
ATTI ACCADEMIA NAZIONALE DEI LINCEI
CLASSE SCIENZE FISICHE MATEMATICHE NATURALI

RENDICONTI

OLIVIERO MARIO OLIVO, ISABELLA GALLIANI

Fattori dell'incremento di attività mitotica nelle colture in vitro di fibroblasti a seguito di lesioni traumatiche

*Atti della Accademia Nazionale dei Lincei. Classe di Scienze Fisiche,
Matematiche e Naturali. Rendiconti, Serie 8, Vol. 32 (1962), n.1, p. 17–25.*

Accademia Nazionale dei Lincei

http://www.bdim.eu/item?id=RLINA_1962_8_32_1_17_0

L'utilizzo e la stampa di questo documento digitale è consentito liberamente per motivi di ricerca e studio. Non è consentito l'utilizzo dello stesso per motivi commerciali. Tutte le copie di questo documento devono riportare questo avvertimento.

*Articolo digitalizzato nel quadro del programma
bdim (Biblioteca Digitale Italiana di Matematica)
SIMAI & UMI*

<http://www.bdim.eu/>

Istologia. — *Fattori dell'incremento di attività mitotica nelle colture in vitro di fibroblasti a seguito di lesioni traumatiche* (*). Nota di OLIVIERO MARIO OLIVO e ISABELLA GALLIANI, presentata (**) dal Socio O. M. OLIVO.

In una precedente Nota [1] abbiamo comunicato che, se si praticano alcune incisioni nell'area di migrazione di colture di fibroblasti, si ottiene dopo 12-24 h un aumento notevole dell'attività mitotica rispetto ai controlli, che può essere superiore del 50%, in media per unità di superficie a quella dei controlli. Nell'interpretazione del fatto restammo dubbiosi se il fattore causale determinante l'incremento di attività mitotica fosse da attribuire alla liberazione, da parte delle cellule, di particolari sostanze, necro-ormoni o ormoni da ferita. Perciò abbiamo cercato di stabilire se l'effetto stimolante venisse a mancare asportando, nei limiti del possibile, le sostanze che si liberano subito dopo praticate le ferite.

L'ipotesi di Wiesner [2] che le sostanze liberate dalle cellule lese stimolino quelle vicine alla divisione trovò larga conferma nelle ricerche su organismi vegetali da parte di Haberlandt [3]. L'ipotesi fu in seguito estesa ai tessuti animali e ampiamente sviluppata e discussa. Concordiamo con Davidson [4] che: « It is undoubtedly attractive to suppose that living cells can actually elaborate as a specific response to injury an agent or agents which might play a part in initiating the early stages of wound healing by causing proliferation of intact cells. Although there is no doubt that injured cells can and do set free nitrogenous material, it is difficult to prove that this material is other than disintegration products of dying and dead cells ».

Ricordiamo brevemente quanto, a nostra conoscenza, è stato fatto su questo argomento col metodo della coltivazione *in vitro*. Ruth [5], e Burrows [6] studiano la riparazione di ferite nella cute di rana isolata *in vitro* soffermandosi specialmente sulla migrazione delle cellule epiteliali. A. Fischer [7] si è ampiamente occupato della rigenerazione in coltura delle colonie di fibroblasti ad accrescimento rallentato in piastre di Carrel. In quasi tutti i numerosissimi suoi esperimenti la valutazione dell'accrescimento è basata sulla misura dell'area di migrazione, utilizzata con metodo già criticato da Olivo e Gliozzi [8]. Comunque gli esperimenti di Fischer sono molto ingegnosi ed interessanti. Egli perviene alla conclusione che in seguito a ferite la velocità di accrescimento rigenerativo è aumentata rispetto a quella della coltura e che le ferite provocano la produzione di sostanze stimolanti e acceleranti l'accrescimento. Le ferite inferte da Fischer consistevano per lo più nell'aspor-

(*) Istituto di Anatomia umana normale - Università di Bologna.

(**) Nella seduta del 13 gennaio 1962.

tazione di un settore o della parte centrale delle colonie cellulari. Colture ripetutamente ferite crescono più rapidamente dei controlli. L'estratto acquoso di colture ferite fa riprendere l'accrescimento a colture in vita latente, che avevano cessato di crescere per mancanza di estratto embrionale. In quanto all'attività mitotica Fischer si è limitato a documentare, su sezioni in serie, che dopo il trapianto, già alla 6^a h, le mitosi sono localizzate in grande prevalenza in una sottile zona periferica. In colture trapiantate, dopo ferite, le mitosi compaiono lungo i bordi della ferita dopo una latenza di alcune ore con intensità pari a quella della restante periferia della coltura. Bentley [9] studia la riparazione *in vitro* di ferite inferte alla pelle di ratto e l'importanza che ha l'epidermide sui fatti proliferativi del connettivo.

Fardon e coll. [10] esaminano il comportamento di segmenti, in sezione trasversa, di intestino, coltivati in liquido di Drew e plasma. Osservano che la migrazione di cellule epiteliali e fibroblasti ha luogo in massima parte dalle superfici di taglio. È molto discutibile che ciò dimostri la liberazione da parte del tessuto traumatizzato, di sostanze stimolanti l'accrescimento. Sono ben diverse le ragioni, del resto non conosciute, che impediscono o ritardano di molto la migrazione di cellule dalle superfici naturali degli organi.

Looburow e coll. [11] provocano lesioni cellulari irradiando all'ultravioletto la polpa embrionale. Il liquido sopra natante di questa, dopo centrifugazione, in confronto col liquido di polpa non irradiata, provoca maggiore migrazione e più intensi fatti degenerativi in espianti recenti di miocardio. Va rilevato che la migrazione, specialmente al primo trapianto, non è equivalente di accrescimento e Davidson inoltre obietta giustamente a questi Autori che i tessuti embrionali sottoposti a grave trauma prima di essere irradiati o usati come controllo non sono prova soddisfacente in favore della produzione di ormoni da ferita per effetto dell'irradiazione.

Sperti e coll. [12] descrivono gli effetti sui tessuti coltivati *in vitro* delle sostanze definite « ormoni intercellulari da cellule lesionate ». Wilbur e Chambers [13] studiano i movimenti delle cellule epiteliali a seguito di microferite.

Davidson [4] nella sua accurata rivista sintetica conclude che per i vegetali i cosiddetti *wound hormones* esistono e la loro costituzione chimica è conosciuta; per gli animali: « There is some evidence that injured animal tissues are the source of a factor (or factors) which accelerates tissue proliferation and the healing of secondary wounds, but the nature of this factor is unknown ».

I nostri esperimenti, come i precedenti [1], sono stati eseguiti su colture di fibroblasti provenienti da tendini plantari di embrioni di pollo di 14 giorni di incubazione coltivati *in vitro* da circa 3 anni. Espianti, provenienti in coppie dalla stessa coltura, venivano tutti trapiantati in una goccia di plasma omologo col 20 % di siero di cavallo e una goccia di succo embrionale al 33 % su doppio copri-oggetti. Dopo 48 h di sviluppo a 38°:

1° in tre esperimenti abbiamo praticato in una coltura di ogni coppia 30-40 piccole incisioni con un coltellino del Gräfe, quindi questa coltura e quella di controllo venivano tenute in abbondante soluzione di Ringer da

30 minuti a 1 h a temperatura ambiente, per rimuovere tutte le sostanze idrosolubili e diffusibili. Dopo aggiunto a tutte una goccia di plasma e una di succo embrionale venivano incubate a 38° per altre 24 h e quindi fissate e colorate. Su queste si procedeva al conteggio delle mitosi e alla misurazione dell'area di migrazione. In due esperimenti si è anche misurato nelle colture viventi, di 24 ore in 24 ore l'espandersi dell'area di migrazione (fig. 1);

2° in 7 coppie di colture abbiamo praticato a tutte, dopo 48 h di sviluppo, egual numero di incisioni e di ogni coppia una sola coltura veniva

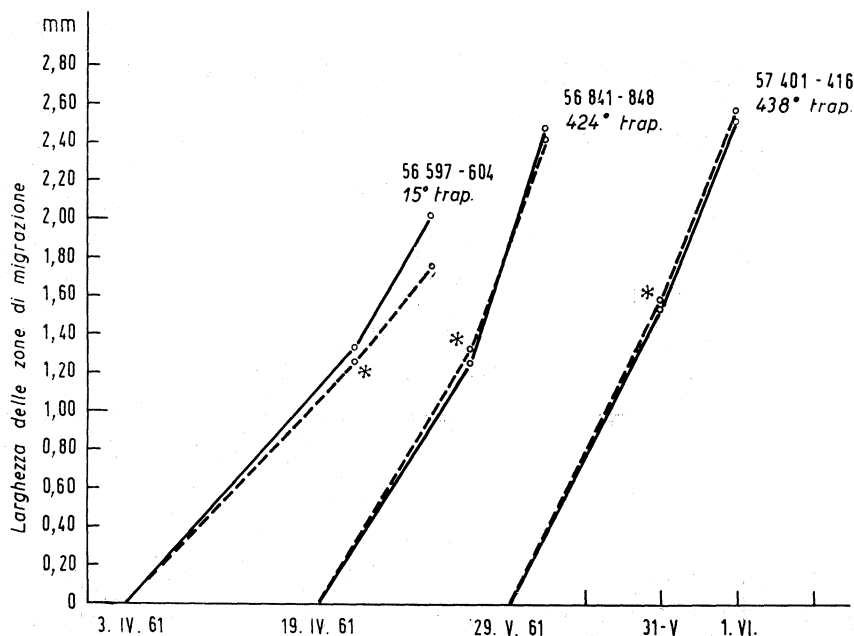


Fig. 1. — Velocità media di migrazione dei fibroblasti nelle prime 48 ore di sviluppo e nelle 24 ore successive alle ferite e alla rialimentazione.

(*) Momento del trauma. — Nei primi due grafici il tratto continuo si riferisce ai controlli, quello tratteggiato alle colture ferite. In quest'ultime, dopo l'intervento, la velocità di migrazione è inferiore a quello dei controlli. — Nel 3° grafico tutte le colture sono state ferite; tratto continuo: colture non lavate; tratteggiato: colture lavate.

lavata in soluzione di Ringer per 1 ora prima della rialimentazione e l'altra no. Tutte venivano addizionate di plasma ed estratto embrionale. Anche di queste colture si è seguita la velocità di migrazione nel vivente (fig. 1);

3° in un ultimo esperimento, dopo praticate le incisioni in una coltura di ogni coppia, tutte venivano addizionate di solo plasma, evitando l'estratto embrionale, considerato materiale stimolante l'accrescimento. I risultati sono riassunti nelle Tabelle I e II.

Quando si eseguono 30-40 incisioni dell'area di migrazione è presumibile che almeno 1000-2000 cellule vengano direttamente colpite e distrutte; e quelle vicine ai bordi delle ferite vengano spremute per la retrazione del

coagulo (vedi le Tavole della Nota precedente [1]). Col susseguente e immediato lavaggio riteniamo che venga asportata la massima parte delle sostanze idrosolubili che si liberano dalle cellule distrutte e da quelle comunque lese.

TABELLA I.

15° Trap. h 72 + 24 Lav. 30'	CONTROLLI		FERITE		Totale mitosi Ferite/Contr.	Mitosi mm ² Ferite/Contr.
	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²		
56597-598 . .	697	24,75	735	30,02	+ 5 %	+ 21 %
599-600 . .	702	20,79	850	48,29	+ 21 %	+ 132 %
601-602 . .	551	21,52	758	31,79	+ 38 %	+ 48 %
603-604 . .	777	27,91	809	41,79	+ 4 %	+ 50 %
	2.727	23,75	3.152	37,97	+ 16 %	+ 60 %
402° Trap. h 48 + 24 Lav. 30'						
55819-820 . .	475	12,22	414	14,22	- 25 %	+ 16 %
821-822 . .	342	15,95	462	14,58	+ 35 %	- 9 %
823-824 . .	261	11,33	535	16,80	+ 104 %	+ 48 %
825-826 . .	463	13,46	681	19,52	+ 47 %	+ 45 %
	1.541	13,24	2.112	16,28	+ 40 %	+ 23 %
424° Trap. h 48 + 24 Lav. 1 h						
56841-842 . .	483	14,37	375	22,98	- 22 %	+ 60 %
843-844 . .	511	16,81	557	18,71	+ 9 %	+ 11 %
845-846 . .	583	14,46	633	20,82	+ 9 %	+ 44 %
847-848 . .	569	17,01	575	21,78	+ 1 %	+ 28 %
	2.146	15,66	2.140	21,07	- 0,3 %	+ 35 %

TABELLA II.

438° Trap. h 48 + 4 Rif.: PISE/3	FERITE		FERITE LAVATE 1 h		Totale mitosi Ferite lav./ Ferite	Mitosi/mm ² Ferite lav./ Ferite
	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²		
57403-404 . .	559	11,88	536	13,29	- 4 %	+ 12 %
405-406 . .	595	17,71	416	8,44	- 30 %	- 52 %
407-408 . .	423	13,84	505	13,49	+ 19 %	- 3 %
409-410 . .	562	16,19	454	11,77	- 19 %	- 27 %
411-412 . .	309	10,11	308	11,26	- 0,3 %	+ 11 %
413-414 . .	443	10,94	378	10,59	- 15 %	- 3 %
415-416 . .	432	12,44	472	12,88	+ 9 %	+ 4 %
	3.423	13,30	3.069	11,67	- 10 %	- 12 %

83° Trap. h 48 + 24 Rif. Plasma	CONTROLLI		FERITE		Totale mitosi Ferite/Contr.	Mitosi mm ² Ferite/Contr.
	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²	N° Totale mitosi	Mitosi per mm ²		
59833-834 . .	287	11,00	670	20,52	+ 133 %	+ 87 %
835-836 . .	273	8,66	348	13,76	+ 27 %	+ 59 %
839-840 . .	352	13,58	264	13,75	- 25 %	+ 1,2 %
	912	11,08	1,282	16,01	+ 41 %	+ 44 %

Nei primi tre esperimenti constatiamo che 24 h dopo l'intervento l'attività mitotica nelle colture ferite è quasi sempre superiore a quella dei controlli, l'aumento per unità di superficie va in media dal 23 % al 60 % (Tabella I). Abbiamo calcolato la significatività statistica delle differenze nel numero di mitosi coppia per coppia mediante il parametro «*t*» secondo il metodo utilizzato per i dati in coppia, tanto isolatamente per ogni esperimento, quanto per le 12 coppie dei tre esperimenti insieme.

Per 4 coppie di osservazioni «*t*» 5 % = 3,182, «*t*» 2 % = 4,541, «*t*» 1 % = 5,841. I dati dei tre esperimenti sono:

$$\begin{aligned}
 15^\circ \text{ trap. } & \langle t \rangle = 2,877 \quad 0,1 > P > 0,05 \\
 402^\circ & \rangle \quad \langle t \rangle = 2,640 \quad 0,1 > P > 0,05 \\
 424^\circ & \rangle \quad \langle t \rangle = 3,860 \quad 0,05 > P > 0,02.
 \end{aligned}$$

Per 12 coppie « t » 0,01 = 3,106; « t » 0,001 = 4,437

Le nostre coppie danno « t » = 3,180; 0,01 > P > 0,001.

Le differenze quindi sono altamente significative.

Le 11 coppie della nostra Nota precedente [1] non lavate in soluzione di Ringer e fissate dopo 12 o 24 ore presentano pure una significatività altissima, « t » = 4,851, P inferiore a 0,001 ⁽¹⁾.

Nell'esperimento nel quale tutte le colture vennero ferite ma si confrontano quelle lavate con quelle non lavate (vedi Tabella II) le differenze per ogni coppia sono assai meno rilevanti che in tutti i precedenti esperimenti; in una sola coppia si ha la differenza del 52 % per unità di superficie e la differenza media complessiva delle 7 coppie è del 12 % a svantaggio delle colture lavate. Statisticamente i dati risultano poco significativi: 0,2 > P > 0,1.

Per questo esperimento va ricordato che, a parità di condizioni, il lavaggio della coltura induce una velocità di migrazione inferiore a quella dei controlli non lavati, (Olivo e Gliozzi [15]) e riduce pure in misura varia dopo 24 e 48 ore la frequenza delle mitosi (Olivo, Gliozzi e Carraro [16]). Nel presente esperimento va quindi tenuto presente che col lavaggio si sono asportate non solo le sostanze liberate dalle cellule lese ma anche il complesso di prodotti del catabolismo della restante coltura che sono favorevoli alla migrazione e all'attività mitotica.

L'ultimo esperimento (Tabella II) lo si è fatto per controllare se la mancata aggiunta di estratto embrionale, dopo praticate le ferite, modifica i risultati.

Con l'aggiunta di solo plasma tanto alle colture ferite quanto ai controlli, permane in tutte, dopo 24 h, una elevata attività mitotica dello stesso ordine di grandezza di quello delle colture rialimentate col succo embrionale. Anche in queste condizioni persiste un'attività mitotica molto più intensa nelle colture ferite. La media complessiva per unità di superficie supera in queste ultime quella dei controlli del 44 %.

Dai risultati di questi esperimenti riteniamo di poter concludere che le lesioni traumatiche inferte a colonie di fibroblasti in attivo accrescimento, con distruzione di un certo numero di cellule, determinano un rallentamento della velocità di espansione in superficie della colonia ed un aumento assoluto vario ma sicuramente elevato in senso relativo (numero medio di mitosi per unità di superficie) dell'attività mitotica. Detto incremento però non sarebbe dovuto, almeno in misura apprezzabile, alla liberazione di sostanze specifiche da parte delle cellule lese, poiché la loro asportazione mediante lavaggio in soluzione di Ringer non modifica il comportamento differenziale fra colture ferite e colture integre.

Se ci domandiamo cosa viene liberato dalle cellule lesionate, dobbiamo ammettere che non vi può essere nulla di qualitativamente diverso da quanto

(1) Nella Nota qui citata vanno corretti i seguenti errori di stampa: della Tabella I a p. 165: 6^a cifra — 66 in + 66, quartultima cifra +52 in +25 %.

si estrae dalla polpa embrionaria per ricavarne l'estratto acquoso usato di norma per nutrimento delle cellule. Si potrà obiettare che nel caso delle ferite le cellule parzialmente lese rimangono in sito e possono elaborare particolari sostanze. Non va però dimenticato che molti autori Anche nella preparazione dell'estratto embrionale conservano la polpa di embrioni tritati qualche ora prima di centrifugarla, e non risultano differenze apprezzabili nell'attività degli estratti preparati coi due sistemi diversi. Ora anche nei tessuti maltrattati per la spremitura sopravvivono molte cellule più o meno lese, che dovrebbero avere la stessa ipotetica capacità di produrre sostanze specifiche come nel caso di piccole ferite.

Anche l'esperimento di A. Fischer, già citato, che l'aggiunta dell'estratto acquoso prelevato da colture ferite fa riprendere a colture in vita latente l'accrescimento, non dimostra l'asserto della produzione da parte delle cellule lese di sostanze specifiche. Va tenuto presente che il liquido prelevato da colture ferite viene aggiunto a colture mantenute in vita col periodico lavaggio in soluzione fisiologica e plasma eparinato, ma il liquido aggiunto è probabile che abbia la stessa composizione se non eguale concentrazione del normale succo embrionale; ora Fischer stesso riconosce che le colture sono sensibilissime anche a piccole quantità di determinate sostanze e, noi aggiungiamo, che il prelievo del liquido aggiunto temporaneamente alle colture ferite asporta non soltanto i prodotti di disintegrazione delle cellule distrutte ma anche i prodotti del metabolismo di tutta la coltura. Olivo e Gliozzi [14] hanno dimostrato che nelle colture in piastre di Carrel la fase liquida prelevata da colture incubate per 72 ore esplica un'azione favorevole e stimolante la migrazione, in qualsiasi momento venga aggiunta ad altre colture in piastra. Il risultato ottenuto da Fischer può invece avvalorare la nostra supposizione, che è alla base dei nostri presenti esperimenti, che le sostanze rese libere dalla distruzione delle cellule vengono in gran parte asportate col lavaggio.

Dal confronto delle colture ferite con quelle ferite e lavate si trae l'impressione che in queste ultime vi sia in media una lieve diminuzione dell'attività mitotica, anche se i reperti sono statisticamente poco significativi. Riteniamo che tale effetto si debba attribuire più che all'asportazione di quell'aliquota di sostanze che sono state liberate dalle cellule distrutte, all'asportazione di tutto il complesso di sostanze prodotte dal metabolismo dell'intera coltura, sostanze che favoriscono la migrazione e la proliferazione cellulare. Questo è almeno il nostro avviso. Nelle colture in goccia pendente, che vengono rialimentate dopo 48 h di sviluppo, la migrazione e la proliferazione cellulare sono più elevate se si tralascia il lavaggio dei preparati in soluzione di Ringer. (Olivo e Gliozzi [15], Olivo, Gliozzi e Carraro [16]).

L'attività mitotica delle colture dell'ultimo esperimento, rialimentate con solo plasma, non ci sorprende, perché da altri esperimenti in corso ci risulta che la proliferazione cellulare in colture rialimentate con solo plasma continua, solo un po' diminuita, rispetto ai controlli per 24-48 h.

Ma per ritornare al nostro argomento quale può essere la spiegazione dei fatti riscontrati? Riteniamo che due sieno i fattori principali in gioco, pur

senza escludere una lieve azione anche da parte delle sostanze liberate dalle cellule distrutte. Tali sostanze comunque riteniamo che non sieno da considerarsi specifiche ed ormonali, ma analoghe a quelle del comune estratto embrionale. I fattori sarebbero questi: in primo luogo le breccie create dalle incisioni vengono colmate, al momento della rialimentazione, di coagulo fresco, che ha proprietà chimiche e fisiche diverse da quello vecchio. Esso eserciterebbe un forte chemiotropismo positivo sui fibroblasti impigliati nel vecchio coagulo, impoverito questo delle sostanze trofiche utilizzabili. Nel complesso si avrebbe una riattivazione del metabolismo cellulare. In secondo luogo, e forse in misura preminente, ha importanza la rarefazione della popolazione cellulare. È difficile stabilire il numero percentuale di cellule che soccombono in seguito alle ferite. Probabilmente è abbastanza rilevante, e il rapporto « cellule: spazio vitale » si modifica, il metabolismo dei singoli elementi migliora, e ne consegue una più frequente attività mitotica. Questo fattore è probabilmente lo stesso che determina nelle colture normali la distribuzione spaziale delle mitosi più fitte alla periferia, minore o assente nelle parti centrali delle colonie. È indubbio che nelle colonie cellulari, entro certi limiti e per alcune attività, la vicinanza di più cellule è di reciproco vantaggio per la loro vitalità, e di fronte a certe difficoltà dell'ambiente può diventare una necessità; al di là di certi limiti la densità delle cellule è di reciproco danno, inibisce l'accrescimento e può diventare un fattore letale. In conclusione una colonia di fibroblasti avrebbe un comportamento collettivo, per alcuni riguardi, assai simile a quello di colture di batteri e protozoi, organismi sicuramente indipendenti. Questo punto di vista è già stato discusso da uno di noi nell'illustrare i tentativi di ottenere l'accrescimento partendo da uno solo o pochi fibroblasti [17]. Anche per le colture di fibroblasti si potrebbe accettare l'interpretazione data da Robertson [18, 19] per la moltiplicazione di infusori, che cioè l'andamento della loro moltiplicazione sia quello dei processi autocatalitici. Nei rapporti « elementi viventi: ambiente » non va dimenticato che quest'ultimo non è mai statico, specialmente se considerato a livello cellulare, esso va soggetto già spontaneamente a lente modificazioni fisico-chimiche, ma le cellule stesse intervengono attivamente col loro metabolismo modificandolo per se e per quelle contigue.

LAVORI CITATI.

- [1] O. M. OLIVO e I. GALLIANI, *Effetto delle lesioni traumatiche sull'attività mitotica dei fibroblasti coltivati in vitro*, « Atti Acc. Naz. Lincei, Rend. », ser. VIII, vol. XXX, 164 (1961).
- [2] J. WIESNER, *Elementarstruktur und das Wachstum der lebenden Substanz*, Vienna, p. 102 (1892).
- [3] G. HABERLANDT, *Wundhormone als Erreger von Zellteilungen*, « Beitr. allgem. Biol. », 2, 1 (1921); ID., *Über Zelleilungshormone und ihre Beziehungen zur Wundheilung, Befruchtung, Pathenogenese und adventive Embryogenie*, « Biol. Zentr. », 42, 145 (1922).
- [4] J. N. DAVIDSON, *Wound hormones*, « Edimburg Med. », 50, 70 (1943).
- [5] E. S. RUTH, *Cicatriziation of wounds in vitro*, « J. Exper. Med. », 13, 422 (1911).

- [6] M. T. BURROWS, *Wound healing in vitro*, «New-York Path. Soc.», 13, 131 (1913).
- [7] A. FISCHER, *Regeneration, Versuche an Gewebekulturen in vitro*, «Virchow's Arc.», 279, 94 (1931); ID., *Biology of tissue cells*, Cambridge Univ. Press, 1946.
- [8] O. M. OLIVO e M. A. GLIOZZI, «Atti Soc. It. Anat., Mon. Zool. It. Suppl.», 68, 403 (1960).
- [9] F. H. BENTLEY, *Wound healing in vitro*, «J. Anat.», 70, 498 (1935-36).
- [10] J. C. FARDON, W. A. SULLIVAN and M. B. ANDRUS, *Growth-promoting substances liberated by traumatized tissues in vitro*, «Cincinnati Inst. Divi Thomae Studies», 2, 233, (1938-39).
- [11] J. R. LOÛBOUROW, A. A. CUETO and M. M. LANE, *Stimulation of tissue culture growth by intercellular wound hormones from injured tissues*, «Arch. f. exper. Zellf.», 22, 607 (1938-39).
- [12] G. S. SPERTI, J. R. LOÛBOUROW and M. M. LANE, *Effects on tissue cultures of intercellular hormones from injured cells*, «Science», 86, 611 (1937).
- [13] K. M. WILBUR and R. CHAMBERS, *Cell movements in the healing of micro-wounds in vitro*, «J. Exper. Zool.», 91, 287 (1942).
- [14] O. M. OLIVO e M. A. GLIOZZI, *Cataboliti e migrazione dei fibroblasti coltivati in piastre di Carrel*, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 37, 266 (1961).
- [15] O. M. OLIVO e M. A. GLIOZZI, *Cataboliti e accrescimento dei fibroblasti in vitro*, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 36, 257 (1961).
- [16] O. M. OLIVO, M. A. GLIOZZI e P. R. CARRARO, *Cataboliti e mitosi nei fibroblasti coltivati in vitro*, «Boll. Soc. It. Biol. Sper.», 36, 737 (1961).
- [17] O. M. OLIVO, *Potenzialità di accrescimento di poche cellule somatiche isolate*, «Arch. It. Anat. Embr.», 30, 241 (1932).
- [18] T. B. ROBERTSON, *Experimental studies on cellular multiplication. - I. The multiplication of isolated Infusoria*, «Biochem. J.», 15, 595 (1921).
- [19] T. B. ROBERTSON, *Experimental studies on cellular multiplication. - II. The influence of the mutual contiguity upon reproductive rate and the parte played therein by the «x sustance» in bacterised infusion with stimulates the multiplication of Infusoria*, «Biochem. J.», 15, 612 (1921).