

cho mucho daño a la lucha contra la lepra. La leprosería de hoy en día, colonia agrícola, establecimiento de trabajo, centro de tratamiento activo, es una gran ayuda y debe mantenerse bajo nuevas bases.

Así pues, al mismo tiempo que técnicamente, preparémonos en este sentido si no queremos que mañana otros tengan que empezar, cuando nosotros y nuestra torpe e inútil acción sanitaria hayamos desaparecido.

Resumiendo, podemos decir, no se puede luchar contra la lepra solamente con un reglamento en la mano; hay que contar con un programa, un personal, una política y añadir suficiente dinero y un poco de pasión.

Una nueva técnica para el estudio nucleolar de la sangre *

Por el Dr. I. GONZALEZ GUZMAN.

La técnica que describí en 1924 (1) para el estudio de los nucléolos de las células sanguíneas no suministra preparaciones permanentes; la circunstancia de ser hecha en la cámara cuentaglóbulos impide el empleo de poderosos objetivos de inmersión con la ayuda de los cuales debe determinarse el volumen de la vesícula nuclear y de tan pequeños organitos.

La aplicación de la técnica de coloración post-vitam de Guarneri y Daddi (2), al estudio nucleolar de la sangre, da excelentes resultados; las células sanguíneas colocadas entre porta y cubre-objetos pueden ser examinadas con objetivo de inmersión en aceite y oculares fuertes, lo que permite las determinaciones volumétricas indispensables para el cálculo del índice Rn. Desgraciadamente, estas preparaciones tampoco son estables y su observación debe ser hecha cuando se ha obtenido el grado óptimo de la tinción nucleolar.

Finalmente, en los frotis pueden obtenerse coloraciones nucleolares permanentes, pero las células del embarre no tienen en el porta-objetos la forma arredondada que tienen en vivo y el aplastamiento que han sufrido es difícilísimo de calcular. La deter-

* Nota leída en la sesión del 14 de mayo de 1941.

minación del índice Rn resulta pues casi imposible de verificar, ya que no se conoce el grado de extensión o aplanamiento que han sufrido los núcleos celulares.

Por todos estos motivos he buscado una técnica que llene estos requisitos: I.—Suministrar preparaciones estables. II.—Colorear electivamente los corpúsculos nucleolares, y III.—Conservar a los elementos celulares la forma redondeada que tienen en la sangre fresca. Creo haber satisfecho tales propósitos con el procedimiento que señalo a continuación:

I.—La sangre obtenida por punción venosa es fijada en formalina al 10% en suero fisiológico. Se proyecta directamente de la jeringa a la solución fijadora, procurando que la solución formólica se encuentre en un volumen diez veces superior al de la sangre.

II.—Tapando el tubo con la yema del dedo, se hace bien la mezcla y se deja sedimentar. Diez o doce horas después se vuelve a mezclar el sedimento sanguíneo con el líquido que sobrenada y se deja sedimentar nuevamente.

III.—A las 24 horas de fijación se centrifuga en tubo de hemolisis de 100 x 10 mm. y se decanta cuidadosamente el líquido que sobrenada.

IV.—El sedimento se resuspende en 8 c.c. de suero fisiológico al que se han agregado dos gotas de amoníaco. Nueva centrifugación hasta obtener un sedimento compacto. Decantar el suero amoníacal sobrenadante, hasta dejar casi únicamente el depósito globular.

V.—Lavado en suero fisiológico. Centrifugar hasta obtener sedimento compacto, retirar el líquido que sobrenada tan completamente como sea posible y llevar el tubo así preparado a un baño maría a 52-55° centígrados.

VI.—A los diez minutos de calentar a esta temperatura se agrega al sedimento la mitad de su volumen de gelatina Difco al 30% en agua fenicada al 1%. La solución de gelatina ha sido previamente licuada a 37° centígrados. La mezcla de sangre y gelatina se mantiene en el baño maría a 52-55° durante 45 minutos, haciendo más homogénea la mezcla con un agitador de vidrio. Moviendo frecuentemente en ese lapso se obtiene buen resultado.

VII.—Se saca el tubo del baño maría y se enfría con chorro de agua sobre el exterior. Cuando la coagulación es completa y firme se rompe el tubo mediante ligeros golpecitos sobre una superficie resistente y se libera el coágulo de las posibles astillas de vidrio que se pudieran encontrar.

VIII.—La inclusión obtenida se coloca sobre un porta-objetos y se deja orear un poco para que pierda agua y gane en consistencia. Entonces se taja en rodajitas de 3 a 4 mm. que se ponen dentro de un tubo y se llevan al refrigerador durante 2 a 4 horas; transcurridas las cuales se les sumerge en agua formolada al 10% previamente refrigerada. En este baño fijador permanecen enfriándose unas 10 ó 12 horas. Después se continúa la fijación de la gelatina durante 2 a 6 días.

IX.—Las tajadas de sangre incluida son entonces cortadas por congelación en secciones de 10 micros de grueso y quedan listas para ser sometidas a las técnicas de coloración nucleolar.

Contra lo que pudiera pensarse, la técnica de tinción para nucléolos, mediante la doble impregnación argéntica de Río Hortega, da resultados mediocres.

Mejores coloraciones pueden lograrse con cualquiera de estos dos procedimientos.

I.—Impregnación argéntica con carbonato de plata piridinado de Río Hortega.

a.—Los cortes son lavados con agua amoníacal durante uno o dos minutos.

Tres gotas de amoníaco para una caja de Petri con agua destilada.

b.—Segundo lavado en agua destilada.

c.—Inmersión de los cortes en carbonato de plata normal y recientemente preparado, al que se agregan de 4 a 10 gotas de piridina químicamente pura por cada 10 cc. de la solución argéntica. Obtener la coloración en frío. Si después de 10 a 12 horas, ésta es ligera y perezosa, calentar a 37°C. en la estufa, hasta color sepia poco intenso.

d).—Pasar los cortes al hiposulfito de sodio al 5%, sin reducción en formol.

e).—Lavado en agua destilada.

f).—Deshidratar el alcohol a 96° y aclarar en creosota.

g).—Montar en bálsamo.

Si se desea, antes del tiempo d se pueden lavar y virar en oro según la manera habitual.

Los hematíes aparecen coloridos en amarillo o en sepia claro; los polinucleares neutrófilos muestran un protoplasma amarillento apenas perceptible, granulaciones específicas incoloras y brillantes y núcleo polimorfo teñido en sepia sin estructuras cromáticas aparentes. Las otras dos variantes de polinucleares muestran detalles semejantes.

Los linfocitos aparecen con protoplasma amarillento muy pálido, en el que no son visibles las granulaciones azurófilas. En las preparaciones mejor teñidas el núcleo se colora en sepia sin estructuras cromáticas y muestra con gran claridad los corpúsculos nucleolares intensamente teñidos en sepia. Sólo en algunos de ellos, particularmente en los que son contenidos en los núcleos de células jóvenes, pueden mirarse las granulaciones argentófilas y otras estructuras intranucleolares.

Los monocitos se distinguen por su mayor tamaño, su protoplasma abundante pálido teñido, su grueso núcleo frecuentemente encorvado y la pequeñez y finura de sus formaciones nucleolares. Sólo las formas jóvenes y los monoblastos muestran núcleos comparables por su tamaño a los de los linfocitos. Un poco de costumbre hace pronto fácil la distinción entre células linfoides y monocíticas.

El contorno nuclear de los linfocitos presenta con gran frecuencia finas incisuras, como las observadas en las células vivas o en los linfocitos tisulares.

II.—Primera variante de Rio Hortega al método de Achúcarro.

a).—Lavado de los cortes en agua destilada.

b).—Inmersión en solución de tanino al 3%, en frío, durante 4 a 6 horas, o en caliente a 50-55°C. durante uno o dos minutos.

c).—Lavado y ablandamiento de los cortes en agua amoniacal. Tres gotas de amoníaco para el contenido de

una caja de Petri de 100 x 10 m.m. Retirar los cortes de la solución alcalina en cuanto se ablandan y recobran su primitiva suavidad.

- d).—Impregnar en tres pocillos sucesivos, cada uno de los cuales contiene 10 c.c. de agua destilada y 10 gotas de plata de Bielchowsky.

En el primer pocillo se tiñen con cierta intensidad y enturbian un poco la solución argéntica; en los dos siguientes acentúan la coloración sin enturbiar casi el líquido colorante. Dejar los cortes un par de minutos en cada uno de los dos primeros pocillos y diez en el último.

- e).—Lavar en agua destilada.

Si se desea y esto es recomendable, se termina aquí la impregnación y se fija en hiposulfito, lava en agua, deshidrata en alcohol a 96°, aclara en creosota y monta en bálsamo.

Si se quiere dorar los cortes, se pasa entonces a los tiempos siguientes:

- f).—Cloruro de oro al 1 x 500, virando en frío y reforzando ligeramente en caliente.
 g).—Fijación en hiposulfito de sodio al 5%.
 h).—Lavado en agua destilada.
 i).—Alcohol a 96°. Creosota de haya.
 j).—Montar en bálsamo.

Los resultados, salvo el calor, son los mismos en los cortes virados o en los sólo impregnados. En las preparaciones que considero como mejor logradas, la cromatina no se tiñe o apenas aparece como sombra; el protoplasma linfocitario o monocitario en lila; el de los granulocitos en amarillo muy pálido o en lila; las granulaciones leucocitarias en sepia negruzco o en negro, y los corpúsculos nucleolares en sepia obscuro o casi negros. Frecuentemente algunos nucléolos muestran sus estructuras internas granulares.

Cualquiera de estos dos procedimientos suministra preparaciones lo suficientemente claras y limpias para poder determinar en ellas las dimensiones nucleares y nucleolares necesarias para el cálculo del índice Rn.