

Inv. Pesq.	31 (1)	Págs. 53-90	enero 1967
------------	--------	-------------	------------

Estudios hematológicos en el atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa sudatlántica de España

por

MANUEL GUTIÉRREZ *

INTRODUCCIÓN

Los trabajos de hematología ictiológica son muy numerosos en ciertos aspectos, especialmente los relacionados con la bioquímica y la inmunología, menos frecuentes los de citomorfología, y muy escasos los citocímicos de los elementos de la sangre circulante.

Se encuentran trabajos en la bibliografía, donde se comentan cambios de gases, reserva alcalina, recuentos de eritrocitos y valor hematócrito. De los leucocitos podemos decir que se comentan casi únicamente los recuentos y el estudio citomorfológico en algunas especies, tanto de agua dulce como marina.

Las investigaciones hematológicas se orientan principalmente desde el punto de vista de la inmunología, destacando principalmente por su actividad los grupos de Honolulu, California, Japón, Francia y Rusia, entre otros. Las especies más estudiadas han sido: atún, trucha, carpa, sardina, etc., y las investigaciones se han encaminado al reconocimiento de las diferentes poblaciones.

En 1961, el doctor J. RODRÍGUEZ-RODA nos facilitó extensiones de sangre de atún, que teñidas y tratadas posteriormente con diferentes técnicas presentaron un gran interés para nuestros estudios, siendo este trabajo el primero de esta índole que se realiza en España.

Bajo el título amplio de estudios hematológicos agrupamos las in-

* Laboratorio del Inst. de Invest. Pesqueras. Puerto Pesquero. CÁDIZ.

vestigaciones realizadas en las siguientes partes: eritrocitos, leucocitos y trombocitos, inmunohematología y bioquímica.

Quiero hacer constar en este trabajo mi agradecimiento al doctor J. RODRÍGUEZ-RODA, director del laboratorio de Cádiz del Instituto de Investigaciones Pesqueras del C.S.I.C., por sugerirnos el tema, proporcionarnos bibliografía y darnos amplias facilidades para realizar las diferentes etapas iniciales de estas investigaciones. No quiero silenciar al Consorcio Nacional Almadrabeto y al personal de la almadraba y fábrica de Barbate, siempre dispuesto a facilitar la labor de toma de muestras.

Se estudian los eritrocitos en sangre periférica desde los siguientes puntos de vista: recuento, contenido en hemoglobina, valor hematocrito, resistencia osmótica en elementos conservados, citometría directa (citoplásmica y nuclear), valor globular, determinación de la superficie total, nuclear y hemoglobínica y caracteres citomorfológicos en extensiones fijadas y teñidas con el Pancromo Azul G 239. Los aspectos citoquímicos se concentran a los ácidos nucleicos (DNA), actividad pseudoperoxidasas y el catión hierro trivalente.

Los leucocitos y trombocitos, en general poco estudiados, son investigados en sus caracteres citomorfológicos diferenciales en extensiones finas según la citoquímica de los grupos electropolares, como también los carbohidratos, lípidos, ácidos nucleicos (DNA-RNA), y entre las enzimas, se investiga la distribución de la actividad peroxidásica.

La inmunohematología, de tanto interés en el estudio de las poblaciones, se ha desarrollado simultaneando y comparando los datos hallados en las investigaciones realizadas en el hombre, por lo que comentaremos de forma resumida las diferentes fases en dichos estudios. Si se mezclan al azar eritrocitos y sueros o plasmas de diferentes personas, puede ocurrir que presente aspecto homogéneo, o por el contrario que prontamente aparezcan grumos irregulares más o menos gruesos, no destruibles por agitación, debido a la aglutinación de los eritrocitos. En los de aspecto homogéneo, los elementos hemoglobínicos están bien individualizados, mientras que en los irregulares, los grumos presentan a dichos elementos en aglomeración desordenada, denominándosele a dicho fenómeno eritroaglutinación, más concretamente, por ser individuos de la misma especie, isoaglutinación. Estas reacciones se pueden llevar a cabo *in vitro*, sobre tubos de hemólisis o sobre portaobjetos, según la técnica empleada. Estas aglutinaciones verdaderas no hay que confundirlas con los posibles grumos que se pueden formar por reunión de los eritrocitos por contacto de sus caras, tomando el aspecto de pequeñas pilas de monedas y que con una agitación discreta adoptan la individualidad. De esta manera quedan perfectamente diferenciadas las aglutinaciones verdaderas de las pseudoaglutinaciones, en las que también influyen otros factores, como el frío.

En 1874, MACHETTI (1952) cita las reacciones de isoaglutinación entre diferentes personas, y en 1869 CRETTE y LANDAIS observaron las reacciones de heteroanticuerpos.

El mérito de las investigaciones metódicas se debe a LANDSTEINER (1900, 1901 y 1941), quien descubre la existencia de tres grupos sanguíneos, correspondiendo el cuarto a sus discípulos STUALI y DECASTELLO. Fue BERNSTEIN quien formuló la herencia de los grupos sanguíneos siguiendo las leyes de MENDEL, actuando con carácter dominante los grupos A y B, y como recesivo el grupo 0.

Estas denominaciones grupales se deben a DUNGERN e HIRSZFELD por el año 1910, que denominaron a los aglutinógenos por dichas letras y a las aglutininas anti-A y anti-B por las griegas α y β , y para los sueros, carentes de aglutininas, por la letra cero en minúscula.

Al mezclar sangre humana con suero de otras especies se observa que hay aglutinación, lo que demuestra que existen antígenos comunes a la especie humana.

El aglutinógeno está en el estroma, de aquí la necesidad de conservar los eritrocitos completos, estando en el suero o plasma las aglutininas. La reacción entre aglutininas y aglutinógenos se realiza de forma lábil, separándose a los 50°C y siempre lo hacen de forma específica. Si se mezcla suero del grupo 0, que lleva las aglutininas α y β , con eritrocitos del grupo A, portador del aglutinógeno A, quedan separadas exclusivamente las aglutininas α , por absorción específica, conservándose el título inicial de las β . El caso contrario ocurre con eritrocitos del grupo B. Los aglutinógenos son de naturaleza lipóidea, termoestables bajo diversas temperaturas que pueden llegar a 100°C. Su sensibilidad aumenta con el tiempo.

Las aglutininas son sustancias de tipo albuminoideo y termoestables, resistiendo los 56°C o más. Su título en el hombre describe una curva parabólica, con un máximo hacia los treinta años. Las aglutininas α , α_1 y β se consideraban naturales desde el punto de vista genético, pero últimamente existen opiniones abogando a favor de la naturaleza reaccional por sensibilización en contra de bacterias saprófitas o de ciertos alimentos, dado que existen polisacáridos muy afines a las aglutininas analizadas. Se originan en el S.R.E., en linfocitos y plasmocitos.

Estudios posteriores han demostrado la existencia de otros subgrupos y grupos, tales como A₁ y A₂, y menos frecuentes o muy raros los A₃, A₄ y A₅, M, N, con aglutininas anti-M y anti-N. De menor interés los aglutinógenos P, G, H. LANDSTEINER y WIENER (1941) descubren el aglutinógeno de gran interés llamado Rh. Los grupos sanguíneos forman un carácter personal fijo desde el nacimiento, no siendo posible descendencia con caracteres distintos a las posibles combinaciones que se puedan hacer con sus progenitores.

Existe otra modalidad de investigación, que es la llamada isoimmuno-

anticuerpos, con lo que tenemos reactivos de especificidad y gran sensibilidad para estudiar parentescos entre especies afines.

Citaremos a continuación algunos trabajos realizados sobre inmunohematología en el hombre por servirnos de iniciación, además de los realizados en diferentes grupos zoológicos, donde se aprecia el interés de estos estudios en sus diferentes métodos de investigación para el análisis de subpoblaciones, en relación con estudios taxonómicos o el comportamiento diferencial de especies afines. En cuanto a trabajos realizados en peces, indicaremos únicamente la bibliografía consultada o citas en autores en relación con nuestras modificaciones.

En invertebrados marinos tenemos las investigaciones de CUSHING y colaboradores (1963). En anfibios, BOYDEM y col. (1933) estudia la relación de algunas especies por métodos serológicos, y en el pollo BRILES y colabs. (1950) indican el valor de los grupos sanguíneos, SCHULTZ y colaboradores (1953), el de los genes, también en el pollo. En bovinos, STORMONT y cols. (1951) estudian los grupos sanguíneos referidos al sistema B y C.

En peces, tenemos los siguientes trabajos: TOTH y col. (1932) relacionando la aglutinación y hemólisis, JENSEN (1937), que inicia el interés de la investigación en el campo de la serología, CUSHING y col. (1953) demostrando los resultados reaccionales de los eritrocitos de varias especies frente a sueros humanos; RIDGWAY (1957), que comenta ampliamente la técnica inmunológica en el estudio racial; BALAKHININ (1962), que describe métodos generales de demostración de grupos sanguíneos; CUSHING (1962), resaltando el gran valor de las investigaciones sobre los conceptos inmunogenéticos en el estudio de las subpoblaciones marinas, y por último los importantes trabajos de PARRISH (1964) sobre métodos bioquímicos y serológicos, como problemas para futuras aplicaciones.

En túnidos citaremos, entre otros, los trabajos de CUSHING (1956), SUZUKI y cols. (1958), MARR (1962), SPRAGUE y col. (1962), RIDGWAY (1962), que emplea métodos inmunoquímicos, y las investigaciones de KEYVANFAR (1962), que encuentra escasísima reactividad en pruebas cruzadas en el atún, *Thunnus thynnus*, observable a veces con el microscopio en una proporción de 5 por 600 reacciones analizadas. Por último, como método de gran interés, destacamos las iniciadas con células humanas y extractos vegetales según BOYD y col. (1949) continuadas por MAKELA (1957) y ULTER y cols. (1964), que los desarrollan ampliamente en varias especies de peces. Nosotros seguimos estas últimas técnicas en el atún, por parecernos más adecuadas en este tipo de investigaciones.

La inmunohematología la dividimos en los siguientes apartados: isoanticuerpos (eritrocitos y sueros de la misma especie), heteroanticuerpos (eritrocitos de una especie y suero de otra, es decir, lo que se denomina seroeritroaglutinación, en el caso de usarse extractos vegetales le

denominamos fitoeritroaglutinación), isoimmunoanticuerpos (inmunización entre animales de la misma especie) y heteroimmunoanticuerpos (inmunización de una especie con eritrocitos de otra).

Los métodos de isoanticuerpos y heteroanticuerpos no necesitan grandes ni costosas instalaciones y creo de gran interés para el futuro las investigaciones correspondientes a los heteroanticuerpos, especialmente las que usan extractos vegetales, por el fácil intercambio de semillas entre los laboratorios de hematología distanciados entre sí y que trabajan en estos problemas serológicos y no cuentan con semillas propias de otras regiones.

Lo mismo podríamos añadir para los sueros, que bien se podrían enviar desecados en pequeñas tarjetas, según se desprende de nuestras pruebas sobre láminas de vidrio o celuloide, las cuales conservan su actividad de 7 a 8 días, con fácil envío por avión.

Además de las investigaciones citadas señalaremos las de inmunoelectroforesis.

Desde el punto de vista de la bioquímica, se estudia exclusivamente el contenido en proteínas totales y urea.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las tomas de muestras de sangre se hicieron los días 11 y 25 de mayo, 9 y 13 de junio y 14 de julio de 1965, en la almadraba de Barbate, entre las 8 y las 12 horas, y en las siguientes condiciones: los peces recién capturados son punzados en la zona lateral del cuerpo, inmediatamente por encima de la aleta pectoral, brotando libremente la sangre en forma de surtidor, la cual es recogida, después de perder los primeros centímetros cúbicos, directamente en frascos estériles que llevan heparina al 5 %, en la proporción aproximada de una gota por cada 10 o 15 cc de sangre, en una cantidad de unos 40 ó 60 cc por frasco. Éstos son inmediatamente tapados con tapón a rosca y agitados ligeramente por rotación suave, para mezclar íntimamente con el anticoagulante y evitar toda posibilidad de formación de pequeños coágulos. Seguidamente se guardan en un refrigerador portátil que mantiene una temperatura que oscila alrededor de los 8°C, hasta su llegada al laboratorio. En general, desde que se recoge la sangre y se la transporta al laboratorio, transcurren de una a dos horas y a veces menos. Prontamente se hace el muestreo para cada determinación, separando el plasma y trasladando los eritrocitos al reactivo de ALSEVER. Una parte de las determinaciones se hacen inmediatamente, y otras, las que necesitan técnicas más complicadas, se realizan en nuestro laboratorio del Instituto de Investigaciones Pesqueras de Cádiz. Durante todo el tiempo, la sangre está conservada en el refrigerador a la temperatura indicada. El plazo transcurrido entre la toma

de sangre y su total utilización es de dos a tres días. Se han realizado ensayos de larga conservación para las técnicas usadas, obteniéndose datos que serán comentados. El estudio de las extensiones se puede realizar, estando reservadas del polvo, aun pasados unos tres meses, sin encontrar por ello variaciones en los caracteres tintoriales diferenciales.

Para comparar alteraciones postmortem, se tomaron muestras en peces que llevaban de 8 a 12 horas de captura, obteniéndose la sangre por punción de los vasos branquiales. La finalidad era estudiar exclusivamente la citomorfología eritrocítica y la capacidad de aglutinación ante sueros diferentes y extractos vegetales.

Para el recuento de los eritrocitos se usan las pipetas cuentaglobulos habituales para diluciones al 1:100 y al 1:200, diluyéndose con solución de NaCl al 1,2 o 1,3 por ciento, discretamente hipertónica para evitar hemólisis. Se puede añadir eosina al 0,1 o 0,2 % para lograr mayor contraste de los elementos con hemoglobina. También se puede hacer la dilución con el reactivo de HAYEM, siendo la cámara usada la de NEUBAUER elegida entre la de THOMA y BURKER y con doble retículo y pinzas. Siempre se usó cubreobjeto grueso para evitar variaciones en el volumen de la zona de recuentos. Los eritrocitos destacan limpiamente en el campo del microscopio, siendo fácil la lectura, y para mayor exactitud se recomiendan dos, una a dilución al 1:100 y otra a 1:200, o sea tomando 1 mm³ o 0,5 mm³ de sangre. Es conveniente hacer el recuento pasados unos cinco minutos de reposo después de haber llenado la cámara por capilaridad, para que todos los elementos estén en un mismo plano y no se repitan sus lecturas al emigrar por flotación.

Los autores han seguido diferentes procedimientos en la determinación de la hemoglobina, debido a que los núcleos de los eritrocitos destruidos pueden interferir en el uso de algunos métodos, especialmente el de SHALI, por lo que se obtienen cifras más altas y resultados inadecuados. Con el método de la cianhemoglobina, da en muchos casos una solución coloidal algo turbia, que enmascara los resultados. En este trabajo hemos usado, por su sencillez y constantes resultados, el método del carbonato sódico de SHEARD y SANFORD (1937), usado y recomendado para sangre de pollo por SCHULZE y ELVEHJEN (1934), por ser los eritrocitos de peces también nucleados. La determinación se hace con lectura en el fotocolorímetro, usando filtro verde y enrasando a cero con la solución reactivo. Los valores se dan en tanto por ciento de Hb y en gramos por ciento de Hb, haciendo la calibración 100 % Hb = 16 g % de Hb. En un tubo se colocan 10 cc de solución de carbonato sódico al 0,1 % y se añaden 20 mm³ de sangre total, se lava la pipeta varias veces para arrastrar toda traza de sangre y se deja la sangre en reposo unos dos minutos y luego se hace la lectura. La solución obtenida es de color rojo totalmente transparente.

Para la determinación del valor hematócrito hemos utilizado el mé-

todo de WINTROBE (1934), con tubo grande y centrifugación a 2500-3000 rev/min durante un tiempo de 20 a 30 minutos. En el plasma separado podemos apreciar su transparencia y color y recogido adecuadamente se puede usar en microdeterminaciones bioquímicas. También se puede determinar el valor hematócrito con muy poca sangre tomando 1 mm³ en una pipeta de recuento de leucocitos y diluyéndola hasta media ampolla con solución de NaCl al 1,2 o 1,3 % y tapando su extremo inferior con un tubo de goma, arrollándolo al resto de la pipeta, y se hace la centrifugación de igual forma. Para los cálculos haremos la longitud de 1 mm³ de la pipeta empleada igual al 100 %. Este micrométodo es útil sólo para conocer la relación plasma-glóbulos. Los caracteres del plasma no se pueden estudiar.

El interés del estudio de la resistencia osmótica es fundamental para realizar reacciones inmunológicas, utilizándose eritrocitos lavados y conservados en diferentes disoluciones. En este trabajo se usó la conservación en el reactivo de ALSEVER. Previamente se desplasmatizan los elementos y luego se colocan a una concentración del 50 % en solución de NaCl al 1,2 o 1,3 %. De lo apuntado anteriormente se destaca la necesidad de conocer lo que sería una solución hemolizante, por hipotonía, para estos eritrocitos en las condiciones de conservación, para realizar las reacciones de eritroaglutinaciones. Las soluciones hemolizantes, no sirven porque al destruir inutilizan uno de los elementos reaccionantes, siendo necesaria la integridad de las células hemoglobínicas. En inmunohematología se hará un detenido estudio de los problemas técnicos usados. A continuación exponemos brevemente la técnica modificada con la que se realiza la determinación de las dos fases de la hemólisis, inicial y total, o sea la resistencia mínima y la máxima. La resistencia osmótica —de los eritrocitos se ha realizado sobre elementos conservados en ALSEVER y refrigeración durante 48 a 72 horas, desplasmatizados y diluidos al 50 % en solución de NaCl al 1,2 %.

En una gradilla (fotografía 1, fig. 1) se colocan 18 tubos de hemólisis y se enumeran, usando en la determinación únicamente a partir del tubo marcado con el 6 ó 7, que les corresponde una concentración del 1,3 o 1,2 % de NaCl respectivamente. La pauta de las diluciones es la siguiente :

Tubos	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
cc de NaCl al 1,8 %	1,3	1,2	1,1	1,0	0,9	0,8	0,7	0,6	0,5	0,4	0,3	0,2	0,1
cc de agua destilada	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1,0	1,1	1,2	1,3	1,4	1,5	1,6	1,7

La concentración de NaCl en gramos por ciento se deduce de los centímetros cúbicos de NaCl al 1,8 %.

Si no se hacen lecturas fotocolorimétricas, se pueden añadir, en vez de centímetros cúbicos, gotas con una pipeta de igual orificio, para que éstas sean del mismo tamaño, y de esta forma al tubo marcado con el 7, por ejemplo, se le añaden 12 gotas de la solución salina y solamente 6 de agua destilada, y así sucesivamente. Luego de realizadas las diluciones se agitan los tubos suavemente y se añade a cada uno una gota de sangre según se ha preparado de la forma indicada. Se agitan y dejan en reposo durante 30 a 40 minutos. Pasado este tiempo, se centrifugan suavemente y se hace la lectura con el líquido sobrenadante. Por último anotamos el tubo que presenta trazas de hemólisis, color amarillo débil y el que presenta hemólisis total. El primero da el valor de la resistencia osmótica eritrocítica mínima, y el segundo el correspondiente a la resistencia máxima. Si se toma el líquido sobrenadante y se hacen lecturas fotocolorimétricas, obtendremos una curva correspondiente a la gradación hemolítica, pasando desde 0 %, ninguna hemólisis, al 100 %, hemólisis total, lograda con una gota de sangre, colocada y agitada en 1,8 cc de agua destilada durante igual tiempo de reposo. El filtro usado es el verde 520 $m\mu$) y el enrase a cero se hace con la solución salina de concentración 1,8 %.

Las dimensiones del citoplasma de los eritrocitos se puede realizar por métodos especiales, tales son el difractométrico de PIPPER (1924), el hialométrico de SCHMIDT-LANGE y SCHENCK (1933) y el de PONDER (1930) o fotográfico, citado por MAS y MAGRO (1953), todos usados en citología humana. El método seguido en este trabajo es de micrometría directa sobre extensiones finas de sangre, secadas y teñidas con el método Pancromo Azul G 239 de GUTIÉRREZ (1962). La exactitud depende de los cuidados técnicos seguidos durante las diferentes determinaciones. Hemos usado el ocular 6 X m Reichert y el micrómetro objetivo de 2 mm dividido en 200 divisiones de Reichert Wien y el objetivo 0,1-1 m, A = 1,25, 100 :1 Reichert Wien.

Los campos elegidos para la lectura presentan a los eritrocitos separados ligeramente, no midiendo a los que tienen zonas de contactos y menos aún superpuesto. Se leen los dos diámetros, dada la forma ovalada de estas células, y se contaron 250 eritrocitos en varios campos. No se ha seguido el método de proteger a las extensiones con bálsamo y cubreobjeto, por dar mayor grado de retracción.

El valor globular es un dato obtenido al realizar el cociente entre el porcentaje de Hb y el doble de las dos primeras cifras del recuento de eritrocitos.

Para calcular la superficie eritrocítica total, nuclear y hemoglobínica, hemos utilizado la fórmula dada por TIMET (1956) en sus investigaciones sobre peces adriáticos :

$$P = 2 \cdot \frac{a}{2} \cdot \frac{b}{2} \cdot \pi$$

siendo los valores a y b los diámetros máximo y mínimo. Con este dato se puede conocer la superficie eritrocítica en mm^2 de sangre y la superficie hemoglobínica.

En el estudio de los caracteres citomorfológicos de los eritrocitos hemos usado las extensiones finas y secas de sangre, fijadas y teñidas en el puente de tinción (fotografía 2) con el Pancromo Azul G 239, haciéndose un estudio detallado del citado colorante al estudiar los leucocitos y trombocitos. El tiempo de fijación oscila entre medio y un minuto, y el de la coloración entre seis y diez, realizándose con el mismo reactivo, diluyéndolo seguidamente con agua destilada libre de ácido carbónico o con solución tampón de fosfatos a $\text{pH} = 6,8$.

Los resultados son uniformes, tonos nítidos, observándose gran gama diferencial en la basofilia, oxifilia, policromatofilia, azurofilia y metacromasia, necesarias para el diagnóstico de las células de la sangre. Se destaca como ventaja el corto tiempo de fijación-coloración en comparación con otros que emplean de 30 a 40 minutos, recomendado por PUCHKOV (1964) usando el GIEMSA-ROMANOWSKY.

Para el estudio citomorfológico de los eritrocitos, también recomendamos los métodos siguientes: fijación con alcohol metílico absoluto de 3 a 5 minutos y secar. A continuación teñir con disolución de eosina al 1% durante 3 minutos y lavar con agua destilada. Otras extensiones se fijaron de igual forma y se tiñeron con solución de azul A o azul I al 0,5% durante 5 minutos, con lavado posterior y secado. El objeto de estos métodos era estudiar la distribución de zonas oxífilas y basófilas exclusivamente, junto con la actividad metacromática. También se usa la fijación con vapores de dicha sustancia, según la fotografía 1. Después se lavan con agua corriente y destilada. Se secan y tiñen con hematoxilina de tipo HARRIS acetificada en la proporción de una gota de ácido acético por cada 10 cc de hematoxilina, durando la tinción 5 minutos, virando con agua corriente y lavando con agua destilada y haciendo contratinción con la solución de eosina durante 2 a 3 minutos. Esta tinción se hizo para comparar la influencia de una fijación y coloración más drástica que la pancromática en la observación de datos citométricos, no encontrándose alteraciones en los caracteres citomorfológicos.

En el estudio del DNA se utiliza el método de FEULGEN y ROSSEMBERG, empleando para la hidrólisis HCl/N y reactivo de SCHIFF, preparado según la fórmula recomendada por MAC MANUS en histoquímica.

Fucsina básica	1 g
Agua destilada (A.D.)	200 cc
HCl/N	20 cc
Sulfito o metabisulfito sódico	1 g

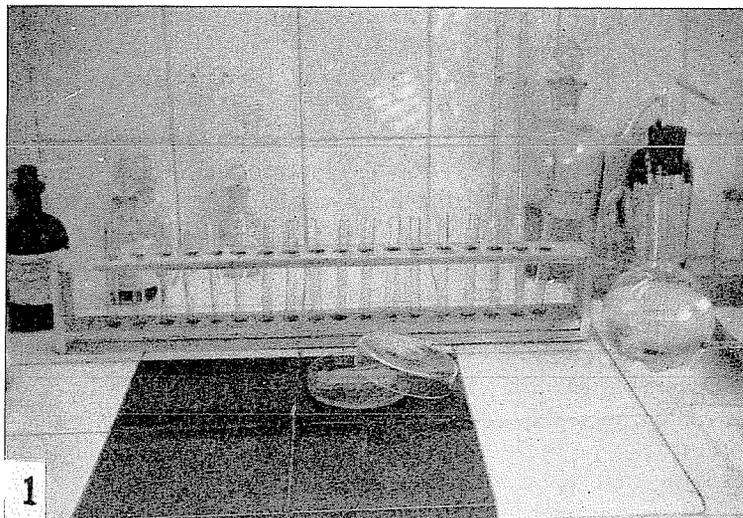


FIG. 1. — Gradilla con tubos de hemólisis para resistencia osmótica de los eritrocitos. Caja de Petri, adaptada como cámara de fijación con vapores de formol.



FIG. 2. — Disposición del puente de fijación-coloración de extensiones.

Cuando el agua destilada está hirviendo, se retira del fuego y se añade la fucsina bien pulverizada, agitándose y enfriándose a 50°C para añadir el HCl/N y dejar enfriar a 25°C, agregando seguidamente el sulfito o metabisulfito sódico y después de agitado y tapado se deja en reposo durante 24 horas en la oscuridad. Pasado dicho tiempo se añaden unos 0,25 g de carbón activado y se agita y filtra sobre un frasco de color topacio. Para su conservación se guarda en un refrigerador.

La técnica empleada es como se describe seguidamente :

1. Fijación : las extensiones se fijan con vapores de formol, según se indicó anteriormente en la caja de Petri, adaptada como cámara de vapores.

2. Luego se lavan con agua destilada y se escurren.

3. Tratar durante 10 a 15 segundos con HCl/N a la temperatura del laboratorio, 18 a 25°C, y colocar en un baño de HCl/N que estará a 59°, durante 5 minutos. Llevar al HCl/N frío para interrumpir la hidrólisis, 10 a 15 segundos. Lavar con agua corriente durante unos minutos y luego con agua destilada y escurrir bien.

4. Cubrir con el reactivos de SCHIFF y dejar actuar durante 15 minutos. Lavar con agua corriente (por tratarse de células aisladas no se lava con agua sulfurosa) y luego, con agua destilada. Se puede hacer una contratinción con solución de Verde Luz al 0,1 %.

También hemos hecho preparaciones simultáneamente con el proceder de GUTIÉRREZ (1960). Las extensiones se fijan con metanol durante 10 a 15 minutos y se dejan secar. Se repiten los tiempos 2 y 3 del método anterior y al llegar al 4, en vez del reactivo de SCHIFF, se hace una tinción con el Pancromo Azul G 239 durante 2 ó 3 minutos, lavando y secando. Con este método se consiguen imágenes nucleares comparables a la reacción de FÄULGEN y simultáneamente la contratinción de los sustratos oxífilos.

En el estudio de ciertos aspectos enzimológicos se hace la identificación de la actividad pseudoperoxidásica (hemoglobina). Las técnicas usadas comparativamente han sido la de la bencidina de LEPEHNE, y especialmente la de glicocola-bencidina de GARCÍA BLANCO (1948), llamado método de G. B., usado en sus estudios sobre sangre de batracio y perro.

En la distribución de los granos de hierro trivalente en las células que llamamos sideroeritroblastos y sideroeritrocitos, hemos usado una modificación del método de PERL, según la variante estudiada para frotis de médula ósea humana e improntas de bazo, GUTIÉRREZ y MONTERO (1961). El hierro se observa en forma de granos de tamaño y número variables, de color azul brillante y disposición perinuclear.

Para la confección de extensiones en el estudio de los leucocitos y trombocitos, hemos seguido la técnica siguiente : sobre un portaobjeto se coloca una gota de sangre, o mejor aún, según nuestra experiencia,

colocando con una pipeta una tira de sangre que llegue cerca de ambos bordes. Se aplica cuidadosamente un borde del portaobjeto o cubreobjeto que sirve de extendedor delante de la sangre y procurando formar un ángulo de unos 40-50°. Por capilaridad se extiende la sangre sobre porta y cubre, ocupando el ángulo diedro. Ahora se desliza el cubreobjeto en la dirección contraria, procurando no despegarlo de la zona de frotación, hasta lograr extender en una superficie toda la sangre. El deslizamiento conviene hacerlo despacio para lograr la extensión fina, que nos facilita una buena separación de las células. Después basta agitarla al aire para secar rápidamente. Un secado lento produce fenómenos osmóticos por concentración del plasma con arrugamiento de las células, aunque siempre existirán zonas idóneas para el estudio microscópico. Las extensiones, bien secas, se guardan en cajas portapreparaciones para preservarlas del polvo, donde se mantendrán hasta el desarrollo de las técnicas convenientes.

Al hacer las extensiones, las células se reparten en general por su tamaño, ocupando el centro las más pequeñas y los bordes las más gruesas. Los elementos formes quedan adheridos al porta al secarse la extensión por el contenido en proteínas del plasma. Los mejores detalles celulares se obtienen observando las zonas finales de la preparación, donde resultan delicadamente separadas y extendidas las células.

En general, los grupos electropolares de los citosustratos que vamos a estudiar son los grupos aminos primarios y secundarios y el radical guanidil, como electropolares positivos y los grupos carboxilos, restos fosfóricos y sulfúricos, como electropolares negativos, estando estos últimos condensados por lo que influyen para ciertos matices de coloración, ya que inducen metacromasia.

Los métodos de coloración que se pueden usar son los siguientes: colorante de GIEMSA, según recomienda HAMRE para estudiar la sangre de pollo, en este caso las extensiones se tratan con el colorante de WRIGHT, unos 4 minutos, después se añade agua destilada y se deja 4-5 minutos, se lava y tiñe con el colorante de GIEMSA durante 15-25 minutos. En este trabajo hemos utilizado nuestro fijador colorante rápido, del que haremos unos comentarios por ser poco conocido en este campo de la hematología ictiológica. Se trata de un colorante que usamos en citología de la sangre humana y de aves, donde realizamos algunas modificaciones según la finalidad perseguida en cada técnica. En el caso del atún introdujimos modificaciones, dando resultados constantes y una buena diferenciación entre la acidofilia, basofilia y metacromasia, sin olvidar el armazón azurófilo de los núcleos y de los granos con las mismas características tintoriales, siendo su preparación la siguiente: se colocan en una cápsula de porcelana de unos 100 cc de capacidad, 0,200 g de azul de metileno y 10 cc de hidróxido amónico de $D = 0,92 - 0,91$, y se calienta en baño María hirviendo durante 3 a 5 minutos. Pasado

este tiempo y sin retirar del fuego se adicionan otros 10 cc de hidróxido amónico y se dejan de 8 a 10 minutos, añadiendo seguidamente 0,120 g de azul de toluidinay se agita hasta disolver. Se añaden después 7 cc de solución de eosina al 4 %, agitando de vez en cuando con una varilla de vidrio hasta obtener una pasta y evaporando a sequedad a unos 70°C. Por último se raspa con la misma varilla, enfriando a la temperatura del laboratorio, 18-25°C, y se disuelve añadiendo 250 cc de alcohol metílico absoluto neutro en pequeñas porciones de 15 a 20 cc y mediante un embudo, sin papel de filtro, se recogen sobre un frasco que estará químicamente limpio y seco. Después de pasadas unas 24 horas se puede filtrar sobre el frasco definitivo que estará para mayor comodidad provisto de tapón de rosca y tetina cuentagotas. En lugares cálidos es útil añadir 4-5 cc de glicerina anhidra por cada 95-96 cc de solución preparada, evitándose así una rápida evaporación durante la fase de fijación.

Las extensiones de sangre bien secas se pueden usar incluso pasados de 3 a 4 meses y según la finalidad a investigar incluso un año, estando reservadas de la luz y polvo, aunque para estudios citomorfológicos en los que se deseen buenos matices y demostración de delicadas estructuras debe usarse dentro de los 10 días de confeccionadas.

Para la fijación y tinción, se siguen las fases siguientes: las extensiones se colocan sobre el puente de tinción y se cubren totalmente con unas 12 o 15 gotas, se deja actuar durante 1 minuto (fase de fijación) y seguidamente se añaden unos 2 cc de agua destilada o, mejor, solución tampón de fosfatos a $\text{pH} = 6,8$, dejándole caer gota a gota en distintos puntos y se sopla con la misma pipeta, suave y rápidamente sin tocar el líquido para homogeneizar dejándola actuar de 5 a 10 minutos, a veces 12, debido a la gran cantidad de células a teñir, especialmente núcleos (fase de coloración). Pasado este tiempo, se lava con agua destilada y se deja secar al aire.

También podemos teñir, haciendo una fijación con alcohol metílico durante 2 a 3 minutos y tiñendo durante 10 minutos con la disolución colorante recién preparada, en la proporción de 3 cc de agua destilada o solución tampón de fosfatos a $\text{pH} = 6,8$ y 10 o 12 gotas del Pancromo Azul G 239. Con ambos métodos hay una seguridad en no obtener precipitados ni sobrecoloración, que siempre dan un aspecto grosero, además de dificultar la observación de los finos detalles en la catalogación de las células.

Para obtener los diferentes diámetros celulares, hemos seguido la citometría directa según se indicó en el estudio de los eritrocitos.

En la investigación de carbohidratos no acídicos hemos usado la reacción llamada del PAS para aquellos grupos oxidables por el ácido periódico, siendo la técnica seguida la siguiente: las extensiones bien secas se fijan en la cámara de vapores de formol durante 3-5 minutos y luego se cubren con alcohol metílico según recomienda GUTIÉRREZ, MONTERO

y GASALLA (1963), con lo que se logra una buena inmovilización del glucógeno y dejándolas secar, pasados unos 5 minutos se cubren con solución reciente de ácido peryódico al 0,5 % durante 5 minutos y después de lavadas se dejan secar. Se añade el reactivo de SCHIFF durante 15 minutos y pasado este tiempo se lavan de la forma habitual y se tiñen con hematoxilina.

Para la investigación de carbohidratos ácidos con grupos aniónicos condensados que inducen metacromasia, hemos empleado el método siguiente: se cubren las extensiones durante 5 minutos con solución de azur A en metanol absoluto al 0,5 g %, y lavando seguidamente con agua destilada.

En la investigación de lípidos hemos seguido la técnica recomendada por LISON y citada por UNDRITZ (1952), para citología de sangre humana. El reactivo es una solución de Negro Sudán B, fenol-etanol-fosfato disódico a pH = 6,5. Las extensiones son fijadas de la forma habitual en vapores de formol durante 5 minutos y luego se tratan con la solución colorante durante 15 minutos. Se lava con agua destilada, arrastrando el exceso de colorante con etanol de 80°, se lava de nuevo y se hace una contratinción con rojo neutro al 1 % o con el Pancromo Azul G 239 previamente diluido según se indicó en la tinción de leucocitos.

Para la demostración del DNA seguimos el método de FEULGEN, según la técnica descrita en el estudio de los eritrocitos, usando el verde de metilo-pironina para el RNA previa fijación en metanol o Carnoy seguido del método de BRACHET citado por DAVIDSON (1960) para tejidos y adaptado por nosotros a extensiones. Otro método es nuestra modificación al de HAENEL (1952), usando nuestro colorante y diluyendo en la fase de tinción con solución tampón a pH = 4 durante 8-10 minutos. Con este método la basofilia citoplásmica debida al RNA se muestra en un tono azul fuerte, mientras que el DNA sólo se aprecia en un tono verde muy claro. Es muy probable que en esta tinción influya el azur B, contenido en dicho colorante. Para un total control de dicho ácido nucleico es necesario usar extracción con RNasa.

Para evidenciar la actividad peroxidásica se emplearon los métodos que en sus diferentes variantes usan la bencidina, entre ellos el de GRAHAM y de SATO, este último descrito por CISCAR y col. (1960) y comparado con nuestro proceder, GUTIÉRREZ (1961), para citología de sangre humana. En la variante llamada A se fijan las extensiones con etanol absoluto durante 5 ó 6 minutos y se deja secar, tratándose después con una solución recién formada por una solución de 1 cc de bencidina-etanol al 2 %, conservada en frasco oscuro, y 10 cc de agua destilada, a la que se le añade una gota de agua oxigenada de 10 volúmenes. Se agita y filtra directamente sobre la extensión, actuando 2 ó 3 minutos, seguido de lavado y contratinción con Pancromo según el método de la dilución previa. Para la variante B se hace actuar, después de la fijación, una

solución de molibdato amónico al 0,1% durante 1 ó 2 minutos y luego se vierte la solución de bencidina, preparada según se indicó antes, por filtración estando la extensión inclinada para que arrastre las nubes que se forman al contacto de la bencidina con la solución de molibdato amónico. Se deja actuar durante 1 ó 2 minutos, se lava con agua destilada y se hace la contratinción con solución de rojo neutro al 1% para hacer destacar los núcleos.

En inmunohematología las muestras de plasma o suero, se prepararon a partir de la sangre heparinizada, o de muestras dejadas coagular y conservadas en el refrigerador portátil. Por centrifugación se separan los eritrocitos, obteniéndose un líquido transparente e incoloro, en unos y ligeramente amarillo o rosado, en otros. Los hemolizados, fueron desechados para estas pruebas. Los sueros o plasmas fueron conservados en tubos de hemolisis en el refrigerador, hasta el momento de realizar los ensayos de aglutinación cruzadas. Estas reacciones se hicieron a las 24 horas y se repitieron a las 48 y los sueros que sobraron, se conservaron durante unas dos semanas, añadiéndose quinosol al 5% en la proporción de una gota por cada centímetro cúbico, lográndose una buena conservación. En la obtención del suero es buena técnica que la coagulación y retracción sea completa, siendo conveniente dejar las muestras durante 24 horas en reposo. Pasado este tiempo, se fragmenta cuidadosamente el coágulo con una varilla estéril y después de comprimir los trozos, los dejamos unas 5 a 7 horas, para obtener el máximo de suero. A continuación seguimos el proceder citado anteriormente, de separación y conservación. Separamos el suero repartiéndolo en pequeñas porciones, unos 2 cc, en tubos para evitar el contacto mínimo con los materiales durante las manipulaciones. Para la preparación de los eritrocitos separados por centrifugación del plasma o suero, seguimos la siguiente técnica: se lavan con solución de cloruro sódico al 1,2 o 1,3%, que según se demostró en la investigación de fragilidad osmótica, esta concentración se comporta como ligeramente hipertónica y con buena conservación de dichos elementos. Al haber comprobado que la sangre total se conserva más días sin presentar signos de hemolisis, cuando se mezcla con reactivo de ALSEVER en la proporción de 1:2, hemos usado éste como conservador, lavando los eritrocitos dos o tres veces antes de efectuar las pruebas y haciendo una dilución al 50% con la solución salina a la concentración citada. También podemos conservar los eritrocitos libres del plasma, durante varios días en el refrigerador, disueltos en solución de cloruro sódico al 1,2 o 1,3%, o mejor aún, en el reactivo de ALSEVER en la proporción 1:3 a 1:5. Para usarlos se lavan con la solución de cloruro sódico y se diluyen con dicha solución al 50% como dilución final. Los eritrocitos conservados de esta forma se pueden usar pasados unos 7 ó 10 días, con buena capacidad reaccional. También hemos comprobado que se pueden usar aún con ligeros signos de hemólisis,

después de 15 ó 20 días, si previamente se lavan, para quitar los vestigios de hemoglobina, finalmente se diluyen al 50 %. En nuestras experiencias los hemos usado dentro de las 48 horas e incluso hasta los 5 días de capturados. El reactivo de ALSEVER usado, tiene la siguiente fórmula :

Citrato sódico	1,60 g
Cloruro sódico	1,60 g
Glucosa anhidra	4,00 »
Agua destilada	200 cc

El cual ha de conservarse estéril y en el refrigerador.

Es curioso, que al intentar fijar y teñir con nuestro colorante de la forma habitual, extensiones de sangre conservadas en el reactivo de ALSEVER, durante unas tres semanas, se observan alteraciones en la superficie de los eritrocitos, que consisten en oquedades con pérdida de hemoglobina, que al hacer el estudio a inmersión en caliente, dan el aspecto de microgotas muy refringentes, en número variable de 8 a 15 y de tamaño desigual. Si las extensiones se fijan previamente con metanol y se tiñen con el colorante diluido, o se hace, una tinción de hematoxilina-eosina, no se observa dicho fenómeno. Por ahora, lo interpretamos como una reacción de la glicerina a nivel de la membrana lipóide-colesterínica, alterada fisicoquímicamente. Estos eritrocitos presentan una forma redonda, en vez de elíptica, y una marcada tendencia a la cariopcnosis, aparte de presentar menor oxifilia (fotomicrografías 17 y 18).

Para la obtención de los diferentes sueros humanos anti-A y anti-B y animales, conejo (*Oryctolagus cuniculus*, L.), vaca (*Bos taurus*, L.), cerdo (*Sus scrofa doméstica*, Gray) y pollo (*Gallus domesticus*, L.) se ha seguido la técnica antes citada de coagulación o heparinización, fragmentación del coágulo, centrifugación y separación en pequeñas porciones.

Para los sueros humanos anti-A y anti-B, se usaron los de gran título, separando las crioaglutininas y liberándolas del complemento con bloqueo de las hemolisinas. También se han usado sueros controles comerciales. Los sueros de animales procedían de un solo individuo joven, comprendidos en el primer año de vida y se eligieron los sueros más transparentes de color amarillo, los de vaca y pollo, y sin color, los de conejo y cerdo.

Para la preparación de los extractos vegetales, se usaron semillas de garbanzo (*Cicer arietinum*), lentejas (*Lens sculenta*), altramuces (*Lupinus luteus*), guisantes (*Pisum sativum*) y judías (*Phaseolus vulgaris*), que se sometieron al siguiente tratamiento : Se pulverizan en un mortero 0,5 g y se colocan en un tubo de hemólisis de paredes reforzadas, añadiendo 2,5 cc de solución NaCl al 1,2 o 1,3 %, agitándose

tres o cuatro veces en intervalos de 10 a 15 minutos, seguidamente se llevan a un termóstato a 37°C durante dos horas, agitando cada 20 ó 30 minutos, con una varilla. Pasado este tiempo de incubación se deja reposar durante 24 horas en el refrigerador a unos 6°C y después se centrifuga a 2500 o 3000 rpm, durante unos 15 minutos, separando el sobrenadante que se usa directamente o diluido.

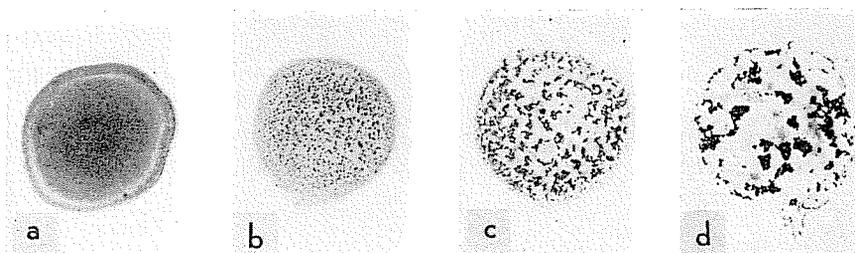


FIG. 3. — *a*, reacción de aglutinación (—); *b*, ídem (+); *c*, ídem (++), y *d*, ídem (+++).

Las muestras conservadas en el refrigerador y estériles son activas pasado de 10 a 15 días y habiendo ensayado su actividad transcurrido un mes con idénticos resultados. Los extractos los guardamos en pequeños lotes y siempre los usamos entre las 24 y 48 horas de preparados y fueron siempre utilizadas varias semillas de cada especie, para obtener disoluciones uniformes.

Las reacciones se realizan sobre portaobjetos, mezclando, con una varilla fina, una gota de suero y otra de eritrocitos de atún diluidos al 50 %, como para las pruebas cruzadas en la investigación de isoanticuerpos. Para los heteroanticuerpos, se mezclan sueros de las especies a ensayar o extractos vegetales (semillas) y los eritrocitos. En todos los casos, las reacciones se realizaron a una temperatura ambiente que osciló entre 18 y 25°C, y la lectura se hizo en un tiempo máximo de 8 minutos. Para la negatividad o tipo de grumo, en lecturas cualitativas, nos guiamos por la gradación de reacción indicado en la fotografía 3.

En bioquímica usamos suero, para la determinación de las proteínas totales seguidos del método de biuret según KINSLEY (1942) y lectura en fotocolorímetro con filtro rojo (640 m μ) y para la urea sangre total, desproteinizando con ácido tricloracético al 20 % y valoración del nitrógeno liberado por la acción del hipobromito sódico según el micro-método de BARRÓN descrito por GASTÓN DE IRIARTE (1950).

ERITROCITOS

Los análisis se realizaron sobre doce muestras de «derecho» y diez de «revés». Los atunes elegidos para realizar las diferentes técnicas se tomaron al azar, vivos, aunque con signos de asfixia y con una talla media de 220 cm. No se llevó a efecto, de momento, el control de grado de asfixia, tal como lo tuvieron en cuenta HALL y col. (1926). Destacamos principalmente el recuento de eritrocitos y el contenido en Hb. En las Tablas I y II, se dan los valores máximos, mínimos y medios de las diferentes determinaciones, comparando simultáneamente los estados de «derecho» y «revés», según términos usados por RODRÍGUEZ-RODA (1964), de los diferentes lotes de atunes que fueron sometidos al control hematológico.

En el recuento (Tabla I) se observa una discreta disminución en los de «revés» que puede tener de momento valor, como índice del grado de asfixia, ya que ambos tipos de muestras, se tomaron al azar, y en tiempos que no se llevaban largos plazos diferenciales. Este mismo comentario es válido para todas las demás determinaciones.

El valor hematocrito de 58 % correspondiente a un atún de «revés», se interpreta de momento, como muestra de sangre en fase avanzada de asfixia y mayor hemoconcentración, debido a probable paso de agua del plasma a los tejidos (Tabla I).

Referente a la resistencia osmótica, si los eritrocitos se colocan en contacto con soluciones hipotónicas de NaCl y en grado más drástico con agua destilada, primero se hinchan (fenómeno de turgescencia) y posteriormente se rompen con salida de la hemoglobina, originándose una solución de color rojo transparente (lacado de la sangre) (Tabla I). Estos datos corresponden a los eritrocitos en las condiciones de conservación que se sometieron para estudios de aglutinaciones. Se observa una desviación hacia la izquierda de la resistencia osmótica en los de «revés», que se interpreta como de alteración química y fisicoquímica a nivel de la membrana. Creemos de interés el estudio de la resistencia osmótica de los eritrocitos como un criterio para caracterizar un estado fisiológico dependiente de dificultades vitales, alimentación por ejemplo, en cambios ecológicos. También estaría influido por otros factores internos relacionados con el metabolismo lipoproteico.

Los valores cariométricos, se mantienen en límites muy constantes y los eritrocitos en la fase de «revés», tienen aparentemente aspecto ligeramente alargado (Tabla II).

El ligero aumento del valor globular en los de «revés» (Tabla I) se interpreta como una compensación a la discreta disminución del número de eritrocitos por milímetro cúbico, para cubrir las necesidades del trans-

T A B L A I

Recuentos, hemoglobina, valor hematócrito, resistencia osmótica y valor globular de los eritrocitos.

	RECUESTO (en mm ³)			HEMOGLOBINA						VALOR HEMATÓCRITO, en %			RESIST. OSMÓT. en g % de NaCl		VALOR GLOBULAR
	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIO	MÁXIMO		MÍNIMO		MEDIO		MÁX.	MÍN.	MEDIO	MÁXIMO	MÍNIMO	
				%	g %	%	g %	%	g %						
«Derecho»	2,4 × 10 ⁶	1,8 × 10 ⁶	2,15 × 10 ⁶	100	16	93,7	15	96,5	15,4	55	50	52,4	0,3-0,4	0,7 -0,8	2,2
«Revés»	2,04 × 10 ⁶	1,8 × 10 ⁶	1,95 × 10 ⁶	95,6	15,3	90,6	14,5	93,2	14,9	58	46	51	0,5-0,6	0,85-0,9	2,4

T A B L A I I

Diámetros y superficies de los eritrocitos

	DIÁMETROS (en micras)						SUPERFICIES (en micras cuadradas)								
	CITOPLÁSMICO						NUCLEAR			TOTAL			HEMOGLOBÍNICA		
	MAYORES			MENORES			MÁX.	MÍN.	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIO	NUCLEAR	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIO
	MÁX.	MÍN	MEDIO	MÁX.	MÍN	MEDIO									
«Derecho»	15,4	11	13,2	10,6	8,6	9,4	5	3	256,28	148,52	194,80	23,55	232,73	124,97	171,25
«Revés»	15,4	10,5	13	10	8,5	8,9	5	3	210,38	140,13	181,65	23,55	186,83	116,58	158,10

porte de oxígeno, ya que dicho valor depende del número de eritrocitos y del contenido en hemoglobina.

En la superficie eritrocítica (Tabla II) si relacionamos el valor correspondiente a la superficie total media y el recuento eritrocítico medio por milímetro cúbico, podemos determinar la superficie eritrocítica total media contenida en 1 mm³ de sangre. Para estos cálculos hemos usado los valores medios eritrocíticos de $2,2 \times 10^6$ y 2×10^6 para los de «derecho» y «revés» respectivamente, cuyos valores son : «derecho» = 428,56 mm² y «revés» = 363,30 mm².

Por último, queremos hacer constar que los datos analíticos cuantitativos hallados de las Tablas I y II, sólo tienen valor de orientación ya que el número de atunes analizados es escaso y no se ha tenido en cuenta la influencia del sexo ni el estado de normalidad fisiológica.

Las extensiones de sangre fijadas y coloreadas con nuestro método muestran a los eritrocitos con los siguientes caracteres tintoriales (fotomicrografía 8). El citoplasma es de color amarillento en las células maduras y con cierto grado de policromatofilia según la concentración en hemoglobina. En algunas extensiones, es más frecuente observar esta coloración en campos aislados, que bien se podría interpretar como la salida a la circulación de elementos no maduros ante la exigencia de mayor actividad funcional respiratoria, motivado por la asfixia durante el proceso de captura. Se observa con mayor frecuencia en las extensiones de sangre correspondientes a atunes que dieron mayor recuento de eritrocitos. La relación de los diámetros medio (máximo/mínimo), es igual a 1,40, mientras que esta relación, referida al núcleo, es igual a 1,66, por lo que éste tiene un aspecto más alargado que el citoplasma correspondiente, aunque los ejes máximos llevan la misma dirección. El citoplasma protegido por la condensación membrana, hace que el eritrocito presente cierta elasticidad, observable en algunos puntos de la extensión, donde un elemento puede presentar como diámetro menor citoplásmico en la dirección correspondiente al mayor del núcleo. Este signo de compresión con la deformidad como respuesta para adaptarse a las fuerzas externas, nos indica cierto grado de elasticidad con mantenimiento de la postura del núcleo dentro del estroma citoplásmico.

El núcleo se presenta como un órgano alargado discretamente y colocado, en general, en el centro del eritrocito, no siguiendo los cambios motivados por las presiones al realizar la extensión, según se ha comentado. Con la técnica de la coloración usada presenta dos tonos, un fondo azulado (ortocrómico), sobre el cual se dibuja un retículo de finas hebras y granos más o menos gruesos de color violeta púrpura. Se han observado diferentes formas de núcleo, pudiéndose presentar dentado, fusi-forme, en pera, escotado, etc., sin que exista deformidad del eritrocito. Los caracteres tintoriales del núcleo están a veces disminuidos en alguna zona o en una gran porción de él, son las zonas cromóforas y que afectan

a las hebras o granos, es decir, falta de inducción de metacromasia ya que en su lugar hay una tinción azul ortocromica uniforme. En elementos muy aislados sólo hemos visto uno o dos granos violeta-púrpura, interpretándose como eritrocitos con signos de lisis (eritrocitolisis periférica), probablemente en células viejas aún circulantes o elementos lanzados a la circulación por las contracciones en las fases de asfixia, procedentes de lugares normales de destrucción (espleno-contracción). Se han visto, en muy pequeña proporción, eritrocitos sin núcleo (eritroplástido), presentándose como una masa circular o elíptica oxífila de igual color que el citoplasma de los eritrocitos nucleados. En los maduros tienen como característico, el citoplasma acidófilo ortocromico y el núcleo ligeramente alargado con una estructuración densa y los no maduros, tienen el citoplasma basófilo presentándose en azul-gris predominante. Muy rara vez, se ha observado algún eritroblasto clasificado de basófilo de tamaño pequeño, citoplasma gris-azulado predominante y núcleo redondo, grande y de cromatina floja.

Los eritrocitos teñidos con solución de eosina presentan el citoplasma de color rosado uniforme, más débil en los policromatófilos con menor contenido en hemoglobina. El núcleo presenta unas hebras muy aisladas de color rosa-rojizo sobre un fondo incoloro limitado del citoplasma. Es probable que en la tinción con el Pancromo, el color púrpura sea el resultado de existir zonas basófilas y acidófilas, mezcla de azul y rosa-rojizo. En la tinción con azul A ó azul I a pH = 6,5 — 6,8, el citoplasma se presenta en un color amarillo-verde muy tenue, mostrando un grado muy débil de basofilia con distribución uniforme, lo que hace que con el Pancromo, no sea rosa o rojizo puro por la eosina que lleva este colorante, pues durante la tinción, también se ioniza una buena fracción de colorantes catiónicos (tiazinas) y aniónico (eosina). El núcleo presenta una tonalidad doble, azulado y púrpura, por ser un colorante metacromático por lo que interpretamos que el color púrpura con el Pancromo sea un fenómeno de inducción de metacromasia por el DNA, por fracciones tiazínicas con grupos amínicos y metilamínicos independientemente de que exista un refuerzo tintorial purpúreo, por haber cierto grado de eosinofilia. El armazón metacromático se revela bien por el azul A, en las condiciones técnicas comentadas.

El DNA se encuentra localizado en el núcleo, observándose una trama reticular densa y sólo en algunos elementos, con ligeros signos de inmadurez, policromatófilos presentan las mallas más fluidez en donde destacan granos sueltos, con un aspecto puntiforme. La reacción es más densa en la periferia, con disposición cercana a la carioteca.

El citoplasma, con la contratinción, presenta color amarillo-verdoso y no se han visto granos FEULGEN positivos dispersos.

Con las técnicas para la demostración de la actividad pseudoperoxi-dásica, se obtiene una positividad bien aparente en el núcleo en forma

de hebras o granos sueltos, muy escasos, en contraste con una reacción muy intensa en el citoplasma. La intensidad es, en general, bastante uniforme en todos los elementos, excepto en los policromatófilos, donde aparte de ser menor, se distribuye algo irregularmente. Del estudio comparado de los dos métodos usados, preferimos el denominado de la glicocola-bencidina (G. B.) de GARCÍA BLANCO Y FORTEZA, por dar más intensidad, obteniéndose preparaciones muy demostrativas del contenido hemoglobínico. Cuando deseamos hacer contratincción, preferimos el método de la bencidina, según LEPEHNE, y la coloración ulterior con nuestro método. Con este proceder se aprecian bien los datos citomorfológicos, junto con la distribución pseudoperoxidásica en el citoplasma, ya que la reacción nuclear queda enmascarada.

La distribución del hierro trivalente, sólo se advierte en muy aislada célula, en forma de granos con disposición yustanuclear o distribuidos por el citoplasma. En general, la reacción es negativa.

LEUCOCITOS Y TROMBOCITOS

Solamente se describen los caracteres citodiferenciales de los elementos maduros de los leucocitos y trombocitos hallados en sangre periférica. Dado que existen varios nombres para un mismo elemento, y creyendo que se debe tender a una nomenclatura que sirva para una mejor comprensión entre los investigadores en esta rama, de tanto interés en la Biología, hemos analizado los datos de la bibliografía, y de momento adoptamos en parte la nomenclatura que sigue, para peces teleósteos, JAKOWSKA (1956), por ser, a nuestro juicio, la más racional con algunas variantes, no a lo que añade al nombre de las células finales de líneas, sino en lo referente a ciertas facetas durante los estadios de diferenciación-maduración, según datos de nuestras actuales investigaciones. Aparte de los eritrocitos ya estudiados, las células a que nos vamos a referir son las siguientes: granulocitos neutrófilos, granulocitos eosinófilos, granulocitos basófilos, linfocitos, monocitos, trombocitos, macrófagos, plasmocitos y panhemocitoblastos estáticos.

Para un estudio más completo de los diferentes colores que vamos a observar en las células, haremos una descripción de los colorantes que componen el Pancromo Azul G 239 y de la forma probable de actuar cuando se ioniza, teniendo en cuenta el pH del medio en la fase de coloración. Nuestro colorante es una solución metálica glicerizada de eosinatos de varias tiazinas procedentes de la desmetilación parcial del azul de metileno por oxidación a pH mayor que 7, según método original con hidróxido amónico, produciéndose azur B, azur A y violeta de metileno en los que queda azul de metileno sin desmetilar y azul de toluidina que se añade. En la fase de coloración se encuentran iones de colorantes

catiónicos, aniónico y moléculas sin disociar, en las que las dos fracciones tienen propiedades colorantes. Dado que el eosinato de azul de toluidina tiene gran ionización, resulta un buen contraste de los sustratos oxífilos y por otra parte, debido a la riqueza en tiazinas con grupos amino y metil-amino, se obtienen buenas tinciones de tipo metacromáticas de aquellos citosustratos ricos en grupos aniónicos condensados. La gradación de los tonos de las diferentes basofilias es muy amplio, por el conjunto resonante que interviene en la coloración de grupos electropolares negativos. Durante la diferenciación-maduración, hay cambios patentes en la polaridad de los sustratos que influyen principalmente en la coloración, a parte de otros factores. Desde este punto de vista y según un pH controlado, la coloración, a nuestro juicio, entra de lleno en la citoquímica de grupos electropolares, los cuales están principalmente representados en los cationes por grupos amino primarios y secundarios, y en los aniones por grupos carboxílicos y restos fosfóricos y sulfúricos, sin definir una sustancia determinada o una agrupación funcional mayor, que entraría en otro aspecto citoquímico, según analizaremos más adelante.

En la tabla III resumimos la interpretación de la ionización de nuestro colorante, en medio acuoso, durante la fase de coloración, el cual presente caracteres especiales espectrofotométricos, tinción a pH adecuado, ionización, tonalidades de basofilias, fijar y teñir en corto tiempo, gran brillantez en mostrar citosustratos oxífilos, basófilos y metacromáticos.

TABLA III
Ionización del Pancromo Azul G 239 durante la fase de coloración

COLORANTES CATIONICOS	COLORANTE ANIONICO	MOLÉCULAS COMPLETAS
Azul de metileno		Eosinato de azul de metileno
Azur B		Eosinato de azur B
Azur A	Eosina	Eosinato de azur A
Violeta de metileno		Eosinato de violeta de metileno
Azul de toluidina		Eosinato de azul de toluidina
Violeta de toluidina (?)		

En la citoquímica de grupos electropolares (a pH = 6,8) haremos una descripción de cada una de las células según el aspecto que muestran cuando son fijadas y teñidas con nuestro proceder, que creemos idóneo para finas investigaciones por dar una amplia información sobre los caracteres diferenciales (tabla IV).

Granulocitos neutrófilos: son células con capacidad fagocitaria (microfagocitos). El tamaño del citoplasma oscila entre 8,5-10,5 micras, y el núcleo entre 5-6 micras. El citoplasma es de color rosado muy tenue,

T A B L A I V

Caracteres diferenciales de células de la sangre periférica del atún, *Thunnus thynnus* (L.)

CÉLULAS	CITOPLASMA	NÚCLEO	GRANOS ESPECÍFICOS	OBSERVACIONES
Granulocitos neutrófilos	Color rosado, 8,5-10,5 micras. Redondeado.	Redondo. Púrpura azulado. Cromatina en hebras y grumos. 5-6 micras.	Finas desigualmente repartidas de color rojo-violácea.	Las granulaciones a veces abundantes, en otros elementos muy escaso.
Granulocitos eosinófilos	Color celeste azulado, a veces no se observa, 11-13 micras. Redondeado.	Redondo-ovalado, rechazado. Púrpura azulado. Cromatina en grumos. 4-6 micras.	Gruesas muy oxífilas y abundante, ocupando todo el citoplasma.	A veces se observan elementos de pequeña talla y pocas granulaciones.
Granulocitos basófilos	Color rosado, escaso. Redondeado. 7,5-9,5 micras.	Redondo, central y de color púrpura oscuro. 4-5 micras.	Medianas, aisladas compactas, de color azul-negro-púrpura. Metacromasia.	Es el más pequeño y escaso de los granulocitos.
Linfocitos	Escaso, redondeado y basofilia ortocrómica. De 6 a 8,5 micras.	Redondo, reticular, grueso, de color púrpura. De 5 a 6,5 micras.	No existen.	A veces granos inespecíficos azurófilos finos, púrpura y yustanuclear.
Monocitos	Abundante, gris azulado tenue. Redondo, 10-14 micras.	Redondeado, irregular o escotado. Cromatina reticular púrpura. 7-9 micras.	No existen.	Tinción a pH 6,5-6,8 para apreciar el color gris-azul.
Trombocitos	Rosado muy débil. Ovoide. 6-7 micras.	Ovoide-elíptico. Púrpura predominante. 4,5-5,5 micras.	No existen.	En general, granos gruesos, escasos y azurófilos polares. A veces vacuolas.
Eritrocitos	Ovoide elíptico, oxífilos, amarillento sucio. De 11 a 15 micras/8,6 a 10,6 micras.	Ovoideo elíptico, púrpura azulado y granular. 5 micras-3 micras.	No existen.	A veces núcleo dentado. Muy raras veces ausencia de núcleo (eritroplástido). Signos de cariorrexis-cariólisis.

Fijación-coloración a pH=6,8, según método original con Pancromo Azul G 239.

donde destacan unas finas granulaciones de color rojovioláceas, distribuidas regularmente y pudiendo ser abundante o muy escasas. El núcleo, cuya situación en general es central, suele ser redondo, a veces algo irregular con mamelones lobulados y la cromatina se dispone en hebras y grumos de color rojo púrpura con un fondo azulado y no se observan nucléolos (fotomicrografía 1, fig. 4).

Granulocitos eosinófilos : El tamaño del citoplasma oscila entre 11 y 12,5 micras, y el del núcleo de 4 a 5 micras, en general, siempre algo más pequeño que el del neutrófilo. Estas células son las mayores de la serie granulocítica. Su citoplasma está totalmente atiborrado de gruesas granulaciones de 1-1,5 micras, con sustrato oxífilo, por lo que muestran un bello color rojo brillante. En las zonas donde están más separadas o en los elementos que presentan menos número y están más extendidos, tienen un color débilmente basófilo, mostrando un color celeste, la matriz donde están las granulaciones. La oxifilia de estos granos es diferente de la del citoplasma de los eritrocitos. En general, los granos eosinófilos se reparten por todo el citoplasma a partir de un polo, lo que hace que quede rechazado el núcleo hacia la periferia y quedando en la zona marginal. El núcleo siempre lo hemos observado de forma redonda y muy rechazado por la presión durante la formación de las granulaciones específicas, colocándose junto a la membrana, pero sin hacer relieve en dicho límite. Su cromatina queda teñida de color púrpura predominante, con un fondo azulado, y sus grumos son compactos y regularmente repartidos. No se ven nucleolos. En algunas extensiones se han visto granulocitos eosinófilos de pequeña talla y escasos granos (fotomicrografía 2).

Granulocitos basófilos : son elementos muy escasos y el tamaño del citoplasma oscila entre 7,5 y 9,5 micras y es el más pequeño de los granulocitos. Su núcleo tiene un diámetro comprendido entre 4 y 6 micras. El citoplasma presenta un color ligeramente rosado en las zonas que no muestra granos específicos. Con nuestro método rápido de tinción, el contacto con el medio acuoso es corto y la conservación de las granulaciones es buena, ya que las pocas células estudiadas muestran granos muy abundantes y compactamente distribuidos, ocultando gran porción del núcleo del que sólo deja apreciar una pequeña zona. Los granos son más pequeños que los de los eosinófilos, con color que varía entre el azul, el negro y el púrpura, o sea con un grado manifiesto de metacromasia, y la diferencia de colores indicaría un estado funcional. El núcleo ocupa gran parte de la célula, pues son de los granulocitos que muestran menor cantidad de citoplasma y se presenta teñido en color púrpura oscuro estructurado, casi uniforme y estando localizado en el centro de la célula o ligeramente excéntrico, no llegando nunca a la periferia, como ocurre en el eosinófilo. La producción granular es más regular que en el oxífilo y con una más amplia distribución, manteniendo al núcleo en posición central (fotomicrografía 3).

Linfocitos : son células que varían mucho en sus dimensiones, en general son pequeñas y redondas, con un citoplasma que oscila entre 6 y 8,5 micras, a veces mayores, siendo de difícil catalogación. El núcleo, central, ocupa casi totalmente el citoplasma, especialmente en los elementos de talla más pequeña, oscilando entre 5 y 6,5 micras. El citoplasma aparece como una franja alrededor del núcleo, de color azul muy intenso (basofilia ortocrómica), y a veces con grumos basófilos muy confluentes. En los elementos de mayor talla, la basofilia citoplásmica es menos manifiesta. En algunos elementos no se han visto pequeñas vacuolas observándose digitaciones en la periferia del citoplasma. A veces se han visto pequeños granos en escaso número, de color púrpura, localizados cerca del núcleo. La cromatina es de tipo condensada en los más pequeños y reticular grueso en los mayores, adoptando forma de bloques y dispuesta en el centro de la célula. No se observan nucléolos ni zonas de menor basofilia con disposición yustanuclear (fotomicrografía 4).

Monocitos : son células con potencial actividad fagocitaria y para su distinción es necesario que las extensiones sean finas. Su tamaño citoplásmico oscila entre 10 y 14 micras, a veces algo mayor, mientras que su núcleo oscila entre 7 y 9 micras. Su citoplasma suele mostrar, realizando las tinciones a un pH entre 6,5 y 6,8, un color gris azulado muy tenue, siendo su tipo especial de basofilia ortocrómica la que nos puede servir para su identificación, pues es difícil hacer un citodiagnóstico, dándole mucho valor a este aspecto del citoplasma. En general no se observan granulaciones de tipo azurófilo y en aislados elementos se han visto pequeñas vacuolas. El número es de color púrpura-azul débil, con cromatina poco densa y tendencia a la reticulación, rara vez en grumos y sin nucléolos (fotomicrografía 5).

Trombocitos : el tamaño de estas células oscila alrededor de 6-7 micras y son ovaladas. Su núcleo sigue la forma general de las células, presentando un diámetro máximo, comprendido entre 4,5 y 5,5 micras. Son elementos abundantes y aunque se observan sueltos es frecuente que se presenten reunidos en grupos (zoogreas) de 4 a 10 células, y son centros de coagulación de la sangre. El citoplasma se presenta en color rosado muy tenue y es frecuente observar alguna vacuola con tendencia a disponerse en las zonas polares. Alguna vez presentan granos azurófilos cercanos a estas vacuolas. El núcleo tiene un color púrpura azulado que recuerda al de los eritrocitos, bien estructurado y menos azulado que en los elementos hemoglobínicos, por lo que presentan, en general, un tono más púrpura. El tamaño es también algo mayor que en estas células y es posible hacer la identificación de los núcleos aislados (fotomicrografías 6 y 7, figs. 4 y 5).

Plasmocitos : son células muy escasas, ya que sólo las hemos observado en una sola extensión de las numerosas estudiadas. Posiblemente están relacionadas con ciertas alteraciones celulares de la sangre. Su

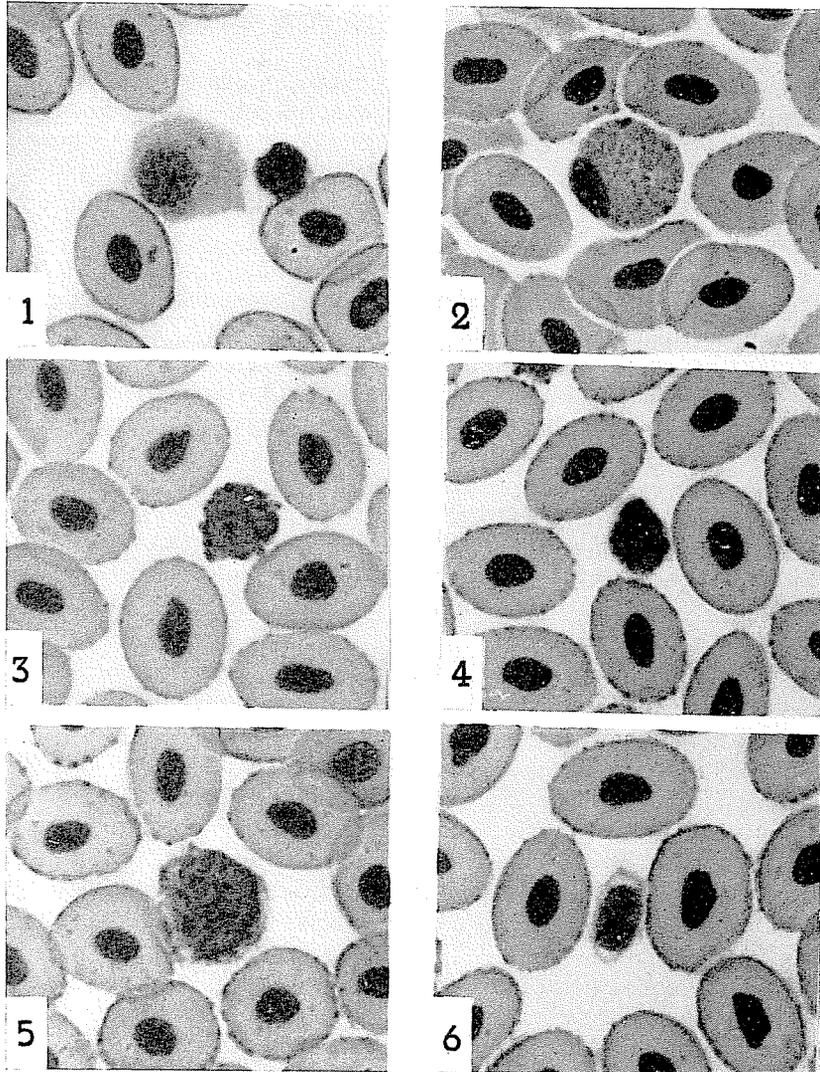


FIG. 4. — Fotomicrografías: 1. Granulocito neutrófilo. - 2. Granulocito eosinófilo. - 3. Granulocito basófilo pequeño. - 4. Linfocito mediano. - 5. Monocito grande. - 6. Trombocito (dos vacuolas).

citoplasma tiene una intensa basofilia especialmente periférica y dejando más clara una zona yustanuclear. La hiperbasofilia se presenta a veces como granos teñidos ortocrómicamente y dispuestos apretadamente. El núcleo es redondeado y situado hacia la periferia, presentando una cro-

matina de grumos gruesos y de color púrpura, los cuales dejan zonas claras.

Macrófagos : estas células han sido vistas en algunas extensiones y creemos que se trata de monocitos con actividad actual fagocitaria y relacionada con ciertos estados de enfermedad-defensa, como los plasmocitos. Su citoplasma muestra en general un color gris azulado, vacuolizado y con granos de pigmentos de color verde o negro o detritos englobados de color azul. El núcleo se corresponde con la descripción dada para los monocitos, lo mismo que el citoplasma, y a veces se ha observado en él signos de picnosis, quizá lesionado por su actividad funcional.

Panhemocitoblastos : son elementos multipotentes, capaces de dar origen a todas las células adultas descritas en la sangre periférica. Según su capacidad de diferenciación-maduración, los dividimos en dinámicos, localizados en los focos hematopoyéticos, y estáticos, sin signos de maduración y en el torrente circulatorio. Son células de gran tamaño, oscilando entre 12 y 16 micras, y de difícil diagnóstico los de menor talla. El citoplasma presenta basofilia ortocrómica no muy acentuada y siempre agranular y el núcleo es reticulado y con cromatina fina de color púrpura. No se han visto mitosis, nucléolos evidentes ni signos de diferenciación-maduración.

En la citoquímica de los carbohidratos hemos usado la reacción del FAS. En este grupo hay varios compuestos no acídicos, siendo los más frecuentes : glucógeno, mucopolisacáridos neutros, mucoproteínas y glicoproteínas. El glucógeno se puede extraer selectivamente por acción enzimática, intercalando dicha secuencia entre la fijación y la reacción del PAS, y según se desprende de nuestras investigaciones, es una reacción muy útil en el estudio de la citología, ya que imprime cierto carácter a las diferentes células y hace fácil su diferenciación, aparte de dar una información sobre la existencia de ciertas agrupaciones químicas e incluso llega al conocimiento de la distribución de la actividad glucogénica en algunos elementos.

Los granulocitos neutrófilos tienen reacción positiva y de color rojo magenta, el cual es localizado en el citoplasma en forma granular compacto, ocupando totalmente el citoplasma y respetando la zona central correspondientes al núcleo (fotomicrografía 9).

Los granulocitos eosinófilos presentan reacción positiva, con localización citoplásmica y distribución exclusivamente perigranular. El citoplasma adopta el aspecto de panal o vacuolar con límites de color magenta y el centro claro ocupado por el grano específico (fotomicrografía 10).

En los granulocitos basófilos, la reacción es positiva y localizada en el citoplasma, a nivel de los granos específicos, los cuales presentan una distribución irregular y escasa, fácil de diferenciar de los anteriores elementos.

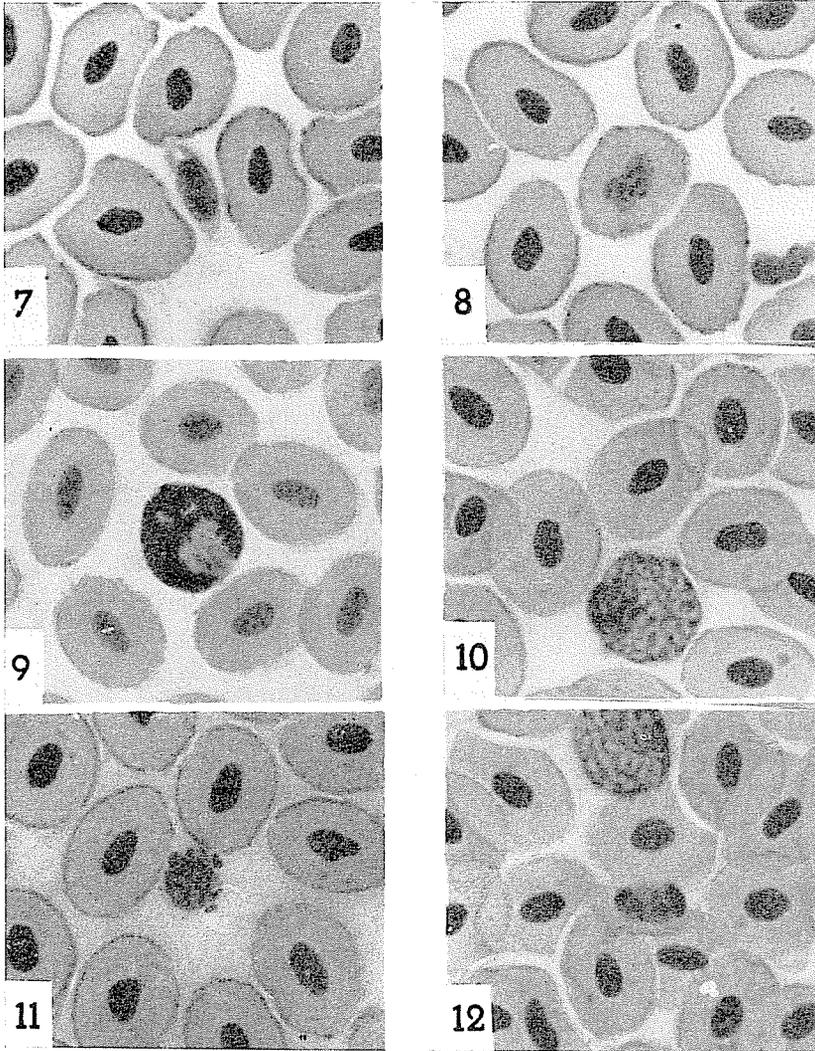


FIG. 5. — Fotomicrografías: 7. Trombocito (una vacuola). - 8. Eritrocito policromatófilo y maduros. - 9. Granulocito neutrófilo, PAS (+) denso. - 10. Granulocito eosinófilo, PAS (+) vacuolar. - 11. Linfocito, PAS (+) granular. - 12. Trombocito, PAS (+) bipolar.

Con esta reacción podemos diferenciar claramente estos tres granulocitos con facilidad, además de demostrar la existencia de grupos fácilmente oxidables por la acción del ácido peryódico.

Los linfocitos tienen en algunos elementos reacción positiva, en for-

ma de granos finos y brillantes, aislados y con disposición perinuclear, a manera de corona o escasamente distribuidos por el pequeño citoplasma que presentan (fotomicrografía 11).

Los monocitos dan reacción positiva en forma de granos muy finos y de aspecto difuso.

En los trombocitos la reacción es positiva y constante en forma de granos muy gruesos a manera de bloques, en número de dos, y con disposición polar respecto al núcleo. A veces estos bloques aparecen en número de tres o cuatro, más pequeños y en las zonas laterales del núcleo.

Respecto a las tres últimas células citadas, destacamos el gran interés de esta reacción al mostrar cada elemento una disposición especial, que sirve para su identificación, ya que los resultados son superponibles en cada tipo de célula (fotomicrografías 12 y 13, figs. 5 y 6).

Al grupo de los carbohidratos ácidos pertenecen : los mucopolisacáridos ácidos (grupos aniónicos condensados), con la propiedad de inducir metacromasia. Hemos usado como colorante la tiazina azul A o azul I, adquiriendo los granos un color más o menos rojo violáceo, con distribución citoplásmica aislada y a veces formando un casquete en una zona del núcleo y siendo positivos, exclusivamente, los granulocitos basófilos.

La citoquímica de lípidos, como dice LITSON, es una investigación de tipo citofísico, ya que al aprovechar la mayor solubilidad del Negro Sudán B, en solución alcohólica en los lípidos, evidencia su localización por acumulación de dicho colorante al disolverse en ellos.

En los granulocitos neutrófilos la reacción es positiva, en forma granular, fina con disposición regular por todo el citoplasma y dejando solamente el espacio correspondiente al núcleo, adoptando la forma de pequeños bastones muy cortos y de color negro, siendo la única célula positiva a esta reacción (fotomicrografía 14).

En la citoquímica de los ácidos nucleicos, el DNA siempre ha sido positivo en el núcleo y nunca en el citoplasma. La reacción puede ser intensa en los núcleos condensados de los linfocitos y menos intensa en los reticulados de los monocitos. En aquellas células con núcleos formados por zonas más densas, a ese nivel la reacción es más fuerte, como ocurre en los granulocitos neutrófilos y eosinófilos.

El RNA se observa en los delgados citoplasmas de los linfocitos y algunas células catalogadas de monocitos. Con esta técnica, y dependiendo del pH, se suele observar el DNA en color verde muy débil (debido probablemente a cierta metacromasia inducida por el DNA sobre el azul B). Con la técnica del verde de metilo-pironina, el DNA toma un color verde azulado débil, con zonas de color rosado, y el rojo vivo se encuentra solamente en el citoplasma de los linfocitos y menos intenso en los monocitos. Algunas células de tipo inmaduro presentan una

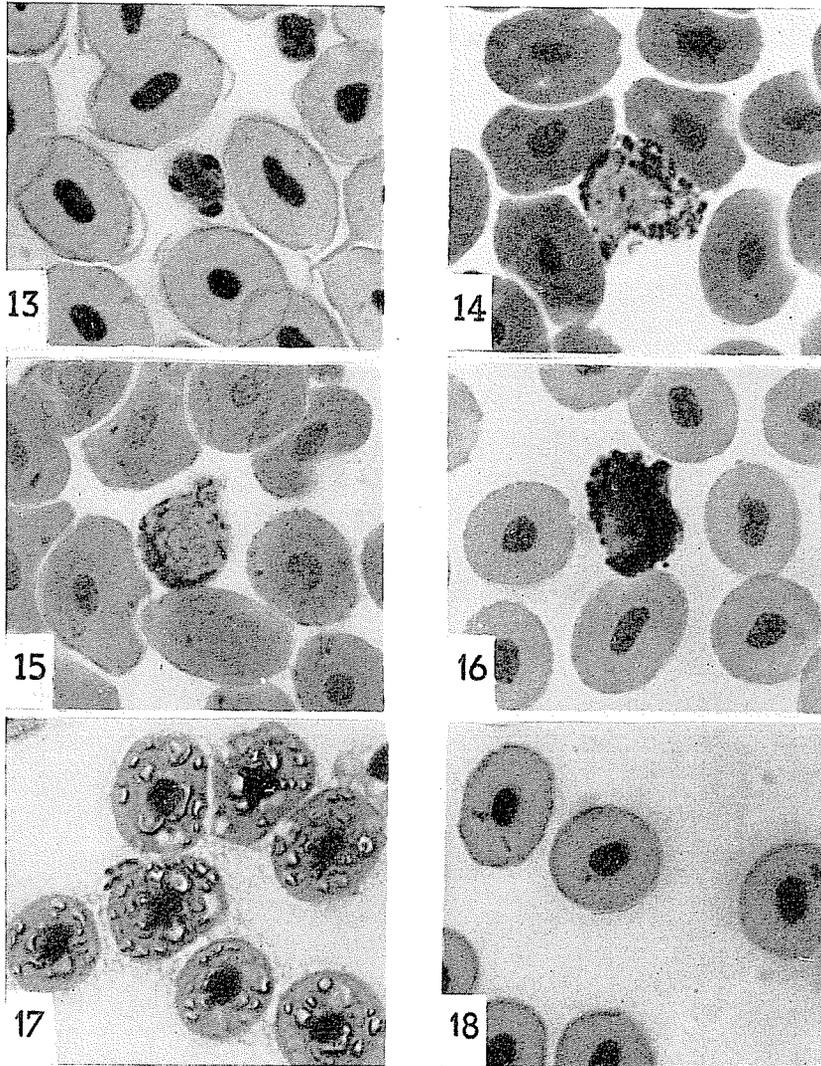


Fig. 6. — Fotomicrografías: 13. Trombocito, PAS (+) irregular. - 14. Granulocito neutrófilo, lípidos (+). - 15. Granulocito neutrófilo, peroxidasas (+) granular. - 16. Granulocito neutrófilo, peroxidasas (+) densa. - 17. Eritrocitos conservados con alteración superficial. - 18. Idem sin alteración.

zona pironinófila en el citoplasma. En los núcleos no se han visto zonas circulares intensas relacionadas con el nucléolo.

Citoquímica de enzimas: se investiga exclusivamente la actividad peroxidásica en los granulocitos neutrófilos, usando la variante A de

T A B L A V

Caracteres citoquímicos de células de la sangre periférica del atún, *Thunnus thynnus* (L.)

CÉLULAS	CARBO- HIDRATOS	MUCOPOLI- SACÁRIDOS ÁCIDOS	LÍPIDOS	DNA	RNA	PEROXIDASAS	PSEUDO- PEROXIDASAS	HIERRO
Granucitos neutrófilos	(+) granular uniforme		(+) granular aislados o compactos	(+) nuclear		(+) granular compacto y uniforme		
Granulocitos eosinófilos	(+) peri- granular			(+) nuclear				
Granulocitos basófilos	(+) granular aislado	(+) granular aislado. Me- taeromasia		(+) nuclear				
Linfocitos	(+) a veces granular, po- co numeroso			(+) nuclear	(+) intenso citoplasma, débil nuclear			
Monocitos	(+) débil y difuso			(+) nuclear	(+) muy dé- bil citoplas- ma, débil nuclear			
Trombocitos	(+) granular grueso y polar			(+) nuclear.				
Eritrocitos				(+) nuclear	(+) difuso, débil en poli- cromatófilos, (-) en oxifilos	(+) intenso uniforme en citoplasma, en hebras y granos nuclear	(+) en gra- nos en esca- sos elemen- tos	

nuestro método, los cuales presentan granos finos o gruesos de color amarillento oscuro y repartidos por el citoplasma. Las demás células presentan reacción negativa a esta actividad enzimática, incluso el granulocito eosinófilo, que muestra, bien contrastado en rojo vivo, los granos específicos, no dando positividad ni la periferia de los mismos. Con la variante B se observan los granos quizá más compactos, en un color azul intenso, siendo esta variante más sensible. Los diferentes colores según la técnica empleada serían debidos a los productos de oxidación, simple en la variante A, y por condensación posterior de la forma oxidada de la bencidina con moléculas no oxidadas por la acción del molibdato amónico, en la variante B (fotomicrografías 15 y 16). Los caracteres citocósmicos comentados se dan de forma resumida en la tabla V.

INMUNOHEMATOLOGÍA

Las reacciones cruzadas (isoanticuerpos) de tipo aglutininas-aglutinógenos, en las condiciones técnicas descritas, han sido negativas en todos los casos, incluso observadas con lupa. No usamos tiempos mayores de ocho minutos en las lecturas, porque una desecación puede dar resultados falsos. En la investigación de heteroanticuerpos (seroeritroaglutinación) seguimos el mismo criterio que para las lecturas, indicado en la figura 3, mientras que en las lecturas cuantitativas las reacciones positivas con sueros sin diluir se repiten a diluciones al 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, hasta lograr negativizar, para conocer el grado de sensibilidad o título. En la tabla VI, en la que se usaron diferentes sueros de animales y eritrocitos de atún, resumimos los resultados obtenidos, en la que puede apreciarse el título de reacción. Se puede observar en ella la existencia de antígenos comunes a la especie estudiada según los diferentes sueros probados, la incompatibilidad de las sangres, la menor reactividad con el suero del conejo, el mayor título reaccional para el suero humano anti-A y la correspondencia en los resultados con los sueros de vaca, cerdo y pollo.

En las reacciones por fitoeritroaglutinación solamente obtuvimos resultado positivo con extractos de judías (*Phaseolus vulgaris*), siendo sensible hasta título 1/32, y las demás reacciones fueron negativas en el tiempo límite. La intensidad de los cruces (grumos gruesos) en tiempos que oscilaron desde 15 hasta 20 segundos, hasta una cruz (grumos finos) en un tiempo de 5 a 7 minutos. Un ejemplar procedente de la almadraba de La Línea de la Concepción (atunara) en el mar Mediterráneo y sometido a las mismas pruebas serológicas, obtuvimos idénticos resultados al de los ejemplares de Barbate (Atlántico).

TABLA VI

Resultados obtenidos en los ensayos de reacción entre los eritrocitos del atún y diferentes sueros de animales. (+ indica reacción positiva, — negativa y ± dudosa)

SUEROS USADOS	DILUCIONES DE LOS SUEROS						
	0	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64
1. Conejo	+	±	—	—	—	—	—
2. anti-B	+	+	+	—	—	—	—
3. anti-A	+	+	+	+	±	—	—
4. Vaca	+	+	+	+	+	—	—
5. Cerdo	+	+	+	+	+	—	—
6. Pollo	+	+	+	+	+	—	—

BIOQUÍMICA

En la tabla VII quedan resumidos los valores hallados de las proteínas totales en gramos por ciento de seis ejemplares de «derecho» y cinco de «revés», y la urea en gramos por mil, en ocho de «derecho» y seis de «revés». Se observa en ella una discreta disminución en el contenido de las proteínas totales, en el corto número de ejemplares de «revés», probablemente relacionado con el cambio ecológico que pudiera influir en el régimen alimentario proteico. Por parte de la urea, las cifras oscilan dentro de unos valores límites estrechos, lo que podría indicar un metabolismo normal, constante y relacionado con ciertos compuestos nitrogenados.

TABLA VII

Concentración de las proteínas totales (en g %) y de la urea en sangre (en g ‰)

	PROTEÍNAS			UREA		
	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIO	MÁXIMO	MÍNIMO	MEDIO
«Derecho»	6,00	5,25	5,57	0,35	0,21	0,26
«Revés»	5,00	4,08	4,46	0,35	0,27	0,30

RESUMEN

Nuestros estudios hematológicos han sido realizados en el atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa datatlántica de España (Barbate) en ejemplares de «derecho» y «revés».

En ellos se estudian los eritrocitos, leucocitos y trombocitos, caracteres inmunohematológicos y en el aspecto bioquímico, los relacionados

con las proteínas totales y la urea en sangre. Los valores correspondientes a los eritrocitos, hemoglobina, valor hematócrito, resistencia osmótica, valor globular, diámetros y superficies de dichas células, quedan resumidos en las tablas I y II. Los caracteres citomorfológicos y citoquímicos de los eritrocitos, leucocitos y trombocitos, se reflejan en las tablas IV y V. Se hace un estudio detallado del colorante hematológico Pancromo Azul G 239 usado en la fijación y coloración de dichas células, indicando su rapidez y detallando su preparación, aparte de señalar en la tabla III los colorantes que resultan durante su disolución en agua. Los caracteres inmunohematológicos, especialmente las reacciones entre eritrocitos de atún y sueros de diferentes animales (seroeritroaglutinaciones), se recogen, según su título, en la tabla VI, en la cual damos entre otras las reacciones positivas entre dichas células y el extracto de judías (*Phaseolus vulgaris*) (fitoeritroaglutinaciones) a título 1/32. Por último los valores correspondientes a las proteínas totales y urea se dan en la tabla VII.

S U M M A R Y

Twenty-two Bluefin tuna, *Thunnus thynnus* (L.), from southern coast of Spain (Barbate) of which 12 were of «derecho» (coming season) and 10 of «revés» (returning season) were studied on their haematological characters. It was not possible to take in consideration in this study neither the degree of asphyxiation nor the sex, therefore our conclusions concern chiefly on the two phases said of «derecho» and «revés».

Maximum and minimum values of the number of erithrocytes, hemoglobin concentration, hematocrit value, osmotic resistance, globular value, diameter and surface of the cellules, are given in the tables I and II.

The cytomorphological and cytochemical characters of the erithrocytes, leucocytes and thrombocytes are presented in the tables IV and V. The techniques of our special haematological staining (Pancromo azul G 239) as adapted to the blood of fishes is described in the text and resumed in the table III.

The results of our serological studies between tuna erithrocytes and human serum anti-A and anti-B and animal serum (rabbit, cow, pig and chicken) and extracts of plants (French beans, garavances, lentils and peas) are given in the table VI.

The total proteins and urea values are given in the table VII.

BIBLIOGRAFÍA

- BALAKHININ, J. A. — 1962. Techniques for the investigations of Fish Physiology. *Akademiya Nauk SSSR Moskva* (translated from Russian).
- BOYD, W. C., y R. M. REGUERA. — 1949. Hemagglutinating substance for human cells in various plants. *Journal of Immunology*, 62(3):333-339.
- BOYDEM, A. A., y G. K. NOBLE. — 1933. The relationship of some common Amphibia determined by serological study. *American Museum*, n.º 606:1-24.
- BRELES, W. E.; W. H. MAC GIBBON y M. R. IRWIN. — 1950. On multiple alleles affecting cellular antigens in chickens. *Genetics*, 35(6):633-652.
- CISCAR, F., y P. FARRERAS. — 1960. *Diagnóstico hematológico. Laboratorio y Clínica*.
- CUSHING, J. E., y L. SPRAGUE. — 1953. Agglutinations of the erythrocytes of various fishes by human and other sera. *American Naturalist*, 87:307-315.
- CUSHING, J. E. — 1956. Observations on the serology of tuna. *U. S. Fish and Wildlife Service Special. Scientific Report Fisheries*, n.º 183:14.
- 1962. Immunogenetic concepts in marine population research. *American Naturalist*, 889.
- CUSHING, J. E.; N. L. CALAPRICE y G. TRUMP. — 1963. Blood group reactive substances in some marine invertebrates. *Biological Bulletin*, 125(1):69-80.
- DAVIDSON, J. N. — 1960. *La biochemie des acides nucleiques*. Dunons, Paris.
- GARCÍA-BLANCO, J., y J. FORTEZA. — 1948. Nuevos métodos de coloración en hematología. Editorial Saber, Valencia.
- GASTÓN DE IRIARTE, E. — 1950. Valoración de la urea en sangre y el aclaramiento ureico como prueba del funcionalismo renal. *Medicamenta* (edición farmacéutica), año II, 35:269.
- GUTIÉRREZ, M. — 1960. Investigación nuclear con extracción del RNA en citohematología. *Laboratorio*, 401-406. Granada.
- 1961. Citoenzimología sanguínea. Peroxidasas. *Laboratorio*, 9-14. Granada.
- 1962. Leichte und rasche Herstellung eines Farbstoff-Fixatives (Blau G 239) für die zytohämatologie. *Blut*, VIII, 424-425.
- GUTIÉRREZ, M., y C. MONTERO. — 1961. Demostración citoquímica del hierro en extensiones de sangre y médula ósea. *Laboratorio*, 207-214. Granada.
- GUTIÉRREZ, M.; C. MONTERO y R. GASALLA. — 1963. Un nuevo método de bloquear y desbloquear la función aldehído en citoquímica. *Anales del Desarrollo*, XI (23, 24, 25). Granada.
- HAENEL, U. — 1951. Die basophilie des nucleolus als Zeichen der Eiweißproduktion. *C. R. III Congrès Société Internationale Européenne d'Hématologie*, I:134-140. Roma.
- HALL, F. G.; I. E. GRAY y S. LEPKOVSKY. — 1926. The influence of asphyxiation on the blood constituents of marine fishes. *Journal Biological Chemistry*, LXVII, 549-554.
- JAKOWSKA, S. — 1956. Morphologie et nomenclatures des cellules du sang des Téléostées. *Revue d'Hématologie*, XI, 519-539.
- JENSEN, W. — 1937. Blutgruppenuntersuchungen bei Fischen (Dorschen). *Zeitschrift für Rassenphysiologie*, 9(1-2):22-25).
- KEYVANFAR, A. — 1962. Serologie et immunologie de deux espèces de Thonides (*Germo alalunga* Gmelin et *Thunnus thynnus* L.) de l'Atlantique et de la Méditerranée. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 26(4):407.
- KINGSLEY, G. R. — 1942. The direct biuret method for the photoelectric and visual colorimetry. *Journal of Laboratory and Clinic Medicine*, 27:840-845.
- LANDSTEINER, K. — 1900. Zur Kenntnis der antifermentativen lytischen und agglutinierenden Wirkungen des Blutserum und der Lymphe. *Centralblatt für Bakteriologie Parasitenkunde und Infektions Krankheiten*, 1 Abteilung Originale, 27(10-11):357-362.
- 1901. Über Agglutinationserscheinungen normalen menschlichen Blutes. *Wiener Klinische Wochenschrift*, 14: 1132-1134.

- LANDSTEINER, K., y A. S. WIENER. — 1941. Studies on an agglutinin (Rh) in human blood reacting with anti-Rhesus sera and with human isoantibodies. *Journal Experimental Medicine*, 74(4):309-320.
- MACHETTI, S. — 1952. *Epitome de Transfusión Sanguinea*. Artes Gráficas «Pirineo», 2:101, Zaragoza.
- MAKELA, O. — 1957. Studies in hemagglutinins of Leguminosae seeds. *Annales Medicinæ Experimentalis et Biologiæ Fennicæ*, Supplementum 85, 133. Helsinki.
- MARR, J. C. — 1962. Subpopulations identifications. *World Scientific Meeting on the Biology of tunas and related species*, Section n.º 2. La Jolla, California, USA.
- MAS y MAGRO, F. (hijo). — 1953. *Técnica de hematología clínica*. Editorial Científico-Médica, Barcelona.
- PARRISH, B. B. — 1964. Notes on the identification of sub-population of fish by serological and biochemical methods. The status of techniques and problems of their future application. *FAO Fisheries Technical*, paper n.º 30.
- PUCHOV, N. V. — 1962. Technique for the investigation of fish physiology. *Akademiya Nauk SSSR Moskva* (translated from Russian).
- RODRIGUEZ-RODA, J. — 1964. Biología del atún, *Thunnus thynnus* (L.) de la costa sudatlántica de España. *Invest. Pesq.*, 25:33-146.
- RIDGWAY, G. J. — 1957. The use of immunological techniques in racial studies. *U. S. Fish and Wildlife Service. Special Scientific Report Fisheries*, 208:39-43.
- RIDGWAY, G. J. — 1962. Distinguishing tuna species by immunochemical methods. *Fish Bulletin*, 63(1):205.
- SCHULTZ, F. T., y W. E. BRIELES. — 1953. The adaptive value of blood genes in chickens. *Genetics*, 38(1):34-50.
- SCHULTZE, M. O., y C. A. ELVEHJEM. — 1934. An improved method for the determination of hemoglobin in chicken blood. *Journal Biological Chemistry*, 105:253-257.
- SHEARD, C., y A. H. SANFORD. — 1933. The use of the photometer in the determination of the amount of hemoglobin in grams per 100 ml blood. *American Journal Clinic Pathology*, 3:412-414.
- SPRAGUE, L., y L. I. NAKASHIMA. — 1962. A comparative study of the erythrocyte antigens of certain tuna species. (Abstract J. C. Marr, Editor). *Pacific Tuna Biology Conference*, August, 14-19 1961. *U. S. Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report, Fisheries*, 415:36-37, Conference paper III-8.
- STORMONT, C.; R. D. OWEN y M. R. IRWIN. — 1951. The B and C systems of bovine blood groups. *Genetics*, 36(2):134-161.
- SUZUKI, A.; Y. SHIMIZU y T. MORIO. — 1958. Serological studies of the races of tuna. (I) The fundamental investigations and the blood groups of albacore. *Report of Nankai Regional Fisheries Research Laboratory*, 8:104-116.
- TIMET, D. — 1956. Some hematological characteristics of Adriatic fish. *Thalassia Jugoslavica*, 5-31 zagreb.
- TOTH, L. VON. — 1932. Agglutination und Hämolyse bei Fischen. *Zeitschrift für Immunitätsforschung un experimentelle Therapie*, 74(314):277-283.
- UNDRITZ, E. — 1952. *Planches d'Hématologie*.
- UTTER, F. M.; G. J. RIDGWAY y H. O. HODGINS. — 1964. Use of plant extracts in serological studies of fish. *U. S. Fish and Wildlife Service, Special Scientific Report, Fisheries*, n.º 472.
- WINTROBE, M. — 1933. Variations in the size and hemoglobin content of erythrocytes in the blood of various vertebrates. *Folia Haematologica*, 51, 32.