

MECANISMO DE DESTRUCCION DE LOS ERITROCITOS.

LA HEMOLISIS INTRAVASCULAR

MANUEL CUADRA*

El mecanismo de destrucción fisiológica de los eritrocitos es un problema antiguo que pese a los desvelos de innumerables investigadores, permanece aun sin una clara solución. Tres son las teorías que tratan de explicarla: 1ª La teoría de la fragmentación; 2ª La teoría de la eritrofagocitosis; y 3ª La teoría de la hemólisis. De las 3, la que cuenta con el mayor número de adeptos es la primera y se basa en las investigaciones de Rous y Robertson (1), (2), (3), robustecidas con los trabajos de Doan y Sabín (4) y de Cooley y Lee (5). Sin embargo, en condiciones patológicas salen a la vista solamente los otros dos mecanismos: mientras son evidentes los fenómenos de eritrofagia y de hemólisis intravascular, no se conoce un tipo definido de anemia hemolítica en la que la destrucción eritrocítica fuera por fragmentación; tal vez la anemia eritroblástica pueda serlo (5).

En la presente comunicación vamos a ofrecer una nueva prueba en favor de la teoría de la hemólisis intravascular y es la siguiente: El fenómeno de la hemólisis lo entendemos como el desdoblamiento del eritrocito en sus dos componentes fundamentales: el estroma y la hemoglobina; en el organismo cada uno de estos componentes sigue por separado un proceso ulterior de destrucción; mientras que el destino de la hemoglobina liberada está al presente casi totalmente conocido, nada se sabe acerca del destino de los estromas, pues bien, valiéndonos de un método original de coloración de estromas en extensio-

* Profesor en la Facultad de Medicina de Lima-Perú, y médico del Hospital "Dos de Mayo" de Lima.

nes de sangre (6), (7) y de otros medios de examen más o menos conocidos, hemos podido encontrar estromas en la sangre de sujetos normales (hemólisis intravascular fisiológica) y en la de pacientes afectos de diversos tipos de anemia hemolítica (hemólisis intravascular patológica). Estos estromas tienen indudablemente un origen común con la hemoglobina libre del plasma normal (8) y con la conocida hemoglobinemia de los procesos hemalíticos agudos. La presencia de estromas y de hemoglobina libre en la circulación abonan por cierto en favor de la hemólisis intravascular como mecanismo de destrucción.

MATERIALES, METODOS Y RESULTADOS

Se ha hecho un estudio de estromas liberados por hemólisis *in vitro* y por hemólisis *in vivo* (hemólisis intravascular). La hemólisis *in vitro* fue provocada por diversos agentes y procedimientos y los estromas resultantes fueron examinados tanto en fresco (campo oscuro) como en extensiones coloreadas con un método especial (6), (7). Para emplear este método de coloración es necesario remover previamente la hemoglobina disuelta derivada de la hemólisis mediante lavados reiterados con suero fisiológico y centrifugación (la hemoglobina oculta a los estromas en las extensiones de sangre); el sedimento resultante se redisuelve en el plasma o en el suero de la misma muestra de sangre; con este producto se hacen las extensiones destinadas a la búsqueda de estromas.

Los estromas provenientes de hemólisis *in vivo* o hemólisis intravascular, fueron examinados en extensiones de sangre directamente tomadas del dedo de sujetos normales, del dedo de enfermos con anemia hemolítica de diversos tipos, y de la oreja de animales de experimentación. También se empleó en algunos casos la remoción previa de la hemoglobina en muestras de sangre tomadas de la vena.

HEMOLISIS IN VITRO

1.— Hemólisis por agua destilada:

El procedimiento clásico de provocar hemólisis se logra mezclando sangre con agua destilada (lavado de la sangre). Aunque algunos autores creen todavía que en tal circunstancia estallan los eritrocitos, es sabido que únicamente se produce la salida de la hemoglobina; ésta se disuelve en el líquido circundante y los estromas quedan suspendidos y continúan conservando

su estructura globular; el proceso es reversible en cierto grado, esto es que la hemoglobina puede, bajo condiciones especiales, reingresar a los estromas (Brinkman, R. y Szent Gyorgi, citados por Isaacs (9); Rockwood (10) y otros). Sin entrar en detalles apuntaremos solamente algunos hechos salta-ntes: le hemólisis tiene sus grados que van desde las leves pérdidas de hemoglobina hasta su total liberación, quedando los estromas como glóbulos blancos; esta gradación depende de la proporción entre el agua destilada y la muestra de sangre o de glóbulos y de la tendencia del plasma o de la hemoglobina liberada de oponerse a la hemólisis. La observación en campo oscuro de la sangre lacada es demostrativa de que los estromas conservan todos sus atributos de elementos globulares, tales como: la forma, la tensión y elasticidad de sus paredes, que les permiten deformar a los hematíes que chocan contra ellos o recuperarse de las deformaciones que en tales circunstancias ellos experimentan; otras veces se advierte gran hipotonía de sus paredes, esto es que se deforman con gran facilidad y recuperan su forma redondeada perezosamente. Si la sangre lacada se centrifuga, a 3000 revoluciones por ejemplo, al fondo van los eritrocitos no hemolizados y los parcialmente hemolizados (hipocromía artificial); los totalmente o los casi totalmente hemolizados quedan suspendidos en el líquido rojo sobrenadante, lo cual se demuestra observando en campo oscuro o coloreando con la mezcla Leishman-agua destilada una extensión dada (técnica en el párrafo N^o 15). Por lacado y centrifugación repetidos con agua destilada se llega a obtener un residuo blanco, en grumos, constituido por estromas; si se le redisuelve en plasma o suero sanguíneo y se realizan extensiones que luego se colorean con nuestro método, se encuentran abundantes estromas. Si extensiones del sedimento de una muestra de sangre lacada se colorea con nuestro método, se obtiene una mezcla de glóbulos rojos normales, glóbulos rojos hipocrómicos y estromas, dependiendo la proporción relativa de cada uno de ellos del grado de la hemólisis.

2.— Hemólisis por solución hipertónica de cloruro de sodio.

Las soluciones hipertónicas de cloruro de sodio también determinan hemólisis; en este caso igualmente se produce únicamente el escape de la hemoglobina y los estromas continúan conservando sus propiedades de elementos globulares. Coloreando con nuestro método extensiones hechas del sedimento se encuentran abundantes estromas mezclados con hematíes.

3.— Hemólisis de eritrocitos de carnero por suero hemolítico anticarnero de conejo.

Hemos aprovechado de la reacción de fijación del complemento de Wassermann para la lúes. Centrifugado el tubo donde se produce hemólisis (reacción negativa) y extendiendo y coloreando el sedimento con nuestro método se encuentran abundante estromas (foto N^o 1). Haciendo la misma operación con tubos donde no hay hemólisis (reacción positiva) se encuentran abundantes hematíes no hemolizados (foto N^o 2). Las reacciones de Wassermann débilmente positivas o moderadamente positivas, proporcionan

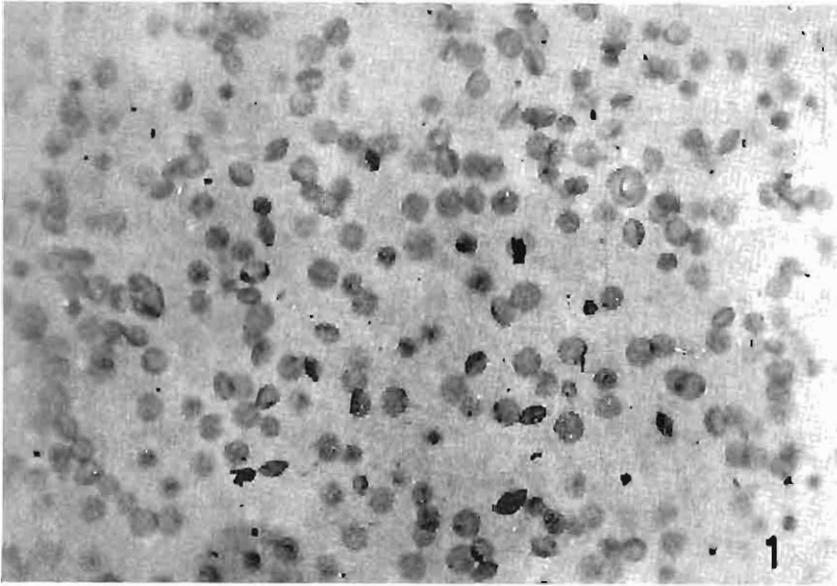


Foto 1.— Rección de Wassermann negativa (hemólisis completa).
Hay ausencia de eritrocitos y todas las imágenes redondeadas
corresponden a estromas.

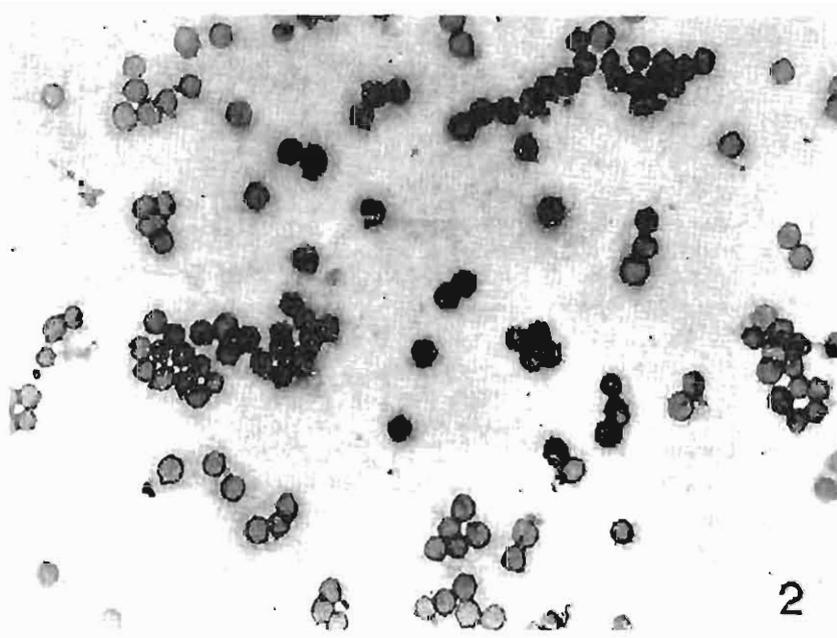


Foto 2.— Rección de Wassermann positiva (ausencia de hemólisis).
Abundantes hematies no hemolizados y ausencia de estromas.

mezclas de hematíes y estromas predominando uno u otros según la tendencia dominante de la reacción.

4.— Hemólisis de eritrocitos de cobayo por suero hemolítico anticobayo de conejo.

Mezclando eritrocitos de cobayo con suero de conejo anticieritrocitos de cobayo preparado según la técnica de Dameshek y Schwartz (11) se produce hemólisis. Coloreando con nuestro método extensiones del sedimento se encuentran abundantes estromas mezclados con hematíes.

5.— Hemólisis bacteriana.

Es sabido que la sangre dejada a la intemperie se hemoliza en pocos días por acción de bacterias saprofitas. Coloreando extensiones del sedimento

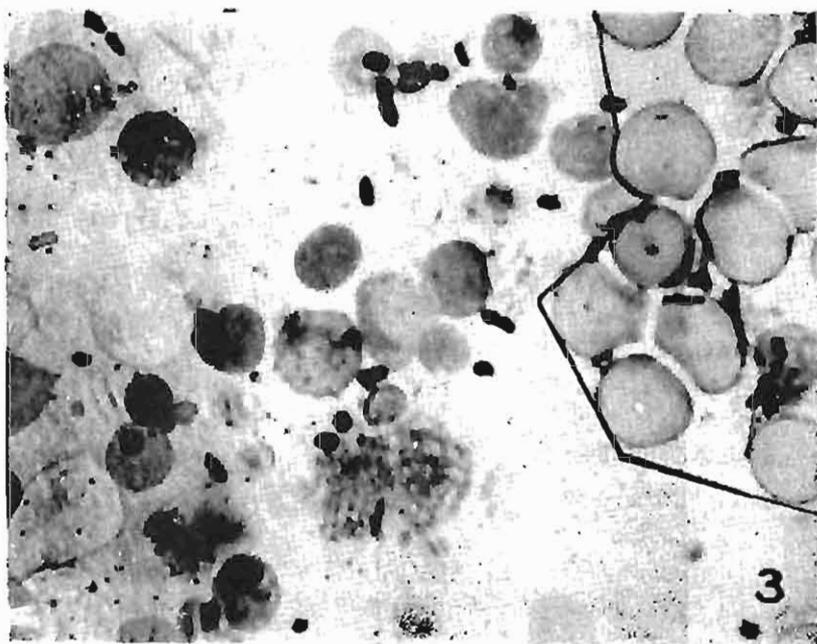


Foto 3.— Hemólisis por bacterias saprofitas. Abundantes estromas de diferentes tamaños y tonos. En el ángulo superior y derecho delimitados por una línea quebrada, un grupo de 11 hematíes no hemolizados. Las imágenes intensamente negras corresponden a organismos saprofitos.

con el método ya señalado se encuentran abundantes estromas, hematíes y bacterias. (foto Nº 3).

Cuando se congela una muestra de sangre en la cámara de congelación de una refrigeradora y luego se lleva a la intemperie, se produce la descon-

gelación y simultáneamente intensa hemólisis. Por coloración de extensiones del sedimento se demuestra la presencia de abundantes estromas.

7.— Hemólisis por agitación con perlas de vidrio.

La agitación de una muestra de sangre con perlas de vidrio determina hemólisis como bien es conocido (Meltzer y Welch) (12). Con nuestra técnica de coloración se demuestra la presencia de abundantes hematíes, abundantes estromas: enteros unos y desgarrados otros, o convertidos en hilachas.

8.— Hemólisis por pasaje forzado de sangre a través de un orificio estrecho.

Si se perfora la piel del pulpejo de un dedo con una aguja finísima y se exprime con violencia el dedo, la sangre al salir se hemoliza en parte; en efecto, coloreando las extensiones respectivas se ve una mezcla de hematíes normales, estromas, una gama de estudios intermedios (sombras globulares) y hemoglobina libre.

9.— Hemólisis en cámara húmeda.

Dejando una extensión fresca de sangre en cámara húmeda (una caja de petri con papel de filtro embebido de agua destilada en el fondo) durante 24 horas, se produce la hemólisis de gran parte de los eritrocitos; en efecto, coloreando la extensión se encuentran abundante estromas bajo la forma de discos intensamente coloreados.

10.— Hemólisis por presión entre portaobjetos y cubreobjetos.

Si se observa detenidamente al campo oscuro una pequeña gota de sangre entre portaobjetos y cubreobjetos, en los espacios negros intereritrocitarios se llega a ver glóbulos de paredes muy tenues, como pompas de jabón; estos glóbulos al ser movilizados por ligeras presiones sobre el cubreobjetos chocan contra los hematíes deformando a estos; probablemente Fahraeus, citado por Rosenow (13), vio estos mismos elementos. Estos glóbulos corresponden a estromas y no son visibles con microscopio corriente. Su cantidad aumenta enormemente al presionar fuertemente el cubreobjetos contra el portaobjetos, pues en tal circunstancia se hemolizan gran cantidad de eritrocitos. Vintschgan, citado por Meltzer y Welch (12), también los produjo.

11.— Hemólisis por calentamiento.

Calentando sangre en baño de María (lo hicimos a 56° durante una hora), se obtiene hemólisis intensa (Ham y colaboradores (14)). Se encuentra gran cantidad de estromas de diferentes tamaños (esquizocitosis) y estromas dando inserción a filamentos (medusas), coloreando extensiones del sedimento con nuestro método.

12.— Hemólisis por azul de cresil brillante.

Si se disuelven pequeños cristales de azul de cresil brillante en unas cuantas gotas de sangre y luego se preparan extensiones y se colorean con nuestro método, aparecen regular cantidad de estromas; si la sangre contiene abundantes reticulocitos aparecerán muchos estromas con retículo en su interior; estos reticulocitos sin hemoglobina que muy probablemente se forman in vitro fueron considerados de formación intravascular y comparados por Lee, Minot y Vicent (15) a los "cuerpos" descritos por Rous y Robertson (1). Si la muestra es lipémica (lipemio postprandial o lipemia endógena) aparecen muchos cuerpos selenoides con retículo en su interior; estos elementos y los anteriores fueron también erróneamente interpretados por Th. Eilers (16).

13.— Hemólisis por anticoagulante de Wintrobe.

Las extensiones de sangre tomadas en oxalato o en anticoagulante de Wintrobe (17) y coloreadas con nuestro método contienen mayor cantidad de estromas que las extensiones tomadas directamente del dedo. La cantidad de eritrocitos hemolizados es tan bajo que no llega a enrojecer el plasma.

14.— Hemólisis al extender sangre en portaobjetos.

Coloreando con nuestro método extensiones corrientes de sangre se encuentran estromas en cantidad variable y según la zona de la extensión; es sobre todo en la zona final donde se encuentran estromas en gran parte desgarrados conjuntamente con hemoglobina libre. (Estos estromas desgarrados de la zona final se ven mejor coloreando la extensión con la técnica descrita en el párrafo N^o 15). También es frecuente encontrar en la primera zona, o zona del plasma estromas bajo la forma de discos, aislados o más frecuentemente en grupos; y en las zonas centrales de la extensión estromas escasos o muy frecuentemente numerosos, dispuestos en faja que recorre varios campos microscópicos.

Nosotros sorprendimos en una oportunidad el fenómeno: en una extensión húmeda que observábamos al microscopio desapareció un eritrocito, marcamos el sitio y después de colorearla con nuestro método encontramos un estroma (disco) en su lugar; la hemoglobina que salió del eritrocito no fue visible.

Si la extensión de sangre se realiza en portaobjetos calientes se produce intensa esquizocitosis, transformación de hematíes en bandas o filamentos y marcada hemólisis; los reticulocitos no son generalmente afectados por la injuria térmica.

Si se practican extensiones de sangre cargada de lípidos (lipemia postprandial o lipemia endógena) se produce intensa hemólisis; pero, en este caso, los estromas no se nos presentan como discos sino como medias lunas o "cuerpos selenoides" como llamamos nosotros (6), (7); la hemoglobina que salió del eritrocito no es visible al microscopio o algunas veces se la ve como una mancha rojiza muy tenue. Los reticulocitos no escapan a este tipo de hemólisis.

15.— Hemólisis de sangre seca.

Si se vierte sobre una extensión seca de sangre: agua destilada, suero fisiológico, plasma o suero sanguíneo, se produce la desaparición y aparentemente la eliminación de la capa de sangre; en realidad se produce solamente una hemólisis, la hemoglobina es liberada y arrastrada por el líquido y los estromas quedan adheridos al vidrio; efectivamente coloreando con nuestro método esta capa residual se constata estar constituida por estromas. Sabemos que vertiendo alcohol (etílico, metílico, etc.) sobre una extensión de sangre se produce fijación y no hemólisis.

Como una variante de lo expuesto, nosotros producimos hemólisis y coloración simultánea de estromas, cubriendo una extensión seca de sangre con una mezcla de colorante Leishman y agua destilada en la proporción de una gota por dos, respectivamente, durante dos horas; en lugar de agua destilada se puede usar "agua hemoglobínica" (6) (7); la hemoglobina se va y quedan los estromas bajo la forma de discos rojos granulados. Si la muestra de sangre es lipémica (lipemia endógena o lipemia postprandial) también aparecen coloreados los "cuerpos selenoides" (7).

HEMOLISIS IN VIVO

1.— Investigación de estromas en sujetos normales.

Examinando al campo oscuro sangre normal entre portaobjetos y cubreobjetos, siempre se llega a encontrar número variable de estromas en los espacios negros intereritrocitarios; dijimos que la presión del cubreobjetos contra el portaobjetos aumenta su número.

Centrifugando sangre tomada en anticoagulante de Wintrobe (17) y examinando el plasma sobrenadante, ya sea al campo oscuro o por coloración de extensiones de ella, se encuentra abundantes plaquetas, escasos hematíes muy hipocrómicos y escasos estromas. Sabemos que por centrifugación los hematíes hipocrómicos, los reticulocitos y los estromas se disponen en las capas superiores en virtud de su menor densidad y que los hematíes intensamente cargados de hemoglobina van al fondo. Hemos manifestado en un párrafo anterior que el anticoagulante de Wintrobe es muy débilmente hemolítico; no hemos trabajado con heparina.

En extensiones de sangre normal tomadas con mucho cuidado siempre se encuentra cantidad variable de estromas, como ya se dijo en otro párrafo; en general aparecen como discos rojos de superficie lisa unas veces y rugosa otras, de estructura finamente granulosa; algunas veces ofrecen una vacuola excéntrica; en algunas circunstancias experimentan tales modificaciones que podrían confundirse con plaquetas pero éstas generalmente se tiñen de azul oscuro y poseen patas (6), (7). Su determinación cuantitativa con fines de aplicación práctica todavía no ha sido lograda; ofrecen dificultades algo mayores que la que ofrecen la numeración de plaquetas o de reticulocitos; mientras se descubra un método adecuado, por ahora la cantidad normal de estromas la podemos a groso modo expresar con la calificación

de "muy escasa", que corresponde a no encontrar estromas en la mayoría de los campos microscópicos examinados. Comparando con la gran cantidad de estromas, por encima del 50%, y visibles en todos los campos microscópicos encontrados en procesos hemolíticos agudos (fotos N^o 4 y 5) podemos establecer la siguiente escala: "muy escasa cantidad" (+); "escasa cantidad" (++); "moderada cantidad" (+++); "abundante cantidad" (++++) y "muy abundante cantidad" (+++++). No tomamos en cuenta los estromas de la zona final de la extensión, desde que aquí muy probablemente la gran mayoría de ellos se forman *in vitro* (hemoglobina libre) y se encuentran muy alterados.

2.— Hemólisis por inyección endovenosa de agua destilada.

La inyección endovenosa de agua destilada determina hemólisis manifiesta; Banti, citado por Wasatjerna (18), en 1913, produjo hemoglobinuria en perros y conejos y reducción de la tasa globular inyectándoles agua destilada. Nosotros hicimos la siguiente experiencia: nos inyectamos agua destilada en un tronco venoso del antebrazo, cerca de la muñeca; simultáneamente extrajimos sangre con otra jeringa del mismo tronco venoso, pero con la aguja insertada a distancia de la primera, cerca de la flexura del codo; la sangre salió lacada. Haciendo la coloración de estromas con la técnica ya conocida, se encontró abundantes hematíes normales, hematíes hipocrómicos, hematíes en rodela (semejantes a los de la talasanemia) y estromas.

Tras la inyección endovenosa de 10 cc. de agua destilada en el brazo derecho, buscamos estromas en extensiones de muestras de sangre tomadas de la mano izquierda cada 3 y 5 minutos durante una hora; el resultado fue negativo.

3.— Bartonellosis murina.

Hemos investigado estromas en un lote de seis ratas albinas en las que, por esplenectomía, se indujo la conocida invasión de la sangre por *Bartonella muris* y el consiguiente desencadenamiento de anemia hemolítica aguda con hemoglobinemia y hemoglobinuria. El examen de sangre periférica, previo a la esplenectomía, reveló en casi todos los animales la presencia de apreciable cantidad de estromas al comienzo de la extensión (zona 1) y muy escasos o ausentes en el resto de los campos. En los días 2^o y 3^o consecutivos a la esplenectomía en que todavía no se vieron bartonellas en los hematíes, el aspecto fue similar a lo dicho; al 4^o día en que comenzaron a aparecer las *Bartonellas*, igualmente la cantidad de estromas no presentó alteración; en los días 5^o y 6^o se constató enorme cantidad de estromas repartidos en todos los campos, coincidiendo con intenso parasitismo de los eritrocitos por *Bartonella muris*; del 7^o día para adelante se constató declinación de la cantidad de estromas, hasta finalmente normalizarse entre el 9^o y 10^o días; la desaparición de las *Bartonellas* fue anterior a la normalización de la cantidad de estromas, indicando que la destrucción sanguínea continuaba después de la desaparición de las *Bartonellas*.

Los estromas observados correspondían la mayoría a discos rojos con o sin bartonellas en su interior; unos de superficie lisa, otros de superficie rugosa y una buena proporción eran estromas "de doble tono". Esta última variedad nunca fue observada en extensiones de sangre normal, previas a la esplenectomía. Nos parece que los estromas sin bartonellas predominan sobre los con bartonellas.

La intensa reticulocitosis, la policromatofilia, la anisocitosis, la eritrofagocitosis y los cuerpos selenoides reticulados y no reticulados fueron hallazgos constantes.

No hemos realizado investigación de estromas en ratas esplenectomizadas, en quienes no se hubiera producido bartonelosis, ni en ratas no esplenectomizadas en las que se hubiera inducido bartonelosis por inoculación del germen.

Un hecho que nos llamó la atención fue la presencia de discos blancos (en realidad incoloros), del tamaño de hematíes, con Bartonellas en su interior; provisionalmente, los denominamos ["hematíes albinos"]; su visibilidad se logra por contraste, coloreando el plasma y este efecto se consigue alargando el primer tiempo de nuestro método (6), (7). Estos discos son completamente diferentes a los estromas que, como sabemos, se colorean de rojo. Ellos pueden corresponder a grados extremos de hipocromía.

4.— Anemia hemolítica aguda del cobayo por suero hemolítico anticobayo de conejo.

Produjimos anemia hemolítica aguda con hemoglobinemia y hemoglobiuria, en cinco cobayos, por inyección de suero de conejo antieritrocitos de cobayo, preparado de acuerdo al esquema de Dameshek y Schwartz (11); 0.5 cc. por cada animal, vía intramuscular. La sangre de los animales contenía muy escasos estromas antes de la inyección del suero hemolítico. Se constató abundantes estromas durante el desarrollo de la destrucción sanguínea. Llegando a la cifra máxima al culminar la anemia entre el 3º y 5º días. En los animales sobrevivientes, al ocurrir la regeneración sanguínea marcada por una intensa reticulocitosis, se observó disminución considerable de dichos elementos. Los estromas observados fueron de tres tipos: discos de superficie lisa, discos de superficie rugosa y estromas de dos tonos (estromas bitonales). Se constató también intensa eritrofagia en sangre periférica, en el brazo y en el hígado.

5.— Bartonellosis humana (Enfermedad de Carrion).

Hemos examinado la sangre de cinco pacientes; en cuatro de ellos la tasa de glóbulos rojos oscilaba entre 1 y 2 millones por mm³ y el parasitismo por Bartonella bacilliformis alrededor del 90%; los enfermos ingresaron en estado de anemia intensa, de modo que no hemos podido verificar exámenes seriados desde el comienzo del proceso. La cantidad de estromas fue ostensiblemente mayor que lo que se encuentra en extensiones de sangre normal, pero muy inferior a lo que se observa en Bartonellosis murina (foto N° 6); muchos de estos estromas se encontraban parasitados; con las coloraciones corrientes aparecen como que las bartonellas estuvieran libres en el

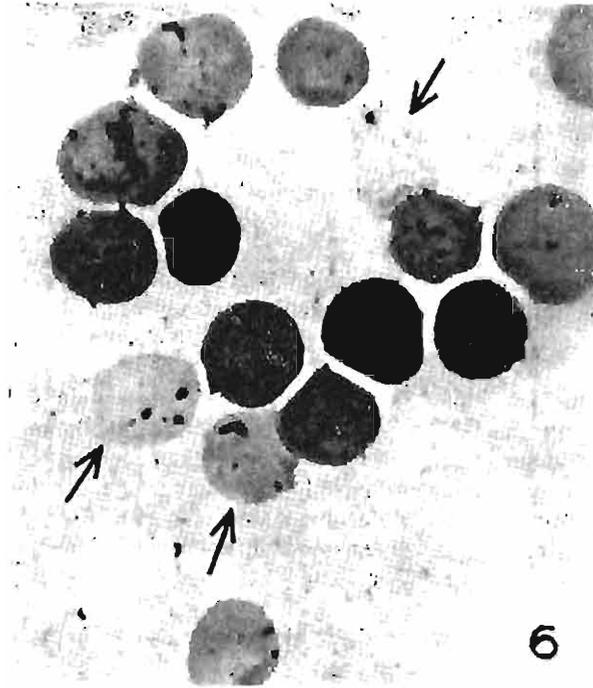


Foto 6.— Bartonellosis aguda (Enfermedad de Carrión). Las flechas señalan estromas, dos de los cuales albergan Bartonellas.

plasma; también se encontraron eritrocitos muy hipocrómicos y muy pálidos, algunos blancos (incolores en realidad), o "hematíes albinos" como los denominamos y que, como dijimos, son visibles únicamente con coloración de contraste. Probablemente los eritrocitos, intensamente hipocrómicos, son los mismos que describieron Hurtado, Pons y Merino (19) con las denominaciones de "acromia" y "macrocitós fantasmas". En extensiones de sangre, después de la ingestión de grasas, se encontraron cuerpos selenoides con bartonellas en su interior (7).

El cuarto enfermo, ingresó con 4 millones de eritrocitos por mm^3 , aproximadamente a los 10 días de enfermedad, y el 95% de hematíes parasitados por *Bartonella bacilliformis* a gran predominio de la forma bacilar. La cantidad de estromas fue normal. Cuando esperábamos que iba a tener lugar la fase de destrucción eritrocítica y que con un parasitismo tan alto iba a producirse anemia intensa, en el curso de la semana siguiente, se produjo el deceso del paciente al día siguiente de su ingreso al Hospital; la causa no pudo ser determinada.

6.— Anemia hemolítica adquirida crónica.

Hemos investigado estromas en dos casos. Primer caso: R. R. M. de 20 años de edad, con un año de padecimientos. Sus hematíes oscilaban alrede-

dor de 2 millones; la hemoglobina alrededor de 5 gramos; los reticulocitos en 70%; bilirrubina total 3 mgrs. % a predominio de la fracción indirecta; urobilinógeno fecal 8.421 miligramos en 24 horas; resistencia globular osmótica disminuida y test de Coombs positivo. Se le extirpó el bazo (2,500 gramos de peso) y no se obtuvo ninguna modificación del cuadro hemolítico. En todas las muestras de sangre, que fueron incontables, y durante casi un año de control, se encontró marcado aumento de estromas, unas veces más que otras (foto No. 7). Después de la esplenectomía, varios meses de control, las cifras fueron igual o algo mayores. El tratamiento con ACTH y cortisona determinaba mejoría notable de la anemia, pero no reducción de la cantidad de reticulocitos ni estromas. Los estromas observados fueron del tipo de discos de superficie lisa.

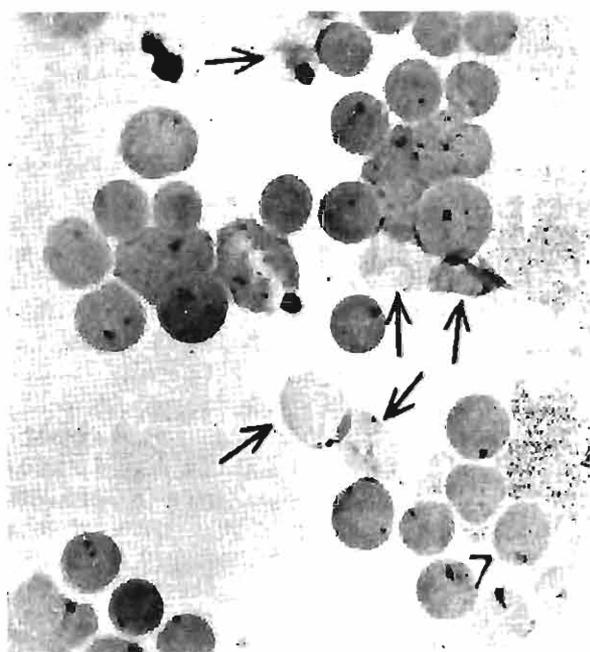


Foto 7.— Anemia hemolítica adquirida crónica.
Las flechas señalan estromas.

Segundo caso: C. B. de 56 años, con dos meses de enfermedad; hematíes alrededor de dos millones; hemoglobina 7 grms. %; reticulocitos 20%; bilirrubina total 1.8 mgrs. % a predominio de la reacción indirecta; test de Coombs positivo. La cantidad de estromas fue notoriamente mayor que lo encontrado en sangres normales

7.— Esferocitosis hereditaria.

O. O. de 21 años, pálido e icterico desde la infancia, Hematíes alrededor de 3 millones; hemoglobina fluctuante en 19 grms. %; reticulocitos alrededor de 5%; bilirrubina total alrededor de 3 mgrs. % a predominio de la frac-

ción indirecta; test de Coombs negativo. La esplenectomía (900 grms.) produjo resultado excelente. La cantidad de estromas, en varios exámenes, fue normal.

8.— Anemia hemolítica aguda por ingestión de naftalina.

M. A. Z. de 28 años; ingresó al Hospital a los 4 días de acusar trastornos digestivos y psíquicos con 1.070.000 hematíes por mm³; hematócrito 12.5%; leucocitos 32.000; reticulocitos 45%; hemoglobina 4 grms. % normoblastos 20%; intensa hemoglobinemia y hemoglobinuria. Al día siguiente 930,000 hematíes, 3.9 grms. % de hemoglobina; hematócrito 12.93%; reticulocitos 42.2%; bilirrubina total 4.50 grms. %, bilirrubina indirecta 2.64, bilirrubina directa 1.86. El paciente falleció. La cantidad de estromas encontrada fue muy abundante (+ + + + +) con la particularidad de que muchos de ellos contenían gránulos en su interior, uno o varios de 1 a 2 micras de tamaño y de color de hemoglobina (restos de hemoglobina?). Estos gránulos probablemente son los mismos que describieron Zuelzer y Apt. (20).

9.— Anemia hemolítica aguda por mordedura de *Loxosceles laeta*.

Los *Loxosceles laeta* es una araña doméstica muy común en América del Sur; su mordedura determina necrosis cutánea más o menos extensa y muchas veces se asocia a éste un cuadro de anemia hemolítica aguda con hemoglobinemia y hemoglobinuria que frecuentemente lleva a la muerte. Hemos estudiado tres casos; en el caso N° 1, una muchacha de 15 años, los hematíes bajaron hasta 885,000 por mm³ y 2.6 grms. % de hemoglobina al 5º día de ocurrida la mordedura. La cantidad de estromas fue muy abundante, 60 por 100 hematíes (+ + + + +) (foto N° 4) al 4º y 5º días del accidente para después disminuir y normalizarse al 7º día. La remisión de la cantidad de estromas fue paralela a la remisión de la hemoglobinuria. Los tipos de estromas fueron: discos de superficie lisa, discos de superficie rugosa y estromas de dos tonos (estromas bitonales).

En el caso N° 2, una niña de 4 años y medio, la cifra de glóbulos rojos fue de 1'280,000 por mm³ al 5º día de la mordedura. La cantidad de estromas fue abundante al 4º y 5º día y después declinó hasta normalizarse al 7º día. Los estromas fueron igualmente de los tres tipos..

En el caso N° 3, un hombre de 54 años, la cifra de glóbulos rojos bajó a 2'560,000 por mm³ y 6.0 grms. % de hemoglobina al 6º día de la mordedura. La cantidad de estromas fue moderada (+ + +) durante los días 4º, 5º y 6º días y se normalizó al 8 día. Los estromas fueron también de los tres tipos.

10.— Hemoglobinuria de marcha.

Sujeto de 25 años que padece crónicamente de "orinar sangre" después de cada caminata. Se le hizo correr 400 metros y al término de ésta todavía cuando jadeaba, se le extrajo sangre de la vena y se practicaron varias extensiones tanto con esta sangre como con otra extraída por picadura del lóbulo de una oreja; luego emitió orina que resultó de color rojo-vinoso con apariencia de sangre. El suero sanguíneo fue de color normal; sin indicios,

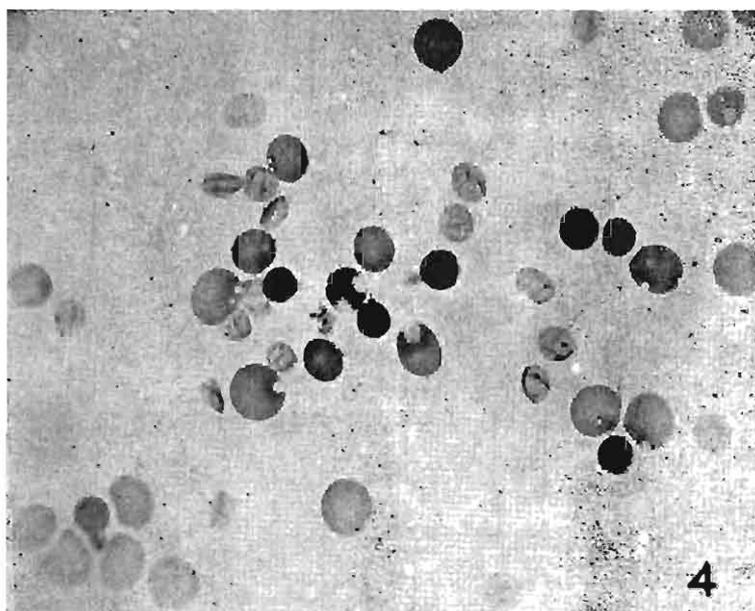


Foto 4.— Anemia hemolítica aguda por mordedura de *Loxosceles* *reclusa* (Araña venenosa sudamericana). Los discos pálidos y rugosos corresponden a estromas; los discos bien formados y teñidos a eritrocitos.

al menos macroscópicamente, de contener hemoglobina disuelta. La investigación de estromas reveló muy escasa cantidad (+) o sea normal. No fue determinada químicamente el pigmento causante del color oscuro de la orina.

11.— Anemia hemolítica aguda por infección a *Clostridium welchii*.

B. M. de 22 años, falleció a los 35 días de habersele practicado un aborto criminal. La primera semana consecutiva a la maniobra se caracterizó por manifestaciones de hemólisis aguda: fiebre, gran postración, ictericia, empalidecimiento, trastornos de la conciencia, hipotensión arterial, hemoglobinemia e intensa oliguria con hemoglobinuria; del endometrio fue aislado *Clostridium welchii* por el Dr. Philipps (*). En las semanas siguientes predominaron las manifestaciones renales: desaparecieron la hemoglobinemia y la hemoglobinuria y la ictericia disminuyó bastante; la cifra de eritrocitos permaneció alrededor de los dos millones; la oliguria se mantuvo tenaz y la retención nitrogenada fue progresiva e irreductible hasta la muerte.

En cuanto a los estromas, al 4º día de practicado el aborto, en pleno periodo de la hemólisis (hemoglobinemia, hemoglobinuria, bilirrubina total 3.8 mgrs. %, bilirrubina indirecta 2.0 mgrs. %, bilirrubina directa 1.8 mgrs.

(*) Luis A. Philipps. Bacteriólogo del Instituto Nacional de Biología Animal.

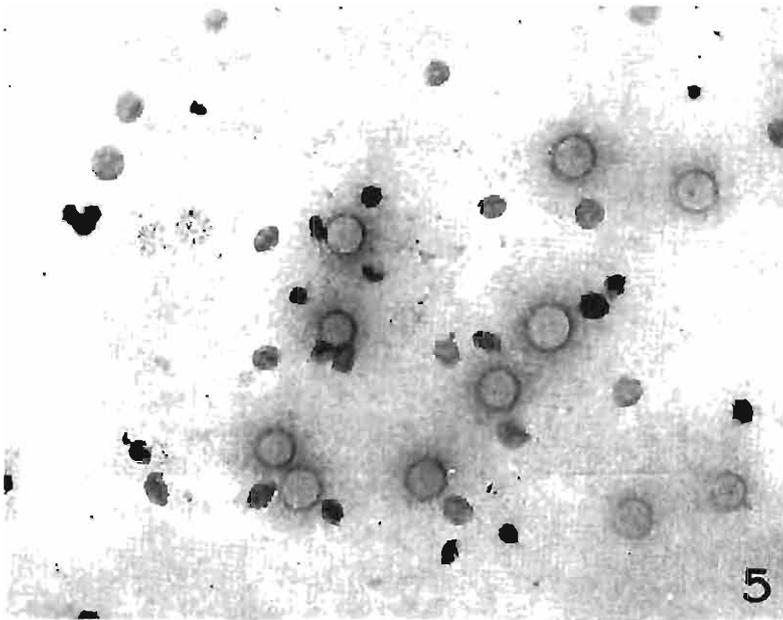


Foto 5.— Anemia hemolítica aguda por infección a *Clostridium welchii*. Los discos grandes y bien formados corresponden a eritrocitos y los pequeños y deformados a estromas.

%) se encontró en extensiones coloreadas con nuestro método en la proporción de 75 estromas por 100 hemalies (+ + + + +) (foto Nº 5). (Los hemalies no fueron contados este día; el día anterior estuvieron en 2 millones por mm^3 y 6.67 grms. % de hemoglobina). Al 5º día se contó 15 estromas por 100 hemalies; estos estaban en 1'800,000 por mm^3 y 5.61 grms. % de hemoglobina. Al 6º día 3 estromas por 100 hemalies. Al 7º día, 1 estroma por 100 (muy escasa hemoglobinemia y hemoglobinuria). En adelante, los estromas, coincidiendo con la desaparición de la hemoglobinemia y de la hemoglobinuria, se mantuvieron en escasa proporción, pero siempre por encima de las cifras habitualmente observadas en sangres normales.

Al 5 día del aborto (1'800,000 hemalies por mm^3) se centrifugó cierta cantidad de sangre (anticoagulante de Wintrobe), a 2,500 revoluciones por minuto durante 15 minutos; las extensiones del plasma sobrenadante, roja por la hemoglobinemia, coloreadas con nuestro método revelaron abundantes estromas; el examen al campo oscuro, en fresco, reveló igual resultado; los mismos exámenes con suero del paciente (suero rojo por la hemoglobinemia) fueron negativos a estromas.

Los estromas observados fueron de tamaño inferior al de los hemalies normales; tenían la forma de discos con superficie lisa unos y rugosa otros y de estructura granulosa; la mayoría muy conservados y la minoría arrugados o desfigurados; una buena proporción correspondían a "estromas bifonales"; la gran mayoría intensamente coloreados y los demás muy pálidos y muy difícilmente reconocibles (estromas en desintegración?). Los pe-

queños estromas podían confundirse con plaquetas, pero éstas se colorean en azul oscuro.

TIEMPO DE VIDA DE LOS ESTROMAS EN LA CIRCULACION

Por punción cardíaca se extrajo 10 cc. de sangre de un conejo, en anticoagulante de Wintrobe y se hizo congelar (dos horas en la cámara de congelación de una refrigeradora); luego al descongelarse a la temperatura ordinaria del ambiente, la muestra quedó completamente hemolizada. Se inyectó dicha muestra (estromas + hemoglobina) en la vena marginal de una oreja del mismo animal; no se produjo ninguna reacción.

Se buscó estromas en extensiones de sangre coloreadas con nuestro método, a los 3, 13, 28, 43, 58 y 63 minutos de la inyección en muestras tomadas de la oreja. Se encontró muy abundante muestras a los 3

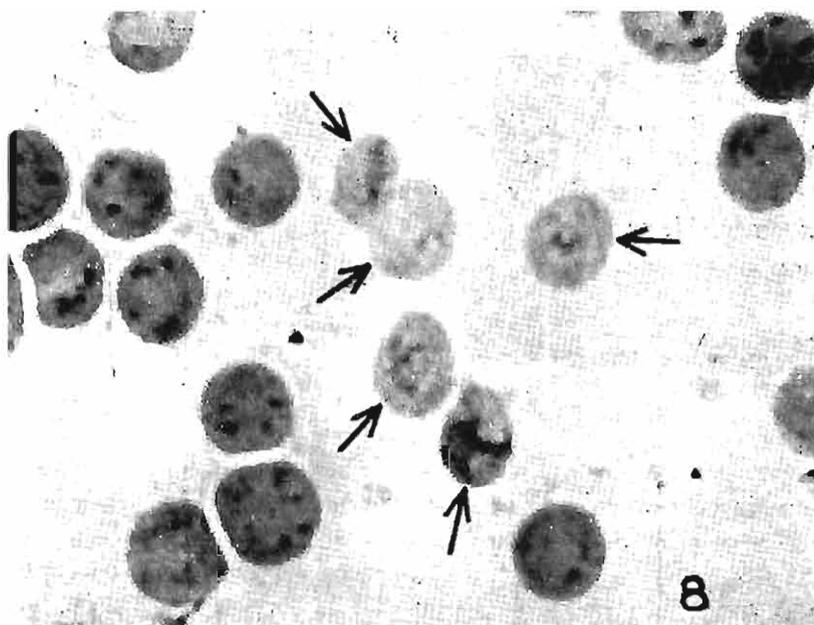


Foto 8.— Inyección endovenosa en conejo de sangre hemolizada del mismo animal (hemólisis por congelación y descongelación). Las flechas señalan estromas.

minutos (foto N° 8), abundantes a los 13, en moderada cantidad a los 28, escasa a los 43, muy escasa a los 58 y 63 minutos. La coloración fué muy nítida en las muestras 1 y 2, moderada en la N° 3 y muy pá-

lida en las restantes. Los estromas encontrados fueron de 3 variedades: discos de superficie lisa, discos de superficie rugosa y "estromas bitonales".

Experiencia semejante llevada a cabo con sangre guardada sin congelarse durante 3 días y congelada durante las 24 horas siguientes, dió muy abundantes a los 5 minutos de la inyección endovenosa, abundantes a los 10, escasos a los 23 y muy escasos a la hora. El conejo se mostró decaído y anoréxico.

Estas experiencias todavía no han sido intentadas en seres humanos.

MORFOLOGIA GENERAL DE LOS ESTROMAS

En preparaciones húmedas los estromas ofrecen todas las propiedades de los cuerpos globulares; se requieren instrumentos de observación de buena calidad para un estudio integral, cosa que no está a nuestro alcance.

En extensiones de sangre normal ellos aparecen como discos rojos de estructura finamente granulosa; en general, su tamaño es algo inferior al de los eritrocitos normales; de superficie lisa unas veces y rugosa otras; libres en los espacios dejados por los eritrocitos o apriados entre estos; algunas veces muestran una pequeña vacuola excéntrica; de contornos regulares unas veces e irregulares otras; unos muy coloreados y otros muy pálidos. Existen además otros elementos de formas caprichosas pero que indudablemente son afines a los estromas.

En los procesos hemolíticos agudos con hemoglobinuria en los que se encuentra gran cantidad de estromas en sangre periférica, se encuentran tres tipos de estromas: discos de superficie lisa, discos de superficie rugosa y estromas de forma romboidal de dos tonos ("estromas bitonales") (foto N^o 9 y 10). Bessis (21) ha logrado fotografiar con microscopio electrónico estos estromas bitonales; en nuestra opinión corresponden a estromas de hematíes en forma de campana. Mientras que estos estromas bitonales pueden ser vistos en la mayoría de las variedades de hemólisis invitro que hemos descrito y después de la inyección de sangre descongelada en conejo, no los hemos visto en extensiones de sangre normal ni en los casos de anemia hemolítica adquirida y esferocitosis hereditaria.

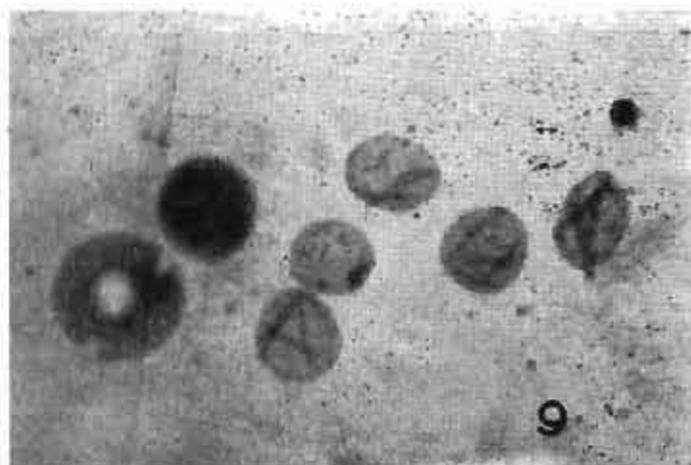


Foto 9.— Anemia hemolítica aguda por mordedura de *Loxosceles laeta*. Cinco estromas de superficie con plegamientos, y dos hematías.

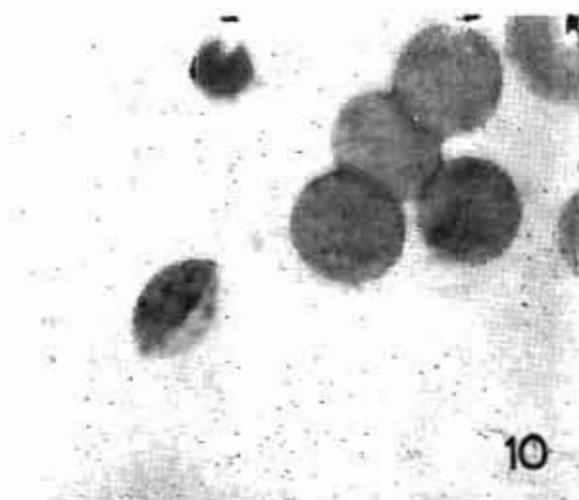


Foto 10.— Anemia hemolítica aguda por infección a *Clostridium welchii*. En el centro un estroma bitonal y en un ángulo un grupo de hematías.

El tamaño de los estromas en los procesos hemolíticos agudos es pequeño, como si fueran estromas de esterocitos; la mayoría muy bien coloreados, muchos muy pálidos casi irreconocibles (estromas en desintegración?).

DISCUSION

El concepto de que el eritrocito está constituido por un armazón protoplasmático o estroma en el que está alojada la hemoglobina y que in vitro, bajo circunstancias especiales, puede producirse la separación de estos dos constituyentes (hemólisis) es antiguo y muy difundido: (1885) Schilling (22), (23). Butschli, Ruzicka, Hamburger, Bechold y Hayem citados por Naegeli (24); Bechold, Kraus, Salén y Hattori citados por Rockwood (10); Bayliss (25); Cooley y Lee (5); Schulten (26); Isaacs (9), (27); Meltzer y Welch (12). Parece que Rollet fue el creador del concepto de estroma, pues Schilling denomina "estroma de Rollet" (23).

El concepto de la hemólisis como disyunción del hematite en estroma y en hemoglobina prevalece sobre el concepto también antiguo de la hemólisis como estallamiento o disolución del eritrocito, considerado todavía en la actualidad por algunos (Wassastierna, 1951), (18).

El fenómeno de la hemólisis in vitro llevó al planteamiento de que el mismo fenómeno en el interior de los vasos (hemólisis intravascular) podría intervenir en el mecanismo de destrucción fisiológica de los eritrocitos; la evidencia de hemólisis intravascular en muchos cuadros hemolíticos agudos con hemoglobinemia y hemoglobinuria hizo más lógica la suposición; pero la búsqueda de indicios de hemólisis intravascular en condiciones normales no tuvo éxito (1), tomando más bien cuerpo la teoría de la fragmentación (1), (2), (3), (4) y (5). La eritrofagocitosis, otro fenómeno evidente en condiciones patológicas, no pudo ser hallado en nivel aceptable como para explicar la cantidad de eritrocitos que normalmente se destruyen, de 7 a 8 grms. de hemoglobina cada 24 horas (Roos (28)).

Sin embargo, las mismas investigaciones de Rous y Robertson (1) quienes describieron "cuerpos globulares" con caracteres muy semejantes a estromas o sombras de eritrocitos en el lavado interior de bazo, médula ósea, e hígado y que ellos los consideraron productos de injuria sobre células fijas, no descartan que dichos "cuerpos globulares" puedan realmente ser estromas. El único método de investigación de estromas conocido fue el ultramicroscópico, en preparaciones húmedas. Isaacs (27) sostiene que la destrucción por hemólisis es lo más lógico, aunque ello no puede todavía ser demostrada por falta de procedimientos adecuados.

El descubrimiento de un método de coloración de estromas que

permite verlos claramente en extensiones de sangre (6), (7), nos indujo a estudiar la hemólisis intravascular mediante la búsqueda de estromas en sujetos normales y en anemias hemolíticas, bajo la premisa de que la presencia de estromas significa hemólisis.

En primer lugar, hicimos estudios sobre estromas liberados por hemólisis *in vitro*, empleando diversos agentes y procedimientos: agua destilada, solución hipertónica de cloruro de sodio, sueros hemolíticos de conejo: anticarnero y anticobayo; acción bacteriana, congelación y descongelación, agitación con perlas de vidrio, pasaje de sangre por orificio estrecho, cámara húmeda, presión entre portaobjetos y cubreobjetos, azul de cresil brillante, calentamiento, extensión de sangre en vidrio y anticoagulante de Wintrobe. Esta serie de experiencias nos demostró que la hemólisis consistía siempre en la separación de la hemoglobina del estroma, hemoglobina que se disolvía en el líquido y estroma que continuaba suspendido conservando su forma y propiedades de cuerpo globular. Rockwood (10) por examen ultramicroscópico llegó a la misma conclusión empleando agua destilada, ácido hidrolórico, álcali, saponina, oleato de sodio, solución hipertónica de cloruro de sodio, hemólisis por autólisis, hemolisinas biológicas, hemólisis por calor. Cooley y Lee (5) sostuvieron concepto semejante. Pensamos que la hemólisis determinada por muchos otros agentes, ya sean mecánicos, físicos, químicos y biológicos, de los que Isaacs (9) hace una excelente relación, consista igualmente no en una destrucción inmediata de los eritrocitos sino simplemente en un desdoblamiento o separación de la hemoglobina del estroma.

En segundo término, emprendimos la búsqueda de estromas liberados por hemólisis intravascular. Nuestra hipótesis de que la hemólisis *in vivo* o hemólisis intravascular consistía también no en una destrucción inmediata o disolución del eritrocito, sino primariamente en un simple desdoblamiento en sus componentes el estroma y la hemoglobina y que en una segunda fase estos elementos se desintegraban por vía separada, estromatólisis de un lado y catabolia de la hemoglobina por otro, se vio ampliamente confirmada; en efecto, se pudo encontrar en procesos hemolíticos agudos en los que con toda evidencia ocurre hemólisis en el interior de los vasos, desde que hay liberación de hemoglobina, estromas en gran cantidad y en proporción directa a la intensidad de la hemólisis. Señalamos de paso que estos elementos globulares o estromas, carentes de hemoglobina y oxígeno determinarían a su paso por los capilares anoxia, aplicándose así por lo menos en parte, las graves lesiones de los procesos hemolíticos agudos; (otros

investigadores (3) habían ya hecho estos planteamientos al hablarnos de obstrucción mecánica determinada por los estromas y su consecuencia, la interrupción de la circulación); en efecto, mientras que las inyecciones endovenosas de hemoglobina son inocuas, las de sangre hemolizada (estromas + hemoglobina) son tóxicas (Ottenberg (29); Barral y Yorke citados por Ottenberg y por Rous (29), (3); Sellards y Minot (30); Gilligan (31)).

No sabemos cuanto tiempo circulan los estromas en el organismo humano; en una investigación preliminar realizada en conejos hemos observado que es alrededor de una hora y que el organismo dispone de medios de eliminación (estromatólisis), no sabemos si por lisis, tal como lo sugiere la pérdida progresiva de coloración o por fagocitosis. Se entiende que en el caso de la experiencia en conejos fueron inyectados estromas de eritrocitos de diferentes edades, jóvenes adultos y viejos, pero en el orden fisiológico en que se supone que solamente se lisan los eritrocitos viejos, el tiempo de vida de los estromas tal vez sea más corto. El bazo y los pulmones intervienen en la secuestración de los estromas (Rous (3); cuando la hemólisis se realiza en toluilenediamine, las "Sombras" (estromas) circulan durante mucho más tiempo en animales esplenectomizados que en no esplenectomizados (Joanovics, citado por Rous (3)).

Mientras que la presencia de abundantes estromas fue evidente en procesos hemolíticos agudos (bartonellosis murina, intoxicación por naftalina, mordedura de *Loxosceles laeta*, anemia hemolítica del cobayo por suero hemolítico e infección a *Clostridium welchii*) en concordancia con intensa hemoglobinemia y hemoglobinuria, en procesos hemolíticos crónicos en los que no se produce hemoglobinemia (macroscópicamente) ni hemoglobinuria, el resultado fue distinto: en los dos casos de anemia hemolítica adquirida crónica que observamos, la cantidad de estromas fue evidentemente superior a lo habitualmente encontrado en sujetos normales, pero muy inferior a lo encontrado en procesos hemolíticos agudos; en el único caso de esferocitosis hereditaria que pudimos observar la cantidad fue normal, cosa que llamó nuestra atención.

Crosby y Dameshek (8) encontraron hemoglobina plasmática aumentada en casos de anemia hemolítica adquirida crónica que concuerda con nuestros hallazgos de estromas en cantidad patológica y con la presencia de autoanticuerpos (test de Coombs positivo), sugiriendo estos hallazgos que en este tipo de anemia se produce hemólisis intravascular. Los mismos autores encontraron hemoglobina plas-

mática normal en casos de esferocitosis hereditaria, que concuerda con la cantidad normal de estromas hallado por nosotros en un caso y con la ausencia de autoanticuerpos (test de Coombs negativo), sugiriendo estos hechos que la hemólisis intravascular o no juega rol en esta anemia o si lo hace ella ocurre a nivel esplénico solamente (efecto favorable de la esplectomía); parece sin embargo poco probable que la eritrofagocitosis a nivel esplénico intervenga en la patogenia de este proceso (Guizetti, Elliot y Kanavel, Eppinger, Dick y Meulengracht, citados por Meulengracht) (32).

En la anemia hemolítica aguda del cobayo por inyección de suero hemolítico de conejo anticobayo son evidentes tanto la hemólisis intravascular (hemoglobinemia y abundantes estromas en el plasma) como la eritrofagocitosis. Si las dosis de suero hemolítico son pequeñas y repetidas se obtiene un cuadro de anemia hemolítica moderada (ictericia y anemia) según Dameshek y Schwartz (11), con sintomatología que se acerca a las anemias hemolíticas crónicas del hombre (anemia, ictericia sin hemoglobinemia macroscópica); tenemos que aceptar que con dosis débiles o fuertes de suero hemolítico el mecanismo de destrucción tiene que ser el mismo, por hemólisis intravascular y por eritrofagia; sólo que en el caso de las dosis débiles la cantidad de estromas tendrá que ser muy inferior, tanto porque la producción es menor cuanto porque los mecanismos de destrucción (estromatólisis) son suficientes; estamos pues de acuerdo con la afirmación de Dameshek y Schwartz cuando dicen que "Hemoglobinemia and hemolytic icterus are simply different manifestations of the same fundamental phenomena: intravascular hemolysis".

En la anemia hemolítica de la bartonellosis murina, el problema ofrece características semejantes; son evidentes la hemoglobinemia con hemoglobinuria, la presencia de abundantes estromas en el plasma y la eritrofagocitosis.

En la Bartonellosis Humana o Enfermedad de Carrión se ha encontrado intensa eritrofagia (33), (34), (35), y nuestras observaciones preliminares indican que también entra en juego la hemólisis intravascular (foto N^o). No han sido halladas autoaglutininas ni autohemolisinas en esta enfermedad (Guzmán Barrón (33)); la fragilidad globular osmótica está ligeramente aumentada en el período de anemia intensa (Monge (36), Hurtado, Pons y Merino) (19); la fragilidad mecánica está también notablemente aumentada (37), (38).

La destrucción de los eritrocitos en la Enfermedad de Carrión no es tan violenta como en la Bartonellosis murina o como en otros proce-

sos hemolíticos agudos; no han sido descritos hemoglobinemia ni hemoglobinuria; la podríamos colocar pues dentro de las anemias hemolíticas subagudas (anemia e ictericia).

Según nuestras observaciones, durante los primeros días de enfermedad (período de invasión) la *Bartonella* se multiplica e invade los eritrocitos (*Bartonella bacilar*) y en determinados sujetos, probablemente con inmunidad natural baja, llega a parasitar un altísimo porcentaje de eritrocitos, permaneciendo normal o ligeramente baja la cifra de estos; en los días subsiguientes en que los medios inmunitarios del organismo han alcanzado un nivel alto, se produce intensa destrucción de eritrocitos y de gérmenes, terminando en severa anemia, habitualmente de 1 a 2 millones de hematíes por mm^3 , y en desaparición de las *Bartonellas* de la circulación (*Bartonella cocoide*). No hemos tenido oportunidad de investigar seriadamente estromas en esta fase de destrucción.

En otros sujetos, probablemente con inmunidad natural buena, las *Bartonellas* llegan a parasitar solamente un reducido porcentaje de los eritrocitos, 2 por mil por ejemplo, y el proceso termina con anemia muy ligera que frecuentemente pasa desapercibida.

En la anemia hemolítica aguda por mordedura de *Loxosceles laeta* y en la determinada por infección a *Clostridium welchii*, son indiscutibles la hemólisis intravascular (intensa hemoglobinemia y hemoglobinuria con enorme cantidad de estromas en el plasma); ignoramos si en estos procesos ocurre también eritrofagocitosis.

Nuestros hallazgos de estromas en la sangre de sujetos normales indican que la hemólisis intravascular existe normalmente; estos hallazgos concuerdan con los hallazgos de hemoglobina libre en el plasma normal, alrededor de 4 mgrs. %, según Crosby y Dameshek (8). Tenemos que aceptar que esta hemoglobina se origina por hemólisis intravascular y no por fragmentación o por fagocitosis. El camino que sigue esta hemoglobina es en gran parte conocido (Crosby y Dameshek (8), Sellards y Minot (30), Watson (39), Gilligan y colaboradores (31), Fairley (40), Roos (28), etc.); élla se convierte al final en bilirrubina y se acepta que esta conversión es rápida (Watson (39)). Ignoramos en cambio el destino que siguen los estromas y la velocidad con que son destruidos; en condiciones patológicas ellos circulan cierto tiempo antes de ser destruidos; en condiciones fisiológicas debe ocurrir algo semejante.

No podemos negar que una parte de los estromas que nosotros encontramos en sangre fresca o en extensiones coloreadas de sangre nor-

mal, se produzcan en el curso de las manipulaciones; la tendencia natural y constante de una población de eritrocitos es que los individuos que hayan llegado a su límite de edad sucumban, por hemólisis, según nosotros, a los agentes agresivos que se les presentan (agentes mecánicos, físicos, químicos y biológicos) sea en el interior de los vasos o fuera de ellos; incluso los hematíes jóvenes se hemolizarán si la fuerza de la agresión sobrepasa su resistencia.

Al practicar una extensión de sangre en vidrio (portaobjetos), el frotamiento tiene que desempeñar un rol importante; la mayor cantidad de estromas, desgarrados en gran parte, se encuentra en la zona final de la extensión; aquí el plasma, que evidentemente protege a los eritrocitos contra los agentes hemolíticos, llega en mínima cantidad y esto permite que el frotamiento sea mayor y con ello la hemólisis y ruptura de muchos eritrocitos. De otro lado, Fenn (41) demostró que el contacto de glóbulos rojos lavados con vidrio, determina hemólisis y que el suero sanguíneo inhibe este fenómeno.

En los procesos hemolíticos agudos, la frecuente alteración de la resistencia globular, hace más lógico suponer que las manipulaciones hemolizan una parte; tal vez en el futuro pueda descubrirse un procedimiento que permita excluir o diferenciar a los estromas que se forman *in vitro*, de los que ocurren en el interior de los vasos.

Empleando diversos agentes y procedimientos se llega a la conclusión de que la unión entre el estroma y la hemoglobina es lábil, un fenómeno de adsorción según Mason y Rockwood (42) y que el eritrocito siempre responde a la injuria, hemolizándose tanto en el interior de los vasos como fuera de ellos. En cambio, la fragmentación parece que ha sido lograda *in vitro* únicamente por calentamiento o por microdissección (Mason y Rockwood (42)), condiciones que no se producen normalmente. Hemos buscado esquizocitos en sangre periférica de sujetos con fiebre alta y en individuos sometidos a intensa actividad física (foot-ball) durante una hora, con resultado negativo; los hemos encontrado en cambio en los órganos internos de cadáveres, especialmente en extensiones realizadas con fragmentos de músculo cardíaco, siguiendo a Strauss (43).

Si en condiciones patológicas la destrucción sanguínea por hemólisis y por eritrofagocitosis son evidentes, como si estos mecanismos no fueran sino una desviación de lo fisiológico, en cambio no ha sido demostrada que las anemias hemolíticas se produzcan por exagerada fragmentación, no siendo demostrativas en este sentido las observaciones de Cooley y Lee. Nos parece ilógico admitir que el organismo dispu-

siera de dos mecanismos para destruir sus glóbulos: por fragmentación en condiciones fisiológicas y por hemólisis intravascular y por eritrofagocitosis en condiciones patológicas.

La identificación en el organismo normal de una serie de sustancias con poder hemolítico, refuerza la idea de que la hemólisis intravascular interviene normalmente en la destrucción de los eritrocitos; suponemos que tales sustancias actúen por hemólisis y no por aumento de su fragmentabilidad o por aumento de su capacidad de ser fagocitados, punto que será motivo de una investigación especial.

Ponder (44) ha verificado una excelente recopilación de estos agentes líticos y su acción en el organismo las hace depender de sustancias inhibitoras de un lado y estimuladoras de otro (La teoría del "Lysin-inhibitor-accelerator-complex"). Es cosa que llama la atención que la mayoría de estas sustancias sean lípidos o derivados de éstos (ácidos grasos libres y jabones identificados por Jhonson y Freeman (45)); las lisinas tisulares aisladas por Brinkman (46); las lisinas tisulares aisladas por Laser (47); la lisolecitina aislada por Berghem y Fahareus (48). Vamos a comentar algunas de estas sustancias.

A la cabeza colocamos a ciertos derivados de la digestión de los lípidos, jabones y ácidos grasos, que ingresan por el conducto torácico y poseen marcado poder hemolítico (Jhonson y Freeman (45)); ellos determinan liberación de hemoglobina (hemólisis) la que se convierte en bilirrubina que es excretada por el hígado (acción colerética). Sabemos de otro lado que la presencia de grasas en el duodeno determina el vaciamiento de la vesícula biliar (acción colágena).

Josephs, Holt, Tidwell y Rajdi (1038-1042) citados por Jhonson, Freeman y Longini (49), demostraron en perros y en niños que la excreción diaria de los productos de degradación de la hemoglobina (urobilinógeno) era mayor en los que recibían alimentación rica en grasas que los que recibían pobre en ellas.

Loewy, Freemann, Marchello y Jhonson (50), demostraron en perros mediante fístula biliar, que la bilirrubina total eliminada diariamente era significativamente más alta en perros alimentados con dieta rica en grasas que en perros con dieta calóricamente equivalente pero baja en grasas; dedujeron de ello que se producía destrucción de mayor cantidad de glóbulos rojos en tales perros y que el efecto era causado probablemente por una sustancia que ingresaba a la circulación por el conducto torácico; sin embargo, los intentos de producir anemia mediante alimentación grasosa por tiempo prolongado no tuvieron resultado (Jhonson, Freeman y Longini) (49), porque según estos auto-

res la médula ósea normal es suficiente para reponer las cantidades destruidas. Anotamos que Thompkins (51) produjo en conejos con inyecciones endovenosas de lecitina, anemia con reticulocitosis, eritroblastosis e hiperplasia roja de la médula ósea.

Jhonson y Freeman (45) encontraron que el poder hemolítico de la linfa vertida por el conducto torácico después de la ingestión de grasas, era determinada por los jabones y ácidos grasos libres que ella contenía.

Longini y Jhonson (53) demostraron en perros que después de la ingestión de grasas aparecía en el suero una sustancia que aumentaba la fragilidad de los hematíes; se inclinaron a pensar, en relación con el trabajo anterior, que tal sustancia podía estar constituida por jabones y ácidos grasos.

Freeman, Loewy y Jhonson (53) demostraron en perros por medición cuantitativa de la bilis excretada, que la inyección endovenosa de jabones y ácidos grasos determinaba un definido aumento de la destrucción de los glóbulos rojos. Calcularon que del total de la sangre diariamente destruida, del 8 al 35 % correspondía a lo que lo hacían los jabones y los ácidos grasos que ingresaban en una alimentación corriente.

Jhonson, Freeman y Longini (49) encontraron que los hematíes de personas sanas en contacto con suero lipémico se hacían más sensibles a la hemólisis osmótica; en pacientes con anemia perniciosa no tratada, el suero lipémico de estos producía no solamente aumento de la fragilidad osmótica de sus glóbulos rojos sino incluso hemólisis.

Creditor (54) demostró que la inyección endovenosa de emulsión de grasas, en perros y en seres humanos, determinaba aumento de la fragilidad mecánica de los hematíes.

Swank y Roth (55) confirmaron que la ingestión de grasas (crema, aceite de hígado de bacalao y trioleato de glicerina) determina aumento de la fragilidad mecánica de los hematíes y que este aumento era visiblemente proporcional al grado de la lipemia; contrariamente, la sangre de perros en ayunas carecía de esta propiedad.

Nosotros en 1956 (6) (7) pudimos descubrir que extendiendo sangre lipémica en porta objetos se producía hemólisis, pero que los estromas en lugar de presentarse como discos aparecían bajo la forma de medias lunas ("cuerpos selenoides" según nuestra denominación).

La serie de trabajos que hemos mencionado prueban que las grasas ejercen un importante rol de destrucción de eritrocitos y que esta

acción se relaciona íntimamente con los conocidos efectos colerético y colagogo.

De otro lado tenemos las lisinas tisulares descubiertas por Metchnikoff y que han sido confirmadas por varios investigadores, tanto en tejidos normales como en tumorales y que han servido de base para el descubrimiento de otras (Well y Gross, citados por Ponder (44), Macgrath, Findlay y Martín (56). Las lisinas tisulares aisladas por Brinkman (46) que parecen corresponder a una mezcla de losfólidos y jabones. La sustancia hallada por Laser (47), de gran poder hemolítico, aislada del plasma y de varios órganos; químicamente corresponde a un ácido graso no saturado. La lisolecitina identificada por Berhenhem y Fahraeus (48) en el suero sanguíneo. Según Singer la lisolecitina, que en el bazo se encuentra en alta concentración, juega un rol importante en la destrucción fisiológica de los eritrocitos, cosa que pone en duda Collier (58). De Vries (59) produjo anemia hemolítica experimental aguda en conejos mediante inyecciones endovenosas de lisolecitina. Laser (47) afirma no haber comprobado la existencia de lisolecitina en el organismo.

Debemos finalmente decir que el plasma normal contiene autoaglutininas y hemolisinas activas contra eritrocitos previamente dañados por enzimas, tales como la tripsina (Rosenthal y Schwartz) (60); Hurley y Docie (61); según Dacie (62), estas autoaglutininas y hemolisinas, aunque aparentemente inactivas contra hematíes normales en las experiencias in vitro, podrían serlo activas in vivo por su contacto permanente con los eritrocitos.

SUMARIO

Se ha hecho el estudio del mecanismo de destrucción de los eritrocitos desde un punto de vista nuevo : mediante la investigación de estromas en preparaciones húmedas (campo oscuro) y en extensiones de sangre coloreadas con un método original.

La investigación de estromas fue hecha en dos circunstancias :

1.— En muestras de sangre hemolizadas mediante los siguientes agentes y procedimientos (hemólisis in vitro) : agua destilada, solución hipertónica de cloruro de sodio, suero hemolítico anticarnero de conejo contra eritrocitos de carnero, suero hemolítico anticobayo de conejo contra eritrocitos de cobayo, bacterias saprofitas en muestras de sangre dejadas a la intemperie, congelación y descongelación, agitación con perlas de vidrio, pasaje forzado de sangre a través de un orificio estrecho, cámara húmeda, presión de sangre entre portaobjetos y cubreobjetos, calentamiento, azul de cresil bri-

llante, anticoagulante de Wintrobe, al extender sangre en portaobjetos, y vertiendo diversos líquidos (suero fisiológico, suero sanguíneo, etc.), en extensiones secas de sangre. Cantidades enormes de estromas fueron encontradas en prácticamente todas estas circunstancias.

2.— En muestras de sangre tomadas directamente de seres vivos (hemólisis *in vivo* o hemólisis intravascular) bajo las siguientes circunstancias y condiciones: sujetos normales, después de inyección de agua destilada por vía endovenosa, bartonelosis murina, anemia hemolítica aguda del cobayo por suero hemolítico anticobayo de conejo, bartonelosis humana (Enfermedad de Carrion), anemia hemolítica adquirida crónica, esferocitosis hereditaria, anemia hemolítica aguda por ingestión de naftalina, anemia hemolítica aguda por mordedura de *Loxosceles laeta* (araña venenosa sudamericana), hemoglobiuria de marcha, después de inyección endovenosa en conejos de sangre hemolizada de conejo y anemia hemolítica aguda por infección a *Clostridium welchii*. Cantidades variables de estromas, abundantes en unos casos y escasos en otros, fueron encontradas en estas diferentes circunstancias.

Se ha determinado en conejos, bajo condiciones experimentales especiales, el tiempo de vida de los estromas.

Los resultados obtenidos por nosotros y los logrados por otros autores nos permiten sentar los siguientes hechos:

Hemólisis, de acuerdo al concepto predominante, es la disyunción del eritrocito en sus dos elementos constitutivos fundamentales: a) el estroma, y b) la hemoglobina.

Se ha comprobado que la hemólisis representa la forma habitual de respuesta del eritrocito frente a la injuria, sea ésta de naturaleza mecánica, física, química o biológica.

Han sido encontrados estromas en sangre normal, tanto en muestras húmedas como en extensiones secas coloreadas con el ya mencionado método original. Se considera que estos estromas se originen en parte en el interior de los vasos (hemólisis intravascular) y en parte en el curso de las manipulaciones (hemólisis *in vitro*).

Se considera que la hemoglobina libre del plasma normal se origine también por hemólisis intravascular y que tenga por consiguiente con los mencionados estromas un origen común.

La presencia de estromas y de hemoglobina libre en el plasma normal dan apoyo a la tesis de que la hemólisis intravascular interviene en el proceso de destrucción fisiológica de los eritrocitos. La existencia en el organismo de varias sustancias con propiedades hemolíticas refuerza esta tesis.

Han sido igualmente encontrados estromas en diferentes procesos hemolíticos, muy abundantes en aquellos de carácter agudo que se acompañan de hemoglobiuria y en menor proporción en los subagudos y crónicos.

Se ha constatado que los estromas suspendidos en plasma se comportan como glóbulos de paredes tensas; se responsabiliza a ellos (glóbulos que no llevan oxígeno) de las lesiones tisulares que se producen en los procesos hemolíticos agudos.

La destrucción intravascular de los eritrocitos tendría, en nuestro concepto, lugar en tres fases:

1.— Desdoblamiento del eritrocito en estroma y en hemoglobina (hemólisis).

2.— Circulación de hemoglobina y de estromas durante cierto tiempo.

3.— Destrucción de hemoglobina y de estromas: lo primero por conversión en sus derivados, y lo segundo por desintegración en el torrente sanguíneo (estromatolisis) o por fagocitosis (estromatofagocitosis).

Se ha encontrado, ser de una hora aproximadamente el tiempo de vida de los estromas en el conejo. para 10 cc. de sangre hemolizada por congelación y descongelación e inyectada por vía endovenosa (experiencia preliminar).

Zusammenfassung

Man hat den Mechanismus der Zerstörung der Erythrozyten von einem neuen Standpunkt aus studiert: mittels der Untersuchung der Stromen in feuchten Präparaten (Dunkelfeld). und in Blutausstrichen gefärbet mit einer neuen Originalmethode.

Die Untersuchung der Stromen wurde unter zwei verschiedenen Umständen gemacht:

1.— In haemolysiertem Blut mittels folgenden Substanzen und Verfahren (Haemolyse "in vitro"): destilliertes Wasser, hipertonsche Kochthrocysten von Hammeln, haemolytisches anti-Meerschweinchenserum von Kalzsalzlösung, haemolytisches anti-Hammelserum von Kaninchen gegen Erythrocyten von Meerschweinchen, Saprophyten-Bakterien im Blut, welches der Luft ausgesetzt war; durch Gefrieren und Tauen, Schüttelung mit Glasperlen, Durchzwingen des Blutes durch eine schmale Öffnung, feuchte Kammer, starker Druck des Blutes zwischen Objektträger und Deckgläschen, Erwärmung, Brillant-cresylblau, anti-Gerinnung von Wintrobe, beim Ausstreichen des Blutes auf dem Objektträger und Bedecken desselben mit verschiedenen Flüssigkeiten (Physiologische Kochsalzlösung, Blutserum, etc.) in trockenen Blauausstrichen. Grosse Anzahl von Stromen wurden fast in allen Umständen gefunden.

2.— In Blutproben, abgenommen direkt vom lebenden Wesen (Haemolyse "in vivo" oder Haemolyse intravasculär). unter folgenden Umständen und Bedingungen: Normale Personen, nach einer intravenösen Injektion von destilliertem Wasser, Bartonellosis in Ratten (Haemobartonella muris), akute haemolytische Anemie des Meerschweinchens verursacht durch haemolytisches anti-Meerschweinchenserum von Kaninchen, Carrionsche Krankheit, erworbene chronische haemolytische Anemie, vererbte haemolytische Anemie, akute haemolytische Anemie verursacht von Einnehmen von Naphtalin, akute haemolytische Anemie verursacht vom Biss der *Loxosceles laeta* (giftige südamerikanische Spinne), Marschhämoglobinurie, nach intravenöser Injektion von haemolysiertem Kaninchenblut in Kaninchen und akute haemolytische Anemie durch Infektion von *Clostridium welchii*. Verschiedene Anzahl von Stromen, zahlreich in einigen und wenig in anderen, wurden defunden in diesen Umständen und Experimenten.

Man hat die Lebenszeit der Stromen festgestellt in Kaninchen unter besonderen Bedingungen und Experimenten.

Unsere erreichten Resultate und die anderer Autoren erlauben uns, folgendes festzustellen :

Haemolyse ist die Trennung des Erythrocyten seiner zwei constitutiven Elemente : a) das Stroma; b) das Haemoglobin, gemäss der Ansicht der meisten Autoren.

Man hat festgestellt, dass die Haemolyse die Antwort des Erythrocyten ist gegen die Angreifung von mechanischer, physischer, chemischer und biologischer Seite.

Man hat Stromas in normalem Blut gefunden in feuchten Präparaten und auch in trockenen Ausstrichen gefärbt mit der schon erwähnten Originalmethode. Man glaubt, dass diese Stromas sich teilweise bilden im Innern der Gefässe (Haemolyse intravasculär) und teilweise beim Behandeln (Haemolyse in vitro).

Man glaubt, dass das freie Haemoglobin in normalem Plasma entsteht durch intravasculäre Haemolyse und demzufolge zusammen mit den Stromen eine gemeinsame Herkunft haben.

Das Vorhandensein von Stromen und freiem Haemoglobin in normalem Plasma unterstützen die These, dass in der physiologischen Zerstörung der Erythrocyten die intravasculäre Haemolyse eingreift. Die Existenz von haemolytischen Substanzen im Organismus bestätigen diese These.

Man hat ebenfalls Stromen gefunden in verschiedenen haemolytischen Prozessen : in grosser Anzahl in akuten Fällen begleitet von Haemoglobinurie, in weniger Anzahl in subakuten und chronischen Fällen.

Man hat festgestellt, dass die Stromen, welche im Plasma schwimmen, sich betragen wie Blasen mit gespannten Wänden; man beschuldigt sie (Körperchen ohne Sauerstoff) wegen der Gewebswunden, welche in akuten haemolytischen Prozessen entstehen.

Die intravasculäre Zerstörung der Erythrocyten hätte nach unserer Meinung drei Entwickelungsstufen :

1.— Trennung der Erythrocyten in Stroma und Haemoglobin (Haemolyse).

2.— Umlauf des Haemoglobins und der Stromen einige Zeit hindurch.

3.— Zerstörung des Haemoglobins und der Stromen; erstere durch Umwandlung in seine Ableitungen; zweitere durch Übergehen in den Blutlauf (Stromatolyse) oder durch Phagozytose (Stromatophagozytose).

Man hat auch festgestellt die Lebenslange der Stromen in Kaninchen in ungefähr 1 Stunde, für 10 c.c. haemolisirtes Blut durch Gefrierung und dann Tauung, demnach intravenös injiziert (Vorläufige Untersuchung).

SUMMARY

A study on manner of erythrocytes destruction was carried out under a new point of view, that is by searching for stromas of erythrocytes (shadows or ghosts) both in wet samples of blood (dark-field examinations) and in dry smears stained with a new method.

The searching for stromas was carried out in two circumstances :

1.— In blood samples hemolyzed by means of the following agents and procedures (in vitro hemolysis) : distilled water, hypertonic saline solution, sheep erythrocytes hemolysis produced by antisheep hemolytic sera of rabbit, hemolysis of guinea pig erythrocytes by antiguinea pig hemolytic sera of rabbit, bacterial hemolysis (saprophytic bacteria), freezing and thawing, by shaking blood with glass balls, by forcing blood to pass through a narrow hole, wet chamber, by pressing glass cover against slide, by heating, brilliant cresyl blue, Wintrobe's anticoagulant, by spreading normal blood on slides; and normal saline, serum, etc. upon dry blood smears. Abundant stromas were found in practically all of the just mentioned circumstances.

2.— In blood samples directly obtained from human beings and some animals under the following conditions and circumstances ("in vivo hemolysis" or intravascular hemolysis) : normal subjects, after intravenous distilled water injection, murine bartonellosis, acute hemolytic anemia of guinea pig as induced by hemolytic antiguinea pig serum of rabbit, Carrion's disease (Oroya fever), chronic acquired hemolytic anemia, hereditary spherocytosis, hemolytic anemia by naphthalene ingestion, hemolytic anemia caused by the biting of *Loxosceles laeta* (poisonous South American spider), march hemoglobinuria, hemolytic anemia caused by *Clostridium welchii* infection, and after intravenous injection (in rabbits) of blood hemolyzed by freezing and thawing. Variable quantities of stromas, in some cases abundant and in others scarce, were found under the just mentioned conditions and experiences.

The life span of rabbit stromas was carried out under special experimental conditions.

According to the results obtained by us and those accomplished by other investigators we can establish the following facts :

Hemolysis, according to the prevailing concept, is the dissociation of the erythrocyte in its two fundamental components : a) stroma (shadows or ghosts); b) hemoglobin.

Hemolysis has been confirmed to be the usual form of erythrocyte response against injury, being it of mechanical, physical, chemical or biological nature.

Stromas have been found in normal blood, in wet specimens as well as in dry smears stained with a new method. These stromas are considered to be originated partly in the interior of the vessels (intravascular hemolysis) and partly in the course of the manipulations (in vitro hemolysis).

Hemoglobin free from plasma is considered to be originated also by intravascular hemolysis and to have a common origin with the mentioned stromas.

The presence of stromas and free hemoglobin in normal plasma supports the thesis that intravascular hemolysis takes part in the process of physiological destruction of erythrocytes. The existence in the organism of various substances with hemolytic properties emphasizes this thesis.

Likewise, stromas have been found in different hemolytic processes; abundantly in those of acute character which are accompanied by hemoglobinuria, and in minor proportion in the subacute and chronic ones.

It has been observed that stromas suspended in plasma behave themselves as tense wall globules; they are made responsible (globules which do not carry oxygen) of the tissular damages which are produced in acute hemolytic processes.

The intravascular destruction of erythrocytes would have three phases:

1.— Dissociation of the erythrocytes in stromas and hemoglobin (hemolysis).

2.— Circulation of hemoglobin and stromas during a certain time.

3.— Destruction of hemoglobin and stromas: the first by conversion into derivatives and the latter by disintegration in the blood stream (stromatolysis) or by phagocytosis (stromatophagocytosis).

The life span of rabbit stromas was found to be of one hour for 10 cc of blood hemolyzed by freezing and thawing and injected intravenously (preliminary report).

Résumé

On a étudié le mécanisme de destruction des hématies d'un point de vue nouveau : moyennement la recherche de stromes en préparations humides (camp noir) et d'étalements de sang teints avec une méthode originale.

L'investigation de stromes a été faite en deux circonstances :

1.— Sur des échantillons de sang hémolysés par les procédés suivants (hémolyse "in vitro") : l'eau distillée; la solution hypertonique de chlorure de sodium; le sérum hémolytique anti-mouton de lapin; sérum hémolytique anti-cobaye de lapin; des bactéries saprophytes des échantillons de sang laissés au milieu ambiant; la congélation et la décongélation; le mouvement avec les billes de verre; le passage forcé du sang à travers d'un trou étroit; la chambre humide; la compression du sang entre deux lames de verre; le chauffage; le bleu de cresil l'anticoagulant de Wintrobe; l'étalement du sang sur des lames de verre et le versement de divers liquides (sérum physiologique, sérum sanguin, etc.) sur les étalements secs du sang. Des énormes quantités de stromes ont été trouvés dans ces conditions dans la plupart des cas.

2.— Dans les échantillons de sang prises directement des vivants (hémolyse "in vivo" ou hémolyse intravasculaire) dans les conditions que voici : sujets normaux; après l'injection de l'eau distillée par voie intraveineuse, bartonellose murine, anémie hémolytique sigue du cobaye par sérum hémolytique anti-cobaye de lapin; Bartonellosa humaine (Maladie de Carrion), anémie hémolytique acquise chronique, sphérocytose héréditaire, anémie hémolytique aiguë par ingestion de naftaline, anémie hémolytique aiguë par morsure de *Laxosceles laeta* (araignée venimeuse de l'Amérique du Sud), hémoglobinurie de la marche, après l'injection intraveineuse chez les lapins du sang hémolysé de lapin et anémie hémolytique aiguë par infection à *Clostridium welchii*. Des quantités variables de stromes, abondants dans quelques cas; en moindre proportion dans quelques autres, ont été trouvés dans ces conditions.

On a pu établir chez les lapins sous conditions expérimentales particulières, le temps de vie des stromes.

Nos résultats et ceux des autres auteurs nous permettent les faits suivants :

L'hémolyse suivant les idées actuelles, est la séparation de l'erythrocyte dans ses deux composants fondamentales : a) le strome; et b) l'hémoglobine.

On a constaté que l'hémolyse représente la manière habituelle de réponse de l'hématie vis à vis des agents extérieurs soient mécaniques, physiques, chimiques ou biologiques.

On a trouvé des stromes dans le sang normal autant dans les échantillons humides que dans les étalements secs teints avec la méthode originale déjà mentionnée. On considère que ces stromes s'originent en partie à l'intérieur des vaisseaux (hémolyse intravasculaire) et en partie au cours des manœuvres (hémolyse "in vitro").

On considère que l'hémoglobine libérée du plasma normal s'origine aussi par hémolyse intravasculaire et que par conséquent a avec les stromes un origine commun.

La présence des stromes et d'hémoglobine libérée dans le plasma normal appuie l'hypothèse de que l'hémolyse intravasculaire intervient dans le processus de destruction physiologique des hématies. Cette thèse est renforcée par l'existence dans l'organisme de plusieurs substances qui possèdent des propriétés hémolytiques.

On a trouvé également des stromes dans différents processus hémolytiques; ils sont très abondants dans le processus aigu accompagné d'hémoglobinurie; ils sont moins abondants dans les processus subaigus et chroniques.

On a constaté que les stromes en suspension de plasma se portent comme des globules à parois tendues; ils seraient les responsables (globules dépourvus d'oxygène) des lésions tissulaires qui se produisent dans les syndromes hémolytiques aigus.

La destruction intravasculaire des hématies aurait lieu, d'après nous, en trois étapes :

1.— Dedoublement de l'hématie en strome et hémoglobine (hémolyse).

2.— Circulation de l'hémoglobine et des stromes pendant un certain temps.

3.— Destruction de l'hémoglobine et des stromes. La hémoglobine serait détruite par transformation en dérivés; les stromes seraient détruits par désintégration dans la circulation (stromatolyse) ou par phagocytose (stromatophagocytose).

Il est à peu près d'une heure le temps de vie des stromes dans le lapin pour 10 cc de sang hémolysé par congélation et décongélation et injecté par la voie intraveineuse (expérience préliminaire).

REFERENCIAS

1. ROUS, P. and ROBERTSON, O. H.: The Normal Fate of Erythrocytes. I. The Findings in healthy animals. *J. Exper. Med.*, 25:651, 1917.
2. ROBERTSON, O. H. and ROUS, P.: The Normal Fate of Erythrocytes. Blood Destruction in Plethoric Animals and in Animals with a Simple Anemia. *J. Exper. Med.* 25:665, 1917.

3. ROUS, P.: Destruction of the Red Blood Cells. *Physiol. Rev.* 3:75, 1923.
4. DOAN and SABIN: *J. Exper. Med.* 43:839, 1926.
5. COOLEY, T. B. and LEE, P.: The Role of Erythrocyte Fragmentation in the Genesis of Anemia. *J. Pediat.* 3:55, 1933.
6. CUADRA, M.: Un Método Original de Coloración de Estromas. *Anales de la Facultad de Medicina (Lima-Perú)*. 39:1465, 1956.
7. CUADRA M.: Selenoid Bodies. 1957. Aparecerá en *Blood (The Journal of Hematology)*, en Marzo de 1958.
8. CROSBY, W. H. and DAMESHEK, W.: The Significance of Hemoglobinemias and Associated Hemosiderinuria with Particular Reference to Various Types of Hemolytic Anemia. *J. Lab. Clin. Med.* 38:829, 1951.
9. ISAACS, R.: The Erythrocytes. *Hand book of Hematology* Hal Downey (editor). Paul B. Hoeber Inc. New York, 1938.
10. ROCKWOOD, R.: Physicochemical Aspects of Hemolysis. II An Ultra-microscopic Study of Hemolysis. *The Journal of Laboratory and Clinical Medicine.* 0:18, 1924.
11. DAMESHEK, W. and SCHWARTZ, S. O.: Hemolysins as the Cause of Clinical and Experimental Hemolytic Anemias. 196:769, 1938.
12. MELTZER, S. J. and WELCH, W. H.: The Behavior of the Red Blood-corpuses When Shaken with Indiferent Substances. *J. Physiol.* 5:255, 1885.
13. ROSENOW, G.: *Enfermedades de la Sangre*. Editorial Labor S. A. 1936.
14. HAM, T. H., SHEN, S. C., FLEMING, E. M. and CASTLE, W. B.: Studies on the Destruction of Red Blood Cells. IV. Thermal Injury, etc. *Blood.* 3:373, 1948.
15. LEE, R. I., MINOT, G. R. and VINCENT, B.: Splenectomy in Pernicious Anemia. *J. M. Med. Assn.* lxxvii, 719, 1916.
16. EILERS, Th.: Der Latente Erythrocytenumsatz. *Klinische Wochenschrift.* Januar, 1949.
17. WINTROBE, M. M.: *Clinical Hematology*. Lea & Febiger, Philadelphia, 1949.
18. WASASTJERNA, C.: The Destruction of Red Blood Corpuscles in Experimental Hemolytic Anemia. *Acta. Med. Scand.* 140, Supl., 258, 1951.
19. HURTADO, A., PONS, M. J. y MERINO, M. C.: La Anemia de la Enfermedad de Carrión (Verruga Peruana). *Anales de la Facultad de Ciencias Médicas de Lima (Perú)*. 21:25, 1938.
20. ZUELZER, W. W. and APT, L.: Acute Hemolytic Anemia due to Naphthalene Poisoning. *J. Am. Med. Assn.* 141:185, 1949.
21. BESSIS, M.: *Cytology of the Blood and Blood-forming Organs*. Grune & Statton. New York-London. 1956.
22. SCHILLING-TORGAU, V.: Der Saugetricery throzyt als vollstandige Zelle un seine Beziehung zum Bluplatchen. *Munchen. med. Wchnschr.* 58:445, 1911.
23. SCHILLING, V.: *El Cuadro Hemático*. Editorial Labor S. A., 1936.
24. NÁEGELI, O.: *Tratado de Hematología Clínica*. Editorial Labor, S. A., 1934.

25. BAYLISS, L. E.: Reversal of Haemolysis. *J. Physiol.* 25, 59, 48, 1924.
26. SCHULTEN, H.: *Tratado de Hematología Clínica*. Editorial Publ. 1944 (traducido de la segunda edición alemana).
27. ISAACS, R.: Formation and Destruction of Red Blood Cells. *Physiol. Rev.* 17:291, 1937.
28. ROOS, G. E.: Hemoglobinemia and the Hemoglobinurias. *The New England Journal of Medicine.* 233: 691,732 and 766, 1945.
29. OTTENBERG, R. and FOX, C. L., Jr.: The Rate of Removal of Hemoglobin from the Circulation and its Renal Threshold in Human Beings. *Am. J. Physiol.* 123:516, 1938.
30. SELLARDS, A. W. and MINOT, G. R.: Injection of Hemoglobin in Man and its Relation to Blood Destruction, with Special Reference to the Anemias. *J. Med. Resarch.* 34:469, 1916.
31. GILLIGAN, D. R., ALTSCHULE, M. D. and KATERSKY, E. M.: Studies of Hemoglobinemia and Hemoglobinuria Produced in Man by Intravenous injection of Hemoglobin Solution. *J. Clin. Invest.* 20: 177, 1941.
32. MEULENGRACHT, E.: Chronic Hereditary Hemolytic Jaundice. *Hand book of Hematology*. Hal Downey (editor). Paul B. Hoeber Inc. New York, 1938.
33. GUZMAN BARRON, A.: La Reacción de Van den Bergh, hemoaaglutininas y hemolisinas en la Enfermedad de Carrión. Sanmarti y Cia. impresores. Lima-Perú, 1926.
34. WEISS, P.: Hacia una Concepción de la Verruga Peruana. Tesis de Doctorado. Facultad de Medicina. Lima-Perú. 1927.
35. Aldana, L.: Bacteriología de la Enfermedad de Carrión. Tesis de Bachillerato. *Cron. Med. Lima*, 46:235, 1929.
36. MONGE, C.: Algunos puntos de la Enfermedad de Carrión. Tesis de bachillerato. *Cron. Med. Lima.* 602:17, 1914.
37. REYNAFARJE, C. y RAMOS, J.: Estudios Fisiopatológicos en la Anemia de la Enfermedad de Carrión. (Inédito), 1957.
38. BATTIFORA, H.: Estudio de la Fragilidad Mecánica de los Hematíes en la Enfermedad de Carrión. Tesis de Bachillerato. Facultad de Medicina. Lima-Perú, 1957.
39. WATSON, C. J.: The Pyrrol Pigments, with Particular Reference to Normal and Pathologic Hemoglobin Metabolism. *Hand book of Hematology*. Hal Downey (editor). Paul B. Hoeber Inc. New York, 1938.
40. FAIRLEY, N. H.: Methacmalbumin. *Quart. J. Med.. N. S.* 10:95, 115, 1941.
41. FENN, W. O.: Hemolysis of Erythrocytes in Contact with Glass. *J. Exper. Med.* 35:271, 1922.
42. MASON, E. C. and Rockwood, R.: Some physicochemical Aspects of Hemolysis. *J. Lab. and Clinical Med.* 10:10, 1924.
43. STRAUSS, A. F.: (From De Paul Hospital. E. E. U. U. A. A.). Conferencia en el Hospital Dos de Mayo, Lima-Perú. 1953.
44. PONDER, E.: Certain Hemolytic Mechanisms in Hemolytic Anemia. *Blood.* 6:559, 1951.

45. JOHNSON, V. and FREEMAN, W.: The Hemolytic Action of Chyle. *Am. J. Physiol.* 130:723, 1940.
46. BRINKMAN, R.: Résistance osmotique et Phosphatides du Sang Nouvelles méthodes quantitatives. *Arch. néerl. de physiol.* 6:451, 1922 (citado por 44).
47. LASSER, H.: The Isolation of a Hemolytic Substance from Animal Tissues and its Biological Properties. *J. Physiol.* 110:338, 1950.
48. BERGENHEM, B. and FAHARAEUS, R.: Über Spontane Hamolysinbildung im Blut, unter besonderer Berücksichtigung der Physiologie der Milz. *Ztschr. f. d. ges. exper. Med.* 97:555, 1936 (citado por 44).
49. JHONSON, V., Freeman, L. W. and Longini, J.: Erythrocyte Damage by Lipemic Serum in Normal Man and in Pernicious Anemia. *J. Am. Med. Assn.* 124:1250, 1944.
50. LOEWY, A., FREEMAN, L. W., MARCHELLO, A. and JHONSON, V.: Increased Erythrocyte Destruction on a High Fat Diet. *Am. J. Physiol.* 138:230, 1943.
51. THOMPCKINS, E. H.: Effects of Repeated Intravenous Injections of Lecithin in Rabbits; the Relationships to Lipoid Storage Disease and to Hemolytic Anemias. *Arch. Path.* 35:695, 1943.
52. LONGINI, J. and JHONSON, V.: Increased Red Blood Cell Fragility After Fat Ingestion. *Am. J. Physiol.* 140:349, 1943.
53. FREEMAN, L. W., LOEWY, A. and JHONSON, V.: In vivo Hemolysis Produced by Soap Injection. *Am. J. Physiol.* 140:556, 1944.
54. CREDITOR, M. C.: Some Observations of Effects of Intravenous Fat Emulsion on Erythrocyte Fragility. *Proc. Soc. Exper. Biol. & Med.* 74:768, 1950.
55. SWANK, R. L. and ROTH, S. S.: Hemolysis and Alimentary Lipemia. Effects of Incubation, Heparin and Protamine. *Blood.* 9:348, 1954.
56. MAEGRAITH, B., FINDLAY, G. M. and MARTIN, N. H.: Mechanism of Lysis of Red Blood Cells. *Nature.* 151:552, 1943.
57. SINGER, K.: Lysolecithin Fragility Test. *Am. J. M. Sci.* 199:466, 1940.
58. COLLIER, H. B. and WILBUR, K. M.: Lysolecithin and the Antihemolytic Value of the Blood. *J. Lab. & Clin. Med.* 9:1123, 1944.
59. DE VRIES, S. I.: Experimental hemolytic anemia. *Nederl tijdschr. v. geneesk.* 92:2013, 1948.
60. ROSENTHAL, M. C. and SCHWARTZ, L. I.: Reversible Agglutination of Trypsin Treated Erythrocytes by Normal Human Sera. *Proc. Soc. Exp. Biol. NY.* 76:635, 1951.
61. HURLEY, T. H. and DACIE, J.V.: Haemolysis and Reversible Agglutination of Trypsinized Normal Red Cells by a Normal Human Sera. *J. Clin. Path.* 6:211, 1953.
62. DACIE, J. V.: *The Haemolytic Anaemias.* Grune & Stratton, New York, 1954.