



SANG

ESTUDIS MICROSCOPICS SOBRE LA ERITRO-CITOGENESI NORMAL EN LA MEDULA OSSIA DE QUALQUES MAMIFERS

pel Dr. F. MAS I MAGRO

Neumann i Bizzozzero demostraren l'importancia de la mèdula òssia en la producció de les cèl·lules rojes de la sang. Dèu de allavors la gènesi del eritrocit ha estat objecte de perseverant estudi. Les interessants investigacions de Ehrlich, Schridde, Naegeli, Van der Stricht, Pappenheim, Maximow, Dantschakoff, Ferrata, Engel, Dominici, Jolly, Negreiros—Rinaldi i altres han aportat una brillant col·laboració a l'argument de la eritrocitogènesi en el embrió i en el estat adult, normal i patològic.

Les recents i completes adquisicions d'aquests sabis han establert definitivament que l'eritrocit deriva d'altres cèl·lules progenitores, d'aspecte linfoide i en potència de diferenciació. L'element primordial, generador dels diversos estadis ontogènics d'aquelles cèl·lules linfo-eritrocítiques, és l'anomenat linfoidocit de Pappenheim o Stammzelle, la presència del qual és constant en els teixits embrionaris sangui-formadors i en els òrgans i teixits hematopoietics fetals i del adulte. Els coneixements de la fina morfologia d'aquests estats linfoides preeritrocítiques són una brillant i sobressortint aportació de Pappenheim. La cèl·lula matriu dels elements eritrolinfoides ha estat objecte de les pesquises dels sabis, que l'han donat a conèixer baix distintes denominacions: linfoicit (Maximow), mielogoni (Benda), protometrocit (Ciaccio), mieloblaste (Naegeli), hemocitoblaste (Ferrata), cèl·lula medular linfoide (Türk). etz.

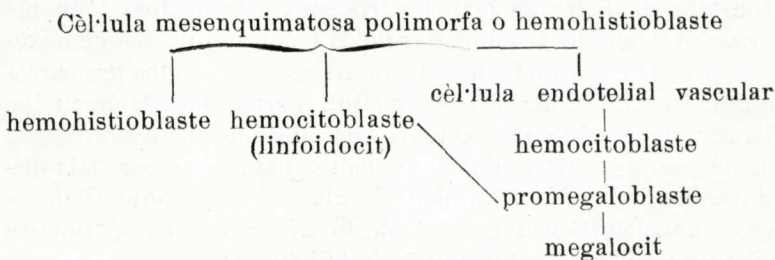
Mes el linfoidocit és una cèl·lula indiferet: pot constituïr

l'element primordial dels granulocits, dels limfocits, dels megacariocits i dels mateixos glòbuls rojos: és, en una paraula, l'element generador de les cèl·lules sanguínies. Se'l troba en tot teixit en potència de hematopoiesi, perquè el limfocit constitueix el punt de partida de tota diferenciació citohemàtica.

L'eritrocitogènesi, a partir de la cèl·lula indiferenciada, s'inicia en l'embrió, en els primers moments de la vida embrionària, en els que encara no s'ha esfumat la formació de l'òrgan hematopoietic; se perfecciona més tard, quan apareixen ja el fetge i melsa; i se normalitza definitivament en la mèdula òssia, on constituirà la eritrocitogènesi fisiològica. En els tres moments o etapes eritrocitogènètiques sempre és el limfocit, en sos aspectes macro, meso i microlinfocit, la cèl·lula progenitora dels glòbuls rojos.

A modo de *referendum* exposarem breument les modificacions que's noten en l'evolució ontogènica del glòbul roig, seguint les línies generals traçades per Pappenheim, Maximow, Engel, Ferrata i Negreiros-Rinaldi.

PERÍODE EMRRIONARI PRIMITIU PREHEPÁTIC.—La activitat hematopoietica i de consegüent, la eritrocitogènesi se efectua en els territoris de dit teixit conectiu-sanguíni, qual localització es deu referir al mesènquim, situat entre la fulla visceral del mesoderm i el entoderm. En aquest teixit mesenquimatós se individualitzen els illots sanguinis de Wolff i de Pander; quan se capilititzen aquestes formacions (vasos primitius), presenten un plasma interior i una paret limitant: aquell conté el·lements redondejats i lliures i aquesta està tapiçada per cèl·lules aplanades, de especie endotelial. La cèl·lula messenquimatososa, progenitora de les cèl·lules parietals i plasmàtiques ha sigut traçada per Ferrata amb el nom de *hemohistioblaste*, quina ulterior diferenciació s'acondiciona baix l'adjunt esquema de Ferrata:



El promegaloblaste és una cèl·lula amb protoplasma forta-

ment basòfil, uninucluada' amb nucliols: son gran núcli ofereix una estructura intermitja entre el limfocit i el megalo-blaste (Ferrata i Negreiros-Rinaldi); això és el retícul cromatínic ostenta evidents discontinuitats, que donen al nucli un aspecte de trobar-se constituït per petites masses cromatíniques, disposades sense cap ordre i no seriades en radis. El megalo-blaste careix de nucliols i, per lo tant, assumeix la configuració del promegalo-blaste. Els megalo-blastes policromàtics i els ortocromàtics amb nucli gran (metrocit I d'Engel) són elements joves, i els de nucli petit (metrocit II d'Engel) representen estats de vellesa (Pappenheim). Els megalocits careixen de nuclis i poden ésser basòfils, policromàtics i ortocromàtics (hipercroms).

PERÍODE EMBRIONARI INTERMIG, HEPÁTIC O REMEDULAR.—En aquest període de la vida embrionaria se manifesta la primera activació de dues glàndules ja individualitzades per a la hematopoesi: fetge i melsa. Aquí també intervé activament, predominantment, com cèl·lula matriu dels glòbuls rojos, la cèl·lula indiferent o limfocit, derivada, no de la cèl·lula messenquimàtica, sinó dels elements connectius intervalasals (hemohistioblaste). En la eritrocitogènesi intrahepàtica es produeixen elements cel·lulars eritroblàstics més petits i de fisonomia peculiar. En primer lloc apareixen el proeritroblaste, amb nucli, nucliolat, qual retícul es presenta interromput per espais clars a modo de fenelles i amb protoplasma hiperbasòfil (fenòmen paradoxal de Ferrata). El eritroblaste té típica estructura nuclear radiada. I en últim lloc neix l'eritrocit, que'n res es diferencia del glòbul roig de la sang adulta. Al principi del període hepàtic es veuen en la sang cèl·lules megaloblàstiques i eritroblàstiques.

Els megalo-blastes i megalocits ostenten amb poca freqüència granulacions basòfiles intraplasmàtiques. Aquestes són, pel contrari, abundants en els eritro-blastes i en els eritrocits del període hepàtic.

PERÍODE MEDULAR.—La tercera etapa de la eritrocitogènesi es compleix en la mèdula òssia, aon restarà definitivament. Aquella s'inicia del mateix modo en el limfocit, que manifesta idèntica diferenciació a la estudiada en el període hepàtic. A contribuir a l'estudi de la eritrocitogènesi medular s'han encaminat nostres investigacions.

TÈCNICA.—Nostres investigacions han recaigut en la mèdula òssia d'alguns mamífers (cobais, conill i moltó jove). Per a l'ob-

tenció de frotis i seccions microscòpiques (inclusió en parafina, congelació mijantsant l'àcid carbònic, etc.) hem seguit les indicacions del llibre de Schridde i Naegeli. Per a la impregnació ens hem servit dels mètodes de May-Giemsa (panòptic de Pappenheim), Unna-Pappenheim (vert de metilè-pironina, reforçat moderadament amb pironina), Ramón i Cajal (urano-formol-plata), Achúcarro — del Rio Hortega (tanino-plata-amoniacal), etc.

I

Els linfoidocits de la mèdula óssia oscil·len entre 8 i 20 μ .

Llur citoplasma és francament bassòfil, sense grànuls azuròfils, sense secreció azuròfila, no homogeni i rara vegada vaquolitizat; el nucli és únic, redonejat, central o quelcòm ex-cèntric, oval o reniform i delicadament contornejat per una subtilíssima membrànula. Amb l'impregnació May-Giemsa adquireix col·loració roig-violeta suau; la cromatina es troba preparada en un finíssim retícul, quina morfologia és axagrínada o comparable a l'aspecte que mostren les fibres de la part superficial de la nou de cocu (Ferrata). L'existència de dos o més nucliols és constant.

Aquest linfoidocit de la mèdula óssia, quan s'orienta cap a la eritrocitogènesi, dóna lloc a la formació dels elements linfoides progenitors dels eritrocits, conforme a l'esquema següent de Pappenheim, modificat per Ferrata:

Linfoidocit—proeritroblaste→eritroblaste basofil→eritroblaste policromàtic→eritroblaste ortocromàtic→eritrocit.

PROERITROBLASTE.—Ferrata i Negreiros-Rinaldi denominen proeritroblastes als eritroblastes basoplasmàtics, de nucli incompletament diferenciat, per la presència de nucliols i per la estructura radiada imperfecta.

El proeritroblaste representa certament una fase de la eritrocitogènesi, com han establert Ferrata i Negreiros-Rinaldi?

Perquè els atributs senyalats al proeritroblaste no li poden otorgar personalitat pròpia. El signe dels nucliols no constitueix motiu eficient per a el tema, tota vegada que respecte an aquest punt els parers dels hematòlegs no són unànims, com ho patentitzen les indagacions de Maximow i Decastello i Krjukow, al sorprendre quelques eritroblastes amb nucliol. I pel fet de la presència dels nucliols no s'està autoritzat a establir noves de-

marcacions en la evolució ontogènica del eritrocit. I a part del signe del nucliol ja no trobém altres qualitats diferencials, perquè la hiperbasofília plasmàtica es troba en el eritroblaste i la especial configuració íntima nucliar marca un estat de transició imprecís entre aquest últim i el linfoidocit.

Nosaltres creiem que la individualitat del proeritroblaste pot establir-se d'un modo rigurós mitjansant un mètode col·loquant apropiat, degut a que'l procedir de May-Giemsa no té el suficient alcanç analític. Amb el mètode de Unna-Pappenheim (pironina-verd metilè, lleugerament reforçada la barreja amb pironina) és possible estudiar qualitivament el proeritroblaste. En la fase proeritroblàstica hem lograt sorprendre una interessant dicotomia evolutiva, que concretarem amb els noms següents: proeritroblaste linfoidocitari i proeritroblaste linfoides. A continuació descriurèm i explicarèm aquestes subfases proeritroblàstiques.

1. *Proeritroblaste linfoidocitari*. — Amb el verd metilè i la pironina hem tintat en la mèdula óssia certs el·lements citològics, d'aspecte linfoidocitari, de citoplasma hiperbasòfil, no homogèni, amb nucli gran, pàl·lidament tintat (el mètode de Unna-Pappenheim no consenteix apareixer cap estructura del retícul cromatínic), gran, oval o reniform, central o excèntric i amb nucliols. Aquesta cèl·lula es diferencia del linfoidocit per la exagerada basofília del citoplasma, però és semblanta a ell en quan a la seva morfologia nucliar. En lo que's refereix als nucliols hem de manifestar que hem arribat a sorprendre'ls en nombre insòlit en qualques nuclis; en aquests cassos, dos o tres guarden les dimensions habituals i els demás (fins a 10 o més) es mostren contrets, a manera de grànols irregulars, amb dimensions distintes i sempre molt fines i amb formes irregulars. Contemplant tan especialíssimes formacions, hem sigut suggerits de pensar en un fenòmen de fragmentació del nucliol, perquè la explicació basada en un precipitat de pironina tinguérem de deixar-la, tota vegada que's un fenòmen que's repeteix en tots els preparats, dintre dels més exquisits cuidados tècnics. I observi's que'n els nostres reiterats treballs sobre el nucliol dels el·lements linfoides de la sang, fa temps publicats, descriguérem la pienosi d'aquest petit òrgan cel·lular com a forma de degeneració. Allavors, doncs, qual fenòmen és de indole degenerativa, la fragmentació o la pienosi del nucliol? No sabem com resoldre

ara aquesta qüestió; però tenim el convenciment que la pienosi és de índole degenerativa.

El citoplasma del proeritroblaste linfoidecitari no és homogeni com en l'eritroblaste, però ofereix la hiperbasofilia paradoxal de Ferrata. Hem dedicat atenció a les reaccions de les plastines basófiles del nucli i hem conseguit veurer que són escases com en el linfoidecit: consisteixen en petits e incomplets filaments, que surten d'aquí i allà, imprecissos, sense connexions amb nucliol, inconstants i difícils d'impregnar per la pironina.

El proeritroblaste linfoidecitari documenta amb rigorosa exactitut una prioritat de diferenciació en favor del citoplasma del linfoidecit: prova evident de que la primera modificació d'aquest corr a càrrec de són protoplasma.

2. *Proeritroblaste linfoide*.—En aquesta cèl·lula el citoplasma, intensament pironinòfil, adquireix el grau més elevat de la basofilia. Es tracta d'un element semblant al proeritroblaste linfoidecitari en sos caràcters generals morfològics i quantitatius, amb plasma homogeni en cert modo, tota vegada que encara deixa percebir una trama espongioplasmàtica grollera i gromullosa. El nucli es descubreix en sobreactivitat funcional, patentitzada pel hipereromatisme de la cromatina i per la abundant producció de plastines. La cromatina obté el grau màxim de la impregnació amb el verd metilè i la col·loració panòptica de Pappenheim: el filament cromatínic adquireix una robustesa no acostumada, es fa discontinu en grossos cromosomes, de forma irregular i la tela no deixa d'ésser perceptible. Al ensemps el nucli es troba atravesat per grossos manolls plastínics, fortament pironinòfils, variables en llargada i amplada, disposats sense determinada orientació i amb freqüents dicotomies o tricotomies. La intensitat cromàtica i la quantitat de les plastines nucliars impossibiliten en moltes ocasions sorprendre al nucliol, i en els cassos favorables ho hem pogut trobar com producció redonejada, robusta i ben tintada submergit o empresonat en les revoltes dels fasciculs plastínics: distintament solzament hem conseguit veure dos nucliols en un mateix nucli.

Al costat del fenòmen paradòxic de Ferrata (basofilia plasmàtica augmentada en els eritroblastes i proeritroblastes) cap també col·locar el fenòmen no menys paradòxic de la hiperbasofilia plastínica del nucli, que nosaltres creiem ésser els pri-

mers en haver-la posat de manifest. L'importància d'aquest fet, si hem de jutjar per nostra personal experiència, queda demostrada amb la consideració de que la plastinització del nucli i la fragmentació de la cromatina en grossos cromossomes s'ofereixen simultànies en el proeritroblaste linfoide. En cert mode podríam enunciar que la fragmentació cromatínica es forja a expenses dels robustos manolls plastínics. Mai en la mèdula òssia dels mamífers i de qualques vertebrats inferiors (gall, colóm) hem sorprès tan especial i intensa plastinització nucliar fóra dels el·lements linfoïdes de la sèrie roja i aquest fet mereix cuidadosa anotació, per quan ha passat desapercebut dels investigadors, a excepció de Pappenheim que fa una vaga alusió, com després veurem. La fragmentació del retícul cromatínic en cromossomes, lo mateix que la plastinització, deuen interpretar-se com una fasce d'activitat premitòsica.

Com abans diguerem, les plastines nucliars han sigut objecte de menció per part de Pappenheim, segons es despren de ses manifestacions, expressades en els tèrmens següents: «Im lymphoiden Erythroblast ist das Parachromatin oft noch basophil (Karyobasophilie). Mit der zunehmenden Alterung und Pyknose findet relative (und absolute) Chromatinzunahme bei Parachromatinschwund und Verlust der Radiärstruktur statt». (*Pappenheim. ATLAS. Suppl. Bd. Drit. Lief.*)

Després d'exposades les anteriors manifestacions podem asseverar que'l terme proeritroblaste ofereix una concepció molt més ampla i més precisa, conforme, en principi, amb el significat assignat per Ferrata i Negreiros-Rinaldi, encara que més completa, perquè explica millor les mutacions successives del linfoïdocit.

En les fases proeritroblàstiques narrades per nosaltres no hem lograt observar figures nucliars mitòsiques o amitòsiques; ço no vol dir que no admitim la possibilitat d'una segmentació carioquinètica.

ERITROBLASTES. — Són cèl·lules basoplasmàtiques amb un sol nucli o dos, en els cassos de citodièresi, amb estructura radiada típica (Pappenheim) i sens nucliols. Aquests caràcters estan subjectes a variacions en relació amb els estats de juvenut o revelliment: les cèl·lules joves són de hàbit linfoide i les més avançades en l'evolució eritrocitogenètica ostenten una atenuació progressiva de son aspecte linfoide. Per aquest motiu des-

cribim dues varietats del eritroblaste, que ofereixen fisionomia propia.

Eritroblastes linfoides.—Quan s'estudia el eritroblaste dels autors, quan es valoren ses qualitats genèriques. posant a contribució els procediments de coloració tantes vegades citats, és treball fàcil realitzar els dos agrupaments eritroblàstics que anem a descriure. El eritroblaste veritable és un el·lement citològic morfològicament linfoide, de citoplasma hiperbasòfil (fenòmen paradoxic de Ferrata), no granulós, homogèni, amb nucli radiat típic, amb abundantes plastines, sense nucliols i en constant activitat mitòsica.

El citoplasma és homogèni, havent perdut aquell aspecte de groller reticul espongioplasmàtic del proeritroblaste: però encara no conté cap vestigi d'oxifilia plasmàtica, si bé en alguns exemplars es mostra quelcóm decaiguda la reacció plasmobasòfila. El nucli, sense indicis nucliolars, conté evidentes les plastines basòfiles, encara que quelcóm atenuades, i ostenta una estructuració radiada molt característica. El caràcter predominant d'aquest nucli és presentar freqüentes mitosis, en molt diferents fases.

La característica del linfoïdocit és la indiferència, lo peculiar del proeritroblaste és la hipergènesi plasmínica, tant en el citoplasma com en el nucli, i la qualitat preeminent del eritroblaste linfoide té sa residència en l'activitat carioquinètica. A propòsit dels fenòmens que se succeeixen en la eritrocitogènesi podem dir, sintetitzant, que's poden agrupar en dues categories: en la primera inclouríem aquells fets pertanyents de la diferenciació citològica i que vindrien a ésser els preparadors de la especial formació de la hemoglobina; en la segona categoria inclouríem la serie de fenòmens resultants de la iniciació i de la terminació de la hemoglobinogènesi. Els primers fenòmens són de índole citològica i els segons de caràcter bioquímic. A l'acabar l'evolució del eritroblaste linfoide quedaria, *ipso facto*, ultimada la diferenciació citològica, perquè les modificacions cel·lulars subsegüents, incloses entre el normoblaste i el eritrocit, tenen totes el mateix exponent microquímic.

NORMOBLASTES.—Tenen tots una mateixa característica, per ésser tots cèl·lules nucliades. El nucli és únic o doble (divisió amitòsica no acabada), sense nucliols, amb estructura radiada ben manifesta (exemplars joves) o en forma de bloc redonejat no estructurat (nucli pïcnòtic dels eritroblastes madurs) sense nu-

cliols amb segmentació amitòsica o indirecta, o rars vegades amb divisió nucliar carioquinètica (primeres fases de l'evolució normoblàstica), sempre reduït de volum en relació al citoplasma i amb fenòmens de pïenosi més o menys avançada.

El citoplasma presenta reacció labil, perquè és el substracte d'intensa sobreactivitat bioquímica, quina finalitat s'obté amb la producció del cromoproteic hemoglobínic, que admet tota la fisiologia del glòbul roig. El protoplasma es presenta eixamplat i a mida que disminueix el nucli s'augmenta la superfície lliure. Per la reacció podem dividir els normoblastes en basòfils, policromàtics i ortocromàtics.

a) *Normoblastes, basocromàtics o basòfils*.—La basofília és força menys pronunciada que'n l'eritroblaste linfoide i molt semblant a la basofília del monocit de la sang circulant normal. El nucli és d'estructura radiada i en general poc pïenòtic.

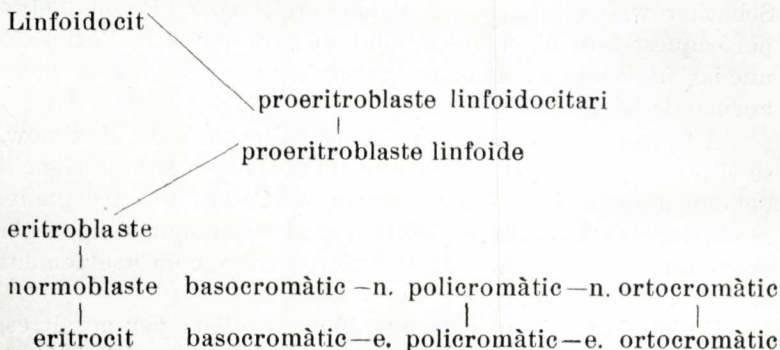
b) *Normoblaste policromàtic*.—Es una cèl·lula de protoplasme policromàtic: la policromatofília pot ésser també azuròfila (Ferrata). La degeneració nucliar es fa més patent.

c) *Normoblaste ortocromàtic*.—El citoplasma presenta les reaccions normals del eritrocit de la sang circulant. El nucli sofreix els graus més avançats de la pïenosi.

Es de notar que'l citoplasma del normoblaste pot contindre un grànol o massa cromàtica (a vegades dos o més), colorejable pel verd de metilè i altres colorejants nucliaris (cariorrexí).

Cada una de les citades varietats del normoblaste poden engendrar al ensemple sos respectius eritrocits.

Evolució de l'eritrocitogènesi en la mèdula òssia:



II

El fi de l'evolució filètica de l'eritrocitogènesi és l'eritrocit o cèl·lula hemoglobínica de la sang circulant: en els vertebrats superiors (mamífers, a excepció dels til·lòpeds) és una cèl·lula privada de nucli—segons Pappenheim el eritrocit no nucliari deuria anomenar-se *eritrocitode*.

El eritroblaste dels mamífers expulsa el seu nucli i es transforma en eritrocit definitiu; aquest és un fet per tots admés. ¿Cóm es verifica aquesta expulsió? Aquest és el punt controvertit. Sobre aquest assumpte s'han donat diverses hipòtesis i aquestes s'han resolt en les següents teories:

1. *Teoria de l'expulsió total del nucli*.— Ha sigut exposada per primera vegada per Rindfleisch. El nucli, quan ja obtingut el grau de diferenciació necessari, experimenta un procés emigratori centrífug en el normoblaste, fins a guanyar sa periferia, des de la qual, poc a poc, adquireix successives posicions expulsives, acabant per quedar definitivament extracel·lular (Bizzozzero, Howell, Aubertin, Ehrlich i Engel). Els nuclis expulsats degeneren o són fagocitats; hi ha autors que han cregut veure un ulterior destí de les masses nucliars expulsades, suposant que quelques vegades poden engendrar nous normoblastes (Ehrlich) o petits limfocits (Engel).

Maximow admet l'enucleació *in toto*, previa la picnosi del nucli. Aquest modo de veure ha trobat partidaris distingits, com Schacharow, Dominici, Albrecht, Helber, i, en part, Pappenheim; però aquest sabi últimament citat declara que si bé l'expulsió nucliària *in toto* és un fenomen general, no representa el modo normal de la enucleació.

A la teoria de Rindfleisch, inclòs a l'acceptació de Maximow, se li pot oposar l'objecció de que no pot explicar la presència del corpuscle de Jolly i de les anelles de Cabot, tot i acceptant-se el parer de Schilling, segons el qual solzament s'expulsa la cromatina nucliària, quedant la oxieromatina com a element residual.

En la mèdula òssia dels mamífers estudiats per nosaltres, rares vegades hem sorprès el fenomen de Rindfleisch-Maximow. Es cert que com més avançada està l'evolució del normoblaste, el nucli sembla que adopti posicions més excèntriques; emperò

no hem lograt veure les últimes etapes de l'èxode nuclear. Per altra part, hem observat que alguns exemplars megacariocítics englobant masses nuclears eritrocítics, que nosaltres tenim per eritroblastes digerits i que previament havien sigut fagocitats en totalitat, çó és, amb nucli i plasma; perquè és possible assistir a totes les fases del procés de citodigestió pels megacariocits. Aquestes cèl·lules gegantines inclouen els eritroblastes, després es mostren fenòmens de reducció del protoplasma d'aquests, que's presenta cada vegada més pàlit i menys detallat, i per últim queda reduït a anell fi i irregular; el nucli, més resistent a les accions lítiques, roman intacte durant cert temps, però acaba per desaparèixer o partir-se irregularment. Per consegüent, sens negar l'existència del fenomen de Rindfleisch, creiem més acceptable la versió de Pappenheim, que la jutja com natural, encara que no normal.

2. *Teoria de la cariorrexi amb ulterior expulsió dels fragments nucliaris.* — Segons Weidenreich i Jolly el nucli eritroblàstic experimenta una fragmentació degenerativa, amb la subsegüent pïcnosi de les masses nucliaris resultants, que són en definitiva expulsades de la cèl·lula o tenen de suportar en ella un fenomen de cariolisi (Weidenreich). Negreiros-Rinaldi ha detallat formes valentes de cariorrexis intracel·lular, amb formació de nuclis bi, tri i tetralobulats (en la mèdula òssia i en el fetge embrionari). La cariorrexis ha sigut apreciada com un procés netament embrionari; pot admetre's com fenomen patològic, emperò no com procés normal (Pappenheim).

En la mètula òssia no hem pogut veure les curioses figures de foliació nucliar (cariorrexi).

3. *Teoria de la cariòlisi endocel·lular.* — Primerament ha sigut professada per Köllicher i Neuman, i actualment ha sigut defensada per Israel i Pappenheim. El nucli del eritroblaste, a l'acabar sa activitat proliferativa, disminueix successiva i progressivament són volum per un mecanisme bioquímic de cariòlisi; i una de ses últimes etapes es constitueix per la presència dels corpusculs de Jolly-Howel-Schmauch o per l'existència de les granulacions azuròfiles de Ferrata.

Aquesta teoria és altament suggestiva per explicar, entre altres coses, les citades formacions endoglobulars de Jolly, Howel, Schmauch, Ferrata i altres, i la pienosi nucliar, fet constant, observat per tots els investigadors. I referent a n'aquest argument de la cariòlisi com a mecanisme normal de l'enucleació

del eritroblaste, entre quins partidaris pretendrem afiliar-nos, mentres recents i decissius fets no l'invaliden, hem de presentar nostre punt de vista, mantenint per nostres investigacions en els dominis fisiològics de la mèdula òssia, com explicació, complement i adició als fets coneguts.

Els documents de la cariòlisi consisteixen en la picnosi, en les anelles de Cabot, i en els nomenats restes nucliar. A ells els farem referències personals.

Picnosi. — Quan l'eritroblaste ha complert sos processos proliferatius o diferenciants i ingressa en la per nosaltres dita fase de normoblaste, el nucli està destinat a degenerar per no ésser precis per a les ulteriors intervencions cel·lulars. Allavors s'inicia un particular procés, en el qual la formació nucliar es presenta en involució o degeneració picnòtica; la relació de superfícies entre'l citoplasma i el nucli a cada pas va experimentant alteracions en favor del primer i en la proporció de l'avençament de la cariòlisi, fins arribar als moments finals, en els que s'observa un' ampla superfície citoplasmàtica i un area nucliar minúscula. Dèu del principi de la fase normoblàstica tot moviment carioquinètic acaba, i tot lo més resta en permanència breu una activitat nucliar amitòsica o indirecta. Per lo demés l'estructura cromatínica experimenta també els efectes de la picnosi del nucli; primer es mostra molt clarament radiada, desseguida va fent-se confosa, es difumina després i després es borra totalment, no essent possible distingir al final cap vestigi del retícul cromàtic ni estructura radiada i allavors el nucli queda al estat d'un bloc redonejat, quasi homogeni i petit.

Nosaltres ens creiem autoritzats per a afirmar que'n el procés cariòlític intervenen, entre altres factors, el suc nucliar. En dit procés el paper del suc nucliar s'exerceix mitjansant la dissolució de la cromatina i la disminució de la pressió osmòtica intranucliar. Que's verifica aital dissolució es prova pel fet de la desaparició de l'estructura radiada, no obstant observar el fenomen paradòxic de la major intensitat amb que s'impregna el nucli amb les matèries colorants específiques. El nucli en picnosi, al principi, pren els colors amb més dalèr, però la coloració adquirida no produeix contrastes entre els diversos substractes nucliar, és com taca homogenia. Existeix altra prova indirecta en favor del procés de dissolució mitjansant el suc nucliar. Es un detall que s'observa amb qualquna freqüència i consisteix en la presència en el citoplasma del normoblaste

d'alguna o algunes partícules de cromatina, de gruix variable i amb reaccions de la citada substància nuclear. I per a explicar aquesta particularitat no n'hi ha prou amb la cariorrexí, perquè el nucli sembla intacte i fins ben estructurat en moltes ocasions; el mecanisme de la producció de dites partícules deu consistir en petites expulsions de cromatina, disolta en suc nuclear, a través de la tela nuclear.

Acceptant la nostra conjectura, el procés de la pïenosi es troba més clar, perquè dependria de l'acció hipertònica del contingut intraplasmàtic de l'eritrocit. És natural que aquest mecanisme tan senzill deu estar regit per accions bioquímiques no conegudes. Però cautiva l'idea abans exposada — la pïenosi no pot considerar-se produïda per un a modo de desgast perifèric del nucli—per ésser la explicació més comprensiva de tot el procés cariolític. L'acció hipertònica s'exerceix per part del plasma cel·lular, no perquè an aquest es trobi realçada la tensió osmòtica sinó per la hipotonia del nucli, que és efecte directe de l'augment de líquid o suc nuclear.

I en últim terme, la cariorrexí obeeix a un mecanisme semblant: hipotonia nuclear, per augment del seu suc i subsegüent acció hipertònica (compensadora) del citoplasma, que produeix la ruptura de la tela nuclear i extravassació de la cromatina, que dona lloc a les curioses figures citades per Negreiros-Rinaldi i altres. D'aquí vé la lògica inferència de que les teories cariorrèxica i cariolítica presenten punts de conciliació: la cariorrexí és una modalitat de la cariolisi.

Contra la teoria de la cariolisi s'ha brandat com argument la troballa de Castronuovo (un corpúscul semblant al de Jolly) en els eritrocits nuclears del colom i d'*emys europea*; aquest corpúscul —també pot ésser intranuclear—ha sigut considerat per son descobridor com un producte de secreció nuclear. Nosaltres repliquem que el corpúscul de Castronuovo és degut a una expulsió d'una petita part de cromatina disolta en el suc nuclear, com veniem dient.

El procés de la cariolisi troba un nou argument de defensa en la troballa realitzada per nosaltres en el eritrocit policromàtic de la mèdula òssia i de la sang circulant del conill. Amb el blau de metilè boràcic de Gosio (solució vella) hem obtingut poguer impregnar en tals eritrocits un corpúscul redonejat, tintat en roig del tamany d'un còs de Jolly i situat quelcòm excentricament. Per a veurer bé aquests corpúscols és conve-

nient realitzar una curta diferenciació pírca i un petit excés en aquest sentit fa esgrogueir aquesta formació o la destinta. Els corpúscols eritròfils descrits deuen mirar-se com estats molt avançats de cromatolisi cariolítica, com una pínosi terminal; o poden considerar-se com cossos de Jolly degenerats o molt atenuats.

Cossos en anell de Cabot.—Fóren descrits en 1905 per Cabot i posteriorment han sigut estudiats per Ferrata i Viglioli, Sabrazés, Naegeli, Pappenheim, Rusow i Juspa. S'els ha trobat en els eritrocits basocromàtics, polieromàtics i ortocromàtics, solitaris o amb restes nucliaris i en els eritrocits amb puntuacions basófiles o desprovistes d'elles. En el enverinament experimental amb les sals de plom (Cabot) es presenten en figura de 8 de gorisme, de raqueta, d'anell, etc. Segóns Ferrata i Sabrazés representen la tela nucliar del normoblaste; Negreiros-Rinaldi els considera constituïts d'anfipirenina.

Es difícil precisar la significació morfològica dels anells de Cabot. Presenten l'impregnació mitjansant la coloració Giemsa i la pironina; però no's tinten mitjansant el verd de metilè. És molt versemblable que representin la tela nucliar degenerada; la substància que les integra no deu ésser d'origen citoplasmàtica (reacció positiva violeta rojenca enfront al mètode de Giemsa), no es cromatina (falta d'impregnació al verd de metilè) i és possible que sia una plastina.

Nosaltres expliquem la formació de les anelles de Cabot o teles nucliaris per una hidropesía tòxica del nucli; una cariolisi tòxica regenerativa amb producció inusitada de suc nucliar, que inflen, al ensemps que disolen la cromatina, la tela nucliar; i al desaparèixer aquesta cromatina disolta queda l'anell de Cabot com reste de la tela nucliar.

Granulacions atzuròfiles.—Foren vistes per Naegeli en la sang circulant (qualqünes hemopaties). Com el seu nom indica, s'impregnen pel eossinat d'atzur del colorant de Giemsa. Naegeli les anomenà *granulacions basófiles roges*. Han sigut estudiades per Ferrata (granulacions atzuròfiles), que les significà com residuus nucliaris d'una cariorrexia patològica. Aquests petits òrgans són, ordinàriament, fins, o arriben a proporcions colossals entre les espècies granuloses (fins les dimensions d'un petit còs de Jolly). Les granulacions atzuròfiles, com els anells de Cabot, són produccions endoglobulars patològiques (Naegeli, Ferrata, etc., etc.).

En la mèdula òssia del conill adult no és infreqüent trobar eritrocits amb grànuls atzuròfils, impregnables en color rojent violeta amb el mètode de Giemsa. Aquestes granulacions mie-loidees s'ofereixen en dos tipus distints, macro i microgranulós; la macrogranulació atzurófila és gran, redonejada, de color roig violeta molt pàlit, amb centre clar, i són tamany excedeix al d'un grànul eosinófil; aquestes macrogranulacions tenen l'aspecte d'una taca roig violeta i habiten en els eritrocits amb blocs basòfils o cianòfils (mètode de Giemsa). La granulació fina o microgranulació, que també s'observa en la sang circulant del conill, és de dimensions reduïdes; el seu nombre és sempre abundant i sa coloració és semblanta a l'anterior.

¿Qual és el mecanisme genètic de la granulació atzurófila, normal o patològica? ¿Representa estadis terminals de la cariorrexí de l'eritroblaste?

Sa producció no s'aclara invocant l'ordinari procediment de cariolisi amb cariopienosi, que tant bé explica la formació del còs de Jolly. I respecte a la seva gènesi mitjansant la cariorrexí no satisfá, si nó considerem aquest procés com una modalitat de la cariolisi. La granulació atzurófila és un derivat nucliar: la cromatina, una vegada disolta en el suc nucliar, pot escampar-se per la superfície cel·lular, previa la desaparició de la tela nucliar o per sa permeabilització anormal, quedant aquélla escampada en el citoplasma en forma de grànuls. Aquest procés pot tindre lloc en l'estat normal (ho documenten nostres troballes) i en el patològic.

III

En els eritrocits de l'home i dels mamífers (excepte els tilòpets) s'han trobat diversos corpuscles intraglobulars — còssos hemoglobínogens de Petrone i d'altres autors italians, nucleoi-de de Lavdowsky, pseudonucli, Dauernkern, Kernrest, nucli de Böttcher, King, Kronberger; Kernpersistenz de Grosso, Kapselkörper de Schilling-Torgau, etc.) — Totes aquestes formacions representen en cert modo corpuscles endoglobulars o restes nucliars centrals, que diuen en favor d'una persistència de residuus morfològics nucliars.

Les indagacions de Böttcher, Kollmann, Foà i Engel han posat de manifest un corpuscle endoglobular, central, incolor i un

grànul intracorpúscular (Böttcher). Lavdowsky trobà, mitjant-sant l'àcid iòdic un nucliòide. Bremer en alguns cassos logrà tintar amb l'eosina i el blau de metilè, una formació redonejada. El mètode de Altmann ha proporcionat a Arnodd l'impregnació d'un Innenkörper granulós i filamentós (reste nucliària). Amb una tècnica especial Giglio-Tos, Phigini i particularment Petrone, han trobat una formació nucliària, visible ja en la perifèria del citoplasma del eritroblaste; el nucli de Petrone, durant l'enucliació, emigra cap al centre de la cèl·lula, on s'hi localitza, acabada ja l'expulsió del nucli. Maximow ha pogut impregnar en color blau el reste nucliària mitjant-sant l'eosina i blau de metilè; Maximow explica que'l seu nucliòide apareix després de l'expulsió total del nucli. Amb el blau de metilè i la diferenciació pícica, Reddingius logrà tintar el corpúscle intern dels eritrocits; Pappenheim obtingué semblants resultats amb l'eosina fenicada i el China-blau, i posteriorment pel blau de metilè i l'àcid pícic. Preisich i Heim han trobat semblants imatges endoglobulars, lo mateix que King per mediació del blau de metilè, l'àcid pícic i l'eosina.

Les pesquises de Kronberger, de les més interessants, han posat en evidència en els eritrocits de l'home i dels mamífers un corpúscle intraglobular, redonejat i tintat en roig carmesí per mitjà del blau alcalí de Löffler i la diferenciació amb l'àcid pícic. La publicació de Kronberger, a la que van annexes una làmina en colors i un dibuix microfotogràfic (Folia Hämatologica, Arch. Bl. XIII, 1912), ha posat a l'ordre del dia el tema de l'existència d'una morfologia nucliòide intraeritrocítica. Grosso ha alcançat la plena confirmació de les investigacions de Kronberger, aixamplant-les amb aportacions personals: el corpúscle de Kronberger, segons Grosso, es consegueix tintar amb certa facilitat en l'home, mono, cobai, ratolí i rata, mentres que'n el conill, caball, bou i murtó, és difícil col·lorar.

A n'aquest tema hem dedicat nosaltres dos extenses memòries; la primera fou publicada en *El Siglo Médico* (núm. 3,268, 1916):

«Las formas predominantes son las dibujadas en las figuras 2, 3, 4, 15 y 16. Ordinariamente se observa una formación redondeada, circuída de un halo incoloro y más excéntricamente el color del eritrocito » S'allotja en el Delle o excavació eritrocítica. Unes vegades dit producte és rigurosament redonejat i ben delimitat; altres vegades sembla ésser afistonejat o desfilat o en

capdell de revoltes apilotonades irregularment. No és una formació homogènia, perquè és possible discernir una estructura filamentosa, constituïda per un llarg filament, prim, fràgil i disposat en remolinada. No conté cromatina, perquè és refractària a la hematoxilina, al verd de metil i al procediment de Giemsa. En lo referent a la significació microquímica del corpuscle de Kronberger hem d'indicar:

1.^{er} Ha sigut possible sa impregnació mitjantsant el picrat d'atzur de metilè (còs neutre?).

2.^{on} Grosso ha conseguit sa tinció amb el picrat de verd de metilè (1).

3.^{er} Nosaltres també ho hem revelat pel blau de metilè alcali i la diferenciació pel nitrat d'urani (el corpuscle es tinta allavors en color rosa pàlid).

En la segona memoria (*Revista Valenciana de Ciencias Médicas*, 1916), confirmavem nostres primeres investigacions i les aixamplavem sobradament. Estudiada novament aquesta qüestió, afirmem la constància amb que's presenta la formació pseudonuclear en els eritrocits dels mamífers. Es troba versemblablement constituïda per plastines i oxicromatina en estats de degeneració.

La quasi unanimitat dels hematòlegs al admetrer una formació endonuclear és la major prova de sa existència en tots els eritrocits dels mamífers. Sobre aquest propòsit exposa Negreros-Rinaldi (*Morfología normale e patologica dei globuli rossi*, 1916): «No pretendo entrar en discusión sobre la significación morfológica de esta substancia, que, en realidad, con procedimientos técnicos los más desemejantes, se demuestra con relativa constancia en los eritrocitos de los mamíferos. Que la demostración de tal substancia sea efecto de accidentes imputables a la técnica usada, como entre otros, sostienen Ferrata i Naegeli, no parece probable dada la constancia de las investigaciones y la relativa semejanza morfológica producida por métodos diferentes». Per lo demás, aquest investigador també ha tingut la sort d'impregnar un nucliode en els eritrocits dels mamífers.

L'existència del nucliode pot invocar-se, i amb raó, com argument probant de la teoria de la cariòlisi, com modo normal de enucleació del normoblaste. Hem dit en aquest treball que la cromatina es dissol en el suc nuclear, a l'ensemps que's verifica

(1) ¿Es reacció de la oxicromatina?

la cariopienosi; abundant en aquest modo de veurer, suposem ara que les plastines nucliaris i, tal vegada, la oxicromatina resten insolubles en el líquid indicat, i d'aquest modo escapen a l'eliminació o expulsió extranucliar. Basem aquesta conjectura en els fets següents:

1.^{er} Nostres recents investigacions ens permeten exposar que'l nucliode és una barreja de paracromatina o plastina nucliar i oxicromatina.

2.^{on} El nucli dels elements linfoïdes del eritrocit conté plastines abundants i oxicromatina (Pappenheim).

3.^{er} El nucliode s'allotja en l'excavació eritrocítica i ocupa, per tant, la part que correspon al nucli expulsat.

IV

Resten, pendents d'estudi, les modificacions citoplasmàtiques que tenen lloc durant la involució del normoblaste. Solzament exposarém qualquna d'elles i en exposició breu, perquè la médula òssia dels mamífers adults presenta poques ocasions per a la investigació de la fina estructura del citoplasma.

CONDRIOCONTES I MITOCONDRIS, PLASTOSOMES.—Aquestes especials formacions mitocondrials han sigut principalment estudiades per Ciaccio, Meves, Schridde, etz. en la serie hemoglobínica de la sang. El primer investigador citat abans ha descrit en el linfoïdocit cadenets mitocondrials de granets finíssims o grànols vessiculosos aïllats. Les morfologies de condriocontes són força rares. I aquestes granulacions mitocondrials se logra impregnar-les en tots els elements de la eritrocitogènesi i solzament manquen en els eritrocits madurs. Ciaccio ha exposat la hipòtesi de que aquestes formacions mitocondrials guarden íntim nexa genètic amb la formació de l'hemoglobina (*Pathologica*, 1911). Sobre el mateix argument ha publicat Schridde un treball (*Untersuchungen über die Bildung des Hämoglobins. Anat. Anzeig.* Bd. XLII. 1912) en el que s'emet anàloga conjectura referent a la influència dels mitocondris en la hemoglobinogènesi, confirmant així la opinió de Ciaccio i Meves; Schridde exposa decisiu i resolt ses idees en les següents paraules que transcribím: *dass die Plastosomen die Vorstufen, die Bildner des «Hämoglobins sind»*.

Nostra personal experiència confirma les adquisicions

aportades per Ciaccio, Schridde i Meves, especialment els fets descrits per Ciaccio (*Folia Hæmatológica*. Bd. XIV, 1912. Arch.) aquest sabi anomena plastosomes a les formacions mitocondrials de les cèl·lules generadores dels eritrocits. No hem arribat a tintar els plastosomes en els eritrocits humans, moltó, cobai i conill. En la médula óssia hem indagat els plastosomes mitjantsant els mètodes del Altmann-Schridde, Ciaccio, Ramón i Cajal (urano-formol-plata) i Achucarro-del Rio Hortega (tanino-plata amoniaca) i altres. Els mètodes dels últims sabis citats, especialment el d'Achúcarro del Rio Hortega ens han proporcionat una impregnació intensa dels plastosomes en els proeritroblastes, on s'hi exhibeix amb exuberancia la formació argentófila: els linfoidocits ostenten generalment morfologies argentófiles més escasses i discretes.

En tèsi general, la riquesa en plastosomes marxa paral·lela amb la basofília del citoplasma. Veritablement els mitocondris en les cèl·lules de la serie roja tenen estreta relació amb la producció d'hemoglobina. Aquest assumpte de les formacions mitocondrials exigeix més ample examen, perquè s'està molt lluny d'haver-se agotat.

APARELL RETICULAR DE GOLGI.—Ha sigut estudiat per Siniaglia i Berenberg-Gossler en els eritrocits de l'embrió del pollet. Fañanás ha lograt impregnar-lo en tots els elements eritrocitogenètics de l'embrió. Cajal ha lograt impregnar-lo a les trenta-cuatro hores de la vida embrionaria i creu que ja està ben diferenciat en fases anteriors (illots sanguinis de Wolf). «Trátase (Ramón y Cajal «*Trabajos del Laboratorio de investigaciones biológicas*» T. XII, 1914) de un conglomerado, denso y esférico, de materia argentófila, situado en contacto con el núcleo, del lado del máximo protoplasma... Llegada la fase mitósica, el aparato se transforma en gránulos diseminados, que se reparten en cada célula hija, concentrándose en torno del centrosoma». En cap ocasió hem obtingut la impregnació de l'aparell reticular de Golgi en la médula óssia mitjantsant el mètode del nitrat de urano-formol-nitrat de plata.

GRANULACIONS BASÓFILES.—Foren descubertes per Ehrlich en 1880. Se tinten amb els colorants bàsics i mitjantsant el mètode de May-Giemsa adquireixen color blau. Bloch, Naegeli i Ferrata han trobat aquestes granulacions en els òrgans hematopoiètics i en la sang, en el embrió i en el mamífer adult. Són freqüentíssimes en els eritrocits de la fase hepàtica de la hema-

topoiesi embrionaria. Son origen plasmàtic ha sigut admés per Pappenheim, Askanazy, Sabrazés, Schilling-Torgau i altres. Nosaltres també les significuem com un remanent de la basofilia del eritoblaste. En la médula óssia hem sorprés qualques exemplars amb granulacions basòfiles. Existeixen qualques eritrocits ortocromàtics amb taques basòfiles, irregulars, en gromulls o en blocs, de dimensions desiguals i de color blau pàl·lid verdós.

POLICROMATOFILIA. — També fou descrita per Ehrlich en 1880. En la sang circulant i en la médula óssia del conill la policromatofilia constituïa una troballa freqüentíssima.

Com nostres observacions són molt escasses en els territoris de la basofilia i de la policromatofilia, solzament consigném aquesta lleugeríssima anotació.

CONCLUSIONS

I. En la médula óssia dels mamífers s'efectúa l'hematopoiesi fisiològica dels eritrocits o eritrocitogènesi. Entre les cèl·lules línfoides d'aquest teixit es troba constantment un element indiferenciat, que correspon per ses qualitats al línfoidocit de Pappenheim (hemocitoblaste de Ferrata, etc.) I en virtut d'estímul específic el línfoidocit augmenta sa basofilia citoplasmàtica (proeritroblaste línfoidocitari), persistint un mínim reaccional nucliari; després la basofilia del plasma augmenta, es plastinitza el nucli i se fragmenta la cromatina (proeritroblaste línfoide); els nucliols persisteixen en les cèl·lules proeritroblastiques. An això segueix un procés mitòsic de gran activitat, acompanyat també de forta reacció bàsica del citoplasma (eritoblaste línfoide); en una ulterior fase la reacció del protoplasma pot ésser basòfila, policromàtica i ortocromàtica i el nucli sospén sa hiperactivitat mitòsica, adopta el procedir de citodièresi indirecta i es fa picnòtic, fins a obtenir la morfologia del còs de Jolly (normoblaste); i finalment desapareix el núcli (eritrocit).

Els eritrocits basocromàtics, policromàtics i ortocromàtics poden ser engendrats respectivament pel normoblaste basòfil, policromatòfil i ortocromàtic.

II. El normoblaste pert son nucli i es converteix en eritrocit. Aquesta enucleació pot ésser per expulsió total del nucli, per cariorrexí i per cariolisi. Nosaltres admetém una enucleació cariolítica; aquesta s'efectúa per pínosi, amb modificacions del

sue nucliar, que es converteix en disolvent de la cromatina i d'aquest modo exerceix la picensi. Els corpúscles de Jolly-Howell, Schmauch i el nostre (eritrocits policromatòfils de la sang del conill) representen nuclis normoblàstics en picensi avançada. Els anells de Cabot són restes de la tela nucliar del eritroblaste i són produïts per una hidropesia nucliar deguda a una cariòlisi patològica. Els grànuls atzuròfils de Naegeli i Ferrrera i els nostres resulten de la dissolució de la cromatina pel suc nucliar e impregnació de la superfície del citoplasma per aquell: aquestes granulacions són de origen cariòlitic.

III. En els eritrocits dels mamífers existeix un corpúscle nucliode constant. Contenen versemblablement plastines nucliar i oxicromatina degenerades. Dit corpúscle deu mirar-se com el vestigi d'un nucli, després d'experimentar el llarg procés de la cariòlisi.

IV. Els mitocondris o plastosomes de Ciaccio, Meves i Schridde, són una formació endocel·lular constant en tots els elements de la eritrocitogènesi, excepte els eritrocits. Deuen tenir intervenció en el procés de la formació de l'hemoglobina.

En la médula òssia no hem lograt pesquisar l'aparell reticular de Golgi.