

UN METODO ORIGINAL DE COLORACION DE ESTROMAS.

MANUEL CUADRA C. *

Por hemólisis se entiende el desdoblamiento del eritrocito en sus dos componentes: el estroma, que queda suspendido en el medio líquido y la hemoglobina, que se disuelve en él. La hemólisis puede ser lograda mediante agentes y procedimientos diversos (mecánicos, físicos, químicos y biológicos), tanto en experiencias *in vitro* como en el interior de los vasos (hemólisis intravascular) Schilling (1) (2); Butschli, Ruzicka, Hamburger, Bechold y Hayem, citados por Naegeli (3); Bechold, Kraus, Salén y Hattori, citados por Rockwood (4); Bayliss (5); Cooley y Lee (6); Schulten (7); Isaacs (8); Meltzer y Welch (9). Parece que Rollet fué el creador del concepto de estroma, pues Schilling (2) denomina "estroma de Rollet".

El único método conocido de examen de estromas es la observación en fresco, al campo oscuro. Nosotros hemos descubierto un método de coloración que permite verlos en extensiones de sangre al lado de hematíes normales. Este método de coloración nos ha permitido hacer un estudio detallado de los estromas, tanto en condiciones fisiológicas como en condiciones patológicas; ello será dado a conocer en sucesivas publicaciones en idioma inglés. ("The selenoid bodies"; "Manner of erythrocytes destruction. The intravascular hemolysis" y "Acute hemolytic anemia caused by *Loxosceles laeta* bite").

Material y método

La técnica de coloración es la siguiente:

1º Cubrir la extensión de sangre con Leishman durante 5 minutos (fase de fijación y coloración preliminar).

(*) Profesor en la Cátedra de Enfermedades Infecciosas, Tropicales y Parasitarias de la Facultad de Medicina de Lima. Médico del Hospital Dos de Mayo de Lima.

2º Lavar con agua y secar.

3º Cubrir con una mezcla de "agua hemoglobinoso" y colorante Leishman preparada en la proporción de dos gotas a uno respectivamente, durante 2 horas en Verano y 3 horas en Invierno (fase de coloración definitiva). La ciudad de Lima se encuentra a 137 mts. sobre el nivel del mar; la presión atmosférica es de 747 mm en Verano y 751 mm en Invierno; la temperatura promedio es de 22º y la humedad relativa 92%, en Verano; 14º y 95%, respectivamente, en Invierno. No tenemos experiencia de otros climas.

4º Lavar con agua y secar. Lista para la observación.

El "agua hemoglobinoso" se prepara en esta forma: Se deja secar una delgada capa de sangre, preferible sin plasma, en una palangana de amplio fondo. Se vierte encima agua destilada, justamente hasta cubrir la capa de sangre. A los 60 minutos el líquido sobrenadante, cargado de hemoglobina, se trasvasa a otra palangana y se seca a 37º. Se recoge la hemoglobina seca por raspado y se envasa en un frasco seco (No hemos ensayado la liofilización). El material recolectado sirve para muchas veces.

Disolviendo unas cuantas escamas de esta hemoglobina en agua destilada lo suficiente para que ésta tome un color amarillo rojizo, semejante al color de una infusión rala de té, tenemos el agua hemoglobinoso; su Ph es aproximadamente 10. Para usar esta solución se debe dejar madurar previamente durante unos 30 o más minutos.

La mezcla de "agua hemoglobinoso" con Leishman debe de inmediato ser empleada. En verano el "agua hemoglobinoso" se enturbia en corto tiempo debido a la reproducción bacteriana, lo cual resta su potencia; pero, bajo refrigeración puede conservarse por 24 o más horas. Nosotros preparamos solución fresca para cada medio día de labor.

Para teñir una sola extensión de sangre se requieren aproximadamente 30 gotas de "agua hemoglobinoso" por 15 gotas de Leishman. Para teñir series grandes nos evitamos la molestia de contar tantas gotas empleando goteros con capacidad conocida en números de gotas; lo importante es respetar la proporción de dos gotas de "agua hemoglobinoso" por una gota de Leishman.

El "agua hemoglobinoso" preparada con hemoglobina comercial es inferior a la que se obtiene con el método indicado. El papel de filtro embebido en sangre, una vez seco, da buen resultado; sumergiendo pequeños trocitos de éste en agua destilada se obtiene "agua hemoglobinoso"; pero nosotros preferimos el primer método.

Resultados

Una extensión de sangre coloreada con nuestro método aparece a simple vista de color rojo violáceo, con visos verdosos. Cuando la coloración es buena no aparecen teñidas las zonas del portaobjetos no ocupadas por la capa de sangre y no debe verse a la observación microscópica ningún precipitado. Los hematíes presentan color rojo vivo con ligero tinte violáceo; una gran parte de ellos ofrecen en su zona central correspondiente al "cuerpo vitreo" de Schilling (2) ó fovea central, una especie de núcleo, generalmente grande, redondo, de color que varía desde el rojo azulado hasta el azul negro intenso; de estructura granulosa en unos casos, compacta en otros o como una vacuola limitada por una gruesa membrana en otros; su zona central es frecuentemente incolora, pero algunas veces existe un corpúsculo azul-negro que simula un nucleolo. Podemos, a estos hematíes, provisionalmente denominarlos "pseudonormoblastos".

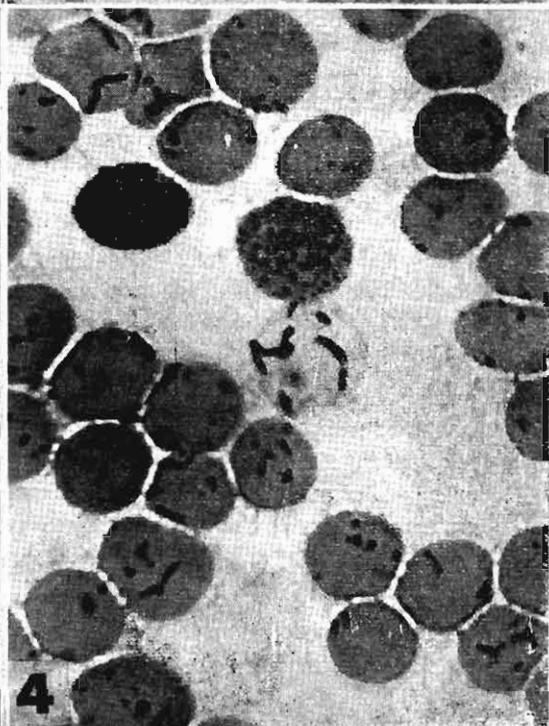
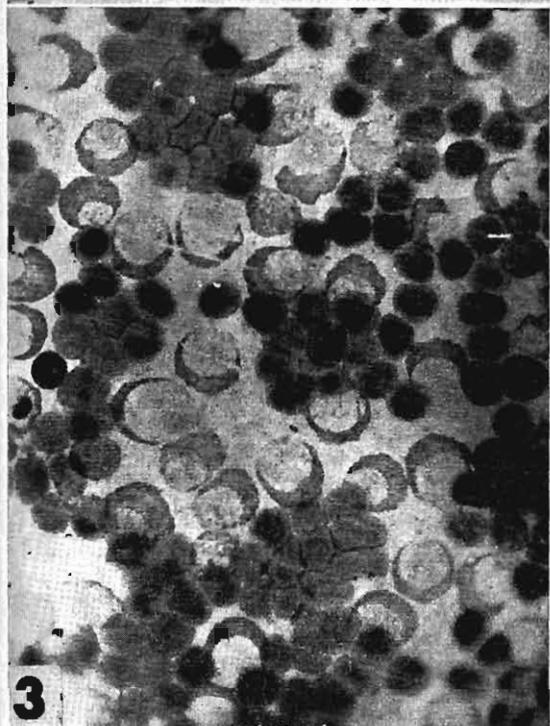
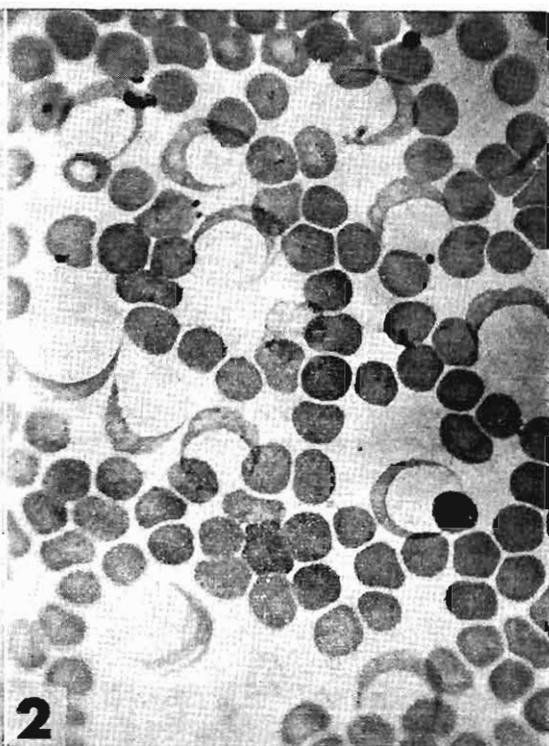
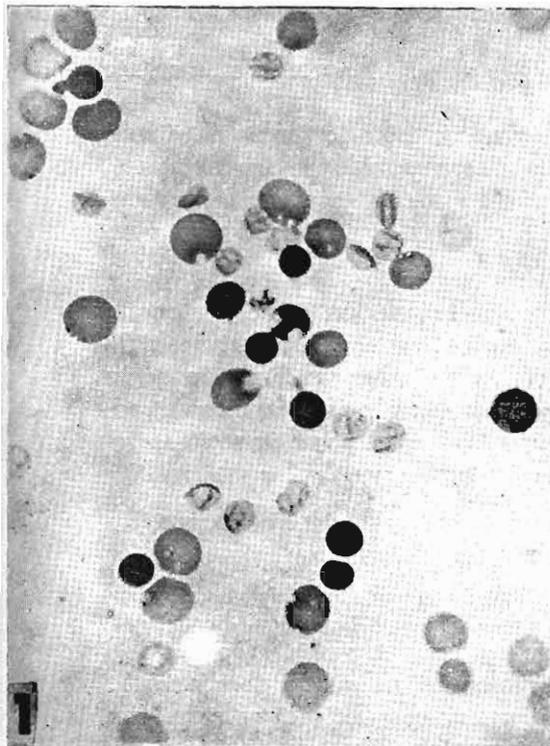
La policromasia, el punteado basófilo, los cuerpos de Jolly y los anillos de Cabot destacan mucho más que con las coloraciones ordinarias.

Los núcleos de los leucocitos aparecen de un color azul-negro intenso, con desaparición de sus habituales detalles estructurales. El protoplasma de los neutrófilos se tiñe en pardo rojizo, pero frecuentemente las inclusiones intracitoplasmáticas se impregnan tan fuertemente del componente básico del colorante, que se borran casi totalmente su apariencia granulosa y su contraste con el núcleo. Los linfocitos, de protoplasma azul oscuro, ofrecen la peculiaridad de presentar en su periferia numerosas espículas dispuestas en penacho o en corona radiada. El protoplasma de los eosinófilos se tiñe en rojo y su apariencia granulosa se borra un tanto por la presencia del componente básico del Leishman.

Las plaquetas se tiñen en azul oscuro y presentan generalmente prolongaciones muy visibles, como patas, semejando en conjunto hormigas. Si la extensión de sangre ha permanecido en la cámara húmeda, las patas de las plaquetas aparecen como expansiones membranosas; podríamos compararlas con las patas de una ave palmípeda.

Los "cuerpos selenoides" (σεληνη = luna; είδος = forma) aparecen visibles con toda nitidez; denominamos así a lo que en Hematología se conoce con los nombres de: "cuerpos en media luna" en castellano; "Halbmondkörper" en alemán; "crescent bodies" en inglés y "corps en demilune" en francés (foto N^o 2 y 3).

- Fot. 1.— Extensión de sangre correspondiente a un caso de anemia hemolítica aguda causada por mordedura de *Loxosceles laeta* (araña venenosa sudamericana). Mezclados con los hematíes se ven numerosos discos pálidos de superficie rugosa; corresponden a estromas.
- Fot. 2.— Cuerpos selenoides en sangre humana normal; aspecto característico a las dos horas de una comida grasosa (lipemia post-prandial). Durante el ayuno en grasas hay ausencia casi completa de estos elementos.
- Fot. 3.— Cuerpos selenoides de rata normal, a las dos horas de una comida consistente en pan con mantequilla.
- Fot. 4.— *Bartonella bacilliformis*, forma cocoide y forma bacilar. En el centro del campo se ve un disco pálido albergando Bartonellas bacilares; corresponde a un estroma parasitado. Con los métodos ordinarios de coloración no se ve el estroma y las Bartonellas aparecen como que estuvieran libres en el plasma.



Los estromas de los eritrocitos aparecen bajo la forma de discos rojos claramente visibles y fácilmente diferenciables de los hematíes. Estos elementos que en las extensiones de sangre normal, se presentan en escasa proporción, en casos de anemia hemolítica aguda aparecen en gran cantidad (foto N^o 1).

Nuestro método es excelente para la coloración de la *Bartonella bacilliformis* (foto N^o 4), hematozoario de Laverán, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, etc. a condición de que la duración de la fase de "coloración definitiva" se baje a una hora; puede también directamente verse encima del Leishman el "agua hemoglobinoso" en lugar del agua destilada como se hace ordinariamente.

Es posible también colorear la capa de plasma que ocupa los espacios intereritrocitarios de las extensiones de sangre; este efecto se logra alargando el primer tiempo o sea el de la "fijación-coloración preliminar" con el Leishman, unos 10 minutos. Como resultado el plasma aparece teñido en rojo, sobre todo en las márgenes y en la zona inicial de la extensión. Este procedimiento ha permitido demostrar la existencia, por contraste, de hematíes sumamente pálidos y otros con aparentemente ausencia completa de hemoglobina y que aparecen como discos blancos; los podemos denominar "hematíes albinos". En las Bartonelosis, que es donde los hemos identificado, muchos de ellos albergan Bartonellas.

Algunas veces el plasma puede aparecer granuloso o desflechado; o los "cuerpos selenoides" resultar arrugados y desfigurados. Una fijación prolongada previa con alcohol metílico puede ser necesario.

Discusión

De los dos elementos que integran el eritrocito, el estroma y la hemoglobina, solamente el segundo ha merecido la atención de los investigadores, por la importante función de transporte de oxígeno que realiza, por ser predecesora de la bilirrubina y por su llamativo color rojo; en cambio el estroma ha pasado desapercibido, tanto por su rol aparentemente secundario cuanto por su invisibilidad.

Creemos que debe dedicarse mayor atención al estudio de los estromas; de ello han de derivarse importantes hallazgos en el campo de la Fisiología y en el de la Patología. El descubrimiento de un método de coloración de estromas significa un avance en el conociemien-

to del aspecto morfológico, pero aún se requieren de otros medios de investigación.

El nuevo método de coloración se caracteriza en sus resultados por el hecho de que se acentúa el grado de tinción de las estructuras según la afinidad de éstas por los ingredientes ácidos o alcalinos del colorante; esto es que las estructuras basófilas (cromatina nuclear), fijan y se impregnan fuertemente del componente básico (azul de metileno) y las estructuras acidófilas (protoplasma), fijan y se impregnan fuertemente del componente ácido (eosina). Estos resultados se apartan de los conceptos clásicos sobre la materia; en efecto, siempre se ha sabido que la alcalinización del colorante determina tinción de los núcleos en azul oscuro intenso y de los eritrocitos en azul pálido o verdoso; y, la acidificación tinción de los núcleos en azul pálido y de los eritrocitos en rojo vivo (2) (10). El "agua hemoglobinoso", pese a su franco carácter alcalino (Ph de 9 a 10), exagera simultáneamente los dos extremos, ácido y básico, de la coloración en grado tal que aparecen a la vista estructuras que con las coloraciones ordinarias pasan desapercibidas. Dentro de éstas tenemos en primer lugar los estromas de los eritrocitos que, en virtud de su acidofilia, se tiñen en rojo; los "cuerpos selenoides", que son una variedad de estromas estrechamente vinculados en su origen a los lípidos de la sangre, tal como lo vamos a demostrar en el artículo "The selenoid bodies", son igualmente acidófilos y se tiñen en rojo. Schilling (2) recomienda el Giemsa alcalino para colorearlos, pero nuestro método resulta muy superior.

La aparición de estructuras de color azul-negro en el interior de muchos eritrocitos simulando núcleos ("pseudonormoblastos") al lado de hematíes que no los presentan, nos hacen pensar que pueden no ser artefactos sino estructuras reales de naturaleza cromatínica.

La mayor tingibilidad de la *Bartonella bacilliformis*, del *Treponema pallidum*, del hematozoario de Laverán y de la *Trichomona vaginalis*, debemos igualmente relacionar con la sorprendente propiedad del agua hemoglobinoso; las intensas impregnaciones llegan al extremo de presentarnos estos organismos con dimensiones mayores de las que realmente tienen.

Hemos señalado algunos datos climatológicos correspondientes a la ciudad de Lima que es donde hemos realizado los estudios; la temperatura, la humedad y la presión atmosférica ejercen indudable influencia en el resultado de la coloración; en determinadas épocas se obtiene efectos excelentes y en otras mediocres. Estamos viendo la posibilidad de obtener condiciones ambientales óptimas por medios arti-

ficiales. No tenemos experiencia de condiciones climáticas diferentes a las de la ciudad de Lima.

Sumario

Se ha descrito un método original de coloración de estromas; él permite verlos nítidamente en extensiones de sangre al lado de hemáties. También se colorean con el mismo método los "cuerpos selenoides" (*Halbmondkörper* en alemán; "cuerpos en media luna" en castellano; "crescent bodies" en inglés y "corps en demilune" en francés), los que, conforme lo vamos a demostrar en una próxima publicación, son una variedad de estromas y su significación ha sido aclarada gracias al método.

Una pequeña modificación introducida en el método permite lograr muy buenas coloraciones de microorganismos tales como: *Bartonella bacilliformis*, *Treponema pallidum*, hematozooario de Laverán y *Trichomona vaginalis*. Es preciso ensayar en otros microorganismos.

Zusammenfassung

Man hat eine neue Original-Färbemethode der Stromas geschrieben, sie lässt dieselben klar und deutlich in Blutaussstrichen erkennen inzwisohen der roten Blutkörperchen. Ebenfalls färben sich mit derselben Methode die "Selenoidkörper", oder "Halbmondkörper" in deutsch, "cuerpos en media luna" in spanisch, "crescent bodies" in englisch oder "corps en demilune" in französisch, welche verschiedene Formen der Stromas sind, wie wir demnächst veröffentlichen werden. Ebenfalls konnten wir ihre Bedeutung feststellen dank dieser neuen Methode.

Mit einer kleinen Veränderung in der Färbemethode erhält man sehr gute Färbungen der Mikroorganismen, wie z. Bs. "*Bartonella bacilliformis*", "*Treponema pallidum*", "*Hematozooario de Laverán*" und "*Trichomonas vaginalis*". Es wäre nicht überflüssig, diese Methode auch an anderen Mikroorganismen auszuführen.

Die verkürzte Färbetechnik ist folgende: 1º Das lufttrockene Präparat bedeckt man mit dem Leishmanschen Farbstoff 5 Minuten lang — mit Wasser abspülen und trocknen lassen. 2º Das Präparat wieder-

um bedecken mit einer neuen Mischung von Leihsmanschem Farbstoff und hemoglobiniertem Wasser in einem Verhältniss von 1 Tropfen Leihsmanschem Farbstoff und 2 Tropfen hemoglobiniertem Wasser; 2 Stunden lang im Sommer (Lima-Perú) und 3 Stunden im Winter.

Das hemoglobinierte Wasser erhält man, in dem man trockenes Blut hemolisiert in destilliertem Wasser; die Lösung darf nicht zu dunkel und nicht zu hell sein, ungefähr so wie ein klarer Tee. Sie darf vor einer halben Stunden nicht gebraucht werden. (Reifezeit).

Summary

An original method of staining stromas is described. It enables to see them nitidly close to erythrocytes in the same blood smear. The same method is also used to stain "selenoid bodies ("Crescent Bodies" in English; "Cuerpos en Media Luna" in Spanish; "Halbmondkörper" in German and "Corps en Demilune" in French) which, as we will demonstrate in our next paper, are a variety of stromas and the role of which has been possible to make clear by means of the said method.

A little alteration in the method provides very good stainings of microorganisms such as Bartonella bacilliformis, Treponema pallidum, malaria parasites and Trichomona vaginalis; evidently, it is necessary to try with other microorganisms also.

The technique, in short, is as follows: 1st.— Cover the blood smear with Leisman's stain for 5 minutes: wash and dry. 2nd.— Cover again with a mixture of Leisman's stain and "hemoglobinous water" prepared in the proportion of one drop to two respectively, during 3 hours in winter and 2 in summer (Lima-Perú).

"Hemoglobinous water" is obtained by hemolysing dry blood with distilled water; it must not be neither very dark nor very light, it must be weak like tea. It must not be used before 30 minutes (maturity).

BIBLIOGRAFIA

- 1.— SCHILLING-TORGAU, V.: Der Saugtierery throzyt als vollständige Zelle und seine Beziehung zum Blutplättchen. Munch. med. Wehnschr., 58, 445, 1911.
- 2.— SCHILLING, V.: El cuadro hemático. Editorial Labor S. A., 1936.
- 3.— NAEGELI, O.: Tratado de Hematología Clínica. Editorial Labor S. A., 1934.

- 4.— ROCKWOOD, R.: Physicochemical aspects of hemolysis. II. An ultra-microscopic study of hemolysis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 10, 18, 1924.
- 5.— BAYLISS, L. E.: Reversible hemolysis. *J. Physiol.*, 25, 59, 48, 1924.
- 6.— COOLEY, T. B. and LEE, P.: The role of erythrocyte fragmentation in the genesis of anemia. *J. Pediat.*, 3, 55, 1933.
- 7.— SCHULTEN, H.: *Tratado de Hematología Clínica*. Editorial Pubul (traducido de la 2ª edición alemana), 1944.
- 8.— ISAACS, R.: *The erythrocytes*. Hand book of Hematology, Hal Downey (editor). Paul B. Hoeber Inc. New York, 1938.
- 9.— MELTZER, S. J. and WELCH, W. H.: The behavior of the red blood corpuscles when shaken with indifferent substances. *J. Physiol*, 5, 255, 1885.
- 10.— WINTROBE, M. M.: *Clinical Hematology*. Third Edition. Lea & Febiger, Philadelphia, 1951.