantes más útiles para la demostración de los MC. La coloración ortocromática de los MC por la fucsina básica puede ser atribuible a la heparina. Esta sustancia se tiñe "in vitro" por la fucsina básica, utilizando la técnica de Coujard.

2º) Las granulaciones de los MC son, en ciertas circunstancias, argentafines. Esta propiedad puede ser atribuible a la heparina, ya que esta sustancia la presenta "in vitro", utilizando la técnica de Coujard.

3º) La pironina y el verde de metilo coloran metacromáticamente las granulaciones de los MC. Este hecho cuestiona la generalmente aceptada opinión de que la pironina sea un colorante específico para los R. N. A. y el verde de metilo lo sea para los D. R. N. A.

4º) La cortisona actúa directamente sobre los MC, ya sea en inyecciones subcutáneas, ya sea en experimentos "in vitro". Esta acción se traduce histológicamente por degranulación del elemento, dispersión de los gránulos, y, a veces, aglutinación de los mismos, y ocasionalmente, formación de vacuolas.

SUMMARY

Tissue mastcells: their histochemical and functional reactions

Some histochemical and functional reactions of the mast cells have been revised. It

has been found that the great affinity of the mast cells' granulations for fuchsin may be ascribed to heparin, since this substance may be stained "in vitro" with fuchsin. Under certain conditions, mast cells' granulations are argentaffin. This characteristic may be also attributed to heparin, since this substance, under the experimental conditions, reduces silver salts. Both pyronin and methyl-green stain metachromatically the granulations of the mast cells. When following Hotchkiss' technique, mast cells appear occasionally stained, which, we believe is due to the dye's diffusion, since they appear also red without previous oxidation with periodic acid.

Cortisone was subcutaneously injected in one side of the body of albino rats, and the connective tissue of the injected zone was then compared with that of the symmetrical side. Definite alterations were found in the mast cells of the injected side, these consisting in degranulation and vacuolization. Cellular limits appear ragged.

Action of cortisone "in vitro" in biopsies of albino rat subcutaneous tissue or epiploon, was investigated. Pieces of tissue were kept in a suspension of cortisone and then examined after different intervals. After one or two hours mast cells appeared with alterations similar to the ones mentioned above, showing, besides, agglutination of granules.

BIBLIOGRAFÍA

1. EHRLICH, P.—Arch. f. mikr. Anat., 1877, 13, 263.
2. JORPES, E. J.—Heparin, its chemistry, physiology and application in medicine. London, Oxford Univ. Press, 1939.
3. HOLMGREN, H.; WILANDER, O.—Ztschr. f. mikr. anat. Forsch., 1937, 42, 279.
4. LISON, L.—Arch. Biol., 1935, 46, 599-668.
5. LISON, L.—Compt. rend. Soc. Biol., 1935, 118, 821-824.
6. LISON, L.—Histochimie et cytochimie animales. Paris, Gauthier-Villars, 1953.
7. MICHAELIS, L.; GRANICK, S.—J. Am. Chem. Soc., 1945, 67, 1212.
8. MICHAELIS, L.—Cold Spring Symp. Quant. Biol., 1947, 12, 142.
9. POLLISTER, A. W.; LEUCHTENBERGER, C.—Proc. Nat. Acad. Sc., 1949, 35, 111.
10. TAFT, E. B.—Exper. Cell. Research, 1951, 2, 312-326.
11. COUJARD, R.—Bull. Histol. Tech. Micr., 1943, 20, 161.
12. PERRONE, O.; ACOSTA-FERREIRA, W.—Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1949, 15, 120-122.
13. PERRONE, O.; ACOSTA-FERREIRA, W.—Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1950, 17, 58-67.
14. ACOSTA-FERREIRA, W.—Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1951, 18, 109-123.
15. ACOSTA-FERREIRA, W.—Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1952, 19, 3-6.
16. GRASSO, R.—Arch. Histol. Norm. y Patol., 1953 (en prensa).
17. KIRKMAN, H.—Am. J. Anat., 1950, 86, 91-132.
18. COMPTON, A. S.—Am. J. Anat., 1952, 91, 301-326.
19. HOTCHKISS, R. D.—Arch. Biochem., 1948, 16, 131-142.
20. LEBLOND, C. P.—Am. J. Anat., 1950, 86, 1-25.
21. MONTGOMERY, H.—Discusión del trabajo de Schoch y Glick, 36, p. 131.
22. LILLIE, R. D.—Anat. Rec., 1950, 108, 239-253.
23. CAVALLERO, C. BRACCINI, C.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1951, 78, 141-143.
24. DAVIES, D. V.—Stain Technol., 1952, 27, 65-70.
25. SELYE, H.—Brit. M. J., 1949, 2, 1129.
26. SELYE, H.—Annual report on stress. Montreal. Acta Inc., 1951.
27. SPAIN, D. M.; MOLOMUT, N.; HABER, A.—Science, 1951, 112, 335.
28. MEICR, R.; SCHULER, W.; DESAULLES, P.—Experientia, 1950, 6, 649.
29. TAUBENHAUS, M.; AMROMIN, G. D.—J. Lab. & Clin. Med., 1950, 36, 7.
30. BAXTER, H. SCHILLER, C.; WHITESIDE, J. H.; STAITH, R. E.—Plast. & Reconstruct. Surg., 1951, 7, 24.
31. BAXTER, H.; SCHILLER, C.; WHITESIDE, J. H.—Plast. & Reconstruct. Surg., 1951, 7, 85.
32. BLOOM, F.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1952, 79, 651-654.
33. ASBOE-HANSEN, G.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1952, 80, 677-679.
34. DEVITT, J. E.; PIROZYNSKI, W. J.; SAMUELS, P. B.—Proc. Soc. Exper. Biol. & Med., 1953, 83, 335-338.
35. SCHOCH, E. P.; GLICK, D.—J. Invest. Dermat., 1953, 20, 119-132.
36. BUSO, W.; POLETTI, H.—Arch. Soc. Biol. Montevideo, 1953 (en prensa).