

X

MANUEL SALA

SOBRE LA GÉNESIS
DE LAS PLAQUETAS DE LA SANGRE

Designase con el nombre de *plaquetas* (*Bizzozero*) a pequeños elementos componentes de la sangre, de forma ovalar, que miden por término medio de 2 a 3 micrones, y que en estado normal circulan libremente en el torrente sanguíneo, deformándose y aglutinándose inmediatamente de la salida de la sangre de los vasos. Estos elementos carecen de pigmento hemoglobínico.

Debemos a *Doné* (1844) la primera observación de las plaquetas, pero es preciso llegar hasta *Hayem*, en 1878, para tener una noción más clara de los detalles morfológicos de estos elementos, que él consideraba como formas jóvenes de los glóbulos rojos y que, por esta razón, los llamó *hematoblastos*. En 1882, *Bizzozero* estudió detenidamente las plaquetas, calificándolas de células independientes y asignándoles un rol muy importante en la trombosis y en la coagulación. Confirmando con nuevas investigaciones este concepto, *Dekhuyzen* y *Morawitz* propusieron para estos elementos la denominación de *trombocitos*, englobando en

ella las células análogas que se encuentran en la sangre de los vertebrados inferiores y de los invertebrados.

Observando las plaquetas en una preparación húmeda en el plasma sanguíneo, se nota que están constituídas por dos partes diferentes, una periférica, clara, hialina, otra central blancuzca y opaca. Con la coloración vital, usando el azul brillante de cresil, resulta más evidente la distinción entre las dos partes por teñirse la interna intensamente de azul; a esta última *Puchberger* la designa con el nombre de cromómero, mientras llama hialómero a la porción periférica. Algunos autores (*Deetjen, Kopsch y Argutinsky*) ven en el cromómero un verdadero núcleo. El Giemsa colorea en violeta el cromómero. El diámetro de las plaquetas sufre modificaciones en algunos estados patológicos o experimentales, llegando su diámetro hasta 6 micrones.

Mucho se ha estudiado y discutido el rol fisiológico de las plaquetas, sobre todo la participación que ellas toman en la formación del coágulo extravascular, en su retracción y en la producción del trombo. No me detengo sobre estos puntos, que se encuentran tratados en otra memoria de este mismo tomo.

El punto menos conocido de la biología de las plaquetas, a pesar de ser talvez el más estudiado y el más rico en teorías, es el referente a su génesis y a su significado morfológico. Al rededor de cada teoría se agrupa un cierto número de autores y de hechos, a veces contradictorios estos últimos, sin que los problemas relativos al origen y a la naturaleza de tales fenómenos se hayan aclarado mucho durante los últimos años.

Las dos teorías que dominan, hoy por hoy, en el campo científico son una que considera las plaquetas como derivados de los hematíes y otra que cree en su existencia como células capaces de vida y reproducción propia y, por lo tanto, independientes. Menor aceptación tienen las teorías que hacen derivar las plaquetas

de los leucocitos (*Müller, Arnold, Grawitz*), o de estos y los hematíes al mismo tiempo (*Schwalde, Grawitz*); la doctrina hematoblástica de *Hayem* puede considerarse como abandonada completamente.

Es la doctrina eritrocitaria la que más número de autores tiene en su favor; pero si están todos ellos de acuerdo por lo que respecta a la génesis de las plaquetas de los hematíes, empieza la discordancia cuando se trata de explicar cual es el mecanismo de su producción. *Arnold, Schwalbe, Weindenreich*, atribuyen el origen de las plaquetas a fenómenos de eritrosis o eritrosquisis, (ruptura) sufridos por los hematíes. *Pappenheim, Hirschfeld, Maximow, Preisich y Heim, Grawitz*, etc. admiten que en el interior de los glóbulos rojos hay corpúsculos nucleoides que serían expulsados a causa de una cariólisis fisiológica y transformados así en plaquetas (teoría de los nucleoides). De muy distinta manera las hacen derivar *Vassale, Ferrata*, etc. para quienes sería el glóbulo rojo entero el que, en vía de evolución, daría origen a las plaquetas.

Cada una de estas opiniones es apoyada por una serie de hechos y de argumentos que demasiado largo sería pasar en revista, tanto más cuanto que este punto se encuentra tratado con toda la amplitud deseable en la obra de *Ferrata* sobre morfología de la sangre, citada al final.

Un interés especial, en relación con el objeto de mis investigaciones, ofrece un trabajo reciente de *A. Foti*, relacionando la destrucción de los hematíes con la génesis de las plaquetas, en el envenenamiento agudo por pirodina.

Foti, en una primera serie de experimentos, inyecta, ya sea en una vena, ya en el tejido celular subcutáneo de conejos más o menos del mismo peso, 12 cc. de una solución de pirodina al 1 por ciento en agua destilada, cantidad calculada a 0.066 grs. por kilogramo de peso del animal. Cada media hora toma muestras de la sangre y numera los glóbulos rojos y las plaquetas; en esta primera serie nota que después de la primera media hora que sigue

a la inyección de pirodina, hay una crisis eritrodestructiva que coincide con un aumento de las plaquetas, igual al número de hematíes destruídos; las nuevas plaquetas son de gran tamaño (plaquetas gigantes).

La segunda serie de observaciones fué hecha con la misma substancia hemolítica (pirodina) pero usando menor cantidad de ella, para poder estudiar la acción del veneno sobre las plaquetas preexistentes, antes de que intervenga la eritrodestrucción modificando su número.

Las principales conclusiones a que llega *Foti*, son:

1°. La pirodina inyectada a un animal (conejo o perro) a la dosis única de 0.02 a 0.06 grs. por kilo de peso, determina una eritrodestrucción, durante y después de la cual hay un aumento de las plaquetas circulantes.

2°. Las plaquetas son todas gigantes.

3°. El aumento de las plaquetas es máximo en la primera media hora después de la crisis eritrodestructiva. En este período el número de las plaquetas circulantes es igual al de los hematíes desaparecidos.

4°. Durante el período de dos a tres horas que precede a la destrucción de los hematíes (empleando dosis pequeñas de pirodina) se nota que las plaquetas preexistentes desaparecen todas, o casi todas, en la primera media hora después de la inyección, para luego aumentar progresivamente hasta llegar a su número normal.

De estas conclusiones se deduce que la presencia de plaquetas gigantes, coincidiendo con la destrucción de los hematíes, probaría la reciente formación de aquellas, dependiente de los hematíes destruídos. Este aumento de las plaquetas es igual al número de eritrocitos desaparecidos. Al cabo de cinco o seis horas las plaquetas gigantes se reducen en su número y en su tamaño, hasta alcanzar las condiciones normales.

Las observaciones que se relatan en este trabajo han teni-

do como objeto investigar la relación numérica que guardan las plaquetas con respecto a los glóbulos rojos, primero en estado que diremos normal, y, después, esa misma relación, destruyendo los glóbulos rojos por diferentes medios (químicos y mecánicos), empezando con grados pequeños de hemolisis y continuando hasta que esta fuese total o casi total.

El objeto al emprender esta tarea, ha sido contribuir al estudio de la génesis de las plaquetas, en relación a la teoría del origen eritrocítico y, para ser aún más preciso, relacionando la destrucción in vitro de los hematíes con el aumento o disminución de ellas.

Las substancias hemolíticas empleadas en las distintas pruebas han sido: éter, cloroformo, saponina, solanina y suero hemolítico; además se ha usado el mercurio metálico como medio de producir una hemolisis mecánica y, por fin, la hemolisis espontánea.

El animal del cual me he servido para extraer la sangre ha sido el perro, usando una vez el conejo y otra el carnero.

Un tópico de importancia fundamental para nuestro estudio era el método de la numeración de las plaquetas. El número de estos elementos varía mucho según los diferentes autores. Así vemos que para el hombre en estado normal dan estos: *Sahli*, 150.000 a 200.000 plaquetas por milímetro cúbico; *Aynaud*, 216.000 término medio; *Helber*, 200.000; *Afanassiew*, 200.000 a 300.000; *Pratt*, 469.000; *Russel*, 600.000 y *Kemp*, *Calham* y *Harris*, de 700.000 a 900.000. Estas diferencias son debidas (aparte del error personal) a las dificultades que se han encontrado para aislarlas y poderlas contar, pues si es fácil operar con los glóbulos rojos y leucocitos, que se conservan fácilmente en soluciones adecuadas fuera de los vasos y cuya numeración es tan cómoda con las pipetas especiales de Thomas-Zeiss, no pasa lo mismo con las plaquetas, que, inmediatamente fuera de los vasos, tienden a aglutinarse y disolverse, haciendo imposible toda observación.

El método que salva el mayor número de dificultades y da los resultados más constantes, se considera hoy el de *Aynaud*, el mismo que nosotros hemos adoptado en nuestras investigaciones.

Aynaud usa dos soluciones, de las cuales la primera contiene:

Citrato de sodio	50 grs.
Agua destilada	500 c.c.
y la segunda:	
Citrato de sodio	10 grs.
Cloruro de sodio	5 „
Formol	10 c.c.
Agua destilada	C.S. para 500 c.c.

Estas soluciones deberán colocarse en frascos con tapas de esmeril y esterilizarlas a 120° C.

Para extraer la sangre se usa una jeringa Lüer, de capacidad no menor de 3 cc., perfectamente limpia y seca y además parafinada para evitar en lo posible que las plaquetas se adhieran a sus paredes. *Aynaud* aprovecha esta propiedad de la parafina, además, porque retarda su destrucción; con este objeto habrá que parafinar también la aguja correspondiente (yo he usado la vaselina líquida Merk). Preparada de este modo la jeringa, se aspira con ella 2 c.c. de la primera solución (citrato de sodio al 10 %). *Aynaud* indica que se debe tomar la sangre de una vena gruesa (yugular) en el perro (basílica en el hombre) con la misma jeringa que contiene ya los 2 c.c. de la solución primera y señala, a la vez, como debe efectuarse la introducción de la aguja en la vena, para evitar las lesiones del vaso por una punción mal hecha y que se aglutinen de este modo las plaquetas; aconseja hacerla en dos tiempos: el primero atravesando solo la piel y el tejido celular hasta estar sobre la vena, el segundo penetrando en ésta. Como mis observaciones las he hecho sobre animales, no había mayor inconveniente en descubrir una pequeña parte de una vena superficial (yugular), pudiendo de este modo hacer la punción con toda facilidad y éxito.

Introducida la aguja en el vaso en la dirección de la corriente sanguínea, se aspira $\frac{1}{2}$ cc. de sangre; al hacer esta operación, se nota que la columna sanguínea que entra en la jeringa consérvase siempre en el centro de la misma, de modo que al llegar a ponerse en contacto con las paredes del vidrio, ya está fijada. Obtenida la cantidad de sangre deseada, se vuelca inmediatamente todo el contenido de la jeringa (solución I y sangre) en una probeta parafinada, agitándose durante algunos segundos; el objeto de poner la dilución sanguínea en esta probeta parafinada es el de conservar aquella sin que sus elementos morfológicos se alteren; en efecto, *Aynaud* dice que no ha encontrado diferencias en sus distintas observaciones hechas con una misma sangre en estas condiciones, después de 2, 6, 12, 24 y 48 horas de extraída del animal.

Preparada esta primera dilución sanguínea, se toma un vidrio de reloj esterilizado, se coloca en él 2 ó 3 c.c. de la solución n°. II (citrato de sodio, cloruro de sodio, formol y agua) y con una pipeta parafinada se le agrega 2 ó 3 gotas de sangre diluida con el citrato de sodio; se mezcla pero sin tocar el líquido con el agitador, (*Aynaud* prefiere soplar con la misma pipeta parafinada sobre su superficie).

De este modo se obtiene una dilución sanguínea que puede ser observada sin inconveniente en las comunes células cuenta-glóbulos de Thomas.

La numeración deberá hacerse indirectamente, relacionando las plaquetas a los hematíes, es decir: se contarán primero los glóbulos rojos contenidos en un milímetro cúbico de la sangre de estudio, siguiendo el procedimiento ordinario de Thomas. (Supongamos que nos da como resultado 5.500.000 glóbulos rojos). Luego se tomará sangre del mismo animal, siguiendo y observando la técnica arriba expuesta y se contarán los glóbulos rojos y plaquetas contenidos en los 400 cuadritos de la célula de Thomas-Zeiss; si nos diese, por ejemplo, 324 glóbulos y 27 plaquetas, tendríamos que la relación entre ambos elementos sería igual

— 317 —

a 12. Por una simple proporción sabríamos cuantas plaquetas hay por milímetro cúbico:

$$5.500.000 : X :: 324 : 27$$

que nos da, aproximadamente, 450.000 plaquetas por mm. cúbico.

Para adoptar una fórmula general, puede dividirse el número de glóbulos que hay en 1 mm.³ por R y tendremos para el caso anterior:

$$R = \frac{324}{27} = 12$$

$$\text{Plaquetas} = \frac{5.500.000}{12} = 450.000 \text{ (aproximado)}$$

Finalmente, como fórmula general:

$$P = \frac{\text{Gl. rojos}}{R}$$

Las plaquetas así preparadas se conservan sin aglutinarse. Es de necesidad antes de observar las preparaciones al microscopio, esperar de cinco a diez minutos, porque, teniendo las plaquetas un peso específico menor que los glóbulos rojos y los leucocitos, se depositan después que estos elementos. *Aynaud* espera como mínimun 30 minutos.

Las preparaciones serán observadas con un objetivo 6 ó 7 y un ocular 5; conviene usar del diafragma sin temor, pues, en caso contrario, debido a la pequeñez y transparencia de las plaquetas, éstas no se verían.

Depositadas en el fondo de la célula de Thomas, aparecen las plaquetas en el campo microscópico como pequeños cuerpos alargados o redondos, aislados, extremadamente pálidos; a veces se les observa movimientos de desplazamiento; con estos caracteres y un poco de hábito se les distingue fácilmente de los otros elementos sanguíneos.

Es conveniente, si se quiere estar en las mejores condiciones para evitar el error, contar los hematíes y plaquetas en los cuatrocientos cuadritos de la célula de Thomas, salvando así el inconveniente posible de la desigual repartición de estos elementos sobre el campo microscópico.

Antes de entrar a detallar cada uno de los experimentos efectuados, creo que para evitar repeticiones inútiles, será conveniente exponer el procedimiento seguido para obtener la dilución sanguínea sobre la cual se han llevado a cabo las observaciones, y que llamaremos dilución madre.

Preparado el animal y la vena (la yugular externa en nuestro caso), con la jeringa parafinada conteniendo $2\frac{1}{2}$ cc. de la solución n° I de *Aynaud*, se aspiraba suavemente $\frac{1}{2}$ cc. de sangre, sin que la columna de ésta alcanzara directamente las paredes de la jeringa; inmediatamente se volcaba el contenido de esta última en un tubo de ensayo parafinado y se mezclaba durante 15 a 20 segundos, agitando lateralmente el tubo; la sangre en estas condiciones no se coagula y sus elementos, especialmente las plaquetas, se conservan perfectamente bien, durante algunas horas.

Como en todas las observaciones, se ha hecho también con el mismo método la primera preparación microscópica que sirve de base y punto comparativo con respecto a las ulteriores modificaciones numéricas sufridas por los elementos sanguíneos, hematíes y plaquetas, con respecto a las distintas substancias hemolíticas, creo conveniente describir su técnica. Se colocan 7 cc. de la solución II en uno de los cilindros graduados de 10 cc. De la solución madre contenida en el tubo parafinado se tomará, con una pipeta especial, $1\frac{1}{20}$ de cc. que se echará en los 7 cc. de la solución II contenidos en el tubo graduado, obteniendo así una dilución sanguínea apta para ser observada al microscopio en las comunes células cuenta-glóbulos de Thomas.

Hecha, pues, esta preparación, se esperará 20 a 30 minutos para dar tiempo a que los elementos morfológicos se depositen en el fondo de la célula.

Si los elementos morfológicos están uniformemente distribuidos en el campo microscópico, basta contar solo 128 cuadros; en caso contrario, se contarán más.

En un principio, antes de empezar el estudio de las distintas observaciones, hice varias pruebas preliminares y de control, sobre las cuales me parece inútil detenerme.

OBSERVACION N° I

Hemolisis mecánica con mercurio metálico

Este primer experimento fué hecho solo con el objeto de constatar y ver el tiempo necesario para la producción de la hemolisis.

1°. Extracción de $\frac{1}{2}$ cc. de sangre venosa de un perro. —
2°. Preparación de la prueba de control. Ambas operaciones hechas según la técnica ya indicada.

Se prepara luego el mercurio que nos ha de servir para producir la hemolisis, que fué lavado primero con agua, luego con alcohol y éter en partes iguales y, por fin, nuevamente con agua destilada y secado con papel de filtro, a fin de despojarlo de todas las impurezas que podrían ser causa, por sí mismas, de la destrucción de los glóbulos rojos.

Se tomó, más o menos, 1 ó 2 cc. de la dilución sanguínea madre, cantidad que fué colocada en un frasquito con tapa de esmeril, el que contenía ya en su interior 7 u 8 gotas de mercurio lavado. Una vez bien tapado el frasco, se agitó fuertemente durante 5 minutos, al final de los cuales se nota claramente que el mercurio está dividido en una cantidad inmensa de gotitas, una verdadera emulsión que ocupa el fondo del frasco y que dura indefinidamente; en la parte superior del recipiente está la san-

gre, que a simple vista se nota más transparente que la solución madre (parcialmente hemolizada). Con esta solución se hace una prueba microscópica para constatar la hemólisis, usando un cuenta-glóbulos de Thomas, y siguiendo el mismo procedimiento que para la de control, es decir, 1|20 de cc. en 7 cc. de la solución II de *Aynaud*. Se observa sucesivamente al microscopio las dos preparaciones y se cuentan los hematíes y las plaquetas, cuyos resultados fueron: para la primera (de contralor) 712 hematíes y 63 plaquetas y para la segunda, 92 hematíes y 72 plaquetas.

Se contaron 256 cuadritos en cada preparación.

Preparación	Hemólisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	712	63	256
I	Mercurio	5 minutos	92	72	»

OBSERVACION N° II

Hemólisis mecánica por el mercurio y numeración relativa de las plaquetas.

1°. Preparación de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor: 324 hematíes y 27 plaquetas, se contaron 128 cuadritos.

Sangre usada: la venosa del mismo perro del día anterior.

Para obtener la primera preparación microscópica, después de tratada la sangre con el mercurio, se sigue el mismo procedimiento que el día anterior, pero en vez de agitar 5 minutos se hace solo durante 2 minutos; a esta altura se hace con esta sangre el primer preparado, dando como resultado 107 hematíes y 36

plaquetas. Se sigue más adelante la hemolisis, agitando esta misma sangre otros dos minutos más, es decir, un total de cuatro minutos, al fin de los cuales se hace la segunda preparación microscópica con resultados de 9 hematíes y 32 plaquetas.

Se contaron siempre 128 cuadrillos.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadrillos contados
Contralor	—	—	524	27	128
1ª	Mercurio	2 minutos	105	56	128
2ª	Mercurio	4 minutos	9	51	128

OBSERVACION N° III

Hemolisis mecánica con mercurio y numeración relativa de las plaquetas.

1°. Obtención de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor, 344 hematíes y 27 plaquetas, se contaron 128 cuadrillos; sangre del mismo animal que los días anteriores.

Se tomó 1 ó 2 cc. de la dilución madre y se agitó con 6 ó 7 gotas de mercurio en un frasquito tapa de esmeril, durante tres minutos; pasado este tiempo se hace, siguiendo siempre el mismo procedimiento que los días anteriores, la primera preparación microscópica, cuyo resultado fué: 74 hematíes y 49 paquetas. Esta misma sangre se sigue agitando en el mismo recipiente durante otros tres minutos más, es decir, un total de seis minutos; se hace entonces la segunda preparación con resultados de: 39 hematíes y 18 plaquetas.

Se toma nuevamente 1 cc. de la dilución madre y se agita con mercurio durante cuatro minutos, se hace al cabo de este tiempo la tercera preparación, dando: 25 hematíes y 40 plaquetas.

En cada una de las preparaciones se contaron 128 cuadrillos.

Preparación	Hemolisis mecanica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadrillos contados
Contralor	—	—	344	27	128
1 ^a	Mercurio	5 minutos	74	49	»
2 ^a	Mercurio	6 minutos	59	18	»
3 ^a	Mercurio	4 minutos	25	40	»

OBSERVACION N° IV

Podría pensarse que la presencia de mercurio frente al citrato de sodio contenido en la dilución madre, fuese capaz de producir un compuesto químico, (¿citrato de mercurio?) que determinara por sí mismo la hemolisis; por esta razón es que en la presente observación, como en una parte de las dos siguientes, trataremos de poner de manifiesto que el mercurio obra sólo mecánicamente, destruyendo los elementos de la sangre.

A tal fin se extrajo de un conejo 10 cc. de sangre que fué inmediatamente desfibrinada; con ella se hizo una numeración ordinaria de los hematíes, usando para la dilución el cloruro de sodio al 3 por ciento y dió como resultado 7.000.000 de glóbulos rojos. Luego con esa misma sangre desfibrinada se hizo otra numeración de los hematíes usando la solución I de *Aynaud* para diluirla; el resultado fué 6.520.000. Por fin se preparó

una tercera prueba en las mismas condiciones y con la misma sangre, pero se diluyó con la solución I de *Aynaud* que había sido previamente agitada durante dos minutos con mercurio metálico y dió 6.720.000 glóbulos rojos.

Como se ve, si en este último caso el citrato de sodio contenido en la solución I, al ser agitado con el mercurio hubiese dado un producto capaz de destruir los glóbulos rojos, hubiésemos tenido hemolisis, lo que no ha pasado, pues las pequeñas diferencias habidas caben en el error personal.

OBSERVACION N° V

Hemolisis mecánica con el mercurio y numeración relativa de las plaquetas.

Sangre de perro.

1°. Obtención de la dilución madre. — 2°. Prueba de control, con 401 hematíes y 34 plaquetas, contándose 128 cuadritos.

De la dilución madre se tomó en un tubito de ensayo 1 cc. y se le agregó 4 ó 5 gotas de mercurio lavado, se agitó durante dos minutos, al fin de los cuales se hace la primera preparación microscópica, dando como resultado 55 hematíes y 14 plaquetas. Se prosigue la hemolisis de esta misma sangre agitando otros dos minutos más, es decir, un total de cuatro minutos y se hace la segunda preparación, dando: 6 hematíes y 7 plaquetas.

Para comprobar otra vez que es el mercurio el que obra mecánicamente, destruyendo los glóbulos, se tomó 1 cc. de la dilución madre y en vez de agitarla con mercurio metálico, se le agregó 1 cc. de la solución I de *Aynaud* que previamente había sido bien mezclada con mercurio; se agita entonces durante cuatro minutos, se hace una preparación cuyo resultado fué: 200 hematíes y 18 plaquetas.

Como se ve, comparando este último resultado con el obtenido en la prueba de contralor, no hay entre ellos diferencia; pues esa aparente disminución de los elementos en $\frac{1}{2}$ no es tal, si se recuerda que esta última prueba fué exactamente diluida dos veces, al agregarle 1 cc. de la solución de *Aynaud*.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematies	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	401	34	128
1ª	Mercurio	2 minutos	55	14	»
2ª	Mercurio	4 minutos	6	7	»
3ª	Sol. I con mercurio	4 minutos	200	18	»

OBSERVACION N° VI

Hemolisis mecánica con mercurio y numeración de las plaquetas.

Sangre de conejo. 1°. Obtención de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor, 233 hematíes y 27 plaquetas.

Se toma 1 cc. de la dilución madre y se agita con 5 ó 6 gotas de mercurio durante dos minutos, se hace a esta altura de la observación la primera prueba, dando: 61 hematíes y 18 plaquetas. Se sigue agitando otros dos minutos más y se hace la segunda preparación, con resultado de: 3 hematíes y 8 plaquetas.

Por fin se hace como en la observación anterior, otra prueba, tratando la dilución madre con la solución I previamente agitada con mercurio y nos dió como resultado: 119 hematíes y 13 pla-

— 325 —

quetas; comparando este resultado con el de la prueba de control, como hicimos en el experimento anterior, observamos la misma relación, comprobando otra vez la acción mecánica del mercurio.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	225	27	128
I	Mercurio	2 minutos	61	18	»
II	Mercurio	4 minutos	5	8	»

OBSERVACION N° VII

Hemolisis por el éter

Se usó sangre de perro. 1°. Preparación de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor con resultado de: 589 hematíes y 30 plaquetas en 128 cuadritos.

A 2 cc. de la dilución madre colocados en un tubito de ensayo, se le agregaron 5 pequeñas gotas de éter sulfúrico y se agitó el todo durante cinco minutos; a simple vista se observa una hemolisis completa, que se comprueba haciendo la primera prueba microscópica, que dió: 4 hematíes y 16 plaquetas.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	2 minutos	589	30	128
I	Eter 5 gotas	—	4	16	»

OBSERVACION N° VIII

Hemolisis por el éter

Sangre de perro. 1°. Obtención de la dilución madre. — 2°. Preparación de contralor, 410 hematíes y 24 plaquetas en 128 cuadritos.

Como en la observación anterior se usó un exceso de éter, se esperó mucho tiempo antes de hacer la preparación y tuvimos una hemolisis casi completa, por eso en el transcurso de este experimento iremos graduando paulatinamente la hemolisis.

La primera preparación se hizo con 2 cc. de la dilución madre, tratada con una pequeña gota de éter y agitando dos minutos, dando como resultado: 379 hematíes y 54 plaquetas.

La segunda se hizo como la anterior, pero se le agregó tres gotas de éter y agitóse durante cuatro minutos, con resultados de: 254 hematíes y 21 plaquetas.

La dilución madre que se preparó a las 9 a.m., se deja en reposo para continuar el experimento a las 3 p.m. del mismo día; como entonces se trató con cloroformo, lo seguiremos al tratar de los hechos con esta substancia, (véase observación N° 10).

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos: contados
Contralor	—	—	410	24	128
I	Eter 1 gota	2 minutos	379	54	»
II	» 2 »	4 minutos	254	21	»

OBSERVACION N° IX

Hemolisis con el éter

Sangre de perro. 1°. Obtención de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor, con resultado de 286 hematíes y 20 plaquetas; se contaron 128 cuadritos.

A 1 cc. de la dilución sanguínea madre, se le agrega 2 pequeñas gotas de éter y se agita durante dos minutos; macroscópicamente no se observa hemolisis, se hace entonces la primera prueba y nos da: 236 hematíes y 18 plaquetas. A esta misma sangre se le agregan otras 2 gotitas de éter y se sigue agitando otros dos minutos más; se nota entonces a simple vista la hemolisis y se hace la segunda preparación microscópica con el siguiente resultado: 10 hematíes y 8 plaquetas.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos cont dos
Contralor	—	—	286	20	128
I	Eter 2 gotas	2 minutos	236	18	»
II	» 4 »	4 »	10	8	»

Se deja la dilución madre para ser observada a las 24 horas. El resultado se verá al tratar los otros experimentos hechos en estas condiciones. (véase observación N° 16).

OBSERVACION N° X

Hemolisis por el cloroformo

En la observación N° 8 se dejó la dilución madre obtenida por la mañana a las 9 para ser usada a las 3 p.m.

Con esa dilución se hizo, siguiendo la técnica de siempre, la prueba de control, habiéndose producido un poco de hemolisis espontánea, como puede verse en el siguiente resultado: 215 hematíes y 35 plaquetas. Con la dilución madre se hicieron, después de tratada con cloroformo, dos preparaciones, la primera con 1 cc. de la dilución más una gota de cloroformo y agitando dos minutos, con el siguiente resultado: 106 hematíes y 29 plaquetas. Para la segunda prueba se le agregó $\frac{1}{2}$ gota más de cloroformo a la dilución anterior agitando otros dos minutos, y dió 75 hematíes y 27 plaquetas.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	215	35	128
I	Cloroformo 1 gota	2 minutos	106	29	»
II	» 1 1/2 »	4 »	75	27	»

OBSERVACION N° XI

Sangre de perro. 1°. Preparación de la dilución madre. 2°. Prueba de contralor, con 302 hematíes y 22 plaquetas, en 128 cuadritos.

— 329 —

Se toma de la dilución madre 1 cc. y se coloca en un tubito de ensayo. Se le agrega $\frac{1}{2}$ gota de cloroformo y se agita durante un minuto; se observa macroscópicamente la hemolisis y se comprueba ésta haciendo la primera prueba microscópica, que dió: 79 hematíes y 19 plaquetas. La segunda prueba se hace tomando igual cantidad de dilución madre, se le agrega 2 gotas de cloroformo y se agita dos minutos; se obtiene así un resultado de 13 hematíes y 14 plaquetas.

La solución madre se deja para ser observada 24 horas después. (véase observación n°. 17).

Preparación	Hemolisis mecanica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	502	22	128
I	Cloroformo $\frac{1}{2}$ gota	1 minuto	79	19	»
II	» 2 »	2 »	13	14	»

OBSERVACION N° XII

Hemolisis por la solanina

Sangre de perro 1°. Obtención de la dilución madre. — 2° Prueba de contralor, con 423 hematíes y 31 plaquetas en 128 cuadritos.

Se coloca en un tubito de ensayo 1 cc. de la dilución madre, se le agrega 1 gota de solución de solanina al uno por mil (en solución fisiológica de cloruro de sodio al 9 por mil) se agita 20 ó 30 segundos y se hace la primera preparación microscópica, cuyo resultado fué de: 216 hematíes y 20 plaquetas. La dilución

para la segunda prueba se hace lo mismo que la anterior, pero en vez de una gota de solanina al 1 por mil, se le agrega $1\frac{1}{2}$ gota, agitando más o menos el mismo tiempo, con resultado de: 138 hematíes y 25 plaquetas. Por fin se hace una tercera preparación, usando esta vez 2 gotas de la solución de solanina y agitando el mismo tiempo que en las dos anteriores; el resultado fué: 107 hematíes y 23 plaquetas.

La dilución madre se deja 24 horas en reposo para obtener una hemolisis espontánea (observación n°. 15).

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	425	31	128
I	Solanina 1/100, 1 gota	20 a 30 segundos	216	20	»
II	» » 1 1/2 »	» » »	158	25	»
III	» » 2 »	» » »	107	25	»

OBSERVACION N°. XIII

Hemolisis por la saponina

Se usó sangre de perro. Una vez hecha la dilución madre, se hace la preparación control como de costumbre, dando como resultado: 168 hematíes y 28 plaquetas; se contaron 128 cuadritos.

Se toma en un tubito de ensayo 1 cc. de la dilución madre y se le agrega una pequeña gota de solución fresca de saponina al 1 por ciento, se agita durante tres minutos y se hace la primer prueba con resultados de: 111 hematíes y 34 plaquetas. La segun-

da prueba se hace con la misma dilución anterior, pero no se le agrega más saponina y se deja en reposo durante quince minutos, al finalizar estos, se ve a simple vista que la hemolisis había continuado hasta ser casi completa; se hace entonces la preparación microscópica con resultados de: 58 hematíes y 23 plaquetas, en 128 cuadrillos.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadrillos contados
Contralor	—	—	168	28	128
I	Saponina 1° 10 gota	5 minutos	111	34	»
II	" " " "	15' Reposo	58	25	»

OBSERVACION N°. XIV

Hemolisis por la saponina

Sangre de perro. 1°. Preparación de la dilución madre. — 2°. Prueba de contralor, con 274 hematíes y 25 plaquetas, en 128 cuadrillos.

Se toma 1 cc. de la dilución madre y se le agrega una pequeña gota de solución de saponina al 1 por ciento, se agita durante un minuto, haciendo la primera prueba con resultados de: 122 hematíes y 21 plaquetas. La segunda se hace lo mismo que la anterior, pero se mezcla durante tres minutos, dando como resultados: 51 hematíes y 17 plaquetas.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	274	25	128
I	Saponina 1 ^o / ₁₀ , 1 got.	1 minuto	122	21	»
II	" " " "	5 »	51	17	»

OBSERVACION XV

Hemolisis espontánea

Se recordará que la dilución madre empleada en la observación n°. 12 dió en su prueba de control, 423 hematíes y 31 plaquetas en 128 cuadritos; se recordará también que esa dilución se dejó 24 horas en reposo para ver si había producido hemolisis espontánea.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	452	31	128
I	—	24 horas	117	23	»

OBSERVACION N°. XVI

Hemolisis espontánea

Como dijimos al tratar de la observación n°. 9, la dilución madre que sirvió para efectuar las distintas pruebas de esa observación, fué dejada 24 horas en reposo, esperando se efectuara

la hemolisis espontánea. La prueba de control hecha con esa dilución madre nos dió: 286 hematíes y 20 plaquetas en 128 cuadrillos.

En este experimento se hace solo una prueba con la dilución madre dejada 24 horas en reposo, dándonos como resultado: 74 hematíes y 16 plaquetas en 128 cuadrillos.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadrillos contados
Contralor	—	—	286	20	128
I	—	24 horas	74	16	»

OBSERVACION N° XVII

Hemolisis espontánea

En esta, como en las dos observaciones anteriores, la dilución sanguínea empleada fué después de 24 horas de preparada. Se usó la obtenida en la observación n°. 11 que tenía 302 hematíes y 22 plaquetas, en 128 cuadrillos. Después de 24 horas había en esta misma dilución 38 hematíes y 14 plaquetas, en la misma cantidad de cuadrillos.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadrillos contados
Contralor	—	—	302	22	128
I	—	24 horas	38	14	»

OBSERVACION N° XVIII

Hemolisis con suero

Se extrajo 10 cc. de sangre de la yugular de un carnero y después de desfibrinada y filtrada sobre algodón, se tomó de ella 2 c.c. para diluirlos en 8 c.c. de solución de cloruro de sodio al 9 por mil, obteniendo así una solución madre; de ésta se tomaron 4 cc. para ser repartidos en cuatro tubitos de ensayo numerados del 1 al 4. A cada tubito se le agregaron tantas gotas de suero hemolítico como el número correspondiente, es decir, al tubo núm. 1 se le agregó una gota de suero, al tubo núm. 2, 2 gotas, etc. Así preparados se colocan (a las 9 de la mañana) todos en una estufa cuya temperatura era de 37 a 38° C., mezclando de tiempo en tiempo los tubitos.

Mientras se efectúa la hemolisis se hace una numeración de los elementos de la dilución madre, usando el método seguido en las otras observaciones, es decir, diluyendo 1|20 de c.c. en 7 c.c. de la solución II de *Aynaud*; el resultado fué: 773 hematíes y 19 plaquetas. No nos debe extrañar el número tan bajo de las plaquetas con relación al de los hematíes, si se tiene presente que la dilución madre fué desfibrinada y, por consiguiente, como es sabido, casi todas las plaquetas quedan en la red fibrinosa.

A las 10.30 a.m., es decir después de una hora 30 minutos de estar en la estufa, se nota que en el tubo n° 4 que contenía como ya dijimos 4 gotas de suero, empieza la hemolisis; se hace, entonces, una prueba con la sangre contenida en él, siguiendo siempre la misma técnica de diluir 1|20 de cc. en 7 cc. de la solución II de *Aynaud* y nos da como resultado: 292 hematíes y 17 plaquetas en 128 cuadritos.

Se apaga, entonces, la estufa para evitar que el fenómeno

hemolítico siguiera rápidamente en los otros tubos y tener tiempo de observarlos a todos antes de que la reacción fuese completa en ellos.

A las 10.50 es manifiesta la hemolisis en todos los tubos; se toma entonces el n° I y se hace la misma operación que con el n°. 4 y se obtiene el resultado siguiente: 383 hematíes y 21 plaquetas.

A las 11.15 se repite la misma operación con el tubo n°. 2, dando: 297 hematíes y 14 plaquetas.

Con la estufa siempre apagada, se deja la observación para seguirla esa misma tarde.

A las 2 p.m. se ensaya la sangre contenida en el tubo n°. 2 con el resultado siguiente: 168 hematíes y 11 plaquetas.

A las 3 p.m. se observa por segunda vez el contenido del tubo n°. 4, dando ahora 186 hematíes y 13 plaquetas.

Por fin a las 3.30 p.m. se observa como el anterior, por segunda vez, la sangre del tubo n°. 1, que da: 267 hematíes y 17 plaquetas.

En cada una de las distintas pruebas se contaron siempre igual número de cuadritos, 128.

Preparación	Hemolisis mecánica	Tiempo de agitación	Hematíes	Plaquetas	Cuadritos contados
Contralor	—	—	775	19	128
1	I gota	1 hora 50'	585	21	»
2	II gotas	2 horas 15'	297	14	»
5	III »	5 » —	168	15	»
4	IV »	1 » 30'	292	17	»
1	I »	6 » 15'	267	17	»
4	IV »	6 » 30'	186	15	»

CONCLUSIONES

La destrucción in vitro de los glóbulos rojos de la sangre por medio de una acción puramente mecánica, o por la acción del éter, del cloroformo, de la saponina, de la solanina, del suero hemolítico, y por el contacto prolongado con una solución salina isotónica, no se acompaña con un aumento de las plaquetas, sino, más bien, con una pequeña disminución de estos mismos elementos.

La acción hemolítica de los agentes empleados es mucho menos activa sobre las plaquetas que sobre los eritrocitos, hecho que demostraría las distintas propiedades fisiológicas (resistencia a la hemolisis) de estos elementos.

Estos hechos excluyen la posibilidad de que de los glóbulos destruidos se hayan formado plaquetas y que estas a su vez hayan sido disueltas en segundo tiempo. Efectivamente, las plaquetas que se encuentran en la sangre hemolizada no son del tipo gigante, como las que *Foti* ha comprobado que se forman directamente de los eritrocitos.

El resultado de nuestra investigación induce a admitir, pues, que si se quiere aceptar la posibilidad de que en la sangre circulante la destrucción de los glóbulos rojos se acompaña con formación de plaquetas, intervengan, entonces, en el fenómeno, factores o procesos extraños a los hematíes y que no puedan actuar in vitro (¿Los órganos hematopoiéticos?). En conclusión, la formación de las plaquetas no sería el simple resultado de un hecho de eritrosquiasis (ruptura de los glóbulos) o eritrolisis (disolución de los glóbulos), como admiten algunos autores.

BIBLIOGRAFIA'

Otto Naegeli. — Enfermedades de la sangre y hemodiagnóstico. Montevideo.

Adolfo Ferrata. — Morfología del sangre normale e patológico. — Milano, 1912.

Bezançon et Labbé. — Traité d' hematologie. 1913.

G. Hayem. — Leçons sur les maladies du sang. — Paris, 1900.

Gilbert y Weimberg. — Traité du sang. 1913.

Y. Riex. — Précis de Hematologie et Cytologie. 1911.

Foti A. — Contributo sperimentale alla genesi delle piastrine del sangue. — Archivio di Fisiologia. — Vol. XI. 1913. pág. 491.
