

Inv. Pesq.	42 (2)	Págs. 293-297	Septiembre 1978
------------	--------	---------------	-----------------

Preparación de un colorante para hematología comparada *

por

M. GUTIÉRREZ ** y C. GUTIÉRREZ

Los colorantes usados en el estudio de las células de la sangre son muy variados, aunque todos tienen en común el derivar de la fórmula empírica de ROMANOWSKY, siendo mejorada por ZIEMANN, quien le da gran valor práctico, ya que prepara el colorante por métodos más controlados.

Con el método de ROMANOWSKY-ZIEMANN se inicia una nueva era evolutiva de los colorantes panóptico-pancrómicos para citohematología, los cuales en lo posible deben tener la propiedad de poner en evidencia el mayor número de estructuras celulares, para lograr una mejor diferenciación y diagnóstico en la fase de maduración de las diferentes líneas de las células de la sangre.

Aunque el mérito de introducir los conceptos de acidofilia, basofilia, metacromasia y neutrofilia se debe a EHRLICH con el uso de sus colorantes, son realmente las fórmulas derivadas del ROMANOWSKY, las que se usan exclusivamente en las investigaciones citohematológicas, ya que aparece un nuevo concepto, azurofilia, que amplía el gradiente de tonos de colorantes diferenciales. Las fórmulas más usadas y mejor conocidas son entre otras las siguientes: JENNER, NOCHT, LEISHMAN, MAY-GRUNWALD, MICHAELIS y WOLF, GIEMSA, MACNEAL, WRIGHT, PAPPENHEIM, URTUBEY, ROELILLIE y WILLOX y LILLIE. Estos autores son recogidos en los trabajos de MAS y MAGRO (1943), GURR (1960), CONN (1961) y BAKER (1962). Destacamos los trabajos de HOLMES y col. (1926), EMERY y col. (1952), EVANS y

* Recibido el día 7 de noviembre de 1977.

** Laboratorio del Instituto Nacional de Investigaciones Pesqueras. Puerto Pesquero. Cádiz.

*** Instituto de Biología Celular. C.S.I.C. Madrid.

col. (1952) así como los de uno de nosotros, (M. G.) GUTIÉRREZ (1960a, 1960b), (1962a, 1962b), (1964) y (1967).

En el presente trabajo damos los métodos para preparar un colorante para citohematología comparada, destacando las estructuras núcleo-citoplásmicas durante las fases de maduración de los diferentes tipos celulares y poner en evidencia los caracteres diferenciales de los hemoparásitos.

El colorante da tonos de buena calidad y muestra con gran nitidez las células de la sangre de las diferentes especies estudiadas de anfibios, reptiles, aves y mamíferos. Sólo especificamos algunas de interés en biología marina.

Peces: Atún (*Thunnus thynnus*), sapo (*Halobatrachus didactylus*), sargo (*Diplodus sargus*), dorada (*Sparus aurata*) bonito (*Sarda sarda*), lisa (*Mugil auratus*), mojarra (*Diplodus vulgaris*), salmonete (*Mullus surmulletus*), salpa (*Sarpa salpa*), vieja (*Dentex filusus*), chova (*Pomatomus saltatrix*), caballa (*Scomber colias*), herrera (*Lythognathus mormyrus*) y róbalo (*Dicentrarchus labrax*).

Crustáceos: Langostino (*Penaeus kerathurus*), cangrejo (*Carcinus maenas*).

Moluscos: Ostión (*Crassostrea angulata*), ostra (*Ostrea edulis*), mejillón (*Mytilus edulis*) y almeja (*Tapes decussatus*).

MATERIAL Y MÉTODOS

A. — Preparación del colorante «Pancromo Azul G. 239» en polvo.

a) Todo el material estará químicamente limpio y seco y los productos serán de garantía.

Calentar a 80-85° C en baño-maría una cápsula de porcelana de fondo redondo que contiene 300 ml de una solución de carbonato sódico o potásico al 0,25 %. Añadir 8 g de Azul de Metileno y dejar durante 20 minutos, agitar suavemente con una varilla de vidrio cada 5 minutos, retirar la cápsula del baño y dejarla enfriar durante 10 minutos. Pasar todo el contenido a un vaso de precipitar en caliente que contiene una solución de 2g de Azul de Toluidina «0» en 500 ml de agua destilada a temperatura ambiente y agitar para homogeneizar. Añadir a la mezcla anterior una solución de 6,5 g de Eosina Amarillenta al agua y al alcohol en 200 ml de agua destilada.

Agitar para precipitar, pasados unos 10 minutos agitar nuevamente y colocar una gota sobre un trozo de papel de filtro, observar el halo cromatográfico formado alrededor del colorante precipitado, seguir añadiendo en pequeñas cantidades (0,1-0,2 g) Eosina hasta lograr que el halo sea de un color ligeramente rosado persistente.

Si nos pasamos, se ajusta el color, añadiendo un poco de Azul de Metileno.

Después de 1 hora, se comprueba que el halo sigue teniendo el mismo color y se deja el precipitado en reposo hasta el día siguiente. Decantar y recoger sobre un papel de filtro sin pliegues todo el colorante precipitado, lavar con unos 200 ml de agua destilada y repetir esta operación 3-4 veces (el agua de lavado tendrá un $\text{pH} = 7$). Dejar escurrir el precipitado unas 2 horas y llevar el filtro sobre la tapa de una caja de Petri a una estufa regulada a unos 45°C hasta lograr su total desecación. Recoger las escamas de colorante, pulverizarlas finamente y guardar en un frasco de color topacio con tapón de rosca.

b) Se puede obtener un colorante homogéneo a partir de tiazinas del mercado de la forma siguiente:

En un vaso de precipitar en caliente se ponen 800 ml de agua destilada calentada a unos $60\text{-}65^\circ \text{C}$ y se disuelven 3 g de Azul de Metileno, 3 g de Azur A, 1 g de Azur B, 1 g de Violeta de Metileno de Bernthsen y 2 g de Azul de Toluidina «0», agitar bien para disolver.

Se añaden para precipitar una solución de 6,5 g de Eosina amarillenta en 200 ml de agua destilada, agitar y continuar según se indica en (a). No hay que lavar el precipitado.

c) También se puede preparar el colorante a partir de una solución en agua destilada de 3 g de Azul de Metileno, 4 g de Azur I, 1 g de Violeta de Metileno de Bernthsen y 2 g de Azul de Toluidina «0», y precipitar con una solución acuosa de 6,5 g de Eosina Amarillenta haciéndolo como se describe en (b).

Si se quiere se puede sustituir la cantidad de Violeta de Metileno de Bernthsen por Azur B en (b) y por Azur I en (c).

B. — Preparación del colorante «Citopancromo» en solución:

Se añaden 1,6 g de «Pancromo Azul G 239» y 0,1 g de Azur I a 1000 ml de Metanol absoluto contenido en un frasco que tape bien, agitar 4-6 veces al día, repetir esta operación durante 4-6 días seguidos (o más días), filtrar y recoger la solución colorante lista para uso en frascos de color topacio con tapón de rosca y cuentagotas. La disolución se puede hacer en una estufa a 37°C durante 24 horas, y luego seguir a temperatura ambiente.

C. — Técnicas de empleo del «Citopancromo».

a) Método rápido: Para extensiones finas de sangre.

Cubrir la extensión de sangre seca con unas 20 gotas del colorante y dejar actuar 2 minutos. Añadir gota a gota con una pipeta, 1,5-2 ml de agua destilada o solución tampón de fosfatos a $\text{pH} = 7$, soplar suave y

rápidamente con la misma pipeta para homogeneizar y dejar actuar de 4-8 minutos. Lavar con agua destilada, escurrir y secar.

b) Método estándar: Para extensiones finas de sangre, frotis de órganos hemocitopoyéticos y citología en general.

Cubrir la extensión o el frotis con unas 20 gotas del colorante y dejar actuar de 2-3 minutos. Añadir 1,5-2 ml de agua destilada o tampón, homogeneizar y dejar 2 minutos. Tirar el colorante y cubrir seguidamente con una solución recién preparada de 9 gotas de colorante en 3 ml de agua destilada o tampón (se pueden añadir 3 gotas de glicerina neutra), dejar actuar de 15-25 minutos. Lavar con agua destilada, escurrir y secar.

COMENTARIOS Y RESULTADOS

El «Citopancromo» es una solución en Metanol absoluto de Eosinatos de tiazinas derivadas del Azul de Metileno parcialmente demetilado a pH alcalino; donde se originan, Azul A, Azur B y Violeta de Metileno de Bernthsen al que le añadimos Azul de Toluidina «0» que origina probablemente Violeta de Toluidina al sustituirse el grupo $-\text{NH}_2$ por $=\text{O}$. Además lleva en forma de colorantes básicos, el Azur A y B. Resulta de interés en este colorante la presencia del Eosinato de Azul de Toluidina que está muy ionizado en la fase de coloración (dilución con agua destilada o con solución tampón de fosfatos), lo que hace que se consiga una mejor y más limpia e intensa coloración de los sustratos acidófilos, tomando color rojo más vivo los granos de los leucocitos eosinófilos así como los eritrocitos que destacan especialmente a $\text{pH} = 6,4$.

Queda mejorada la coloración policromatófila de la serie eritrocítica en maduración y los granos metacromáticos de los leucocitos basófilos, tanto de la sangre como los tisulares.

La basofilia de las células inmaduras y el citoplasma de los linfocitos y de ciertos hemoparásitos se muestran en un color azul limpio con distintas intensidades.

La azurofilia es muy característica y brillante, a nivel de los granos de los promielocitos-mielocitos, monocitos, linfocitos y plaquetas. Dejamos constancia del color púrpura de los núcleos en general y el rojo-púrpura del núcleo de los hemoparásitos.

En resumen, se aprecia bien y se puede valorar, la basofilia, acidofilia, neutrofilia, metacromasia y azurofilia en las diferentes estructuras que sirven para el diagnóstico de un tipo de célula madura o en fase de maduración en citohematología comparada normal o patológica.

Los caracteres diferenciales de la sangre de aves (gallinas) y de peces (atún) quedan recogidos en los trabajos de GUTIÉRREZ (1964) y (1967).

SUMMARY

PREPARATION OF A STAIN FOR COMPARATIVE HEMATOLOGY. — We give the methods for to prepare a panchromic stain and the techniques of its employments. Also we described in general the characters of the blood cells, hemocytopoietic organ and hemoparasites.

BIBLIOGRAFÍA

- BAKER, J. R. — 1963. Principles of Biological Microtechnique. Methuen-Co. Ltd. (London), John Wiley-Sons Inc. (N.Y.).
- CONN, H. J. — 1961. Biological Stains. Williams-Wilkins Co. Baltimore.
- EMERY, A. J., E. STOIZ. — 1952. Paper chromatography for analysis of a dye mixture. *Stain Technol.*, (27): 21-28.
- EVANS, E. E., K. W. WALLS. — 1952. The separation of biological stains by filter paper electrophoresis. *J. Bacteriol.*, (63): 422-423.
- GURR, E. — 1960. Encyclopedia of microscopic stains. Williams-Wilkins Co. Baltimore.
- GUTIÉRREZ, M. — 1960a. Técnica para preparar un Fijador-Colorante-Rápido para hematología. *Laboratorio*, (6): 519-526.
- 1960b. Colorantes para citología hemática. *Ibidem*, (8): 107-110.
- 1962a. Eosinatos de azul de metileno y de azul de toluidina en la tinción de células sanguíneas. *Medicamente, ed. farm.*, (215): 26-27.
- 1962b. Leichte und rasche Herstellung eines Farbstoff-Fixatives (Blau G 239) für die Zytohämologie. *Blut.*, (8): 424-425.
- 1964. Aspectos citomorfológicos y citoquímicos de la sangre en el desarrollo del pollo: embrión, recién nacido y adulto. *Anales del Desarrollo*, 12 (26, 27, 28): 341-370.
- 1967. Estudios hematológicos en el atún, *Thunnus thynnus* (L.), de la costa sudatlántica de España. *Inv. Pesq.*, 31 (1): 53-90.
- HOLMES, W. C., R. W. FRENCH. — 1926. The oxidation products of methylene blue. *Stain Technol.*, (1): 17-26.
- MAS y MAGRO, F. — 1943. Técnica de hematología clínica. Ed. Científica Médica.