

# HEMATOTECNIA

## NORMAL

POR EL

Doctor Antonio González y Prats,

*Ex Interno, ex Ayudante, y Director  
de Museos anatómicos por oposición, y Catedrático  
supernumerario de la Facultad de Medicina de Granada; miembro del Ateneo  
de Ciencias antropológicas de Madrid, del Colegio Médico de Granada,  
laureado y de mérito de la R. S. Económica de Granada;  
colaborador de la «Gaceta Médica de Granada»,  
«R. de Oftalmología, Dermatología, etc.» de Madrid,  
de la «Médecine Scientifique de Paris»,  
etc., etc.*

~~~~~  
**Obra ilustrada con numerosas figuras.**  
~~~~~

GRANADA.

Imp. y Lit. de la Vda. e Hijos de P. V. Sabatel  
calle de Mesones, 52.

1897.

## PUBLICACIONES DEL DR. A. G. PRATS.

---

- 1 **Granulaciones de la conjuntiva.**—Tesis de Doctor calificada con nota de sobresaliente. Madrid, 1884.
- 2 **Del hipopión.**—Granada, 1885. (Publicado en la «R. de Especialidades de Madrid» y en «La Clínica» de Granada).
- 3 **Del orzuelo.**—Granada, 1887.
- 4 **Más sobre el hipopión.**—Granada, 1888. (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»).
- 5 **Preparación anatómica de la válvula existente en la desembocadura del conducto torácico.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada», 1887).
- 6 **Modo de plantear las Colonias escolares en Granada.**—Trabajo laureado con el *primer premio* en Certamen público de la R. S. Económica de Granada, é impreso á su costa. Granada, 1891.
- 7 **Hojas antropológicas de los niños que formaron la 1.ª Colonia escolar de vacaciones de Granada que costeó la R. S. Económica.** Granada, 1891.
- 8 **De la reproducción fotográfica en la ciencia médico-quirúrgica.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada 1891.
- 9 **Discurso-Memoria de los trabajos llevados á cabo en la Sección de Estudios para la Enseñanza de la mujer que costeó la R. S. Económica de Granada.** Leído en su sesión inaugural como Profesor Secretario de la misma. Granada, 1892.
- 10 **Programa de un curso de lengua alemana.**—Granada, 1894.
- 11 **Examen de la sangre viva circulante.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada, 1895.
- 12 **De la Sueroterapia.**—(Publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1895.

(Signe en 3ª plana).

Presentado, con otros dos ejemplares  
a la Biblioteca Universitaria y  
provincial de Granada en cumpli-  
miento a la ley de Propiedad in-  
telectual.

Granada 22 Julio 1897

D. Antonio - Ortiz

HEMATOTECNIA.

R. aludot.

al Depto. de Propiedad  
Intelectual





R. 25097

# HEMATOTECNIA

NORMAL, PATOLÓGICA Y JURÍDICA

POR EL

Dr. Antonio González Prats,

Catedrático Supernumerario de Medicina.

.....

1.<sup>ª</sup> PARTE.

**Hematotecnia normal.**

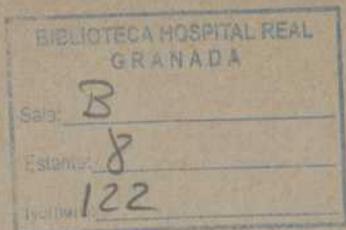
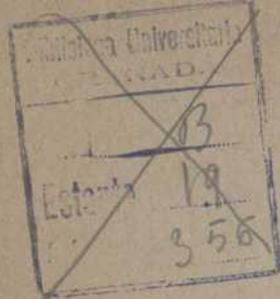
.....



GRANADA

IMP. LIT. Y LIB. DE LA VDA. É HIJOS DE P. V. SABATEL,  
calle de Mesones, número 52.

1897.



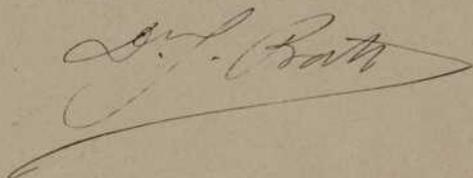
# HEMATOTECNIA

## NORMAL, PATOLÓGICA Y JURÍDICA

---

### CONSIDERACIONES PRELIMINARES

**E**L título de este modesto trabajo indica desde luego su fin esencialmente práctico. Siendo un hecho que cuantos adelantos y conquistas hanse logrado de poco tiempo acá en el humano saber, son debidos á los perseverantes esfuerzos llevados á cabo en los Laboratorios, inventando y perfeccionando instrumentos y aparatos, medios, métodos y procederes técnicos cada una vez más adecuados y determinativos, de tal modo y en tal grado de certeza, que años atrás ni sospechase pudieran; claro es que no se necesita insistir mucho para convencerse de la imperativa necesidad de educarnos y familiarizarnos en los derroteros técnicos sobre los que hoy caminan las ciencias todas. En lo que atañe á la ciencia del hombre enfermo nos ofrece un hermosísimo ejemplo los progresos proporcionados por el microscopio y espectróscopo, asociados ó no al análisis químico, como preciosísimos auxiliares en los esclarecimientos clínicos. Por virtud del



perfeccionamiento alcanzado en la técnica micro-química, se ha llegado casi por completo en nuestros días á disipar, cual se expresa nuestro sabio maestro DR. G. SOLÁ, «aquel verdadero mar de confusiones que envolvía el diagnóstico de las *nosohemias* antes de que la exploración amplificante y el análisis químico consiguieran darle la exactitud con que hoy día la contemplamos». Por otra parte, son interesantísimas en grado sumo las aplicaciones del examen micro-químico en los dudosos casos de Medicina-Legal, cual lo demuestran los casos de manchas de sangre, que solo á beneficio de estas exploraciones pueden diferenciarse «á pesar de su antigüedad y del lavado con que se intentara hacerlas desaparecer, etc.» (1) No obstante la extrema importancia de la microquímica no debe olvidarse la que relativamente también tienen los otros aparatos y procederes auxiliares en las determinaciones diagnósticas. De todo lo cual resulta la necesidad de conocer cuantos medios técnicos se han ideado para valorar los datos teóricos, y ponernos en disposición de aportar tal vez algunos nuevos hechos á los ya conocidos al establecer las reglas técnicas más adecuadas en la ejecución de las observaciones y experiencias que planteemos.

Uno de tantos capítulos de la técnica anatómica es el referente á las exploraciones de que es susceptible el medio interno—*sangre en el hombre*—, cuyas reglas hallanse hasta ahora sin constituir (al menos en España) un total único. Este es nuestro objeto. Intentar reunir

---

(1) E. GARCÍA SOLÁ: Man. de microquímica clínica, pág. 5. Madrid, 1876.

en un modesto manual cuantos consejos se han dado por los más eminentes sabios, al mejor y más acabado conocimiento de cuantas características tipifican la sangre en los diversos aspectos en que puede ésta hallarse.

Llámase HEMATOTECNIA el conjunto de reglas para examinar, analizar y diagnosticar el tejido hemático, ó sea, la manera adecuada de demostrar y descubrir los hechos y principios que condicionalmente integran á la sangre. Apellidámosla *normal*, *patológica* y *jurídica*, en consonancia con los tratados que establecemos en el desarrollo de tan vasto arte, según tiendan aquellas reglas á investigar las condiciones fisiológicas ó morbosas, ó á resolver los controvertidos casos médico-legales.

La sangre ó humor sanguíneo considérase por todos los modernos histologistas, cual uno de tantos tejidos constituyentes del complejismo orgánico; pero, un tejido cuyos componentes elementales histicos flotan y circulan en un líquido ó substancia intercelular de consistencia fluida, siempre que sus características típicas estático-dinámicas se hallen en condiciones de equilibrada normalidad. Tejido hemático que representa, cual gráficamente expresa el sabio histólogo español Dr. S. R. CAJAL, «el río que fecunda, y la cloaca que recoge las escorias de la vida celular». Y no obstante, su composición, principalmente en lo que afecta á sus elementos histicos, permanece inalterable, constante y con contadas diferencias analoga en cuantos puntos del organismo se examine. Sólo el medio líquido en que aquellos viven y circulan—verdadero medio interior orgánico—es el que sufre variaciones de calidad y cantidad; si

bien con la misma rapidez que se establecen, con idéntica ligereza se compensan, quedando, al fin, un término medio que puede señalarse, también, como típico normal.

Que es importante el conocimiento de todos los procedimientos por los que se valoran las diversas circunstancias condiciones en que dicho tejido puede hallarse, casi no se necesita aducir otra prueba, que el saber se trata del transportador, tanto de los materiales asimilables, cuanto de los desasimilados por los elementos hísticos fijos, y por consiguiente, cualquier desequilibrio, perturbación ó trastorno que en estos acaezca, necesariamente ha de reflejarse en modificación de la crisis sanguínea. De donde resulta que su examen por diversos medios técnicos ha de reportar utilidad para el conocimiento de las actuaciones y modo de ser, no sólo de cuanto se refiere á sus particularidades, si que también en lo que respecta á las de los demás componentes orgánicos con los que tan estrecha relación dicho tejido circulante guarda.

No es nuestro ánimo hacer un acabado estudio de la sangre; sólo nos proponemos intentar una exposición de cuantos artísticos procedimientos, en sus múltiples manipulaciones, se aconsejan en la actualidad, para descubrir ó comprobar todas sus características, tanto las del orden normal y patológico, cuanto aquellas á que habrá de recurrirse en litigiosos casos particulares del orden médico-legal.

La *división* de las materias comprendidas en este volumen no puede fundarse en un criterio exclusivo ni puramente científico, dada su gran variedad y su real é in-

mediata aplicación práctica, de modo que dicha división tiene que inspirarse en la conveniencia resultante entre la exposición de las materias en el libro y el ejercicio del arte en el laboratorio. Pretendiendo sirva de útil guía este libro en la práctica, y puesto que los distintos métodos en él desenvueltos tienden á demostrar el todo ó cada uno de los constituyentes hemáticos, en las más opuestas condiciones, la base, pues, para exponer tan rico material, ha de estar convencionalmente ajustada á la mayor claridad, y en armonía—por otra parte—con la marcha analítica seguida en el desenvolvimiento histórico del arte hemático. Resultando así, una ordenación de materias lo más metódica, clara y precisa, sin que se nos escape por demostrar ni un solo hecho sanguíneo; y siendo este orden eminentemente práctico, puesto que la naturaleza de las cosas serán las que determinen la elección de procedimientos adecuados para conocerlas, y ocasionando evidentemente reunir en cada uno de sus capítulos las operaciones más afines, puesto que sirven para la preparación de las partes más análogas.

En su virtud, establecemos tres partes distintas: en la primera agruparemos, lo más extensa y claramente que nos sea dable, cuantos métodos de investigación pueden emplearse en averiguación de las condiciones *normales* ó típicas de la sangre; en la segunda—no tan extensa—cuantas modificaciones de los métodos anteriores y procederes genuinamente especiales se aconsejan para investigar las condiciones del *patologismo* hemático; en la tercera y última, cuantas maneras y modos se sancionan en las determinaciones *periciales* para descubrir y dife-

renciair cantidades, más ó menos grandes de sangre, en controvertidos asuntos jurídicos.

Cierto que la mayor parte de los procederes ideados en averiguación de las características sanguíneas, en su estado típico y en sus variedades compatibles con la salud, son aplicables, con señaladas modificaciones, en el estado morbozo y en las determinaciones médico-legales; pero, si tenemos en cuenta, que tanto la técnica patológica cual la médico-legal, abarcan operaciones genuinamente especiales, propias y exclusivas de su cometido; que aun las comunes hánse de modificar, dado que el objeto investigado es perfectamente diferente; y por último, que la descripción simultánea y mezclada de artes de fines tan distintos, cual correspondientes á ciencias que estudian un mismo asunto mas en aspectos diversos, sería perjudicial á la claridad, y dificultaría la consulta del libro en el Laboratorio, se comprenderá el motivo que nos ha guiado al presentar y exponer la técnica sanguínea patológica y la médico-legal separadas, si bien á continuación de la normal, y haciendo, claro es, á ella referencias tan frecuentes como sean precisas, para evitar la repetición de lo mucho que á las tres partes es común.

Las subdivisiones ó capítulos que cada una de estas partes abrazará ajústase, desde luego, á la marcha que en el conocimiento de tejido tan interesante cual el hemático se sigue—con perfecto acuerdo—por todos los histologistas nacionales y extranjeros. En su consecuencia creemos estar dispensados de justificar tales subdivisiones con nuevos argumentos, impropios de obrita tan

elemental como ésta, y nos limitamos á presentar sinópticamente el orden de los asuntos prácticos que nos proponemos estudiar sucesivamente:

I.— <i>Modo de investigar las condiciones del normalismo hemático . . .</i>	}	A.—	Características morfo-genéticas.
		B.—	— físico-numéricas.
		C.—	— químico-biológicas.
II.— <i>Modo de investigar las condiciones del patologismo hemático . . .</i>	}	A.—	Alteraciones morfológicas.
		B.—	— físico-matemáticas.
		C.—	— químicas.
		D.—	— parasitarias.
		E.—	— tóxicas.
III.— <i>Modo de investigar la sangre en asuntos médico-jurídicos . . .</i>	}	Referentes á su existencia.	
		—	especie.
		—	origen.
		—	antigüedad.
		—	disposición.

---



# PRIMERA PARTE

---

## HEMATOTECNIA NORMAL

### A.

#### INVESTIGACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS MORFO-GENÉTICAS SANGUÍNEAS.

Comprende esta parte de la *Hematotecnia* cuantas reglas hay que seguir para investigar y observar la morfología y modo de generarse la sangre en totalidad, así como también lo referente á cada uno de los elementos que la integran en particular, ó sean los eritrocitos, leucocitos, plaquetas y plasma, en lo que respecta á su fibrina y suero.

Cuantos procederes se han ideado para esta clase de investigaciones pueden reducirse á los siguientes:

*a.*)—Preparados de sangre fresca con ó sin adición de los llamados líquidos conservadores;

*b.*)—Preparados de sangre seca con ó sin fijación de sus elementos celulares á favor de los denominados líquidos fijadores, y con ulterior empleo de los diferentes métodos tintóreos;

*c.*)—Preparados por corte, previa fijación y endurecimiento de la sangre ó de los trozos orgánicos que la contengan, y empleo á continuación de los colorantes.

Es regla técnica general que conviene no olvidar, la que preceptúa: la conveniencia—ya que no precisión imperativa—de combinar y utilizar varios de los métodos que seguidamente explanamos si queremos lograr seguros y positivos resultados.

### I.—Obtención de sangre.

Por regla general es bastante pequeñas gotitas de sangre; sin embargo, en algunas ocasiones ó determinadas investigaciones precisa tenerla en grandes cantidades.

En la mitad pasada del corriente siglo, cuando bajo el imperio de determinados criterios médicos se extraía sangre en abundancia, y los prácticos deducían juicios de los caracteres presentados del diferente aspecto macroscópico del coágulo, por ejemplo, facilitábanse, por razón de la dicha abundancia, los análisis sanguíneos más ó menos precisos y de detalle, que por aquel entonces, en averiguación de las condiciones químicas hematológicas, se practicaban en grande escala. Resultancia fecunda, esos preciosos trabajos analíticos que aun hoy son consultados por los amantes de la verdad, pues ciertamente dejan poco que desear por lo precisos y exactos. Ahora bien, aun hay observadores—si bien en corto número—que solo con el fin de investigar científicamente la química sanguínea, practican verdaderas sangrías, sustracciones realmente considerables de líquido hemático de que disponer en sus múltiples manipulaciones.

Hoy, no obstante, la mayoría de los hematologistas al no necesitar tanta sangre cual se exige en los procederes

genuinamente químicos, y dados los perfeccionamientos con que contamos para hacer un acabado estudio analítico de la misma (físico, anatómico, bacteriológico, etc.), se contentan con algunas gotas de ella recogidas por medio de punciones practicadas, bien en la superficie cutánea, bien en los órganos continentales de sangre, siguiendo variables reglas, según sea la finalidad del examen, y sometiendo después aquella minúscula porción sanguínea á definidas manipulaciones, diferentes según pretendamos inquirir sus diversas características, incluso las químicas, por cuya superior razón tanto al fin han prevalecido estos modos de proceder.

Esto, no obstante, cuando tengamos necesidad de *grandes masas sanguíneas* nos las proporcionaremos, bien utilizando la derramada en sangrías y escarificaciones, bien practicando por nosotros mismos dichas operaciones, según reglas que suponemos conocidas. A fin de obtenerla, en estos casos, en estado de pureza completa, y tal cual se halla dentro de sus cerrados conductos, procederemos del modo siguiente: buscándola dentro del corazón (en los animales), ó en el interior de los vasos, en el hombre y animales muy corpulentos: se aísla y pone al descubierto el órgano que nos ha de surtir de sangre, se asea escrupulosamente separando todos los líquidos intersticiales, y se abre con unas tijeritas, ó mejor se punciona con una pipeta de cristal de punta muy aguda. Penetra de este modo la sangre desde el órgano á la pipeta recolectora sin contactar con el aire. Si no penetrara en dicha pipeta la sangre en cantidad suficiente, obviaremos el percance succionando por el extremo externo de ella

hasta que se llene de la cantidad precisa á la experiencia que se intenta.

Cuando se trata sencillamente de estudiar de modo individual los elementos figurados de la sangre, y no está absolutamente pura, ó sea cuando solo necesitamos *pequeñas cantidades sanguíneas*, procederemos por picadura, excepción hecha de los batracios y peces, en los que la picadura de la superficie tegumentaria proporciona más linfa que sangre.

Los *sitios de elección* para practicar la picadura, son: la oreja ó el pulpejo de las patas en animales como el perro y el conejo; el pabellón de la oreja y la yema del dedo en el hombre. Alguna vez, puede ser elegida la punta de la nariz ó de la lengua en algunos animales. La cantidad de linfa que mezclada á la sangre sale, atravesando los tejidos interesados por la punción, es tan pequeña que casi no es de tener en cuenta, sobre todo cuando se opera en regiones cual las dichas, que están recorridas por una muy rica red de capilares sanguíneos.

En los batracios, pecés y en general animales de corta talla, proporciona muy buenos resultados buscar la sangre directamente en el corazón. Para ello, y después de descubierto el órgano, ó bien se coge con unas pinzas la punta del corazón, se corta, y de la sangre que brota de la punta misma se untan los cristales (Böhm), ó se incinde desde luego y se recoge con cuenta-gotas bien limpio, ó se punciona con una pequeña pipeta de cristal afilada, ó con capilares de vidrio, con los que transportamos la sangre recolectada.

En condiciones determinadas, en las que hay que huir

de contaminaciones microbicas, se procederá según aconseja ZITMANN: este autor punciona directamente la vena del pliegue del codo, mediante una jeringuita previamente esterilizada. Así obtenida la sangre rara vez es fecunda, negación que indica que ella es por excepción residencia de microbios patógenos, y que éstos en las infecciones, pasan rápidamente por el mar hemático para ir á fijarse en la profundidad de los órganos.

Conviene tener en cuenta las siguientes *precauciones* técnicas si pretendemos lograr la obtención de preparados puros: suponiendo sea la del hombre la investigada y que hemos elegido la pulpa del dedo, es necesario ligar ó vendar un corto trayecto del mismo, con objeto de que produciendo algo de éxtasis ó hiperhemia temporal, mayor sea la cantidad de sangre.

La limpieza previa de los dedos que se van á pinchar para la recolecta de gotas sanguíneas, puede hacerse con agua, soluciones jabonosas, fenicadas ó sublimadas, éter, alcohol. Como puede este lavado, ó mejor las substancias empleadas para llevarlo á cabo, alterar tal vez de modo notable la forma de los glóbulos sanguíneos, no la deberemos practicar cuando sea interesante la conservación integral de su propia forma, cual ocurre, por ejemplo, en la oligocithemia. Por el contrario, es ley hematotécnica, practicar un escrupuloso aseo siempre que se traten de examinar los microgérmenes patógenos de la sangre. Sabido es que en estado normal hállase la piel cubierta de microbios: saprofitos unos, otros patógenos, sobre todo cuando les rodea el medio hospitalario, ó tras de contacto

con personas afectas de cualquier supuración. Microbios que alguna vez hundiéndose en los surcos cutáneos, y en las desembocaduras de las glándulas resisten á los lavados desinfectantes, como no persistan largo tiempo los líquidos microbicidas, persistencia no muy posible en la práctica.

La punción se practicará en la pulpa del dedo y lo más cerca de la uña, en un solo golpe seco, y no muy superficial, con lanceta ordinaria ó de vacunar, ó aguja muy fina y fuerte.

Los instrumentos que se utilicen para pinchar es preciso ponerles en estado de la más completa limpieza. Á este fin se calentarán á la llama de una lámpara de alcohol ó de un mechero de gas, enfriándolos rápidamente en agua esterilizada, alcohol y éter; después de enjugados en un lienzo limpio se volverán á someter á la acción de la llama.

Igualmente se asearán escrupulosamente los cristales porta y cubre-objetos, así como los de reloj, en los que hay que manipular para obtener preparados hemáticos. WEICHELBAUM aconseja hacerlo del siguiente modo: se lavan sucesivamente en agua caliente, alcohol y amoníaco, y alcohol solo; se secan y se pasan ligeramente por la llama después.

Conviene untar del vértice ó parte más alta de la gota sanguínea salida en el sitio de la punción, con el laudable fin de no impurificar el preparado con las células epitélicas cutáneas desprendidas al practicar la picadura, ó con cualquier otro elemento extraño, que más adelante sería casi de todo punto imposible el desterrar ó separar.

Por las mismas consideraciones, algunos autores aconsejan no aprovechar la primera gota sanguínea saliente, y solo utilizar las ulteriores (Ström).

Cuando se trate de animales de pluma ó pelo, no olvidaremos cortar ó rasurar una ú otro, y limpiar después cuidadosamente la piel puesta ya al descubierto.

Cuantas manipulaciones hay que practicar en la obtención de preparados de tejido tan vulnerable y fácilmente descomponible, cual es el hemático, se ejecutarán con tal agilidad y ligereza, que no se menoscaben en nada las características morfológicas que van á investigarse.

Ahora bien; obrando prontamente y dado lo relativamente facil y elegante que es hacer y renovar preparaciones sanguíneas, no precisa, de ordinario, el conservarlas. Sin embargo, puede ser precisa la conservación y necesario también el convertir en definitivas preparaciones de esta índole.

En efecto, la mayoría de las pruebas y experiencias á que se somete la sangre, dan solo por resultado preparados del momento, mas ó menos temporales, pero de difícil conservación, y por ende dificultándose su almacenamiento definitivo para en ulteriores exámenes servir de comprobación á asertos establecidos. No obstante, en los métodos que sus autores lo indiquen explanaremos sus consejos, tal cual ellos lo hagan, y en los demás casos intentaremos exponer, bajo el dictado de nuestra propia experiencia, unos consejos de maniobras á fin de hacer definitivas la mayor parte de las preparaciones que se ejecuten sobre sangre.

Y conviene nos fijemos, no es tan baladí el poder lo-



grar tener definitivas las preparaciones sanguíneas ó no, y consiguientemente guardarlas. En casos litigiosos—de orden científico puramente ó de orden jurídico—importa sobre manera, y muy especialmente, el guardar, conservar cual prueba testifical de los hechos aseverados ó certificados, el objeto en donde hayamos recogido y se manifieste tal observación. Intento de conservación que debemos llevarlo al extremo que ni la luz, ni la gravedad, ni el calor, ni la humedad, etc., ni ningún agente, en una palabra, que pudiera alterar ó mermar las condiciones demostrativas de un preparado, pueda actuar ocasionándolo; es decir, que aquél se mantenga en el mismo estado en el que lo estudiáramos ó halláramos por vez primera, y de este modo poder siempre recoger una misma imagen.

Claro es que esto no lo podremos lograr en aquellas manipulaciones reaccionales de paso ó transitorias que solo son observables en el momento oportuno de producirse ó manifestarse. Pero sus resultancias en lo que tienen de estables ó cuando por medios adecuados las podemos fijar, si intentaremos, al menos, el conseguirlo. Á este fin se han ideado y emplean medios y substancias diversas para conservar y fijar la forma de los elementos hemáticos.

## II.—Medios de conservar y fijar la sangre.

Los *medios conservadores* cuya utilización nos reportará más beneficios, son los expresados á continuación.

a.)—**Solución acuosa de cloruro de sodio.**—Muy útil

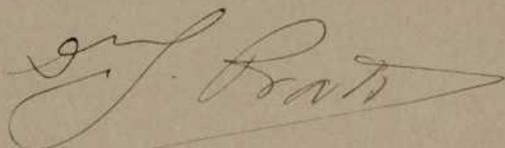
y conveniente. Debe tenerse con distintos grados de concentración, pues según BIZZOZERO hay que probar cual es el necesario para cada especie animal en particular. Concentración que oscila entre 1,0 (JAKSCH), 0,6—0,75 (solución fisiológica de la Escuela belga, y á la que CARNOY adiciona ácido ósmico) y 0,8 por 100.

b.)—**Sueros naturales**, como el de la sangre, linfa ó líquido amniótico de la misma clase de animal. También puede servirnos el humor acuoso. Estos líquidos pueden usarse solos ó también mezclados con yodo, y aun en el momento de usarlos adicionarles al nivel del borde del cubre-objetos, cual recomienda KAHLDEN, un líquido colorante. Es decir, hacer confluír, por ejemplo, una gota de humor acuoso y otra de solución fisiológica de sal común coloreada con verde de metilo.

c.)—**Licor yodo-yodurado** de tinte amarillo vinoso. Muy útil para hacer ostensibles las sombras eritrocíticas. Este licor tintóreo le señala HAYEM cual substancia que no disuelve la hemoglobina. En su virtud, si se coloca, dice KAHLDEN, una solución agradable de color pardo, medianamente intenso, en una preparación de sangre seca, adquieren todos los elementos continentales de hemoglobina un color pardo con tinte violáceo la mayor parte de las veces. De aquí lo sencillísimo y útil de este proceder para investigar la existencia de los glóbulos rojos nucleados en los animales recién nacidos.

d.)—**Ácido pícrico** en solución saturada acuosa, que tiene la misma propiedad que el licor anterior.

e.)—**Nitrato de plata** en solución proporcional de 0,5 por 100, si bien muy poco usada.



f.)—Licor de PACINI.—Su constitución es:

Bicloruro de mercurio. . . . .	1 —
Cloruro sódico . . . . .	2 —
Agua . . . . .	210 —

M. Fórmula de KAHLDEN (1).

Bicloruro de mercurio. . . . .	1 —
Cloruro sódico . . . . .	2 —
Agua. . . . .	13 —
Glicerina. . . . .	113 —

M. Fórmula de FREY (2).

Debe renovarse cada dos meses. Al tiempo de emplearse se diluirá 1 — de cualquiera de las fórmulas anteriores, con 3 — (FREY) ó con 2 — (LANDOIS) de agua destilada, y se filtrará.

g.)—Licor de HAYEM.—Es una modificación del anterior:

Bicloruro de mercurio . . . . .	0,5 —
Cloruro sódico. . . . .	1 —
Sulfato de sosa puro. . . . .	5 —
Agua destilada. . . . .	200 —

M.

Su autor—cual veremos más adelante—la recomienda como excelente para la numeración globular hemática en todos los animales, aun en los casos de anemia (3) muy acentuada. La sangre se mezclará con este licor en la

(1) KAHLDEN.—Technik der histolog. Untersuchung patholog. anatom — Pág. 80.—3.ª ed. Jena.—1893.

(2) FREY.—Das Mikroskop und die mikroskopische technik.—Leipzig.—1873.

(3) HAYEM.—Du sang et de ses alterations anatomiques.—Paris, 1880, página 16-28.

proporción 1 : 100. En perfecto reposo se dejará durante 12—24 horas la mezcla, á fin de que se precipiten tranquilamente los elementos conformados de la sangre. Se decanta el líquido de la parte superior y se lava el precipitado con agua. Después se pueden teñir los elementos así endurecidos y conservados, con hematoxilina. También puede hacerse á la vez la coloración, añadiendo directamente al licor eosina, y conservar la preparación en glicerina. En este licor se pueden también conservar sutiles membranas y órganos vasculares, como, por ejemplo, mesenterio, cola de renacuajo, etc., y manipulando después de modo análogo, quedan bien perceptibles los glóbulos sanguíneos *in situ*. Esta misma fórmula adicionada con 10 — de glicerina neutra á 28° BEAUMÉ, dice el propio HAYEM, que fija inmediatamente los glóbulos especialmente los hematoblastos.

*h.*)—Licor de BOUILLARD (1).—

Solución A de goma arábica bien blanca en agua destilada al 8 por 100.

Solución B de sal común limpia en agua destilada al 3 por 100.

Solución C acuosa de sulfato sódico al 5 por 100.

Todos los menstruos deben marcar en el areómetro de BEAUMÉ, 1022°. Para emplearle se mezclarán B y C, y á los 200 — de la mezcla adiciónese 65<sup>cc</sup> de la solución A. Resultará después de filtrado un suero artificial útil para la conservación temporal, y de consiguiente la numeración sanguínea. Agréguesele unas parcelas de alcanfor en evitación de posibles descomposiciones.

---

(1) BOUILLARD.—Et. prat. s. le numeration de globules du sang, 1882.

i.)—**Suero artificial colorante.**—

Solución concentrada en alcohol de fuchina diamante . . . . .	4 —
Sal común. . . . .	1 —
Sulfato de sosa . . . . .	3 —
Agua . . . . .	100 —

M.

Útil para el estudio morfológico y numérico de los leucocitos.

j.)—**Licor conservador de GROEBER.**—

Sulfato de magnesia. . . . .	5 —
Agua. . . . .	100 —

Muy poco usado.

El empleo de todos estos diversos líquidos adicionales y otras mezclas, como las de AFANASIEW, MALASSEZ, JAKSCH, etc., que más adelante apuntaremos, y aconsejados con fines particulares tienen limitada su utilización. En efecto, raro es el de ellos que por sí solo empleado colocan á las preparaciones en condiciones de convertirlas en permanentes, toda vez que no impiden con seguridad los cambios estructurales del núcleo celular.

Este inconveniente se obvia empleando los conocidos *medios fijadores*, si bien por estos tal vez la forma externa celular en más de una ocasión se alterará. Entre otros citaremos, como más útiles á nuestros particulares intentos, los siguientes:

a.)—**Ácido acético** en solución acuosa al 1 por 100.

b.)—**Ácido ósmico.**—Soluciones desde 1—2 por 100. —Según BÖHM Y OPPEL proporciona muy buenos resultados hacer actuar los vapores ósmicos sobre una delgadita

capa de sangre extendida en un cristalito. El modo de obrar es igual que cuando se utiliza para matar rápidamente pequeños organismos. Es decir: en un frasco chato, de boca ancha, se vierten unas gotas de ácido ósmico, y, ó se tapa con el porta-objetos, sobre el que está extendida la sangre, de modo que la cara untada mire el interior del bote, ó si es un cubre-objetos el untado, se prende de un hilo pegado con gota de parafina en uno de sus ángulos, y se cuelga en el interior del frasco, sin que jamás toque la capita hemática ensayada al mismo ácido, tapando el frasco con cierre de cristal.

Las soluciones ósmicas pueden emplearse también, cual aconseja, entre otros, **RENAUT**, del modo siguiente: se mezcla rápidamente la gotita de sangre con otra gota de solución ósmica al 1 por 100, sobre el porta-objetos, por medio de una agujita de cristal ó de la extremidad de la pipeta con la que se ha recogido la sangre. Todo esto ejecutado con gran presteza, haciendo el examen en cuanto esté cerrada la preparación, porque si bien son apresados los elementos en seguida por el reactivo y fijados en su forma casi exacta, al cabo de unos minutos es atacado el mar plásmico que le rodea y se opera la coagulación, cuyo retículo fibrinoso deforma mecánicamente los elementos que aprisiona.

Los vapores ósmicos gozan de la propiedad, al actuar sobre preparados secos hemáticos, de quitar á la hemoglobina su solubilidad y facilidad de escaparse del eritrocito (**HAYEM**).

*c.*)—**Soluciones cromo-osmo-acéticas.**—La mayor parte de los autores, cual dice **KAHLDEN**, modifican cada uno

por sí la formulación de estos solutos. Aquí vamos tan solo á transcribir las dadas por STÖHR, H. FOL y FLEMMING, que de entre todas representa el término medio típico de las soluciones débiles, flojas, suaves y fuertes.

	STÖHR.	H. FOL.	FLEMMING.	
	<i>Fuerte.</i>	<i>Floja.</i>	<i>Débil.</i>	<i>Suave.</i>
Acido crómico	1 por 100—100	1 por 100— 25	1 por 100— 25	4 por 100— 15
Acido ósmico	2 por 100— 12	1 por 100— 2	1 por 100— 10	2 por 100— 4
Acido acético.	glacial—0.04	2 por 100— 5	1 por 100— 10	glacial — 1
		Más 68 de agua destilada.	Más 55 de agua destilada	

De todas estas fórmulas, la más recomendable es la de STÖHR, porque ennegrece poco, por la posibilidad de dejar los cristales untados en sangre durante más tiempo sumergidos en el licor, y entorpecer menos que los otros caldos las necesarias coloraciones ulteriores. Estas tinciones se hacen, ó adicionando al líquido fijador, por ejemplo, verde de metilo, zafranina, etc., ó tiñendo después de ejecutada la preparación húmeda, seca ó por corte.

*d.*)—**Líquido fijador de ZENKER.**—La fórmula, que tras largas tentativas y experiencias hechas en el Instituto de Anatomía patológica de Erlangen, por su primer asistente ZENKER (1), ha logrado llamar la atención y merecido el aplauso de histologistas tan distinguidos cual STÖHR, en

(1) Según su nota publicada en Münchener Medicinische Wochenschrift, núm. 27.—1894.

el Instituto anatómico de Zürich, y A. MERCIER (1) y FELIX, es la constituida por:

Agua destilada. . . . .	100	—
Sublimado corrosivo. . . . .	5	—
Bicromato de potasa. : . . . .	2,5	—
Sulfato de sosa. . . . .	1	—

Adiciónesele en el momento de usarla, en evitación de las precipitaciones que produce, ácido acético glacial en proporción de 1<sup>cc.</sup> de ácido por cada 20<sup>cc.</sup> de líquido fundamental.

Por la acción de este reactivo los glóbulos sanguíneos se conservan en perfecto estado de conservación y coloración, tanto en preparaciones de sangre fresca, cuanto en las demostrativas de aquellos elementos en cortes de tejidos vasculares.

El tratamiento ulterior será: lavado en agua; trasiego por alcoholes de concentración cada vez más grande; trasiego al alcohol iódico renovado; baño á la tintura colorante; lavados en alcohol solo, con esencia bergamota, y solo de esencia; montaje al bálsamo Canadá.

*e.*)—**Calor.**—Fijador de rápida y segura acción pero de difícil manejo, siendo el utilizado en preparaciones hemáticas el *calor seco*. La mayoría de los hematólogos aconsejan obrar cual á continuación exponemos, para obtener la *deseccación brusca*. Se extiende rápidamente la pequeña cantidad de sangre que puede cargar la punta de una aguja de cristal sobre el centro de una de las caras de un porta-objetos, que se calienta de 50°—80° C.

---

(1) MERCIER.—A propos d'une nouvelle méthode de fixation. Bibliographie Anatomique de Nancy. 1894. N. 6.

y agitando en seguida en el aire muy de prisa, quedarán desecados y adheridos al cristal los glóbulos. Se termina la operación pegando el cubre con bálsamo Canadá.

Solo la práctica enseña qué temperatura debe darse al porta para lograr una desecación conveniente, pues cuando se calienta demasiado el cristal, pasa el calor de sus justos límites y ocasiona la pérdida del agua protoplasmática de los glóbulos, que aparecen entonces deformados, angulosos y aun reducidos á gránulos de verdadero detritus; es decir, sobreviniendo la eritrocitotripsia.

En los casos felices, se obtiene una fijación de los elementos en su forma y dimensiones, de tal índole, que pueden hacerse preparaciones permanentes ó persistentes, que pueden guardarse al aire libre indefinidamente, ó conservarse, después de exponer la tenue capa seca de sangre á los humos ósmicos, de teñirla y cerrarla en glicerina ó bálsamo. De tal modo, tan poco varía el volumen y forma de los glóbulos, que ha servido esta manera de manipular á WELCKER y MALASSEZ frecuentemente para sus mensuraciones micrométricas.

El aspecto de preparados así ejecutados, es: el núcleo de los eritrocitos de los animales amamalianos — cual dice RENAULT—aparece limpiamente en claro sobre el fondo amarillo naranjado del disco, con su forma aboyada, siendo raros los glóbulos deformados en las preparaciones de sangre de los mamíferos.

La desecación lenta produce, entre otras deformaciones, la separación del estroma globular y su materia colorante, por cuya razón habrá que pecar de exceso más bien que de defecto. Parece ser que ha sido EHRLICH el

primero en demostrar que se puede evitar se disuelva la hemoglobina, y se dificulte en ulteriores manipulaciones su salida á favor de temperaturas altas. Aconseja colocar portas ó cubres untados de tenue capa de sangre, sobre plancha de cobre calentada de 120°—150° durante varias horas.

### III.—Examen de la sangre viva circulante.

Para observar fácilmente el tejido hemático en su completa integridad, con todos sus elementos morfológicos vivos, nada mejor que practicar este interesante examen en los territorios vasculares de partes membranosas transparentes, por cuyos cerrados canales camina el liquido sanguíneo.

Ningunos sitios más útiles para sorprender con el microscopio este interesante fenómeno, que: la cola del renacuajo, las larvas de urodelo, pulmón, mesenterio, lengua y membrana interdigital de la rana viva, epiploón

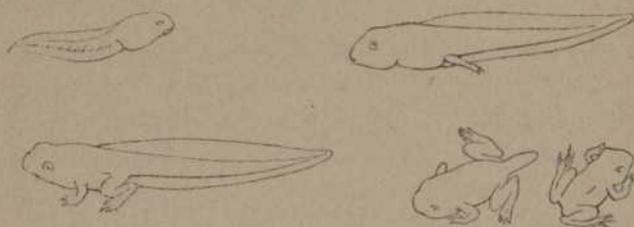


Fig. 1.<sup>a</sup>—Alas murciélago extendidas.

y mesenterio de pequeños mamíferos, como rata, ratón, conejillo indiano, ala del murciélago muy joven, (*Fig. 1.<sup>a</sup>*) etc., previa anestesia del animal para inmovilizarlo.

En ninguna parte se percibe y sorprende el fenómeno de la circulación hemática, con tanta claridad y belleza, cual en las expansiones membranosas de la cola del renacuajo y de las larvas de urodelo.

1.º—Larvas de batracios.—Para ello se saca del agua un *renacuajo* (*Fig. 2.ª*) que mida 2—3 centímetros de lon-



*Fig. 2.ª*—Larvas de rana.

gitud, y se le coloca encima de un porta-objetos ordinario, procurando no salte, á cuyo fin se le comprime con una varilla de vidrio. Se puede con ventaja utilizar á este objeto el llamado *si/ón* de HOLMÁN que consiste: en un porta-objetos grueso, cuya cara superior tiene dos excavaciones ovoideas que comunican entre sí por una canalita, y de un tamaño tal, que puede colocarse extendido un pececito, un renacuajo ú otro animal pequeño á lo largo de las dos hoquedades y mantenerlos en una posición dada sin exceso de presión. Parten desde las cavidades hacia los bordes del cristal, unos canalitos ó tubos metálicos, que se continúan con tubitos de goma, de modo que queda establecida una continua corriente fluida desde el momento que uno de los tubos sirve de entrada y otro

de salida del líquido frío ó caliente que ha de actuar sobre el animal. Para hacer uso del sifón, bastará colocar el renacuajo con un poco de agua sobre la canalita media, quedando así el cuerpo en una cavidad y la cola en otra; se cubre con laminita de cristal delgada y grande; se introduce uno de los tubitos de goma en una vasija con agua, y succionando por el otro tubo, pasará el agua por todo el aparato, vaciándose en otra vasija. Colocado el aparatito sobre la platina del microscopio, cuidese de que la vasija que sirve de depósito, esté un tanto más alta que la que recoge el líquido derramado, si bien las dos vasijas ó frascos se hallarán á nivel inferior que la platina, á fin de que hallándose el cubre-objetos en la parte más culminante del sifón, se adapte y apriete por la simple presión atmosférica, sin que se necesite de más para enfocar. Este aparato es realmente excelente, adaptándolo al microscopio de gas, puesto que por medio de la corriente constante de agua fría, el animal (tritón) puede mantenerse en el foco durante varias horas. (1)

Para inmovilizar el renacuajo, nos valdremos de la anestesia, haciéndole pasar varias veces por sus tubérculos nasales y abertura bucal un pincelito empapado en amileno, cloroformo ó éter. En los renacuajos muy pequeños hay que tener la precaución de reducir á muy cortos instantes la anestesia, pues mueren á poco que se prolongue.

---

(1) Este aparatito lo expende el óptico norte-americano J. ZENTMAYER al precio de P. 4 con todos sus accesorios; y el óptico inglés R. & J. BECK al de P. 8 según anuncian en sus respectivos Catálogos.—ZENTMAYER: 209 South eleventh street, Philadelphia.—BECK: 68 Cornhill, E. C., Londres.

Según el DR. G. SOLÁ, es este medio anestésico—cual hemos podido observar nosotros también—más cómodo y expedito que el conocido baño de agua templada á 38° C. (CL. BERNARD), y mejor que la curarización ó la destrucción de la médula cervical. La curarización de las larvas se obtiene sumergiéndolas en una solución muy diluida de curare (1 : 1.000); pero como la absorción del tóxico no se hace al través de la piel íntegra, es preciso inferir con una aguja pequeñas picaduras en ella para que tenga lugar la penetración del veneno, paralizándose el animalito. Para continuar la observación durante varias horas, hay que mojar continuamente el cuerpo de la larva, por medio de un pincel empapado en agua fría. Anestesiado el renacuajo, se enfoca, de modo que lo examinado sea, bien la punta ó uno de los bordes de la cola, por ser estas regiones las más delgadas y transparentes.

2.º—Peces.—(1) Como hoy es fácil proporcionarnos de cualquier *acuarium*, jóvenes pececitos (un hijuelo de 2 centímetros de largo, de trucha ó salmón son los mejores) que tengan saliente fuera del abdomen la vesícula transparente umbilical y natatoria, podremos utilizarlos para observar cuál corren sus glóbulos sanguíneos por los capilares de sus paredes. Para ello, ó se pone el pececito en un cristal de reloj con un poco de agua, ó se introduce en las hoquedades del sifón de HOLMAN y se observa directamente dicha vesícula.

Pudiéramos hacernos una especie de porta-objetos con

---

(1) SCHÖNLEIN y WILLEM: Observations sur la circulation du sang chez quelques poissons. Bull. sc de la Fr. et de la Belg. 1895, t. XXVI., págs., 1-27, con figuras.

mortaja en la que se aloje el pececito del modo siguiente, según FRANCOTTE: se rodea un porta-objetos bien seco de un reborde de papel de medio centímetro de ancho, formándose así una cajita en la que se vierte parafina líquida á una temperatura de 70.º En el momento que vaya á producirse la solidificación, se sumerge un pececito del tamaño del que vayamos á observar, procurando tenderlo de costado. Cuidese de que no aprese al animal la parafina que se va solidificando, para lo cual bastará mojar el pececito. De este modo quedará impreso un hueco en el blok de parafina; en el punto donde se haya impreso la nadadora caudal, se separará completamente la parafina, dejándola en los demás sitios.

En el molde así preparado, se introduce un pez vivo cubriéndole con un poco de agua. Se sujetará con unas tiritas de papel de filtro que se fijarán con alfileres á la parafina. Todo así dispuesto, se lleva á la platina del microscopio, enfocando la nadadora caudal que es muy transparente. Fácilmente se comprende que, tallando de modo adecuado previamente la parafina, no habrá dificultad en colocar un cubre.

3.º—Rana adulta.—En este utilísimo animal podemos ver la sangre circulando viva en el pulmón, mesenterio, lengua, y membrana interdigital.

a.)—Pulmón.—Para adquirir una idea clara del fenómeno circulatorio hemático en el pulmón de la rana adulta viva, es utilísimo el ingenioso aparatito de HOLMGREM (1). Consiste éste en una tabla rectangular de cao-

(1) El óptico francés VERICK (hoy su sucesor M. STIASSNIE, r. des Ecoles 43) ofrece este aparato por 25 fr.—La casa R. DROSTEN de Bruselas (r. des Boiteux 23) pide 35 fr.

ba á modo de gran porta-objetos, la que está horadada en su parte lateral; abertura reforzada con una anilla metálica que lleva una laminita de cristal circular; sobre este pequeño sostén existe otro anillo metálico del mismo diámetro que el inferior y cual él también cerrado por otro disco de cristal que hace oficio de cubre-objetos; este anillo á favor de una cremallera, puede separarse más ó menos del porta-objetos y paralelamente á su superficie.

La insuflación del pulmón se hace por medio de una cánula especial introducida en la glotis. El aparato insuflador se compone de una cánula fina de unos dos milímetros de luz, que tiene en su parte anterior varios orificios, tras de los que hay dos ranuritas distanciadas 6—8 mm.; por la parte posterior se continúa y comunica con un tubo de goma, al que se adapta por su otro extremo una cánula con llave.

La observación se practicará del modo siguiente: inmovilícese una rana, bien curarizándola, bien puncionándole la médula; córtense de un tijeretazo las comisuras bucales, incluso los maxilares inferiores y aplíquese el insuflador acondicionado del modo siguiente: extraído de otra rana un trozo de 12 mm. de largo de intestino grueso, vacío y bien lavado, se envaina en la canulita bucal, sujetando sus dos extremidades mediante dos hilos finos á las dos ranuritas, cuidando no quede colocado tirante el trocito intestinal que forma como un manguito de la cánula. Si después de replegar las porciones de ese intestino que pasan por encima de las ranuras, se introduce la cánula así armada en la glotis de la

rana, y se insufla; el aire llenará el pulmón, de modo que dilatando el manguito que rodea la cánula, impedirá salir de las vías aéreas. La insuflación se hace soplando aire con la boca por la cánula con llave que entonces se abrirá.

Se abre ahora la pared pectoral izquierda por fuera de las venas laterales con un escalpelo caliente, para evitar la hemorragia, á favor de una sección de unos 14 mm. de larga; soplando saldrá por la herida torácica el pulmón inflado; cerrada entonces la llave del insuflador, se coloca la rana en decúbito supino sobre las láminas de corcho que existen en la cara superior del aparato de HOLMGREN, de tal modo, que se coloque el pulmón salido entre los dos anillos. Si entonces bajamos á favor de la cremallera el anillo superior, comprimiémos entre los dos cristales al pulmón, que entonces presenta superficies planas en las mejores condiciones para sorprender el maravilloso fenómeno.

b.)—Mesenterio. (*Fig. 5.<sup>a</sup>*)—Si tratamos de observar el fenómeno en el mesenterio de la rana, deberemos en primer término elegir un animal macho, á fin de evitar la interposición del ovario que llena casi todo el abdomen de la hembra. Distingúense los machos por poseer un tubérculo negro en la eminencia tenar de la mano.

La inmovilización se logrará inyectando bajo la piel del dorso tres ó cuatro gotas de una solución de curare al uno por ciento. Al cuarto de hora queda inmóvil el animal sin respiración pulmonar, por cuyo motivo se le mojará la piel de cuando en cuando para que no cese la respiración cutánea y sobrevenga la asfixia.

Para extraer el mesenterio se practica en la parte late-

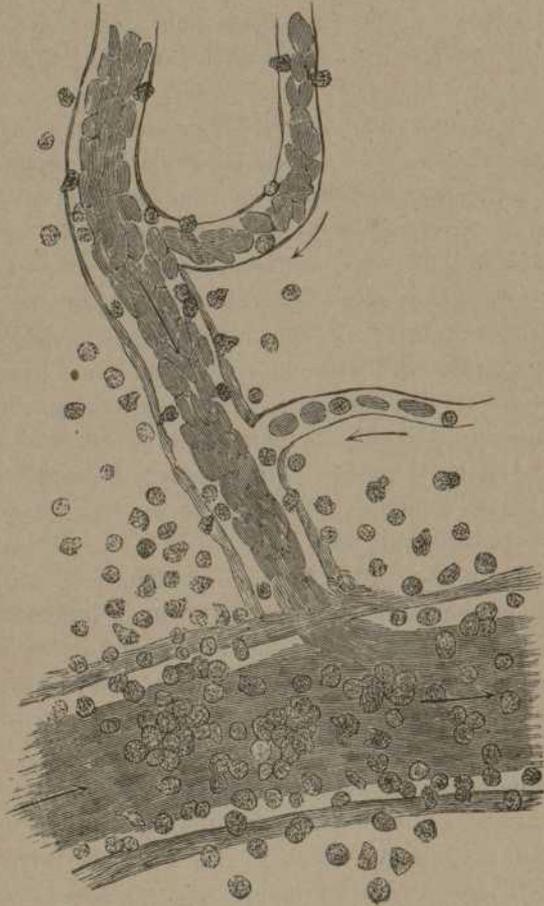
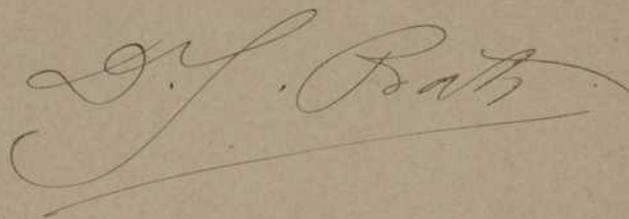


Fig. 3.\*—Circulación en el mesenterio de la rana. Las células rayadas son hematies, las puntuadas leucocitos.

ral del abdomen una incisión de unos 16 mm.; se cauteriza la herida con un escalpelo candente para contener la hemorragia; se abre el peritoneo y se extrae un asa intestinal que se coloca ó entre los dos cristales del aparato de HOLMGREN, ó mejor y más barato en el siguiente, que podemos construir por nosotros mismos: sobre un cristal plano de los llamados en fotografía de  $\frac{1}{4}$  de placa ( $9 \times 12$ ), se adhiere cerca de uno de los lados con parafina, cola ó bálsamo del Canadá, un cono de corcho de 1 centímetro de alto por 2—3 de ancho; se horada su centro verticalmente, de modo que la luz del agujero superior mida 1—1  $\frac{1}{2}$  centímetros, y se bisela su reborde á fin de que pueda adaptarse y pegarse un cubre-objetos redondo.

Extraída el asa intestinal, y colocada la rana en decúbito supino sobre el cristal, se extiende con suma delicadeza el mesenterio sobre el cubre-objetos del corcho, fijando con dos ó tres alfileres de insectos el intestino al reborde circunferencial. Encima del mesenterio se coloca un pequeño cubre-objetos redondo, con el fin de aplanar la membrana, impedir la desecación y los ulteriores derrames de sangre ó linfa, y facilitar el empleo de fuertes objetivos.

c.)—Lengua.—También puede efectuarse la observación de la sangre circulante en la lengua y membrana interdigital de la rana, si bien nunca con la claridad, limpieza y perfección que en el mesenterio. Desde luego se comprende es preciso extender las partes más transparentes y fijarlas luego con alfileres muy finos, á una tablita de corcho perforada, ó sujetarlas con hilos en el mismo soporte.

A large, elegant handwritten signature in cursive script, which reads "A. S. Prats". The signature is written in dark ink and is positioned at the bottom right of the page, below the main text.

Para estas investigaciones el profesor THOMA (1) aconseja se empleen cualquiera de sus platinas. La destinada á observar microscópicamente la circulación en la lengua de la rana viva, consiste en una tabla con varios agujeros por los que pasan hilos para sujetar el batracio; en la cara superior, próximo á uno de los lados, existe un agujero rectangular, cerrado por un cristal sobre el que se estira la lengua; rodea este sitio una armadura con dos porta-tubos para cánulas de irrigación y un porta-cánula para la infusión simultánea de líquidos en la sangre. Con ligeras variantes de tamaño y disposición del cristal, construyen los fabricantes las otras platinas de THOMA para observar el mesenterio y el pulmón de rana viva, así como las destinadas á examinar el mesenterio y el omento en perros y conejos. (2)

La marcha que habrá de seguirse para examinar la circulación en la lengua, será la trazada hace tiempo por M. DONNE, y consiste: sujetar una rana, bien atándola con hilos, bien atravesando con gruesos alfileres que se fijan á la tabla manos y patas extendidas, cual si estuviera crucificada, de modo que el animal no pueda hacer grandes movimientos con sus patas ó su cuerpo. Se coloca sobre el dorso, cuidando de que la punta de la boca coin-

---

(1) Virchow's Arch. B. 65; Journal of the royal microscopical Society, Londres, Abril, 1886.

(2) DROSTEN ofrece estas platinas por 36 fr. las destinadas á ranas, y por 100 fr. las mayores para perros. Á su vez anuncia unos especiales stativs de microscopio contruidos para adosar estas platinas, al precio de 120 francos. También pueden servirnos al propio fin el microscopio que por 200 L. ofrece KORIŠKA, de Milán, para el examen de cortes del encéfalo humano en toda su extensión.

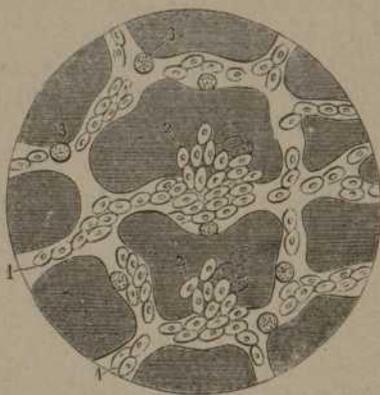
cida con el borde del agujero encristalado. Se comienza entonces á tirar hacia fuera de la lengua; para esto se pasan las láminas de un par de tijeras mohosas bajo la lengua, y se coge con una pinza la punta de este órgano, que en la rana ya se sabe está dirigida hacia atrás; se vuelve así la lengua, que, estando el animal echado sobre el dorso, será la cara superior del órgano la que se verá encima; sin soltar la punta cogida con la pinza, se tira dulcemente de la lengua, que se presta y alarga, hasta que haya traspasado el borde opuesto de la ventana; atravesando por medio de un alfiler la lengua, se fija en aquel sitio á la madera.

Otro punto de la extremidad de la lengua se coge igualmente con la pinza, y estirado, se fija con otro alfiler. Después se extiende la lengua por cima del cristal, tirando por sus dos bordes hacia los lados, en los que se implantan por dos alfileres. Queda así por cuatro alfileres sujeta, estirada y extendida la lengua de tal modo, que presenta el aspecto de una membrana semi-transparente, que permite investigar á través su substancia por medio de luz más bien intensa.

Si es tan viva la rana que tira enérgicamente de su lengua, á riesgo de desgarrarla por las contorsiones y bruscos movimientos de la cabeza, se inmoviliza con un quinto alfiler que se hinca en la madera, después de atravesar la boca en un punto delgado como los alrededores del ojo. Por lo demás, hay ranas que se prestan mucho mejor que otras á esta magnífica experiencia, bien porque su lengua es más extensible, bien porque no ejecutan movimientos violentos que sean capaces de desgarrarla.

Así dispuestas las cosas, se fija la placa con la rana á la platina del microscopio, de tal modo, que el sitio más transparente caiga bajo el campo del objetivo. Basta la luz difusa solar, pero DONNE prefiere mucho mejor la de un foco de una buena lámpara.

d.)—Membrana interdigital. (*Fig. 4.*)—Para hacer el



*Fig. 4.*—Membrana interdigital de rana:  
1, glóbulos rojos; 2, los mismos extra-  
vasados por rotura; 3, glóbulos blancos.

examen en esta región del batracio, podemos servirnos de la placa de cobre, *frog plate* de GOADBY, que podemos construir bien fácilmente con solo disponer de una tableta, de modo que en uno de sus extremos lleve una ventana cuadrada cerrada por un cristal, sobre el que se extiende la pata de la rana, á favor de hilitos que se sujetan á clavitos que habrá alrededor de la abertura.

La rana se mete en un saco que con una cinta se inmoviliza, y por cuya abertura saldrá la pata que se va á examinar.

4.º—Mamíferos.—De estos animales, los más á propósito para esta clase de investigaciones, son el conejo indiano y ratoncitos de pocas semanas. Antes de comenzar la maniobra principal se inmovilizará el animal, según los consejos de BIZZOZERO, inyectando en la cavidad peritoneal cierta cantidad de solución de hidrato de cloral, que puede ser unos 2 gramos de una solución al 5 por 100.

Para sujetar el animal podremos valernos de los aparatos inmovilizadores: de RANVIER, para ratas y conejos; el de CL. BERNARD, para perros; el bozal de BERDIN; la guillotina de BARRIER; el de CZERMAK, para conejos, con soporte niquelado y pinza movable; el nuevo modelo para ratones de KITASATO, ó los llamados de *pinza con articulación en bola*, para gatos y conejitos de Indias, que son los más recomendables y fáciles de manejar (1). También podremos servirnos de una tablita con varios agujeros, acondicionada previamente, de modo que en una perforación lateral hayamos pegado un cilindro de corcho horadado y pegado por arriba con un cubre. Este corcho así dispuesto, tiene por objeto sustentar el mesenterio del animal en posición elevada y con la necesaria planimetría.

Rodeándonos de cuantas precauciones hemostáticas conocemos, incindiremos las paredes abdominales del conejillo; por ejemplo, se extraerá un asa intestinal y suavemente se extenderá y colocará en torno del cilindro

---

(1) Todos estos aparatos los proporciona la casa belga R. DROSTEN, que los ofrece en precio variable de 19—70 fr., según tamaño.

antes dicho. Luego se llevará el todo así dispuesto á la platina del microscopio, se iluminará, se enfocará y comenzará la observación del preparado. Será conveniente, por si utilizamos grandes aumentos, cubrir el mesenterio con laminilla redonda de cristal que alisa y evita la sequedad del preparado.

#### **IV.—Obtención de preparados húmedos de sangre.**

Á este objeto se puede proceder de distintos modos.

Supongamos haber recogido con una pipeta la sangre que se va á investigar. Con la misma pipeta que la contiene, á fin de manipular rápidamente, se reparten gotitas de sangre sobre porta-objetos, previamente limpiados con gran cuidado y colocados paralelamente unos al lado de otros sobre un papel de color claro; á seguida se van cubriendo cautamente con laminitas cuyos bordes se van engrasando, ó rodeando de parafina para evitar en lo posible la evaporación. De este modo tendremos unos preparados temporales de sangre fresca, en los que pueden observarse durante unos momentos los elementos hemáticos aun vivos y nadando en el mar plásmico propio.

Sobreviniendo á poco la coagulación—á pesar de cuantas precauciones se tomen—altéranse los elementos, por lo cual no pueden así hacerse definitivas estas preparaciones. De consiguiente, para observarlos con su forma exacta y tal cual ellos se hallan en la sangre circulante, es preciso fijarles definitivamente la forma.

LANDOIS recomienda la siguiente maniobra con el fin

de alejar toda influencia del aire al examinar la sangre humana fresca: se coloca una gotita de licor de PACINI sobre el sitio de la piel que se va á pinchar con una fina aguja, y se hace esta operación al través de dicho líquido. De este modo la sangre, sin ponerse en contacto con el aire, se mezcla desde el primer momento con el líquido conservador que inmediatamente fija la forma de los glóbulos.

WEICHELBAUM recomienda maniobrar del modo siguiente, que, cual él dice, es elegante y sencillo: se extrae sangre viva pinchando con aguja esterilizada la piel limpia de la pulpa del dedo ó del pabellón de la oreja; se comprime la gota saliente entre dos cubres, obteniéndose, así extendida, una delgadita capa sanguínea en cada uno de los cubre-objetos que después se colocan en sus respectivos portas. Si se quiere impedir el arrugamiento de los glóbulos rojos, se echa sobre la piel que va á ser pinchada unas gotas de la solución fisiológica de cloruro de sodio (0,75 por 100), si bien es más conveniente practicar el examen directo sin diluir la sangre.

Cual dicen BÖHM & OPPEL, puede apresarse la gota sanguínea, ó entre dos cubres, cual ya se dijo, ó también entre cubre y porta adaptados para que se difunda por capilaridad la parcela hemática.

Cuidese al terminar de que no penetre ningún aire, untando los bordes del cubre-objetos con aceite ó vaselina. Es indudable, que cuanto más delgada y fina sea la capita sanguínea, tanto más fácilmente podrán efectuarse, en preparados así dispuestos, las investigaciones y el estudio de las finísimas estructuras globulares. Con este ob-

jeto, cual KHALDEN aconseja, podremos disponer un cubre sobre un porta, ambos escrupulosamente limpios, asegurado uno á otro cristal por bordeamiento con cera en dos sitios opuestos del cubre-objetos cuadrado. Después de deslizar una gota sanguínea por el espacio capilar entre ellos existentes, se cerrará definitivamente, completando el bordeamiento con cera. Por medio de esta maniobra puede obtenerse sangre de enfermos, al pie de la misma cama, y cerrada la preparación, llevarla al Laboratorio, donde se someterá más tarde al examen analítico que más adecuado parezca. Se puede también, según el método de PLEHN, apresar ó coger sangre entre dos gotas de parafina.

También podemos servirnos para mantener la sangre fresca el mayor tiempo posible, de las *cámaras húmedas*: de RANVIER; de la escavada de KOCH, para preparaciones á gota colgante; la célula de GEISSLER y BREFELD, y las extemporáneas de BËTCHER, BUCHNER, SOLÁ, etc.

El modo de construirnos una cámara húmeda es bien sencillo: sobre un porta-objetos (forma inglesa) pegamos en su centro una rodaja ó virola de cristal; en el centro del espacio así circunscrito, se adhieren varios pequeños y redondos cubres, hasta una altura casi igual á la de la rodaja. Queda así un hueco circular, que puede contener cualquier líquido, limitado por la cara interna de la rodaja y los bordes de los cubres. Tanto la rodaja como los cubres, se pegarán, ó con bálsamo del Canadá seco derretido al calor, ó mejor aún con una disolución de gelatina en ácido acético, adicionándole en el momento de usarla un poco de bicromato de potasa pulverizado fina-

mente. Esta mezcla, que no es otra cosa sino la cola que con el nombre de *Syndetikon* se vende en el comercio para pegar cristales y porcelanas, tiene la ventaja, sobre el bálsamo, de resistir según HANSEN, temperaturas de más de 150° C.

Ahora bien, en el centro de la columnita de cristal se deposita la sangre que se va á examinar, y en la canalita se echa licor de HAYEM, por ejemplo; se adapta un cubre-objetos de diámetro igual al de la rodaja, previa lubricación con vaselina del reborde de la virola, y queda así extendida la sangre y al abrigo de la evaporación.

#### V.—Obtención de preparados hemáticos secos.

Se deposita una gota de sangre sobre un porta; se extiende por medio de un agitador, y se seca venteando el porta con rápidos movimientos de vaiven y auxiliándonos en último término de la corriente rápida de aire producida por un fuelle. De este modo los leucocitos se aplanan, pero los eritrocitos y hematoblastos quedan con sus características anatómicas, prestándose bien á su estudio (*Fig. 5.ª*).

Mejor aun conseguiremos una tenue capita de sangre maniobrando, según KAHLDEN aconseja. Se deposita la cantidad más pequeña, en lo posible, de sangre, sobre un cubre; se adapta encima otro cubre y se separan deslizando cautamente uno sobre otro, con lo que queda extendida la gotita. Conviene no olvidar el coger los cubres

con pinzas de madera y no con los dedos, pues como EHRlich dice, basta la atmósfera de los dedos manipuladores para modificar de modo considerable los elementos sanguíneos.

La desecación ulterior será siempre lo más brusca posible. Ya C. SCHMIDT, decía que si se seca la sangre rápidamente y á un calor moderado sobre un porta, los glóbulos rojos desecados conservarán para siempre su forma normal. Más tarde, EHRlich, sabemos ha demostrado que se quita á la hemoglobina su solubilidad y facilidad para salirse, si se calienta sangre untada en cobre, y después de desecada al aire, colocarla en una estufa ó sobre una lámina de cobre durante varias horas, con una temperatura de 120°—150° C.

Según NIKIFOROFF se logra el propio resultado, aun más fácilmente, si se coloca la preparación y se seca al aire en una mezcla á partes iguales de alcohol absoluto (1) y éter, durante veinte horas largas, enjugando después y tiñendo.

Un método grosero en apariencia, pero que conduce á buenos resultados, es el aconsejado por BÖHM, que consiste: en extender por deslizamiento entre dos cubres ó un cubre y un porta, una gota hemática fresca; secar rápidamente á la llama de una lámpara de alcohol, y bordear después para que quede terminado un preparado seco de sangre. El bordeamiento se ejecutará extendien-



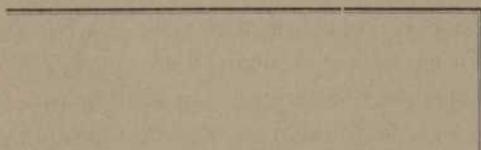
Fig. 5. — Glóbulos sanguíneos, a, b, d, rojos, y c, blanco.

(1) El alcohol debe estar privado completamente de agua, lo que se consigue echando sulfato de cobre calcinado.

do con un alambre caliente, (*Fig. 6.ª*) una de cuyas puntas está doblada en ángulo recto (FRANCOTTE), la masa fundida, para lo que se echará primero una gota en cada ángulo, para que no vacile el cubre, y luego se costean sus bordes de modo que el cierre sea lo más completo; si bien conviene advertir no debe traspasar la masa de bordear los bordes del cubre. Puede servir la parafina, aunque no es muy recomendable por su inestabilidad. Mejor resultado nos ha dado la laca de KRÖNIG, que se hace así:

Cera virgen. . . . .	2 —
Colofonia. . . . .	7,9 —

Fúndanse y menéese sin que caiga masa en el fuego. Puede filtrarse en caliente por gasa.



*Fig. 6.ª—Alambre doblado para bordear.*

Siempre que preparados así cerrados tengamos que observarlos con objetivos de inmersión al aceite, untaremos los bordes con un soluto alcohólico de laca vieja.

## VI.—Examen de la sangre en cortes.

Para examinar sangre previamente fijada, ha propuesto BIONDI un método que es á modo de preparados por cortes, y que puede también utilizarse para la sangre y otras partes componentes líquidas de los tejidos.

En una copa graduada de 20<sup>cc.</sup> de capacidad, se vierten unas gotas de sangre sobre 5<sup>cc.</sup> de disolución de ácido ósmico al 2 por 100, que previamente se habrán medido en la misma; se agita para que se reparta bien la mezcla y se deja reposar. Pasado algún tiempo, se precipitan al fondo los elementos celulares de tal modo, que, primero lo hacen los glóbulos rojos, después los blancos y después las plaquetas, por lo que pueden aislarse perfectamente unos elementos de otros. Transcurridas veinticuatro horas (no más largo tiempo), se saca con una pipeta bien seca 1 — 2 gotas de la mezcla ósmica, y se trasiegan á 5<sup>cc.</sup> de Agar-Agar (que debe proceder, según BIONDI, de casa del Sr. KÖNIG, de Berlín, Dorotheenstrasse, 29), que se mantendrá líquida á 33°—37° C. En el mismo Agar se repartirá la mezcla ósmica sanguínea otra vez por agitación; á seguida se verterá el Agar en cajita de papel, en la que pronto se solidificará.

Después el blok de Agar congelado se endurecerá en alcohol de 85 por 100, varias veces remudado, y cortará colocándolo entre dos médulas de saúco. Practicase después muy bien la coloración con las tinturas anilínicas intensas, aconsejadas—cual ya veremos—para teñir las variedades leucocíticas, según los métodos de EHRLICH-BIONDI. A continuación lavados en alcohol, aclarando los cortes en seguida, utilizando después los aceites etéreos y la creosota, que tienen aquí una gran aplicación, al contrario de lo que ocurre con el silol que se evitará.

Pueden obtenerse cortes aun más finitos, según BIONDI, combinando la inclusión en Agar con rodeamiento de parafina. Á este fin, la sangre contenida en el blok de Agar

se mantendrá un día en aceite de bergamota, de donde se saca, y directamente se coloca 1 — 2 horas en parafina (45°), dejándola en una cajita de papel rodeada de agua para que se solidifique. Antes de teñir se quitará la parafina.

Análogos resultados se logran con el método de RIND-FLEISCH y H. MÜLLER. Según el primero, se lavará sobre un porta-objetos sangre fijada de cualquier modo, incorporándole una cortísima cantidad de glicerina; entonces, sobre un sitio libre de polvo (bajo una campana) se abandona para que se seque cuanto consienta la mezcla glicerina. Después se vierte encima una capita muy tenue de celoidina, que cuando se ha secado por evaporación puede quitarse (despellejarse) ó desprenderse como fina cutícula. Membranita que sucesivamente después se teñirá, aclarará y montará.

H. F. MÜLLER dispone la sangre para preparados en seco sobre cubre-objetos—pero también con otras sustancias que no se pegan fijamente al cubre,—colocando estos por un momento sobre una tenuísima solución de celoidina, escurriendo luego y secando al aire. Se teñirá después, siguiendo los procederes de EHRLICH.

En tejidos muy vasculares, en los que interesa conocer el modo de ser de los elementos sanguíneos que le integran, pudiéramos hacer aplicación—para obtener cortes—del método general de КОСН de endurecimiento por la cocción de los albuminóideos.

## VII.—Eritrocitotecnia.

La investigación directa de la morfología de los eritrocitos no puede ser más sencilla. Punción de la pulpa de un dedo; untar un cubre-objetos con la segunda gota saliente; depositación y bordeamiento del cubre sobre un porta-objetos; investigación al microscopio con variables combinaciones de sistemas oculares y objetivos.

Se pueden hacer durables estas preparaciones dejando la gota de sangre desecarse en cubre al aire libre, y fijándola sin más manipulaciones sobre un porta. En medio de glóbulos rojos deformados, se ven en preparaciones aun hechas, glóbulos que han conservado su forma normal.

Si queremos observar los corpúsculos apilados como monedas, convendrá escoger gota grande. Cuando se manipula bien, agrúpanse formando islotes de extensión más ó menos considerable; islotes que dejan entre si espacios libres plasmáticos, que comunican unos con otros, simulando los brazos de mar de un archipiélago. En este mar se observan sueltos los leucocitos, alguno que otro hematie y las plaquetas en grupos ó aisladas, de las que á poco, cuando comienza la coagulación, se ven partir trenzas filamentosas que á corto trecho se deshilachan, ó entrecruzan formando enrejados.

Para observar cuantos detalles de organización presentan los eritrocitos, que no son fácilmente estudiables en los humanos por su pequeñez, sobre todo para los principiantes, se escogerá sangre de aquellos animales cuyos

glóbulos alcanzan tallas gigantescas. Como más voluminosos, pueden citarse: los del *proteo*, tras del que siguen los hematíes de la *salamandra terrestre* y los de los *tritones*. Los *ciclostomos* (excepción de los *mixynos*), tienen los glóbulos rojos circulares y nucleados. También son buenos objetos de investigación los *ammocetos* y las *larvas de lampreas*.

Para demostrar la *membrana de cubierta* del eritrocito, podremos manipular siguiendo los consejos de RANVIER (1) y RENAULT, como exponemos á continuación:

Una gota de sangre de rana, axolote ó tritón se extiende sobre un porta y se tapa, fijando el cristalito cubre por sus cuatro ángulos con otras tantas gotas de parafina. Á seguida se hace entrar capilarmente una gotita de alcohol diluido al tercio, solo ó eosinado al 1 por 1.000 por uno de los lados del cubre, facilitando la entrada con la colocación de un trocito de papel chupón en el lado opuesto del cubre. De esta manera, entra de un modo igual y regular el alcohol, y obra uniformemente sobre los glóbulos rojos. Éstos se fijan después por solución ósmica al 1 por 100; se conserva el preparado en glicerina salada, débilmente eosinada, y se examina. También puede ponerse en evidencia tratando hematíes frescos por el ácido acético diluido, ó por solución de verde metilo acetificado, y examinando con objetivos de inmersión homogénea.

Para adquirir una idea clara y demostrar la *elasticidad* y la gran *ductibilidad* de los glóbulos rojos, aconseja

---

(1) RANVIER.—Rech. sur les éléments du sang.—Arch. d. physiol.—1875.

RENAUT, cual medio fácil, estudiar la circulación sanguínea en el pulmón de la rana viva, dispuesto convenientemente en el aparato de HOLMGREN (pág. 29).

Una vez ejecutada la observación en vivo, se puede fijar instantáneamente la forma de los elementos hemáticos que circulan en un capilar pulmonar, sin dificultad de ejecución, retirando el pulmón del aparato de HOLMGREN y humectándolo con unas gotas de solución de ácido ósmico al 1 por 100. De este modo se sorprenden é inmovilizan los glóbulos en su situación y se logra conservarlos en estado de preparación persistente con sus diferentes actitudes. Para hacer definitiva esta preparación, escindiremos con las tijeras un trocito del pulmón fijado, y lo guardaremos con glicerina, después de colorearlo con la hematoxilina eosínica.

El método que más fácilmente determina la *capacidad de resistencia á disolverse* de los eritrocitos y que reúne la sencillez á la rapidez, es el aconsejado por LANDOIS, y consiste:

El fundamento de este proceder radica en mezclar una parcela sanguínea con igual porción en cantidad de una disolución de cloruro sódico al 3 por 100, y adicionar á seguida tanta agua destilada (reactivo determinador) cuanta sea necesaria para que se disuelvan todos los glóbulos rojos.

Las manipulaciones que se ejecutarán con la sangre humana, son:

Con el mezclador del aparato contador de glóbulos, se coge sangre obtenida pinchando con aguja fina la yema del dedo; se toma tanta cuanta coge hasta la señal nú-

mero 1; se sopla para verter esta porción de sangre en la celda de un porta escavado, en la cual previamente se habrá echado una cantidad igual de la solución sódica al 3 por 100. Se remueve bien la mezcla con un agitador delgadito de cristal y se tapa con un cubre-objetos, conservándose así perfectamente todos los glóbulos rojos.

Ya enfocado el preparado, y valiéndonos del mismo tubo graduado de antes, se va añadiendo agua destilada, y se observa cuando se han disuelto, bajo el microscopio,

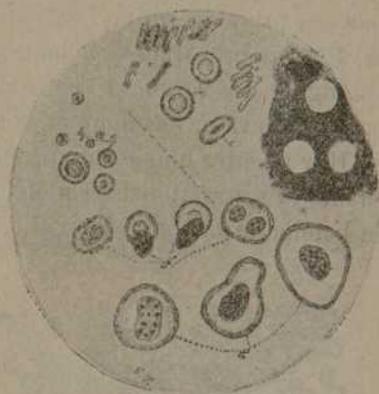


Fig. 7.<sup>a</sup>—Eritrocitos humanos, a, b, c, en diversas posturas; d, decolorados por el agua; e, microcytos; f, nucleados; g, giganteos.

todos los glóbulos rojos, teniendo en cuenta el agua consumida. Cada vez que se añade agua, se evita toda evaporación en la celdita del porta. Hay sujetos cuyos eritrocitos se disuelven indudablemente con más facilidad que en el tipo normal. Son sus eritrocitos blandos, untosos, y se deforman de un modo muy extraño (Fig. 7.<sup>a</sup>).

*A. G. Prats*

Los procedimientos demostrativos de las características físico-matemáticas-eritrocíticas, así como el estudio acabado de las condiciones hemoglobínicas, se estudiarán y explanarán más adelante de modo adecuado.

Estudiados suficientemente íntegros los hematíes, se someten después un número indeterminable de preparaciones á una serie de experiencias en averiguación de los cambios que sufren bajo influencias extrañas.

Estudiaremos en primer término las *modificaciones de lugar y forma*: En una preparación hemática, ejecutada sin precaución alguna, se verán los eritrocitos mantenidos en su forma corto rato, terminando por deshacerse por completo. Hay agentes que aceleran tanto la eritrocitotripsia, cuanto la eritrocitolisis. En efecto, la chispa eléctrica de la botella de LEYDEN. Para ello, depositare-



Fig. 8.<sup>o</sup>—Eritrocitos deformados, adoptando la forma de estramonio.

mos una gotita de sangre fresca en los llamados portá-objetos eléctricos, que vienen á ser á modo de cámara

húmeda porta-objetos, cuya celda se comunica con dos electrodos, en relación con dos láminas de latón que pueden unirse á los polos de los aparatos eléctricos. Bajo su influencia, sucesivamente veránse adoptar á los eritrocitos la forma de mora, estrella matutina, estramonio, (*Fig. 8.<sup>a</sup>*) esferas pequeñísimas que van palideciendo, y que al fin se sustraen á la observación visual, quedando cual sombras.

El fenómeno de la agrupación en pilas de monedas (*Fig. 9.<sup>a</sup>*) se deshace adicionando á la sangre depositada entre un porta y un cubre-objetos, algún cuerpo que hinche los glóbulos, marchándose cada uno de ellos por su lado, efecto de la forma esférica que adoptan. En efecto: se pone en tal preparación agua, y se nota desde luego que los hematíes que son alcanzados por la ola acuosa se hinchan primeramente. Sueltan su tinte propio, palidecen más y más, hasta solo percibirse sombras esféricas. Se coloca en otro preparado ácido acético débil, y se ve á los eritrocitos hincharse, obscurecerse primero algo, y aparecer sus sombras últimamente. Se añade del mismo animal, bilis á una gota sanguínea, y también se hincharán y deformarán. La putrefacción hemática origina también las mismas transformaciones. La disolución de urea concentrada obra sobre la sangre de un modo análogo.

Conviene recordar aquí las experiencias de LIXWURM y ROLLET. El primero mezcló sangre con una disolución concentrada de goma, y después, ya bajo el microscopio, añade otra disolución concentrada de sal común. Si esto



*Fig. 9.<sup>a</sup>—Glóbulos sanguíneos humanos; fijación ósmica; tinción en sol. acu. eosina; conservación en glicerina salada eosinada.*

se hace, obsérvese cómo se estiran los eritrocitos adoptando formas alargadas. Un hecho algo parecido nótase mezclando, cual dice ROLLET, iguales cantidades de sangre y de masa gelatinosa, que se liquide á 36° C., y después de fría la mezcla preparar por cortes para inspeccionar al microscopio.

Para investigar las *modificaciones de color*, procederemos: En un porta-objetos escavado en el que se halla depositada una parcela sanguínea, ó mejor en una cámara húmeda porta-objetos ó cámara de gases (RANVIER), si se hace actuar el O nótase se vuelve la sangre de color rojo escarlata; si se sustrae O aparece rojo azulado oscuro; el CO rojo cereza; el NO rojo violeta, etc. Aclaran el rojo sanguíneo todos los agentes que encogen y arrugan los glóbulos; le oscurecen todos aquellos que los hinchan, cual el agua. Conviene estudiar estas variaciones cromáticas en un solo eritrocito.

Si una preparación de sangre seca se trata con:

Solución concentrada de azul metilo . . . . .	1 —
Agua. . . . .	1 —

se tiñen, según EHRLICH, todos aquellos eritrocitos que ya han sucumbido, los de más tamaño, y que, según GABRITSCHESKY, son los que precisamente se encuentran en la anemia y leucemia.

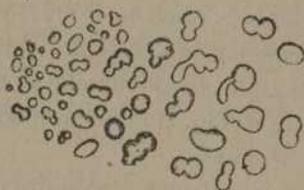
Para estudiar la influencia del *calor* sobre los eritrocitos, procederemos del modo siguiente: según RANVIER (1), se calienta una barra de estaño, hasta que comienza su extremidad á fundirse; depositase una gota de sangre

---

(1) Tr. techn. d'Histologie, p. 185-196.

viva en un porta; tocar con la punta, extremadamente caliente del estaño, la cara inferior del porta, precisamente por debajo del centro de la gota sanguínea; punto de contacto que se calienta aproximadamente á una temperatura de  $250^{\circ}$ , y temperatura que va naturalmente siendo menor hacia la periferia de la gota. De este modo se consigue tener en una misma preparación las diversas modificaciones eritrocíticas ocasionadas por calor de intensidad variable.

También podremos manipular pasando rápidamente por encima de una placa de cristal muy caliente, el dedo mojado en sangre, de modo que la fina capa líquida se deseque con brusquedad. Si así procedemos, se reconocerán las formas más singulares de hematies, estirados y deformados de mil maneras (*Fig. 10*). Este experi-



*Fig. 10.* — Eritrocitos deformados.

mento pone perfectamente en evidencia la gran blandura y distensibilidad de la substancia constituyente de los eritrocitos.

También nos serán útil para observar estas influencias caloríficas, las platinas calientes, valiéndonos en las prue-

bas de sangre de conejo. La más útil á este respecto puede citarse la *placa de cobre níquelada* (1), doblada en forma de **S**, del DR. MALASSEZ, uno de cuyos extremos, el superior, se calienta por un mechero de gas; desde dicho sitio se difunde el calor en toda la extensión de la placa, la que resultará con temperaturas variables.

*Modos de separar la materia colorante del estroma globular, quedando disuelta en el líquido sanguíneo.*— Hay muchos agentes que separan la materia colorante del estroma globular, de tal modo, que pasando la hemoglobina al suero y transparentándose deja de ser la materia colorante de color opaco. Á dicha sangre la denomina ROLLET y otros sangre de color de laca, y aparece de un rojo oscuro.

Conviene recordar, cual lo hace LANDOIS, que el deshacerse los glóbulos rojos no se trata de un cambio en el estado de agregación de la hemoglobina, sino de una traslación de ésta, que abandonando el estroma, el cual se aclara, pasa al líquido, sin que tampoco se produzca ningún descenso térmico.

Para obtener el estroma y examinarlo al microscopio, LANDOIS recomienda mezclar la sangre con un volumen igual de una disolución concentrada de sal de Glaubero, y adicionarle cautamente otra de ácido tártrico al 1 por 100.

Su obtención en grandes cantidades para, v. gr., su examen químico, se consigue mezclando sangre desfibrinada con 10 volúmenes de una disolución de sal común

---

(1) Su coste 17,50 fr., casa de DROSTEN.

que contenga 10 volúmenes de disolución concentrada, y 15 á 20 de agua. Los estromas se depositan cual un sedimento blanquecino.

Se separa el estroma de la hemoglobina con los agentes siguientes:

a.)—*Agentes físicos.*—

1.º *Calor.*—SCHULTZE dice que se obtiene calentando sangre á 60º, si bien no conviene olvidar (LANDOIS) que el grado de calor varía según los distintos animales. ROLLET recomienda la congelación y el deshielo sucesivamente repetidos.

2.º *Electricidad.*—La chispa de la máquina eléctrica (si bien no si se añaden sales á la sangre) (ROLLET), y las corrientes constantes y de inducción (NEUMANN).

b.)—*Substancias de origen orgánico por acción química.*—

1.º La bilis, según HUNEFELD, ó las sales biliares para PLATNER, VON DUSCH.

2.º Según LANDOIS el suero de otras especies animales. Por ejemplo: el suero de perro ó de rana disuelven en pocos minutos los glóbulos rojos del conejo.

Según RUMMO, MARAGLIANO y CASTELLINO, el suero sanguíneo de determinadas infecciones agudas y de discrasias crónicas tiene acción destructora sobre los eritrocitos de sujetos sanos.

3.º Dice LANDOIS que la sangre color de laca de otras especies animales.

c.)—*Substancias no orgánicas por acción química.*

1.º Agua.

2.º La presencia y paso por la sangre de substancias diversas.

Así: vapores cloroformicos, según BÖTTCHER,  
id. de éter, según V. WITICH,  
id. de amileno y de pequeñas cantidades de  
alcohol, según ROLLET,  
el paraldehido, según FRÖHNER,  
timol, según MARCHAND,  
nitrobenzol, éter etílico, acetona, éter de petróleo  
y otros, L. LEWIN,  
el hidrógeno antimoniado, el arsenical, sulfuro de  
carbono, HÜNEFELD.

3.º Sábese por V. VRIES, HAMBURGER, que ciertas disoluciones salinas pueden indudablemente mezclarse con la sangre en determinada concentración (lo que se llama disolución isotónica), sin que se disuelvan los glóbulos rojos; ahora, si la disolución salina está más concentrada ó más diluída, se deshacen dichos elementos. Conviene no olvidar que dicen BERNSTEIN y BECKER que las sales aumentan la resistencia globular á los medios de disolución físicos, pero por el contrario, la disminuyen en lo que respecta á los químicos.

4.º Refieren BRÜCKE y STRICKER, que adicionando solución de ácido bórico al 1 por 100 á sangre de anfibios, ocurre que en los glóbulos la masa roja llamada zooídea, y que cuando existe núcleo éste la encierra en su interior, se separa del estroma ó ecóídea, retrayéndose desde la periferia al centro, y en muchas ocasiones abandone por completo el estroma. BAÜCKE considera, según esta experiencia, al estroma, cual una especie de estuche dentro del que reside la restante substancia del glóbulo, ó sea aquella que está principalmente provista de propiedades vitales.

5.º Disuelven los eritrocitos las mezclas fuertemente ácidas; las débiles ó medianas producen precipitados en la hemoglobina. HULS, bajo la dirección de LANDOIS, ha observado este hecho muy claramente con el fenol.

6.º Ocasionan una rápida destrucción globular los álcalis en mediana concentración. Una solución potásica al 10 por 100 próximamente, colocada junto el borde de un cubre, bajo el que haya sangre, permite ver al microscopio con bastante evidencia, cómo se verifica, por qué trámites pasa la disolución eritrocítica.

Primero se les ve hacerse esféricos y achicarse en apariencia poco á poco, y al fin revientan cual si fueran bolas de jabón.

### VIII.—Leucocitotecnica.

Para obtener preparados extemporáneos de leucocitos humanos, se punciona un dedo y la gota de sangre se adhiere á la cara de un cubre. Operando con rapidez se extiende con aguja de cristal esterilizada la poción adherida al cristal, se coloca sobre un porta, y sujetado con cuatro gotas de parafina ó laca de KRÖNING por sus ángulos, se examina en combinaciones que den 400 ó 500 diámetros.

Para hacer más visibles los leucocitos, se deposita una gota de ácido acético junto uno de los bordes del cubre, teniendo cuidado de poner un trocito de papel absorbente en el borde opuesto. Conforme va penetrando la ola acética, van apareciendo las sombras eritrocíticas, en tanto

que los núcleos leucocíticos se hacen cada vez más visibles.

Para que el estudio morfológico de los leucocitos pueda efectuarse con todo el aprovechamiento que asunto tan importante requiere, precisa recogerlos ó buscarlos en aquellos parajes que son más abundantes, y en aquellos animales que mejor se prestan á observar elemento anatómico tan vivo.

Constituyendo los leucocitos el organismo celular típico de la sangre incolora de algunos seres (cangrejos) invertebrados, ó de la linfa en los vertebrados, aquéllos y ésta será la materia orgánica que elegiremos en obtención de abundantes leucocitos de investigación.

Si se arranca una de las piezas articuladas de la pata en forma de pinza del *cangrejo de río* (*Astacus fluviatilis*), (1) mana un líquido claro en forma de largas gotas, cual si fuera agua. Se recoge una de estas gotas en un porta-objetos, se tapa con un cubre y bordea de parafina. Como á poco, sobreviniendo la coagulación, mueren los glóbulos blancos, precisa antes de que tal ocurra el fijarlos convenientemente en su forma. Para ello el mejor procedimiento consiste en deslizar una gota de solución acuosa de ácido ósmico á 1 por 100, capilarmente por entre el cubre y el porta-objetos. Casi instantáneamente los leu-

---

(1) L. CUENOT.—Evolución de los amibocitos en los crustáceos decápodos. Trad. por A. G. PRATS en *Gac. Méd. de Granada*. 1894, núm. 259.

HARDY.—The blood-corpuscles of the crustacea, etc. (*Journal of physiology*, vol. XIII, 1892, p. 165.)

CUENOT.—Et. phys. sur les gastéropodes pulmonés (*Arch. de Biol.*, t. XII, 1892, p. 683).

ALLEN.—*Quart Journ. micro. sc.*, vol. 34, 1893, p. 403.

cocitos quedan muertos, con la forma exacta que ellos tenían durante la vida. Se puede colorear con picrocarminato de amoniaco, que evidencia sus núcleos, ó con solución acuosa de eosina al 1 por 100, que tiñe el protoplasma y sus expansiones de rosa magnifico (RENAUT). Si á poco de sorprendidos y fijados ósmicamente los leucocitos, se introduce capilarmente una gota de solución acuosa de eosina, y después, á favor de un papel secante, se hace penetre lentamente glicerina salada, conseguiremos, después de cementar los bordes para completar la oclusión del preparado con laca KRÖNING, obtener un preparado persistente, en el que durante varios años los glóbulos blancos muestran sus pseudópodos estrellados, fijados *in situ* en la posición, ó sorprendidos en uno de los estadios de su movimiento, sin cesar variables, y que durante la vida, no habría durado, y por consiguiente no se hubiera visto más que un instante.

Manipulando de modo análogo, obtendremos también preparados de las dos variedades leucocíticas de los crustáceos decápodos, en cuyos preparados se verá á los leucocitos ordinarios teñidos en rosa, y á los leucocitos de granos vitelinoides de RENAUT (glándulas unicelulares movibles de RANVIER) de un color rojo vivo, sobre todo si son tratados por el carmín que prefiere colorear los gránulos vitelinos de que este protoplasma se halla sembrado.

De los vertebrados, la rana en primer término, conejo, perro, asno y caballo después, serán los seres que más utilidades nos reportarán.

El medio más simple para recoger la linfa en la rana,

que es la que proporciona ordinariamente el tipo de los leucocitos de los vertebrados de sangre fría, consiste en aspirar en el saco linfático dorsal, con la ayuda de una pipeta afilada á la lámpara, y cuya extremidad se ha cortado en pico de flauta, de modo que incinda cual lo hace la cánula de la jeringa de PRAVAZ. Se escoge una rana de gran talla, que haya permanecido en el agua durante varias horas, con objeto de que no se seque al aire. Se sujeta el animal sobre una tableta de corcho, atando sus patas anteriores y posteriores, y con el dorso hacia arriba; se seca con lienzo la región vertebral, y con los dedos se ejerce una compresión de derecha á izquierda, de manera que refluya la linfa hacia el sitio que se va á pinchar. Se practica lo más cerca de la columna dorsal una incisión de un centímetro de longitud (STRÖHR), por cuya incisión se introduce una pipeta, cuya punta se dirige hacia adelante, y se aspira con la boca cierta cantidad de linfa. También se puede directamente, sin previa incisión introducir de un solo golpe la pipeta cortante, viéndose, la mayor parte de las veces (RENAUT), ascender una pequeña columna de linfa por el interior del tubo. Cerrando con el dedo la extremidad externa abierta de la pipeta, se retira y llevamos su contenido á depositarlo, bien sobre un porta-objetos, bien á un cristal de reloj, según cuales sean las manipulaciones á que después vayamos á someter la linfa.

Determinando la curarización de la rana, según lo ha demostrado TARCHANOFF (1), un enorme acrecentamiento

(1) J. TARCHANOFF.—De l'influence du curare sur la quantité de la lymphe et l'émigration des globules blancs du sang (*Arch. d. physiol.* 1875, y *Tr. du Lab. d'Histol. de Coll. de Fr.*, 1875, p. 43 y siguientes).

en el contenido de las cavidades linfáticas, de este medio nos valdremos cuando nos sea preciso obtener grandes cantidades de linfa. Pero como el mismo autor ha notado que no es el saco dorsal en el que hay más cantidad, sino que donde se acumula, sobre todo, es en el saco linfático retro-lingual, en este punto será de donde la extraeremos. Para ello, estirando hacia fuera la lengua de una rana adulta curarizada, se verá el saco linfático dicho tan hinchado, que aparecerá cual una bola transparente. Fácil es separarlo por completo, sin más que ligar por la base de la lengua, y practicar un tijeretazo comprendiendo la misma lengua. El saco linfático (*odre* de RUSCOONI) distendido puede conservarse durante varios días en una cámara húmeda de campana, en la que permanece perfectamente fresca y líquida la linfa.

Esta gran cámara húmeda podemos bien simplemente construirmosla del modo siguiente:

Una campana de cristal se coloca sobre un plato de mayor diámetro que el borde inferior de aquélla, lleno de agua. Se suspende el saco linfático por un hilito de un gancho de cristal que se pega con laca KROENING ó cera dura, en la cara interna de la campana, por bajo de su botón. También puede servirnos al mismo fin un frasco cilíndrico de doble cierre y con gancho en la tapa, como los que se utilizan en los Museos de Historia Natural para colgar ó conservar en líquidos, animales de corta talla, cual los peces. La anterior cámara húmeda de campana, podemos acondicionarla, de modo que nos sirva para conservar preparaciones húmedas. Para ello se dispone una especie de escalerilla de vidrio en su interior, cual

la imaginada por MALASSEZ, ó la de FRANCOTTE. Para construir esta escalerilla, dice este último, que se corten cuatro trozos iguales de una regla liralíneas; á distancias iguales practíquense agujeros, por los que se pasarán varillas de cristal de igual longitud. Dispuesto esto convenientemente, se obtiene una pequeña jaula en la que cada cara simula una escala, cuyos escalones son las varillas de vidrio.

Evitándose el contacto del aire seco al tener el saco linfático dentro de la atmósfera húmeda de la cámara, se conserva sin coagularse la linfa, y en buenas condiciones para que en momento dado, si abrimos el saco con tijeritas finas, ó por punción, salga aquélla líquida, si bien coagulándose en seguida en cuanto se pone en contacto con el aire.

Para recoger linfa en los animales de sangre caliente, se escogerá el pericardio, pleura ó el peritoneo. En perros y conejos casi siempre existe una pequeña cantidad en las partes declives de dichas serosas. Se recolecta con una pipeta de punta roma, teniendo cuidado de maniobrar sobre animal curarizado, y evitando, en lo posible, la mezcla de sangre con el líquido linfático, por cuya razón las incisiones con termo-cauterios serán preferidas.

De este modo recogeremos lo que se llama linfa cavitaria. Para procurarnos linfa de los canales, conviene poner al descubierto, en un animal convenientemente inmovilizado, el canal torácico. En el asno y el caballo, COLIX ha obtenido por este procedimiento grandes cantidades de linfa. Como para el análisis morfológico de los leucocitos, solo precisa disponer de unas cuantas gotas,

rara vez tendremos que proceder así. RANVIER aconseja buscar el canal torácico en el tórax de un perro curarizado, y al cual se practicará la respiración artificial. Es fácil descubrir el canal á lo largo de la aorta, cuando se ha practicado una amplia abertura en el pecho. Se liga desde luego, y cuando se haya hinchado bastante, se vuelve á poner otra ligadura unos centímetros más abajo. La porción de canal torácico que hinchado tendremos entre ambas ligaduras, se separa, y con una pipeta punzante, se vacía de la linfa que contiene.

Para el estudio morfológico de los glóbulos blancos, basta una gota de linfa ó sangre que depositada sobre un porta, es tratada después con agua, ácido acético, etc., en averiguación de las modificaciones de forma que experimenten.

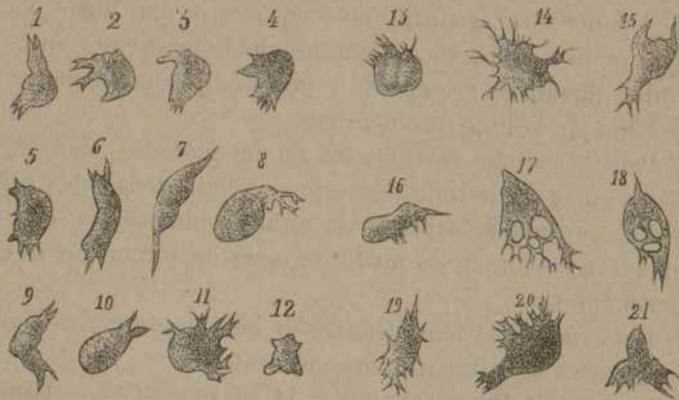
Los procederes demostrativos de las características numéricas ya se estudiarán más adelante.

Examen de los movimientos de los leucocitos.— Para esta clase de investigaciones sería muy útil la sangre de animales mamones, manteniendo sus preparaciones en temperaturas análogas á las del animal.

En los animales hematermos, los leucocitos conservan por mucho tiempo sus movimientos en un porta-objetos caliente; á los 40° C. hasta dos y tres horas; los 47° C. paralizan dichos movimientos produciendo rigidez y muerte. El límite inferior para que sean posibles dichos movimientos, es una temperatura de + 14° C. (MAUREL).

En los animales hemacrimos (rana), se los ve, por ejemplo, salir de una gotita de sangre coagulada (en la cámara húmeda de un porta-objetos con celda), y vagar en

todas direcciones (*Fig. 11*) en el suero exprimido del coágulo. Para estos movimientos es necesaria la presencia del oxígeno. Con las descargas de la corriente de inducción, se redondean repentinamente retrayendo sus pseudópodos. Si la corriente eléctrica no es muy grande y sigue, vuelven á moverse al cabo de algún tiempo. Las



*Fig. 11.*—Movimiento amiboide de las células blancas hemáticas. Diversas formas que ofrecen sucesivamente en el espacio de cinco minutos. Prop. conservado en humor acuoso, 500 diám. Según R. CEINHAUSEN.

descargas intensas los matan, hinchándose y deshaciéndose por completo.

Para observarlos en las células blancas de la rana ó salamandra, es menester, maniobrando con rapidez, diluir una gota de linfa en humor acuoso del mismo animal, dentro de la cámara húmeda porta-objetos. Tras movimientos rapidísimos, se ven en la linfa sucederse éstos

lentamente. Para convencerse de ello es necesario dibujar el mismo leucocito en intervalos de un minuto á dos. Conviene emplear fuertes aumentos.

Los fenómenos amiboides del protoplasma globular, se observan también en el hombre, siempre que se conserven vivos los leucocitos en cámaras apropiadas con temperatura de 37° C. Para ello nos servirá una preparación

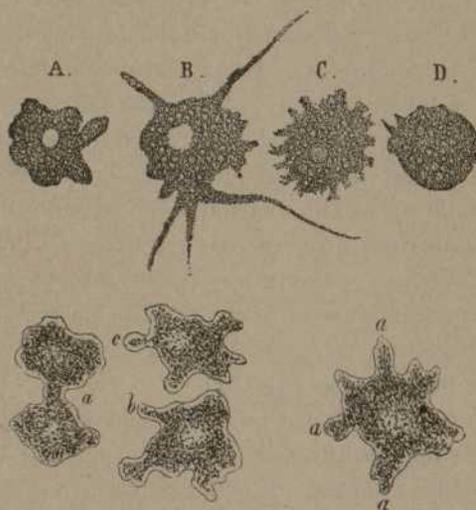


Fig. 12.—Amibocytos vistos en diversas formas, a a pseudópodos.

de sangre desfibrinada, dispuesta en la celda húmeda, sobre la platina caliente. Estas preparaciones encierran bastante número de leucocitos, para que pueda examinarse en alguno su marcha por entre los eritrocitos. Se ve producirse estos movimientos hacia los + 32° C. y

*S. A. G. Prats*

continuar hasta los + 40° C. en condiciones semejantes á las observadas en conejos y perros. Mejor material de estudio nos le proporciona la sangre de los leucémicos.

De modo, pues, que estos movimientos por los que el leucocito se alarga, encoge, emite prolongaciones protoplásmicas y ejecuta, en una palabra, cuantos cambios de posición, forma y volumen se observan en los protozoos amibos (*Fig. 12*), resultan más visibles y graduados cuando se observan dichas células blancas en cámara húmeda porta-objetos y en la platina caliente á 38° ó 40° C., á fin de mantener los corpúsculos vivientes al abrigo de la sequedad y del frío. En tales favorables condiciones se descubre también que su masa es penetrable y penetrada por partículas sólidas (colorantes ó no), que puedan rodearlos (atrayéndolas el leucocito y terminando por engullirlas y sumergirlas en su masa) y hasta por trozos ó restos celulares, como pedazos de eritrocitos que se observan empotrados en su masa en determinados productos inflamatorios (*Fig. 13*).

Ahora bien, para mantener durables estos preparados y bajo las temperaturas indicadas, se construyen los aparatos llamados *platinas calientes*, cuya primera construcción la imaginó SCHULTZE, perfeccionó en 1871 STRICKER y modificaron mejorándolas otros investigadores. Los constructores de objetos micrográficos proporcionan varios modelos, teniendo todas ellas ventajas é inconvenientes, y pudiendo englobarlas en dos agrupaciones, según la calefacción se proporcione: por temperatura seca cual las de SCHULTZE, BÖHM, RECKLINHAUSEN, ZEISS; ó por circulación de agua caliente como las de RANVIER, STRIC-

KER, REICHERT, PFEIFFER, FLEISCH, FRANCOU, VIGNAL, ISRAEL. También puede incluirse entre estos aparatos la *caja* de PFEIFFER-ZEISS para elevar la temperatura de los objetos microscópicos.

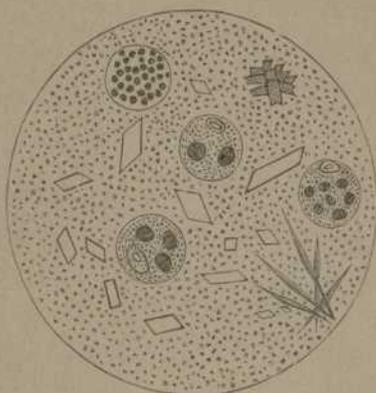


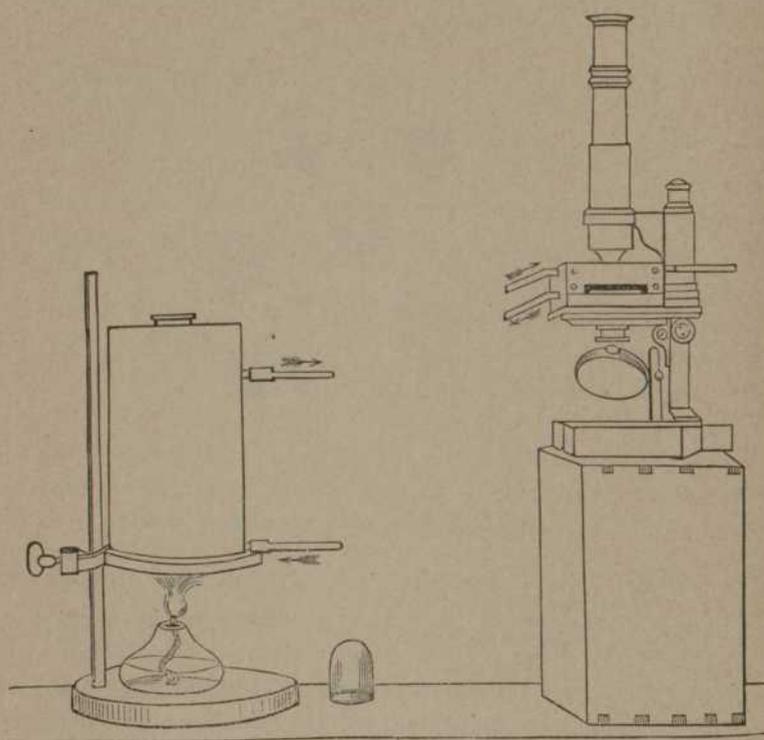
Fig. 13.—Leucocitos y tabletas de hematoïdina.

Platina caliente de RANVIER (1).—Consta este utilísimo aparato (*Fig. 14*) de las dos piezas esenciales siguientes, en comunicación recíproca por dos tubos de goma. 1.º Una cajita cuadrilonga que se coloca sobre la platina del microscopio, y constituida por dos cavidades independientes una de otra: una parietal en comunicación por los tubos de goma con una marmita, y otra central,

(1) Su precio 60 fr., VÉRICK; 55 fr., DROSTEN; 45 fr., E. COGIT (17 Quai St. Michel. París).

El coste de la platina de VIGNAL es de fr. 45, y la de ISRAEL de 47,50, casa DROSTEN.

abierta al exterior, en forma de cruz, de tal modo, que su brazo transversal le ocupa el preparado, y el vertical,



*Fig. 14.—Platina caliente de RANVIER colocada en el microscopio. La dirección de las flechas indica la de la corriente acuosa caliente.*

más ancho y circular, deja pasar la luz reflejada por el espejo, al través del preparado y el objetivo, puesto que

coincide con la abertura de la platina del microscopio sobre el que se apoya esta cajita. 2.º De una marmita de metal muy sólida, cilíndrica, con cierre de tornillo, y dos aberturas laterales donde se adaptan los tubos de goma que comunican su cavidad con la parietal de la cajita rectangular. Esta marmita se coloca sobre un soporte de aros circulares, donde recibe el calor de la lámpara de alcohol.

En la cara posterior de la cajita rectangular existe una abertura donde se adapta un termómetro indicador de la temperatura del agua que llena la cajita.

Para hacer funcionar el aparato, se llenan de agua la cajita y la marmita, y se unen por los dos tubos largos de goma; se cierra la marmita y se calienta. Para que la temperatura se eleve, á la vez, en el agua de las dos vasijas, se colocará la marmita en un plano más bajo que la platina del microscopio sobre la que está la cajita. De este modo, conforme se va calentando el agua de la marmita, el líquido caliente ascenderá por el tubo de goma superior á la cajita que rodea el preparado, y de la cajita descenderá al depósito por el tubo inferior el líquido de menor temperatura, manteniéndose una corriente de agua caliente, á temperatura constante, todo el tiempo que se desee. Cuando el termómetro marque unos 39º—40º C., el preparado cuya temperatura es algo menor que la del agua calentada por la lámpara, ofrecerá una temperatura de 37º—38º C., que es la de los elementos anatómicos vivos; en tales ventajosas condiciones se examinan los elementos sanguíneos, aun después de apagar la lámpara, pues el aparato se enfría muy lentamente y da tiempo sobrado para la observación.

Platina caliente de PFEIFFER (1).—Es una cajita de cristal, en cuya cara superior hay tres concavidades, sirviendo para las observaciones hemáticas ú otras á gota suspendida. En uno de sus lados se adapta un termómetro y dos tubitos de cristal, que se continúan con dos tubos de goma por los que circula el agua caliente, entrando por uno y saliendo por otro, después de calentar la cajita. Se regula la temperatura por medio de pinzas de presión á tornillo, que apretando más ó menos uno de los tubos de

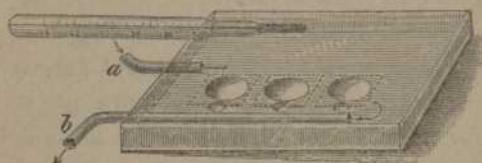


Fig. 15.—Platina caliente de PFEIFFER.

goma, deja salir el agua conveniente para obtener una temperatura constante, pues casi apenas varía un medio grado. (Fig. 15) El agua se calienta á la lámpara en otra vasija. Tiene la ventaja esta platina, lo cual le hace tener una gran práctica, de poder hacer toda clase de investigaciones, aun empleando todos los sistemas de objetivos, sin dañarles la temperatura por muy alta que ella sea.

Platina caliente de STRICKER-REICHERT (2).—El nuevo y li-

(1) La expende R. DROSTEN al precio de 28,50 fr.—El constructor ZEISS la ofrece á los precios y conforme el proceder de LEYBOLD, originales, de 9 Mk. la sencilla y de 15 Mk. la de tres cavidades.

(2) La completa descripción de las mejoras que REICHERT tiene hechas á este aparato, se pueden ver en «Beherend's Zeitschrift für Mikroskopie» II, B., I. H. 1885. En el catálogo núm. 18 de 1892, anuncia REICHERT (VIII Benno-gasse, 26, Wien) al precio de 40 Mk. la platina caliente de nueva construcción y de 14 Mk. la espiral de calefacción, con tubos, pero sin vasos ni llama de gas.

gero aparatito que el fabricante REICHERT, ajustándose á los consejos del Profesor STRICKER, construye en la actualidad, se distingue de las otras platinas calientes en que está provista de un condensador (*Fig. 16 c*), de modo que puede utilizarse con ampliaciones tan grandes cual las proporcionadas por objetivos de inmersión en aceite. Es una cajita metálica de poco grosor, canalizada, por cuyos conductos circula agua caliente, que entra y sale por dos tubos de goma (B-B'). Lleva tendido un termómetro en la parte antero-superior, y dos tornillos (A-A') para fijarla al microscopio (Stativs I. II. III. de REICHERT).



*Fig. 16.*—Platina nueva construcción de REICHERT.

Para obtener, en exámenes de cierta duración, una constante é igual calefacción, se dispondrá la platina caliente, microscopio y depósitos de agua, siguiendo las instrucciones del Dr. SPIETSCHKA, tal cual puede apreciarse en la *Fig. 17*. En el depósito A, de agua, colocado á una altura mayor que la platina, se halla un tubo sifón de goma, que lleva el agua al calentador de tubo en espiral B, en el que á voluntad se dará al agua la temperatura más conveniente, por estar provisto el mechero P, de BUNSEN, de un regulador automático para la presión del gas. Otro tubo de goma conduce el agua ca-

liente á la platina, y de esta sale por otro tubo y se vierte á otro vaso depósito M. El tubo de desagüe lleva una pinza H de presión continua, con la que se regulariza la corriente de agua. Si se abre la pinza, es la corriente de agua mayor, y por consiguiente proporcionará mayor elevación de temperatura á la platina, y por el contrario, si se cierra la pinza, descenderá.



Fig. 17.—Platina de REICHERT colocada en el microscopio y con el nuevo calentador B en espiral.

Platinas calientes de FRANCOTTE (1).—Este ilustrado microscopista, en su constante tendencia á facilitar al principiante en este género de estudios los medios de examen, sin grandes dispendios, da los consejos que casi á la letra transcribimos, para construirnos por nosotros mismos una platina caliente muy sencilla, que rinda iguales servicios que los aparatos más caros. Bastará encomendar á un latonero (fabricantes de objetos de lata) la confección de una cajita de latón de cobre, ajustándose á los siguientes consejos: de las dimensiones de la platina del microscopio, se hará una cajita rectangular de una altura de centímetro y medio. Sus caras superior é inferior deberán estar bien aplanadas y paralelas; en su centro se les hará una abertura circular de igual diámetro que el ori-

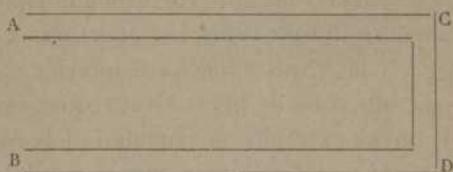
(1) P. FRANCOTTE.—*M. de Techn. microscopique*, París, 1889, p. 262 y siguientes.

ficio de la platina del microscopio. En uno de los costados de la cajita, y después de practicarle dos aberturas, se soldarán dos tubitos de latón de un diámetro como de medio centímetro, á cuyos tubitos más tarde, se envainarán otros tubos de goma para establecer la circulación del agua caliente. La dificultad que hay que vencer es la de disponer convenientemente la abertura central; para ello basta con que corresponda bien, exactamente una enfrente de otra, las aberturas circulares que se hacen en las caras superior é inferior, y unir las dos caras por un tubo de igual altura que las paredes laterales, y cuyos extremos se suelden al borde de las aberturas respectivas. En la cara superior, y lateralmente, se hace una fosita en la que se alojará un termómetro.

Para servirnos de este aparatito, se calienta agua en una vasija, dentro de cuya agua se introduce un tubo de caoutchouc, que se adapta por el otro extremo á uno de los tubos laterales de la caja, de modo que se produce una especie de sifón; el otro tubo lleva también otro de goma que vacía el agua en un vaso. Se modera la llegada del agua cogiendo con una pinza de alambre, de presión constante, el tubo por donde llega el agua caliente.

Más simple aun que el anterior, y menos costoso, si bien no aplicable en muchos casos, es el dispositivo siguiente: un tubo de cristal de  $\frac{1}{2}$  á  $\frac{3}{4}$  de centímetro de luz se dobla en ángulo recto por dos sitios, de modo que tenga la figura de , cuyas dos ramas paralelas sean dos veces más largas que la rama de unión entre aquellas, es decir, cual se ve en la *Fig. 18*:

las ramas A C y B D, deben hallarse en el mismo plano; la distancia entre A B y C D deberá ser de 2 centímetros. Conviene que la longitud de las ramas A C y B D sea tal, que colocado el aparato transversalmente sobre la platina del microscopio, traspasen sus extremos A y B unos dos centímetros del borde de la platina, en tanto que C y D correspondan al borde opuesto. En A se envaina un tubo



*Fig. 18.—Tubo de cristal por el que circula agua caliente, y sobre el que colocamos las preparaciones cuya temperatura se quiere elevar.*

de goma que se introduce por su otro extremo en la vasija donde se calienta el agua á la temperatura conveniente. En B se adosará otro por el que se vaciará el agua. Se pone el tubo que va en A de tal modo, que obre cual sifón. El tubo de cristal A, C, D, B, se sujeta á la platina con las lengüetas pinzas. El preparado se pone sobre el tubo así dispuesto. La llegada del agua se regla por medio de una pinza de bureta ó cualquier otro medio. La temperatura del agua en el matraz calentador deberá ser de 4 ó 5 grados más alta que la del preparado.

Platinas calientes de M. SCHULTZE y RECKLINGHAUSEN.—Ambas muy sencillas y casi iguales. La de este último es una placa de latón, en forma de herradura, cuyos brazos alargados hacia adelante se calientan por medio de una lám-

para. La de SCHULTZE es una lámina metálica de igual forma que la platina del microscopio, sobre la que se asegura con las lengüetas; en su centro hay una abertura que coincide con la de la platina para dar paso á los rayos luminosos; de los lados salen dos brazos, bajo los que para calentarlos se ponen lámparas de alcohol. Se colocan sobre la platina del microscopio, y sobre dichas placas de latón se colocan las preparaciones destinadas á ser investigadas con una temperatura más ó menos elevada. El calor de la lámpara se transmite por los brazos de la platina hasta el centro de ella, en cuyo sitio un termómetro nos marcará el grado de calor.

Caja de PFEIFFER-ZEISS.—Este aparato (*Fig. 19*) sirve para elevar la temperatura de los objetos microscópicos durante la observación. El conocido fabricante ZEISS (1) dice de esta caja: «todos los aparatos hasta ahora empleados con este fin dejan al observador en la duda de si la temperatura del objeto es realmente la indicada por el termómetro. El aparato nuestro da con exacta y completa certeza dicho dato, por cuanto permite mantener igual temperatura al objeto examinado, microscopio y atmósfera que les rodea, pudiéndola mantener también estacionaria.»

Se compone de una caja de caoba cerrada herméticamente, y lo bastante grande para alojar en su interior la parte mecánica del microscopio compuesto, quedando así éste rodeado de una atmósfera perfectamente circunscrita. En su pared anterior existe una ventana en-

(1) El afamado constructor ZEISS ofrece estas *Cajas calentadoras*, provistas de sus correspondientes termoreguladores; al precio de 70 Mk. las destinadas á sus grandes microscopios (1.°, mineralógico y fotográfico) y de 60 Mk. para los medianos (II-V).—Cat. N. 30. 1895.

cristalada, por donde penetra la luz necesaria á la observación; en las paredes laterales hay á modo de dos compuertas, por cuyas aberturas se introducen las manos á fin de poder manipular en las preparaciones. La pared superior dá paso al tubo del microscopio y al tornillo micrométrico. La caja con el microscopio reposa sobre gruesa placa metálica, provista de tres pies de metal. Para elevar la temperatura, se calienta la placa metálica con calentador de gas micrométrico, reglando el aflujo del gas por medio del termostato. La comprobación de la temperatura del aire interior se hace por un termómetro. Según el constructor, puede elevarse la



Fig. 19.—Caja calentadora de ZEISS.

*temperatura hasta 45° C, sin que sobrevenga daño alguno ni al stativ ni á los objetivos.*

Para adquirir buena idea de la locomoción leucocítica, convendría estudiar su modo de penetración en los cuerpos porosos (LORTET, RANVIER). Es decir, que para lograr de un modo indirecto preparados en los que ostensiblemente se manifiesten los movimientos amiboideos de los leucocitos, se colocará un trocito cilíndrico recto de médula de sauco seca en el saco linfático dorsal de una rana recién extraída del agua, á favor de una pequeña herida cutánea que en seguida se cerrará y coserá. Se deja el animal en agua, y después de veinticuatro horas, ó bien se mata al animal (BÖHM), ó mejor se extrae cuidadosamente el trocito vegetal que se dejó bajo la piel, y que ya le ha atravesado la linfa de parte á parte; se fija la forma de sus componentes celulares, se incluye en parafina, corta y tiñe. Las células de la médula de sauco, y los espacios entre ellas existentes, se ven cruzados por leucocitos sorprendidos en las más raras posturas morfológicas. Examinado un cortecito de sauco, sin fijación, ni demás manipulaciones, y sí sencillamente extendido sobre un porta, se reconoce que en el centro del pequeño círculo de médula de sauco separado por la cuchilla, hállanse sus células vegetales llenas solo de plasma, en tanto que las tres ó cuatro series de células vegetales situadas hacia la circunferencia, encierran los glóbulos blancos.

Modo de practicar el análisis estructural del leucocito.—

Cuanto se refiere á las aptitudes tintóreas del protoplasma del glóbulo blanco, más adelante se explanará al tratar los métodos tintóreos, según los consejos de SEMMER, POUCHET y EHRLICH.

El núcleo leucocítico puede ponerse de manifiesto á favor del ácido acético, cual al comienzo de esta parte dijimos. Por lo demás, un buen estudio del núcleo no puede hacerse sin la ayuda de las materias colorantes. La mayor parte de las anilinas usadas en solución acuosa (violeta de metilo, azul, etc.) descubren claramente dicho núcleo.

La muerte del leucocito, la acción del agua, del ácido ósmico, son condiciones para que se revele. Para la escuela belga nada hay mejor, y en efecto así es, que el verde metilo acetificado, pues fijándose este colorante solo en la parte cromática nuclear, proporciona imágenes, tanto más correctas cuanto que el protoplasma permanece casi en absoluto incoloro.

RANVIER y RENAUT aconsejan mezclar sobre un porta una gota de linfa del saco dorsal del batracio, con otra de alcohol al  $\frac{1}{3}$  débilmente coloreada por la eosina soluble en el agua ó por la fuchina; hinchándose el protoplasma por la acción del agua del reactivo, llega á transparentarse, haciéndose muy visible de modo bien manifiesto, el núcleo con sus contornos distintos, y coloreado en rosa ó en rojo.

Para investigar el *comportamiento* de los leucocitos *ante la electricidad*, recurriremos al proceder seguido por DINEUR (1). Este autor recurre ó escoge como fuente de electricidad un solo elemento de DANIELL, á fin—dice—de evitar cuanto sea posible la intervención de la elec-

---

(1) DR. DINEUR.—Sobre la sensibilidad de los leucocitos ante la electricidad.—(Bull. de la Soc. belg. de microsc. N.º V, t. XVIII, 1892.) Trad. de A. G. PRATS en *Gac. Méd. de Gran.* 1892 N.º 213.

trolisis viva en los fenómenos que se van á estudiar. Tiene aun otra ventaja este elemento, cual es la de tener una constancia suficiente durante un tiempo muy largo. Se unen los dos polos de esta pila á dos hilos de platino, introducidos en dos tubos capilares, largos de 4—5 cm., y llenos de la solución fisiológica de cloruro sódico. Estos hilos, bañados en este suero artificial, se meten en los capilares, hasta—poco más ó menos—1 cm. del orificio opuesto por el que han entrado. Dichos capilares se fijan por medio de una gota de lacre sobre una laminita de ébano de 1 x 4 cm., de manera que las extremidades de los hilos metálicos se hallen equidistantes, sin exceder más de 1 cm. El otro extremo del tubo se cierra con lacre. Al lado de estos dos capilares que sirven de electrodos, se fija sobre la misma laminilla de madera, un tercero conteniendo un hilo de platino del mismo diámetro, y bañado del propio modo en la solución clorurada sódica, pero sin estar en comunicación con los polos de la pila. Este tubo se halla destinado á servir de testigo ó fiel de los otros dos.

Se introduce este dispositivo en la cavidad mesentérica de la rana, para lo que se fija este batracio sobre una plancheta de corcho por medio de cintas, y se le incinde el abdomen con las precauciones hemostáticas sabidas. La serosidad peritoneal en la que se sumergen los extremos de los capilares de vidrio, viene á cerrar el circuito de la pila; que efectivamente pasa la corriente nos cerionaremos por el galvanómetro.

Al cabo de veinticuatro horas de pasar la corriente se retiran los capilares y se examinan al miseroscopio. El

tubo del polo positivo contiene más leucocitos que el del negativo.

### **IX.—Procederes de coloración de las células hemáticas.**

Para la distinción y examen de los elementos sanguíneos, tanto aisladamente—en fresco ó en seco,—cuanto en cortes de sangre ó de territorios, en el interior de cuyos vasos hayan quedado después de fijado el objeto ó trozo orgánico sus glóbulos hemáticos, aconsejense varios métodos tintóreos á cual más diferente é instructivo.

Hay colorantes—los menos—que proporcionan una sola uniforme coloración; otros procederes tintóreos—los más—de mejor utilidad, proporcionan preparados hemáticos multicromáticos, en los que la contrastación da resultados positivos é instructivos. Esta clase de métodos—únicos que aquí estudiaremos—nos servirán, tanto para obtener preparados coloreados de la totalidad hemática, cuanto para diferenciar los componentes estructurales de cada elemento hemático en particular.

Preparaciones secas de sangre pueden teñirse ulteriormente, siempre que estén bien adheridos los glóbulos al cristal por la desecación y puedan sufrir los trasiegos á que necesariamente habrá de someterlas. Resulta en este caso agradables demostraciones, provocando la doble coloración con hematoxilina-eosina.

En preparaciones húmedas bastará deslizar por capilaridad el líquido colorante—ejemplo, picrocarminato—depositando una gota del tinte cerca del borde de un cu-

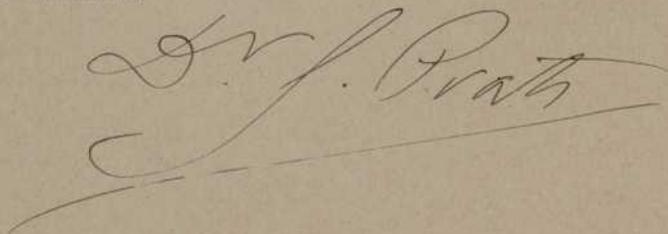
bre, que sujeto por sus cuatro ángulos por medio de parafina, tapa sangre fresca depositada en un porta; á favor de un trozo de papel absorbente colocado en el lado opuesto del cubre, se facilita la penetración á modo de ola del colorante.

Un método muy bueno para obtener preparados de sangre consiste en extender capa muy tenue de ella en un porta; meter éste rápidamente (lo más 10') en solución concentrada de sublimado (1). A seguida se lavará con agua varias veces remudada. Después se trasegará al alcohol, para después teñir, ó directamente del baño acuoso se meterá en el color.—Este modo de manipular fija la sangre tan perfectamente, y con tal éxito, que pueden sufrir después una serie de dobles coloraciones, tales, por ejemplo, como hematoxilina-eosina, verde metil-eosina, ó eosina y orange.

Ya por el año 1877 recomendaba BERTCHER (2) proceder del modo análogo siguiente: se prepara una solución saturada de sublimado corrosivo en alcohol de 96°. Se mezcla un volumen de sangre con 50 volúmenes de dicha solución. Se agita, y deja luego reposar veinticuatro ó cuarenta y ocho horas. Al cabo de este tiempo hállanse desprovistos los glóbulos de su materia colorante. Se decanta. Se vuelve á tratar el precipitado por alcohol puro;

(1) Siguiendo las instrucciones de BÜHM & OPEL en su *Taschenb. d. mikr. Technik* (2.ª ed. München 1893.—Blut und Lymphe, p. 85-95), nosotros obtenemos solutos saturados de sublimado, disolviendo 75 gr. de éste en 1.000 de agua en caliente. Aun caliente la filtramos y le dejamos en reposo enfriar. Si se forman en el fondo del vaso ya enfriado agujas blancas cristalizadas, conceptuamos tener un líquido sublimado más que saturado.

(2) *Arch. f. mikr. Anat.*, p. 74, 1877.



se agita y vuelve á dejar reposar otra vez por veinticuatro horas. Se decanta el alcohol y lava con agua. Este lavado último puede prolongarse varios días, sin perjudicar por eso los corpúsculos, que se mantienen endurecidos, hasta el punto de poder resistir perfectamente la acción de los reactivos colorantes. Es decir, que al fin de todas esas maniobras pueden teñirse y montarse de la manera que se desee.

Tenemos, decíamos, en primer lugar las dobles coloraciones obtenidas con la hematoxilina-eosina, con cuyos menstrosos se apropian los eritrocitos un particularísimo brillante color rojo, que indefectiblemente les hace reconocibles y se puedan descubrir aun en las tramas orgánicas más oscuras. Recordaremos es una coloración separadora temporal. Se manipulará del modo siguiente: se tiñe primeramente en buena hematoxilina, tal como la de BÖHMER, y se lava con agua. Se trasiega luego al soluto de eosina, siendo el más recomendable uno acuoso al 1:100; en él permanecerá la preparación 3'—5', ó si está más concentrado basta 1'; á seguida se lavará bien, en tantas aguas cuantas se necesiten, para que no aparezca más color rojo. Se llevan después á alcohol de 96° durante 2'—5'; al alcohol absoluto, 1'; al xylol y bálsamo Canadá.

Es muy esencial que el tinte de eosina no sea muy fuerte, pues una sobrecoloración hace invisible el preparado. Es posible corregir, si ocurre esta sobrecoloración, trasegando al alcohol flojo de 70°—80°, donde permanecerá un tiempo variable de minutos ú horas.

WISCOWZKY (1) recomienda sobre la hematoxilina la

(1) Arch. f. mik. Anat. 1876, p. 479.

eosina aluminosa, dando la fórmula siguiente:

Eosina . . . . .	1 —
Alumbre . . . . .	1 —
Alcohol . . . . .	200 —

Si se trata primero sangre con agua, y después por la solución de eosina anterior se nota, después de nuevo lavado acuoso, que los glóbulos rojos han adquirido un tinte rosado en todos aquellos puntos en los que la hemoglobina no haya sido extraída por el agua. Los elementos nucleados desprovistos de hemoglobina permanecen perfectamente incoloros, y en disposición de ser teñidos por tinturas como la hematoxilina.

V. THANHOFFER (1) logra mejor esta reacción de modo más marcado y permanente, fijando previamente los elementos hemáticos por el ósmio al 1:100, durante unos minutos cortos.

GIERKE (2) confirma este resultado y recomienda tratar durante 3' la capa sanguínea por solución ósmica á 0,5:100.

MOORE (3) aconseja proceder así:

Secar rápidamente una gota sanguínea sobre un porta-objetos, extendida en capa muy delgada.

Teñir durante 3' con unas gotas del licor siguiente:

Eosina . . . . .	1 —
Agua . . . . .	48 —
Alcohol . . . . .	48 —

Disolver primero la eosina en agua y añadir luego el alcohol.

(1) Centralblatt f. d. med. Wiss 1877, p. 881.

(2) Zeit. f. wiss. Mik. 1884, p. 380.

(3) The Microscope, p. 73, 1882; Journ. Roy. Mic. Soc., p. 714, 1882.

Lavado al agua.

Teñir durante 2' con solución acuosa de verde metileno al 1 por 100.

Lavar.—Secar.—Bálsamo Canadá.

Aparecerán los eritrocitos rojos, leucocitos y sus núcleos verdeazulenco.

HARRIS (1) en 1885 proponía ejecutar preparados hemáticos, cual á continuación expresamos:

Depositar sangre en tenue capita sobre un cubre, secando de seguida. Fijar por ácido crómico al  $\frac{1}{2}$  por 100 ó por bicromato de potasa á 0,5 por 100.—Trasiego durante 5' en alcohol. Lavado en agua. Secar al aire. Flotar el cubre sobre, ó en solución de *Spiller's purple*, al 1 por 100 con trazas de alcohol, ó en solución alcohólica débil de roseina, durante 10'. Lavar en agua. Secar y montar al bálsamo, con ó sin esencia de clavo para esclarecer.

Toison (2) recomienda como líquido diluidor y colorante, útil no solo para diferenciar glóbulos rojos y blancos, si que también como líquido titulado empleable en las numeraciones hemáticas, el formulado así:

Violeta metilo 5 B. . . . .	0,25 gramos
Glicerina neutra á 30° . . . . .	30 cm. <sup>3</sup>
Agua destilada. . . . .	80 gramos

D. y añádase:

Cloruro sódico puro . . . . .	1 gramo
Sulfato sosa puro. . . . .	8 gramos
Agua destilada. . . . .	80 cm. <sup>3</sup>

Filtrese antes de teñir. Los leucocitos se tiñen á los

(1) Journ. Roy. Mic. Soc., p. 537, 1885.

(2) Journ. sc. med. de Lille, Febrero, 1885; Zeit. f. wiss. Mik., p. 398, 1885.

5'—10' de violeta, obteniéndose el máximum colorante de los 20'—30' en cuyo momento se distinguirán perfectamente bien de los corpúsculos rojos teñidos en verde.

En preparaciones hemáticas crónicas, conviene tener en cuenta se enverdecen los eritrocitos, si se emplea la mixtura NORRIS & SHAKSPEARE, que se fabricará cual sigue á continuación:

Carmin. . . . .	2 —
Bórax . . . . .	8 —
Agua destilada . . . . .	130 —

En un mortero se mezclará y hará lo posible se disuelva la mayor parte; se dejará veinticuatro horas en reposo, decantará y filtrará. Por otro lado se mezclarán y después filtrará:

Índigo carmin. . . . .	8 —
Bórax . . . . .	8 —
Agua destilada . . . . .	130 —

De ambos filtrados se mezclarán partes iguales. En los diferentes trasiegos no se puede lavar con agua.

R. HEIDENHAIN recomienda para preparaciones sublimadas, más especialmente, y en la investigación de las diferentes clases de células emigrantes, que según él existen en los tejidos, su modificación al método de BIONDI-ENRICH.

Las cédulas viajeras, según dicho autor, son:

- 1.º Células con cuerpo protoplasmático muy pequeño, casi decolorado.
- 2.º Células con gran protoplasma de tinte rosa claro.
- 3.º Células con granulitos.
- 4.º Células con núcleo verde azulado intenso y pro-

toplasma rojo subido intenso, que, según el criterio del autor, son formas transitorias.

La tintura se preparará: haciendo tres soluciones acuosas saturadas por separado de verde de metilo, de fuchina ácida, y de orange, cuyos polvos colorantes aconseja adquirirlos en casa de GRUBLER, en Leipzig. Se dejarán reposar varios días, pero agitándolas á menudo. Después de estos días se hará la mezcla:

<i>Sol. acu. concentrada de</i>	{	verde metilo . . . . .	50 cm. <sup>3</sup>
		fuchina ácida . . . . .	20 cm. <sup>3</sup>
		orange . . . . .	100 cm. <sup>3</sup>

Cuando vayamos á teñir se diluirá

de la mezcla saturada . . . . .	1 —
Agua. . . . .	100—60 —

Para que se ponga más roja esta disolución habrá que añadir ácido acético, y probarla manchando un papel de filtro, que se teñirá verde azulado en medio y naranja en los contornos.

Los cortes estarán seis-dos horas en el color y se desteñirán en los alcoholes, después xilol y bálsamo. Las figuras karyokinéticas y los núcleos fragmentados de los leucocitos, se verán verdes; los núcleos en reposo, azul; los hematíes, rojos.

Y llegamos ahora á los interesantísimos métodos colorantes instituidos por EHRLICH, y perfeccionados por sus discípulos, para averiguar las diferentes organizaciones leucocíticas, y distinguirlos clara y evidentemente de los otros elementos anatómicos componentes de la sangre, dada la distinta receptividad tintórea de unos y otros.

Más antes creemos pertinente dar un sucinto recuerdo de las diferentes clases de leucocitos que según EHRLICH (1) en la sangre pueden hallarse.

1.º *Linfocitos pequeños*.—Son un poco más pequeños que los eritrocitos, y poseen un núcleo grande intensamente coloreable, y componiendo casi la totalidad de la masa principal de la célula, de tal modo, que solo existe alrededor de dicho núcleo una escasa masa de protoplasma.

2.º *Linfocitos grandes*.—Representan un estadio de desarrollo más avanzado de los linfocitos pequeños, son 2—2 veces tan grandes como los glóbulos rojos, y poseen también un gran núcleo, pero que en oposición á los linfocitos pequeños, está rodeado de una masa protoplasmática clara y ancha. El núcleo es algo más débilmente coloreable que el de los linfocitos pequeños. Los linfocitos grandes y pequeños componen en la sangre normal el 25 por 100 de todos los glóbulos blancos.

3.º *Los elementos mononucleares* ó formas transitorias, distingüense de los linfocitos grandes por que su núcleo no es redondo simétricamente, sino que presenta un recodo en medio.

---

(1) P. EHRLICH.—Methodologische Beiträge zur Physiologie und Pathologie der verschiedenen Formen der Leukocyten.—Zeitschr. f. klin. Med., t. I, p. 553.

P. EHRLICH.—Ueber das Methylenblau und seine klinisch-bakterioskopische Verwerthung.—Zeitschr. f. klin. Med., t. II, p. 710.

Además de estas personales publicaciones, ha dado á conocer EHRLICH sus observaciones en las siguientes tesis de tres de sus alumnos:

SCHWARZE.—Ueber eosinophile Zellen.—Inaug. Dissert. Berlin, 1880.

SPILLING.—Ueber Blutuntersuchung bei Leukämie, id. id.

WESTPHAL.—Ueber Mastzellen, id. id.

4.º *Leucocitos polinucleares*.—Son más pequeños que las formas transitorias mononucleares, pero más grandes que los glóbulos rojos. Poseen, ó un núcleo las más veces giboso, ó varios núcleos intensamente coloreables. Constituyen el 70 por 100 de todas las células blancas de la sangre normal y poseen la capacidad de la emigración.

5.º *Células eosinófilas*.—El núcleo se tiñe un poco más obscuro que el de los leucocitos polinucleares. Las granulaciones que existen por entre el protoplasma se tiñen intensamente en rojo con la eosina. Rarisimos en la sangre normal.

MÁX. SCHULTZE distingue solo tres formas diferentes de leucocitos:

1.º Los redondos, pequeños, menores que los eritrocitos, con granos finísimos ú homogéneo protoplasma, con un núcleo rodeado de corta cantidad de protoplasma.

2.º Los redondos, casi tan grandes como los eritrocitos, con núcleo lobulado y divisible en varios. Movimientos muy perceptibles.

3.º Las formas mayores, escasos en número, con granulaciones fuertemente refringentes, «células granulosas». Movimientos lentos.

Por otra parte, conviene también recordar que EARLICH clasifica los *tintes anilínicos* de modo diferente que en Química. Llama, en efecto, substancias colorantes *ácidas*, aquellos compuestos en los que—cual el ácido pícrico amoniacal—un ácido representa el principio colorante: Eosina, Aurantia, Indulina, Nigrosina. Designa substancias colorantes *básicas*—cual la rosaanilina acética—las originadas de una base colorante y un ácido indiferente:

Fuchina, Pardo BISMARCK, Safranina, Genciana, Dalia, Violeta de metilo. Finalmente, considera cual *neutras* á las nacidas, como la rosaanilina pterica, por la combinación de una base tintórea y un ácido colorante: Azul metilo, Verde metilo.

No hace mucho tiempo ha indicado EHRLICH más detalladamente que los glóbulos blancos contienen en su protoplasma, por fuera del núcleo, granillos ó granulaciones que se muestran con diferente comportamiento frente del grupo definido anterior de los colores de anilina, y en su virtud pueden discernirse ó dividirse las diferentes clases de granulaciones en cinco variedades: *alfa*, *beta*, *gamma*, *delta* y *epsilon*.

Si bien estas diferencias son realmente químicas, se pueden también distinguir por otras características, las diferentes granulaciones leucocíticas. Pueden diferenciarse:

- 1.º, por su comportamiento frente á los medios disolventes, tales como el agua, ácidos, alcohol y glicerina;
- 2.º, por su tamaño, forma y refringencia;
- 3.º, por su comportamiento frente las altas temperaturas; y
- 4.º, por la distribución que presentan los granillos en el cuerpo celular.

a.)—Células eosinófilas ó ácidas.—Son las que primero importa conocer, toda vez que pueden distinguirse sus granulaciones por una intensa coloración á favor de las tinturas anilínicas ácidas, pero sobre todo la eosina. Con granulaciones *alfa*.

Para teñirlas se manipulará del modo siguiente:

1.—Preparado el cubre se calienta varias horas á 120° C. (1)

2.—Tinte varias horas en el soluto ácido á la hematoxilina-eosina de EHRLICH, compuesto de:

Hematoxilina. . . . .	2 —
Alcohol absoluto. . . . .	60 —

A esta solución se añadirá:

Glicerina. . . . .	60 —
Agua destilada. . . . .	60 —
Ácido acético. . . . .	3 —

poniendo alumbre á saturación, y adicionando por último 0,5 — de eosina, y dejando el licor expuesto á la luz antes de usarlo tres semanas.

3.—Lavado en agua.

4.—Secar.

5.—Bálsamo del Canadá.

Los preparados así ejecutados manifiestan los glóbulos blancos, tanto la variedad de linfocitos como la de los polinucleares, teñidos fuertemente; los núcleos de los mononucleares de color gris azulenco; los eritrocitos están teñidos de rojo cobrizo; las granulaciones eosinófilas de rojo.

También se puede emplear, después de observar lo que pasa, según el método anterior, el proceder siguiente de

(1) Aun á trueque de repetir lo ya dicho en otro sitio, conviene recordemos que la preparación de un cubre para teñir la capa de líquido de que se ha untado, se hace: aseo del cubre (agua caliente, alcohol y amoniaco, alcohol solo, llama); unción del líquido al cubre por deslizamiento entre dos cristallitos que se cogen con pinzas de madera; secar al aire; después conviene para fijar la hemoglobina, calentar durante 1/2—2 horas los cubres untados en cámara de aire ó en una esterilizadora, á una temperatura de 120°—130° C., y después ya teñir.

HUBER para cubres untados y secados cual antes (1): coloración con

Aurantia . . . . .	} de cada uno . . . . .	2 —
Indulina . . . . .		
Eosina . . . . .		
Glicerina . . . . .		

Durante doce horas.

Después lavado en agua.—Secar.—Bálsamo.

Por este tratamiento aparecen los núcleos celulares azules; las células eosinófilas rojas, rojo-negras, y los eritrocitos, rojo-cobrizos.

Si se quisieran obtener y presentar aisladas las células eosinófilas, renúnciese de los colorantes nucleares y utilícese solo para colorear de un sencillo soluto de eosina. Los mejores de estos son las fuertes saturadas soluciones rojas de eosina en glicerina; después seguirá lavado en agua.

Tal hacen sobre todos GABRITSCHESKY (2) y ALDEHOF, (3) si bien éste aconseja una solución alcohólica concentrada de eosina núm. 22 (azul), de la fábrica de BAYER, en Elberfeld, la que proporciona resultados magníficos, según JAKSCH.

La demostración de estas células eosinófilas es de extraordinaria importancia, porque como ha demostrado EHRLICH, así como por lo regular no están aumentadas en la leucocitosis aguda, si lo están, al contrario, en la

(1) HUBER & BECKER.—Die pathologisch-histologischen und bacteriologischen Untersuchungs-Methoden. S. 49, 1886, Leipzig, F. C. W. Vogel.

(2) Archiv. f. exper. Pathologie und Pharmacologie 28-83, 1891.

(3) Pragermed. Wochenschr. 92.—1891.

leucemia de modo muy considerable. En la sangre normal son raras.

Según EHRLICH, precisa para diagnosticar con la posible certeza las células blancas eosinófilas, no solo el poder colorable de los granos hacia una de las tinturas ácidas, si no que es necesario probar y mostrar el poder cromógeno hacia todos los demás colores ácidos:

Mixtura *a* de eosina-glicerina al rojo fuerte.

Mixtura *b* de indulina-glicerina á saturación.

Mixtura *c* de orange en solución acuosa saturada.

Mixtura *d* de eosina-indulina glicerina.

Otra mixtura que por último ensayaremos, es la recomendada por WEICHELBAUM:

Eosina cristalizada. . . . .	10	—
Nigrosina cristalizada. . . . .	13,15	—
Orange. . . . .	8	—
Glicerina . . . . .	70,100	—

Bien molidos y mezclados se dejarán un día á 60° C. No se filtra.

Para hacer uso de esta tintura se procederá: viértense unas gotas del color sobre un porta: colóquese un cubre untado con sangre caliente; déjese obre el color más de seis horas. Lavado del cubre en agua. Secar. Bálsamo y examinar.

Maniobrando así aparecen: los núcleos negros; la hemoglobina amarilla; y los leucocitos eosinófilos rojos, no estando muy teñidos los neutrófilos.

b.)—Células con granulaciones beta. — Llamadas también anfófilas, indulinófilas, coloréanse con tintes ácidos y básicos. Existen en el cochinillo de mar, conejitos

y pájaros. Para demostrarlas se procede en preparados secos: utilizando al tiempo de teñir ó soluciones saturadas de eosina, ó amarillo de naftilamina, ó indulina en glicerina.

Aparece la hemoglobina amarilla; núcleos negros; granulaciones *alfa* rojas y las *beta* negras.

c.)—Células basófilas de granulaciones *gama*.—Tiñense regularmente con los colores básicos de anilina (tinturas bacterianas). También son basófilas las células de granulaciones delta. Las granulaciones *gama* se señalan también en los granillos de las *Mastzellen* ó células de engorde, de cebar, existentes en los tejidos conjuntivo y hemático. Si bien no provienen de la sangre normal humana, hállanse en muy respetable número en los leucémicos. Las granulaciones basófilas *gama* son relativamente gordas, comparadas con las *delta* que son finas. Aconseja EHRLICH para demostrar las granulaciones *gama* usar la solución:

Alcohol absoluto . . . . .	50	—
Agua . . . . .	100	—
Ácido acético glacial . . . . .	12,5	—
Dahlia . . . . .	hasta completa saturación.	

Manténgase el cubre untado varias horas en el color.

Lavado por larga permanencia en alcohol.

Para la demostración en los órganos es indispensable indurar y fijar en alcohol (durante veinticuatro horas), teñir durante doce ó más horas; trasiego al alcohol.

WESTPHAL se sirve para teñir el núcleo simultáneamente, así como en cortes que hayan estado fijados por permanencia de más de media semana en alcohol, de la mixtura alumbre-carmin-dahlia siguiente:

Carmin	}	Carmin . . . . .	2 gr.
GRENACHER-PARTSCH.		Agua destilada . . . . .	200 cm. <sup>3</sup>
		Alumbre . . . . .	2 gr.

Estas tres cosas se hervirán más de un cuarto de hora y se filtrará. Frío se le adiciona

Acido carbólico . . . . . 1 cm.<sup>3</sup>.

A este soluto carminoso se añade:

Sol. satur. en alcohol absoluto de dahlia. . . . .	200 cm. <sup>3</sup>
Glicerina . . . . .	100 cm. <sup>3</sup>
Acido acético glacial . . . . .	20 cm. <sup>3</sup>

Mézclese el todo, y déjese reposar algún tiempo.

En este licor se sumergirán los trozos fijados en alcohol, permaneciendo los cortes veinticuatro horas, y aun más largo tiempo, y trasladándolos después á nuevo alcohol tanto más tiempo. Se destiñen los cortes, solo los núcleos mantienen algo de color rojizo, pero quedando de azul intenso las granulaciones de los mastzellea. Material útil: tejido interlobular hepático, intestino, etc.

Si es un cubre untado, después de teñido se dejará secar al aire y cerrará al bálsamo. Aparecen en estos preparados los mastzellen cual acúmulos granulosos de rojo violeta, de los que cada uno lleva en su centro un girón del núcleo celular. Todas las demás imágenes nucleares son violetas ó azules.

Según el mismo autor, tiñe el verde metilo impuro, muy distintamente las granulaciones *gamma* azul violeta y los núcleos verde.

d.)—Células con granulaciones *delta*.—Son muy finos los gránulos que presentan los leucocitos mononucleares de la sangre humana. Estas granulaciones son también

coloreables por los colores básicos y hállanse en las formas transitorias de los mononucleares. Para teñirlas se calentará y colocará la preparación durante 10' largos en solución acuosa concentrada de azul metilo; después lavado en agua, secar y cerrar con bálsamo. Están aun poco estudiados.

e.)—Células neutrófilas ó de granulaciones *epsilon*.—Lo mismo se tiñen con los tintes anilínicos neutros que con las mixturas constituidas por una anilina básica y otra ácida. Hállanse en preparaciones secas de leucocitos, (muy apretados, polinucleares) de sangre humana. Manipularemos del modo siguiente:

1.—Preparación seca de un cubre, según EHRlich.

2.—Sumersión durante unos minutos en el colorante:

Solución acuosa saturada de orange. . . . .	125 —
Solución acuosa concentrada de fuchina ácida con 20 por 100 de alcohol. . . . .	125 —

Mézclese y adiciónese:

Alcohol absoluto. . . . .	75 —
Solución acuosa saturada de verde metilo. . . . .	125 —

No se empleará sino tras largo reposo. Entonces si por la filtración apareciera variación en su composición, ó aparte de esto apareciera sedimento por precipitación, al teñir se procederá cogiendo del centro del líquido con una pipeta la cantidad de tinte necesaria y depositándola en el cubre.

3.—Lavado en agua.—Bálsamo Canadá.

La imagen que así aparece es: la hemoglobina amarillo-naranja, núcleos verdosos, granulaciones eosinófilas ver-

de obscuro intenso, y los granillos neutrófilos violeta intenso.

WEICHELBAUM aconseja preparar la mixtura anterior y utilizarla del modo diferente siguiente: se preparan, primero, á saturación solutos acuosos de orange G, fuchina ácida y verde-metilo, cada uno en su frasco, teniendo la precaución imprescindible de hacer que permanezcan los fondos de los frascos en sitio caliente, aun enfriada la substancia colorante; sin agitar el frasco se vierte de cada disolución 50 cm.<sup>3</sup> en un nuevo y común frasco, adicionando á la triple mezcla 50 cm.<sup>3</sup> de alcohol absoluto y 100 cm.<sup>3</sup> de agua destilada. Conviene permanezca esta mixtura así elaborada muchas semanas, hasta que se forme un precipitado que ocupe todo el fondo del frasco y aparezca un color moreno-oscuro. No conviene filtrar el líquido. Cuando se vaya á emplear se sacará sin agitar, del centro de la masa líquida con pipeta seca, las gotas necesarias, que se llevarán al cubre para teñir. Se dejan unos minutos hasta que comiencen á medio secarse las gotas de color; se lava con agua, secar, y bálamo.

Desgraciadamente no es constante este medio tintóreo en su acción; muchas veces tiñe primero bien, si es ya muy viejo el caldo colorante, y otras veces dá resultados negativos. También puede suceder que uno ú otro de los colores de que se compone la mixtura no valga nada, en cuyo caso el remedio es añadir más cantidad.

Imágenes muy precisas dá tambien el método siguiente:

1.—Coloración durante 5' largos en:

Solución saturada acuosa de fuchina ácida. . . 5 vol.

Adiciónese, agitando poco á poco,

Solución concentrada acuosa de azul metilo. . . . .	1 —
Agua destilada . . . . .	5 —

2.—Lavar, secar y montar.

Aparecen los eritrocitos rojos, los gránulos *epsilon* violeta, y los *alfa* púrpura brillante.

También dá muy buen resultado la mixtura ARONSON-PHILIP, que se prepara: haciendo previamente, y por separado, soluciones saturadas acuosas de orange G extra, rubina ácida extra y verde metilo cristalizado; cuando por la sedimentación y reposo se aclaran las soluciones, se hace la mixtura mezclando:

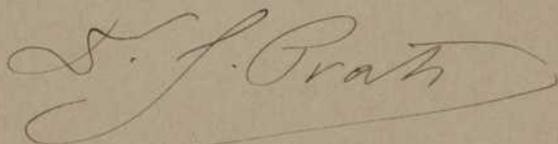
Orange G. . . . .	55 cm <sup>3</sup>
Rubina ácida . . . . .	50 —
Agua destilada. . . . .	100 —
Alcohol . . . . .	50 —
Verde metilo . . . . .	65 —
Agua destilada. . . . .	50 —
Alcohol . . . . .	12 —

Déjese reposar varias semanas. Coloración durante varias horas largas.

Después lavado en agua, secar al aire, bálamo.

Las imágenes que aparecen son: núcleos verdes, hemoglobina naranja, granulaciones *epsilon* rojo violeta, granulaciones *alfa* rojo amarillo.

Las células neutrófilas proceden como mononucleares de la leche, ganglios linfáticos y médula ósea, siendo de particular importancia el recordar que esos granos *epsilon* cruzan luego la sangre, perteneciendo á los leucocitos polinucleares, cual aquellas formas que emigran en la



inflamación. Lo mismo se descubre en las partes capitales componentes de los leucocitos de la sangre normal; el pus se compone en lo esencial de esta clase de leucocitos neutrófilos.

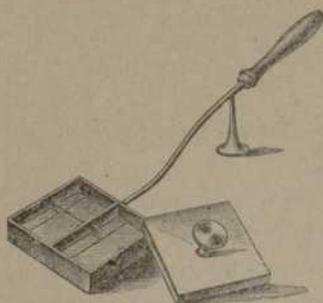


Fig. 20.—Caja del Prof. KRÖNNIG, de Berlín, con cuatro cavidades donde se calientan en soluciones tintóreas preparaciones sobre cubres.

Si utilizamos la fórmula de BIONDI-EHRlich, modificada por HEIDENHAIN (pág. 86), en esta clase de exámenes las imágenes aparecidas serán: hemoglobina amarilla, granulaciones alfa roja y los gránulos epsilon verdes.

### X.—Obtención, examen y coloración de las plaquetas hemáticas.

Son las plaquetas sanguíneas unos elementos discoideos ovals de tamaño variable, pudiendo alcanzar un tercio del tamaño de un glóbulo rojo.

Para demostrarles hay que escoger una especial manera de vislumbrarlas de sorpresa, toda vez que la más débil irritación ó influjo externo, tal cual el aire, los destruyen cambiando considerablemente su aspecto y forma.

Procediendo con suma rapidez, la simple demostración de tales elementos es cosa fácil, maniobrando según los consejos de KEMP (1). No hay más que depositar en un

(1) Studies f. Biol. Lab. Johns Hopkins Univ. Mayo 1886, vol. III, n.º 6.—*Nature*, 1886, p. 132.

cubre-objetos una gran gota de sangre, diluirla muy rápidamente en solución salina normal y proceder de seguida á la observación con el microscopio. Las plaquetas al tener la propiedad de pegarse al cristal, permanecen en su sitio, siendo aquí visibles en gran número. Es decir, que al estudiarlas se enfocarán aquellos puntos del preparado ó mejor del cubre-objetos, con los que contactara primeramente la gota sanguínea, pues por su viscosidad no tan fácilmente se arrastran y esparcen por la varilla agitadora, cual lo hacen los otros elementos hemáticos (HAYEM).

No obstante, como las plaquetas no conservan gran tiempo sus propiedades y características normales, convirtiéndose en masas granulosas amorfas, precisa buscar algún medio que evite ó contenga esas alteraciones. Pueden conservarse las plaquetas con sus normales caracteres, mediante una fijación apropiada, como por ejemplo, con la obtenida por medio de los humos ósmicos.

Se procede para ello poniendo sobre la propia piel, ó mejor sobre la piel rasurada y lavada con agua caliente, una gran gota de solución de ácido ósmico al 1 por 100; á través de dicha gota se punciona la piel. Sale la sangre é inmediatamente se mezcla con la solución ósmica, sin contactar nada con el aire. Las ulteriores manipulaciones, cual en los preparados húmedos hemáticos. De este modo —tan señaladamente recomendado por EBERTH y SCHIMMELBUSCH— pueden investigarse perfectamente bien estos elementos hemáticos. BIZZOZERO aconseja emplear para que la fijación resulte más permanente y durable, la mezcla siguiente:

- Solución acuosa de ácido ósmico al 1 por 100 . . . 1 —  
Solución acuosa de sal marina al 0,75 por 100 . . . 2 —

Pueden observarse también en completa integridad en el interior de los vasos vivos, ó empleando los medios conservadores teñidos para que la contrastación tintórea las ponga de manifiesto. El líquido á este fin empleado, con ligeras variantes en su composición cuantitativa, es una mixtura hecha con un poco de violeta metilo y solución de sal de cocina, que en efecto conserva la forma del elemento y los tiñe, no como á los núcleos, de manera intensa (1), sino ligeramente.

Mixtura que podemos fabricarla de los diferentes modos siguientes:

- Violeta de metilo . . . . . 1 gramo  
Solución acuosa de sal marina al 0,75 por 100 . . . 5000 —

Ó esta otra:

- Violeta de genciana . . . . . 1 —  
Solución acuosa de sal cocina al 0,75 por 100 . . . 3000 —

Fórmulas aconsejadas por BIZZOZERO y FIRKET (2).

Ó esta de KAHLDEN:

- Violeta de metilo. . . . . 0,01 —  
Solución de sal común al 6 por 100. . . . . 50 —

Ó la más práctica de STÖHR (3).

- Solución acuosa de violeta metilo. . . . . III gotas  
Solución de cloruro de sodio al 0,75 por 100. . . . 5 cm.<sup>3</sup>

(1) BIZZOZERO y TORRE.—Arch. per le sc. med. 1880, p. 390.

(2) BIZZOZERO.—Arch. f. path. Anat. sc. Phys.; Zeit. f. wiss. Mik., 1884, p. 389.

(3) STÖHR.—Lehrbuch der Histologie und der microscopischen Anatomie des Menschen, etc., Jena, G. Fischer.—1895.

De esta mezcla se depositan unas gotas recientemente filtradas sobre el sitio que se va á pinchar. Las plaquetas de este modo se tiñen en azul intenso con brillo particular, que conviene no confundir con los leucocitos igualmente coloreados á la vez. El examen se hará con grandes aumentos. Esta última mixtura colorante tiene alguna vez, á pesar de filtrarla cuidadosamente, partículas granulosas sólidas que es preciso no confundir con las plaquetas, por las que se pueden tomar.

BÖHM y OPPEL recomiendan con particular interés el empleo, para investigar las plaquetas, del líquido conservador tintóreo de AFANASSIEW:

Peptona seca . . . . .	0,6
Solución fisiológica de sal común. . . . .	100

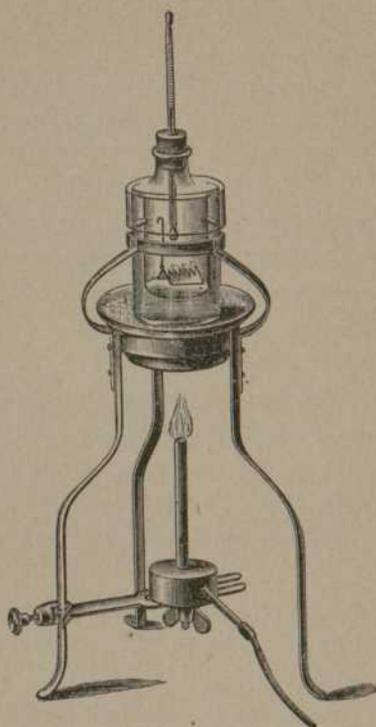
Disuélvase y adiciónese violeta de metilo en proporciones variables desde 1:10.000 hasta 1:20.000. La mixtura se cocerá antes de utilizarla; pínchese á través de una gota de cualquiera de esas mixturas la piel sobre que se deposita. Conserva bien todos los elementos sanguíneos.

Este licor se corrompe fácilmente, por cuyo motivo es preciso esterilizar previamente el bote en el que se guarda, á más de hervir y cocer el licor y de añadirle una insignificante parcela de sublimado ó ácido fénico.

Un medio alejador de las notables visibles mutaciones ó alteraciones de las plaquetas, consiste en utilizar, según EHRLICH, un brusco y fuerte calentamiento, á fin de obtener un preparado seco rápidamente.

Las plaquetas se colorean difusamente en preparados así secos, á favor de las soluciones concentradas acuosas

de violeta metilo, verde anilina, fuchina, etc. Conviene recordar que si al principio de la observación nótanse bien diferenciadas las plaquetas, después—la mayor parte



*Fig. 21.—Baño de aire para fijar sobre cubres preparados, sangre á temperaturas determinadas, según el Prof. G. КАРНИЦ, de Berlín.*

de las veces—aparece una modificación consistente en que se pone granuloso el centro de la plaqueta, tiñéndose algo más intensamente que la periferia que lo hace más homogéneo.

## XI.—Técnica investigadora del origen y evolución de las células hemáticas.

Para que el estudio analítico de un tejido sea acabado, tras de cuantas cuestiones morfológicas conciernen á su estado de adultez, hay que resolver el problema del origen y evolución de sus elementos típicos característicos. La sangre es un tejido definido con sus elementos fijos—paradoja bien definida por RENAULT—de donde habremos necesidad de investigar el origen de estos elementos para hacer una acabada historia evolutiva y genética de las células sanguíneas.

Para estudiar técnicamente el controvertido tema de la celulogénesis hemática de modo adecuado, emprendemos, según los procederes generales de técnica micrográfica, una serie de pruebas experimentales en averiguación de su origen embrionario, evolución fetal, y por último, del modo de renovarse en estado adulto.

a.)—Para hacer en primer término el estudio de los eritrocitos en el embrión, escogeremos huevos de pollo de 20 á 30 horas de incubación; larvas de anfibios, y bazo, médula ósea, hígado y sangre circulante de mamíferos en estado embrionario y fetal (1).

---

(1) BÖHM y OPPEL.—Taschenbuch der mikroskopischen Technik. 2.ª ed., Embriologische Technik, p. 149-158.—München, 1893.—Donde se detallan cuantas reglas técnicas conducen al conocimiento de punto tan interesantísimo de histogénesis, y que dejamos de tratar para no transpasar el cuadro que nos hemos marcado en la redacción de esta obra.

Se emprenderán investigaciones en los islotes de WOLFF del área vascular, en cuyos sitios se observarán los eritrocitos nucleados, así como también las células no diferenciadas constituyendo los leucocitos.

b.)—Para estudiar el desarrollo vascular y de los elementos hemáticos en la primera época post-embriónica, bastará con observar el epiploón de un animal de edad conveniente, cuidando de que esté recién extraído y conservado en líquido peritoneal, evitando toda evaporación por medio de bordeamiento con parafina del cubre-objetos.

Puede ser útil para emprender esta clase de investigaciones la (Fig. 22) cola de renacuajos, en opinión de KÖLLIKER y SOLA;



Fig. 22.—Capilares sanguíneos en vías de crecimiento en una expansión membranosa de la cola de renacuajo. Puntas de crecimiento. Puentes protoplasmáticos sin ahuecar.

para SCHAEFER; el hígado embrionario, según NEUMANN; el amnios del conejo, según WISSUTZKY; el mesenterio del caviar, para NICOLAIDES; en la mancha embrionaria del huevo del pollo, dice KLEIN; BAYERL aconseja las cápsulas cartilagosas de los cartilagos en vías de osificación; HAYEM, LÉBOUCQ, etc., en otros puntos.

La manera de manipular en algunos de estos territorios ahora la indicaremos; pero, interesa antes advertir, que

en esta clase de investigaciones debemos ir sin prejuicio alguno, solo con el buen deseo—tras de largas comprobaciones por diferentes y opuestos medios y modos ejecutadas—de interpretar con el menor error posible los hechos del pequeño, ya que no menguado mundo celular que se examina.

Entre otros, PAUL FRANÇOIS (1) ha estudiado epiploóns de conejos de variable edad, desde algunas horas hasta veinte días. Fija el epiploón por el sublimado, ó por el ácido pícrico, ó por el licor de FLEMMING, tiñendo luego con hematoxilina de KLEINENBERG y la eosina.

La marcha que seguiremos para examinar la neoformación de los capilares, será, por ejemplo: Se mata por el cloroformo un conejito de siete días; se sujeta en una tableta de corcho y se abre la cavidad abdominal por incisión crucial. Se extirpa rápidamente el bazo, estómago y epiploón grande que á él está adherido y se sumerge todo en unos 80 cm.<sup>3</sup> de solución acuosa saturada de ácido pícrico. En este líquido se extiende el gran epiploón muy fácilmente. Pasada una hora de permanencia en el líquido pícrico se separa el gran epiploón de sus adherencias y se mete en 60 cm.<sup>3</sup> de agua destilada; se cortan entonces fragmentos que tengan—poco más ó menos—1 cm.<sup>2</sup> Uno de estos trozos se coloca sobre un porta-objetos, se separa el agua con papel de filtro y después se extiende lo más delicadamente con agujas. Manipulación esta que será tanto más facil cuanto más agua contenga la preparación. Se tiñe después depositando sobre

---

(1) Recherches sur le développement des vaisseaux et du sang dans le grand epiploon de lapin Arch. de biologie. T. XIII, fasc. 4.

el cubre-objetos unas gotas de hematoxilina BÖMER. Después de 5' se mete todo—porta, fragmento y cubre—en agua destilada; se desliza así el fragmento sin plegarse; pasados otros 5' se lleva con espátula, el corte, á un baño de eosina donde permanecerá 3'. Lavado rápido—1' en agua destilada. Colocación en un porta-objetos extendiendo el corte con cuidado, sustracción del agua con papel chupón, adaptación de un cubre-objetos que lleva en su cara inferior, colgando, una gota de glicerina debilitada con agua. Puede montarse con bálsamo Canadá, pero se pierden detalles bastantes importantes. Tiñense los glóbulos rojos de rojo brillante eosínico.

Para examinar los hematies generándose, aconseja BAYERL (1) colorear tejidos, cual el cartilaginoso en vías de osificación. Recomienda proceder del modo siguiente: Escoger cartilagos en tal estado, y decalcificarlos por mezcla á partes iguales de ácido clorhídrico al 1 por 100 y de ácido crómico al 3 por 100. Lavado en agua varios días; deshidratación, inclusión en parafina, cortes. Esencia trementina para sustraer la parafina, trasiego al alcohol absoluto. Coloración de los cortes en una mezcla de

Carmin borácico

Carmin índigo de MERKEL;

lavado en alcohol absoluto; esclarecer con esencia de clavo, ó mejor aun, bencina, pues, la esencia ejerce influencia oxidante, obscureciendo la coloración, y por último, montaje en bálsamo Canadá.

La matriz del cartilago y del tejido óseo se tiñen en

---

(1) Arch. f. mik. Anat., 1885, p. 35.

azul, las células en rojo, y lo que es muy importante, los eritrocitos, se tiñen en verde manzana muy característico.

c.)—Para la demostración de los llamados eritoblastos escogeremos bazos de peces y anfibios con cola, ó la médula ósea roja.

El proceder que más confianza debe merecer—según opinión del sabio histólogo español S. R. CAJAL—para el acabado estudio de las células rojas nucleares, es el examen en fresco, sin más vehículo que el plasma, que normal y naturalmente empapa y separa los elementos vivos. No obstante, pueden ser tan numerosos los elementos celulares, y hallarse tan apiñados (barro esplénico, médula ósea), que sea preciso diluirlos para separarlos; en este caso utilizaremos exclusivamente la solución fisiológica de cloruro sódico (0,75 por 100) que conserva la forma y color de los elementos que investigamos.

El ácido ósmico, el alcohol, etc., deben proibirse, pues alteran notablemente la forma de dichos elementos y enmascaran la coloración, haciéndoles con frecuencia irreconocibles. Los reactivos nucleares los emplearemos para completar el estudio de aquellos elementos. El licor sódico-metílico-acetificado nos revelará especialmente el núcleo de los elementos hialinos y demostrará las fases karyokinéticas.

Otro proceder que permite conservar los elementos disociados consiste en: dislacerar sobre un porta-objetos, rápidamente, una pequeña parcela de médula fresca ósea. Poco antes de que se seque se trata con unas gotas de alcohol absoluto, y luego por solución concentrada de

eosina en alcohol, durante unos cortos minutos; lavado en agua; coloración por la hematoxilina y montaje en glicerina. Estos preparados muestran los núcleos violáceos y las células hemoglóbicas de un rosa amarillento.

Según opinión de NEUMANN la médula roja ósea—propia- mente formadora de sangre, y en la que hallaremos los distintos estadios evolutivos de los glóbulos sanguí- neos—hállase en los huesos del cráneo y en la mayor parte de los del tronco (cuerpos vertebrales); en cambio, los huesos de las extremidades, ó no contienen mas que médula grasienta, ó solo existe la roja en los extremos superiores del fémur y húmero. Sitios donde—por consi- guiente—iremos á buscarla cuando vayamos á hacer pre- parados de ésta naturaleza.

d.)—Para investigar la formación leucocítica se ejecu- tarán preparados de bazo y de ganglios linfáticos, por un lado, ó vivos y circulantes en territorios transparentes y adecuados.

Las figuras kinéticas de los leucocitos en los mamife- ros, son tan diminutas (STÖHR)

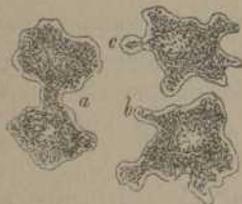


Fig. 23.—Leucocitos en segmentación directa a. Leucocitos hijos b y c

que solo pueden hallarse y ser percibidas por observadores ya ejercitados y con auxilio de potentes amplificaciones. Se les reconoce por su coloración rojo fuerte, si se han teñido por la safranina, después de fijados por el líquido cromo-ósmo-acético, induración al alcohol, y montaje al balsamo, cual en general aconseja aquel ilustre micrografo suizo, al ha-

llazgo de las figuras mitóticas en el bazo y ganglios linfáticos.

En la sangre viva del *pleurodelo* WALTH (CAJAL), cola de tritones, y en otros puntos, se ha sorprendido y puede comprobarse en efecto, la excisión directa de los leucocitos, (*Fig. 25*) cual hace tiempo lo demostraron STRICKER, RANVIER, BIZZOZERO y otros sabios histólogos.

## XII.—Plasma sanguíneo.

Técnica de su obtención é investigación de sus caracteres analíticos anatómicos.

Para el análisis anatómico del plasma hemático, precisa conocer, en primer lugar, las reglas técnicas que habrán de seguirse para prepararlo ú obtenerlo en totalidad y en completa integridad. Conviene tener presente que á causa de la gran rapidez con que la sangre se coagula, envolviendo suero y glóbulos en su trama fibrinosa, la preparación del plasma en aquellas condiciones naturales de normalismo hácese en extremo difícil y delicada.

Desde luego que escogeremos para ejecutar tales operaciones aquellas sangres que gocen de la propiedad de coagularse lentamente, cual ocurre—según opinión unánime—con la del caballo.

a.)—Obtención del plasma sin mezcla alguna.— Procederemos para ello del modo siguiente: como el plasma enfriado á 0° no se coagula, se recoge la sangre que sale de la vena de un caballo en una estrecha probeta graduada y aseada cuidadosamente de antemano con agua, y enjuagada también antes con un poco de sangre desfibri-

nada, y se coloca en paraje donde se la rodee de hielo ó mezcla refrigerante que retarda la coagulación. El licor hemático va separándose poco á poco en dos partes: una que ocupa aproximadamente la mitad inferior de la probeta, y hállase constituida en el fondo por una capa de eritrocitos depositados allí muy lentamente, y por cima nadando, en capa muy delgada y muy débilmente coloreada otra de leucocitos; la otra parte consiste en un líquido opalescente, amarillento, constituida por el plasma, que se sifona en frío para extraerlo. Si este líquido se filtra además—á la temperatura del hielo—queda en absoluto libre de leucocitos.

Podemos también recurrir á un procedimiento propuesto por VON BABO, puesto en práctica por SALET y DAREMBERG, y que ha modificado ligeramente A. GAUTIER: Se recoge sangre de buey, ó mejor de carnero, en un frasco largo y estrecho rodeado de una esponja ó lienzo impregnado de éter, y suspendido por buena y fuerte cadena de hierro al eje vertical de un centrifugo ó volante horizontal á los que pueda imprimirse un gran movimiento rotativo. Llenado el frasco se pone en movimiento el centrifugo cada vez más rápidamente; la fuerza centrífuga arrastra á los eritrocitos lejos del centro de rotación; distanciaci3n tanto más agrandada cuanto el movimiento rotatorio vaya aumentando, de tal modo, que terminan dichos gl3bulos por precipitarse al fondo del frasco, dada su mayor densidad respecto al plasma donde nadan. Al mismo tiempo evaporándose el éter enfría extraordinariamente la sangre, retardándose de consiguiente la coagulación. Poco á poco se disminuye la violenta

rotación y el frasco colócase de nuevo en posición primitiva, sin sacudidas, y describiendo un cono cada vez de modo gradual más agudo. Cuando está en reposo, percíbense claramente separados los glóbulos del plasma que sobrenada casi incoloro.

A este fin puede prestararnos gran servicio el *centrifugo*

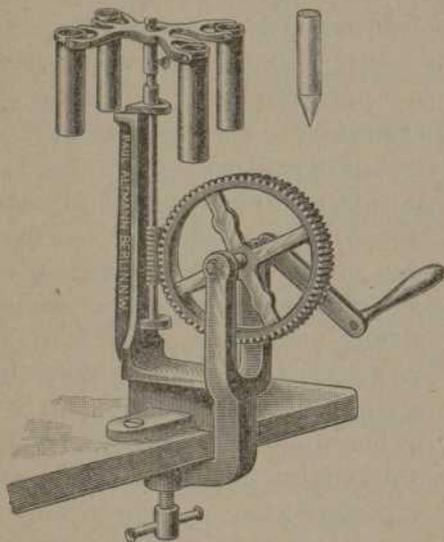


Fig. 24.—Centrifugo manual de ALTMANN.

*manual* que para fines clínicos y bacteriológicos construye, según los consejos de KRÖNIG, el fabricante berlinés P. ALTMANN (1). Este aparato (Fig. 24) da 5,000 vueltas

(1) Su precio, incluso diez tubos de recambio, es de 70 Mk. ALTMANN, Luisenstrasse, 52, Berlín, N. W. (Catal. 1895).

por minuto, y es susceptible de someter á la acción de dicha fuerza cuatro líquidos distintos, en otros tantos tubos de sedimentación que van engarzados en una especial montura de anillos que lleva el extremo superior de un vástago vertical que gira alrededor de su eje. Movimiento giratorio deseavuelto por el engrane del tornillo sin fin que en el extremo inferior tiene dicho eje, y una gran rueda dentada que da vueltas por un manubrio. La montura de todo el aparato, como el pie, son de metal pesado que le da gran estabilidad, á más de que se asegura ésta atornillando el pie á la mesa de trabajo.

También se está acreditando hoy mucho el *centrifugo* de HÖYNEMANN (1), que funciona por la acción del agua, y consiste esencialmente en una caja circular cerrada, que lleva en una misma dirección tangencial un tubo cónico de alimentación de agua motriz (ó vapor de agua, ó aire comprimido) y un tubo de escape. En el interior de la caja se aloja una rueda de aletas, cuyo árbol gira sobre un ágata, y la parte que sale por la cubierta, lo hace dentro de un tubo hueco fijo. El agente motor—agua—penetra por el tubo cónico, imprime movimiento de rotación rápida á la rueda y su eje vertical. En el extremo superior externo de este eje existen unos brazos de suspensión, en cuyos ganchos terminales se cuelgan verticalmente los recipientes (vasos cónicos de gran abertura en la que entra un embudo para filtrar y sedimentar rá-

---

(1) HÖYNEMANN.—Chemiker Zeitung, 1892, Rep. S. 224.—Este aparato lo vende DROSTEN al precio de 110 fr. el modelo chico, y de 225 fr. el grande. M. KÄHLER & MARTINI lo expenden en Berlín W. por 33 Mk. sin cestos ni recipientes.

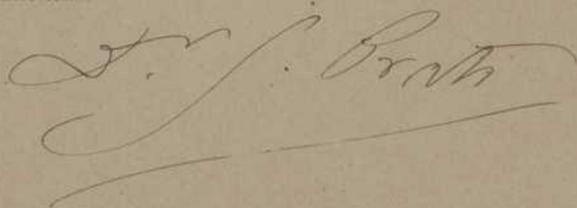
pidamente; vasos embudos con llaves en su extremo inferior), y tubos de ensayos, graduados ó no, que contengan los líquidos que se quieren sedimentar. Todos los recipientes se rodean de un cestito de alambre, en evitación de choques. Cuanta mayor sea la corriente del agua motriz, mas revolución se producirá. Conviene no olvidar que deberá cargarse uniformemente el aparato para producir una marcha tranquila.

Se han ideado y expenden en el comercio multitud de estos aparatos, á cual más ingenioso. Los centrifugos para investigaciones en Laboratorios se construyen de hierro, porcelana y cobre; unos se hayau provistos de un gran volante (cual las ruedas de las bicicletas), el que transmite el movimiento por una delgada cuerda sin fin, y dando 6.500 vueltas por minuto; otros como el *centrifugo-Victoria* (1), muy empleado para sedimentar leche, agua, vino, cerveza, aceite, manteca, orina, esputos, sangre, etc., á cuyo fin está provisto de vasijas de forma diversa y adecuada al objeto que se investiga, pero de complicada armazón, produciéndose el movimiento por el engranaje recíproco de ruedas de piñón, y transmitiéndose aquél por un eje vertical que descansa en un delicado mecanismo, al logro del menor roce posible. Son muy caros (2).

Más fáciles de manejar y no tan caros, son los ideados por el Profesor GARTNER, sistema HUGERSHOFF, llamados de peonza y articulación en bola, por cuanto el movi-

(1) Dr. G. LANGE.—Zeitschr. f. angewandte chemie, 1894, S. 64.

(2) Los precios de todos estos aparatos varían de 75—455 Mk., casa de KÄHLER & MARTINI (Wilhelmstr., 50 Berlín W.) Catal. 1895. Los de peonza cuestan de 30—50 Mk.



miento se produce, cual en los juguetes infantiles trompos ó peonzas, enrollando una resistente cuerda alrededor del eje y desenrollándola bruscamente. Se fijan por un tornillo á la mesa de trabajo. El eje sostiene una especie de plato cubierto, en cuyo interior hay unos ganchos que sujetan los tubos de ensayo ó pequeñas vasijas en las que se coloca la sangre ó el líquido que se analiza. También es práctico y barato el centrífugo manual del Profesor SOXHLET.

De los dos modos de proceder anteriores—por *reposo* ó por *centrifugación*—es indudable está llamado á perfeccionarse, y casi exclusivamente ser utilizado, el de la sedimentación rápida por la fuerza centrífuga. En efecto; desde 1891 que STENBECK, de Stokolmo, describió por primera vez el uso de la centrífuga para la precipitación de los sedimentos de la orina, esputos, etc.; desde que se llamó la atención en el Congreso de Medicina interna de 1891, leyendo LITTEN (1) una comunicación en que recomendaba encomiásticamente el uso de tales aparatos, y sosteniendo que sus ventajas estribaban, sobre otros modos de filtración y sedimentación, en la gran economía de tiempo, impidiendo fermentaciones bacterianas y el contagio por ellas efectuadas, y el hallazgo—en muchos casos citados por él— en orinas perfectamente claras, de un precipitado rojo compuesto de eritrocitos, demostrado por el microscopio luego, y que nunca hubieran podido obte-

---

(1) LITTEN.—Deutsche Med. Wochenschrift, 23. 1891.—El pequeño centrífugo del Prof. LITTEN, conteniendo 2—4 tubos reactivos, dando 5000 vueltas por minuto, cuesta, según sea mayor ó menor ó con piezas cobrizas, de 65—95 Mk. casa de KAEHLER, en Berlín W.

nerse sin el uso de dicho instrumento; desde que el propio LITTEN descubrió el hecho, por medio de la centrifuga, de que todas las exudaciones serosas, cualquiera que sea su naturaleza, así como los exudados no cancerosos ó tuberculosos contienen sangre, aun cuando los resultados obtenidos por el ensayo de HELLER y el espectróscopo dieron resultados negativos; y otras aserciones, á cual más interesantes de otros sabios, llamaron la atención del mundo médico hacia este nuevo medio de diagnóstico é investigación, de tal modo, que hoy los mejores y bien montados Laboratorios europeos y americanos hacen uso diariamente, con creciente utilidad, de la centrifuga.

JAKSCH describe la inmensa ventaja de la centrifuga y la utiliza—cual veremos más adelante—en las determinaciones volumétricas sanguíneas; las últimas publicaciones y revistas críticas que se ocupan sobre este punto, —y que en este momento sabemos—son: la que aparece en *Berliner Clinische Wochenschrift*, cuyo material está tomado de la clínica de GUTMANN, en el Hospital Moabita, y el artículo de FRIEDHEIM (1) en *Berliner Med. Wochensch.* p. 85, 23 Enero de 1893.

En una reunión celebrada en Septiembre de 1891 por la New York Patological Society, el DR. G. C. ICEBORN (2) expuso de manifiesto las excelencias de este método investigador; en otra conferencia que en la misma Sociedad dió en Marzo del 92 el DR. GEORTER, exhibió el

---

(1) U d. Volumbestimmung der roten Blutkörper mittelst des GAERTNER'SCHEN Hematokrits u. der kreiselcentrifuge.

(2) *Medical Reviv*, 22 Febrero 1892.

instrumento que tan buenos resultados proporciona; en fin, el trabajo más completo americano sobre dicho asunto es el de SCHLEON (1), resultado de la labor experimental en 200 casos diferentes, hechos en el Laboratorio del profesor A. JACOBI.

Entre los autores y obras más modernos encontramos la centrifuga mencionada por EDEMBERG (2), MUSSER (3), HEDIN (4), LITTEN, LENHARTZ, ELSNER, HAWLEY (5), y otros, cuyos testimonios prueban sin duda alguna lo valioso del procedimiento y lo que puede esperarse con su utilización en la investigación analítica, por ahorro de tiempo, de la sangre y otros líquidos orgánicos.

b.)—Obtención del plasma mezclando sangre con otros líquidos.—Con cualquiera de los dos métodos anteriores nos proporcionaremos siempre plasma puro, pero se puede también obtener, quizás más fácilmente, adicionando á la sangre sustancias diversas, que no teniendo ninguna actuación, no impiden puedan estudiarse en el plasma así obtenido las propiedades más notables de este licor.

J. MÜLLER fué el primero que dió en 1834 un medio de procurarnos plasma sanguíneo. Su procedimiento (6) consiste en recibir sangre de ranas decapitadas en agua azucarada al 2 por 100, y filtrar luego en frío, sirviéndose de buen papel *Joseph*. Se obtiene así un líquido que á poco parece una jalea incolora.

(1) *The Value of the Centrifugal Apparatus for Diagnostic Purposes.*

(2) *Encyclopædische Jahrbücher.—Reference Handbook of the Medical Sciences.*

(3) Diagnóstico médico.

(4) *Skandinavisches Archiv. für Physiologie*, 2, 134, 1890.

(5) Sobre el valor de la centrifuga. *G. Med. Farm. d. N. Y.*, Enero, 1895.

(6) *Tr. de Physiologie*, t. 1, p. 120.

Recúrrase hoy con más éxito á las sales neutras; sulfato de sosa, fosfato de potasa, sulfato de magnesia, cloruro cálcico, de magnesio, de amonio, al nitro, bórax, oxalatos solubles, etc.

Lógrase nuestro deseo perfectamente recogiendo la sangre en una probeta rodeada de nieve, y conteniendo  $\frac{1}{5}$  de su volumen de una solución saturada de sal marina. Se puede también utilizar por cada 100 volúmenes de sangre, 21 volúmenes de una solución á 25 por 100 de sulfato de magnesia cristalizada (DENIS-SEMMER); ó bien á igual proporción volumétrica sanguínea, 21 de una solución á 8 por 100 de fosfato de potasio (MASSIA). Pero el procedimiento mejor consiste, según recomienda A. GAU-  
TIER, en hacer la mezcla siguiente:

Sangre. . . . .	10 volúmenes	
Agua fría. . . . .	100 —	} de esta solución. 5 —
Sulfato de magnesia . . . . .	1 —	
Sal amoniaco . . . . .	2 —	

Cuidese de que la mezcla no se caliente jamás por cima de + 8° manteniéndola en paraje fresco. Después de doce á veinticuatro horas, se vierte el líquido sobre un filtro previamente humectado con agua salada, de modo que solo dejará pasar el plasma sanguíneo coloreado en amarillo rosáceo. Se puede después sustraer de este plasma, á favor de una rápida dialisis, gran parte de las sales añadidas, si bien coagulándose á poco, cual sucede igualmente diluyéndolo con agua.

Actuando de esta manera recogeremos aproximadamente de cada 100 volúmenes de sangre, 65 de plasma y 35 de glóbulos.

Los procedimientos analíticos, físicos y químicos en persecución del conocimiento de las respectivas características físicas y químicas del licor plásmico, se explanarán más adelante en lugar oportuno.

c.)—Procederes de obtención, examen y demostración de la fibrina.—El modo de preparar macro y microscópicamente la substancia fibrilar que en forma de innumerables filamentos microscópicos constituyen las trabéculas ó mallas del coágulo sanguíneo, es relativamente sencillo.

Batiendo con una varilla de cristal la sangre recién extraída, los filamentos de fibrina se arrollan alrededor de dicha varilla, y de este modo queda desfibrinada la sangre. La fibrina se separa de la varita, ó de las manos con las que se ha hecho el batido, en forma de filamentos y flecos fibrinosos, que aprisionan tanto á los eritrocitos como á los leucocitos, los cuales se separan desmenuzando aquellos flecos y sometiéndolos á un largo lavado en agua fría. También pueden—cual sabemos—proporcionar esta substancia la linfa y las exudaciones serosas.

Para obtener y examinar microscópicamente la fibrina (*Fig. 25*) ejecutaremos un preparado húmedo de sangre, (IV, VII, pág. 38—46) según ya sabemos. Para investigar la fibrina, basta muy á menudo la doble coloración con hematoxilina eosina de cortes lo más tenues posibles de coágulos: por este medio se logra percibir claramente—por ejemplo—las redes fibrinosas en la pneumonía fibrinosa, y en el contenido diftérico de las serosas inflamadas.

Un método preferible para investigar y colorear la fibri-

na, es el recomendado por WEIGERT para la coloración de las bacterias, si bien diferenciándose en que elige y emplea distinto líquido decolorante.

Las manipulaciones que se ejecutarán para colorear fibrina; según WEIGERT, son:

- 1.—Induración en alcohol.
- 2.—Coloración durante 5'—10' largos en solución con-

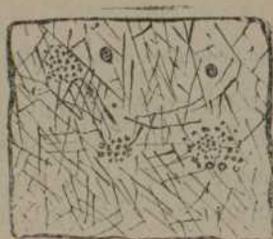


Fig. 25.—Red de fibrina hemática humana obtenida por lavado prolongado  
Coloración sol. acu. eosina; glicerina salada débilmente eosinada.  
Zoogloas de plaquetas. Dos plaquetas sueltas.

centrada acuosa-anilínica de violeta de genciana.

- 3.—Lavado en solución 0,6 por 100 de sal común.
- 4.—Enjugar en la espátula ó en porta-objetos con papel de filtro.
- 5.—Tratar durante 2'—3' en porta ó la espátula, con solución LUGOL (1:2:100).
- 6.—Enjugar con papel filtro.
- 7.—Decolorar con . . .

{	aceite de anilina. . . . . 2 »
	xilol. . . . . 1 »
- 8.—Trasiego al xilol solo.
- 9.—Bálsamo Canadá.

De este modo se teñirá hermosamente la fibrina de azul, en tanto que todo lo demás, excepto las bacterias, se desteñirán. Tampoco se tiñen señaladamente los restos celulares hemáticos, masas caseosas y necrosis de coagulación (1).

Una hermosa doble coloración se logra si teñimos antes con litio-carmin la preparación. Se prepara previamente el soluto siguiente:

Carmin . . . . .	2,5-5 —
Solución saturada acuosa de carbonato de litina.	100,0 —

Manipularemos del modo siguiente:

- 1.—Lavado del corte en agua destilada.
- 2.—Baño colorante de 2'—3' de duración.
- 3.—Lavado durante  $\frac{1}{2}$ '—1' largo en el alcohol clorhídrico siguiente:

Acido clorhídrico . . . . .	1 parte
Alcohol á 70 por 100. . . . .	100 partes

- 4.—Lavado cuidadoso en agua destilada pura.
- 5.—Baño de alcohol. Esencia y bálsamo; ó doble coloración y demás trasiego cual en el anterior método. En este método tan simple, las preparaciones no se sobrecolorean, puesto que por medio de un baño un poco más prolongado en el alcohol acidificado, se puede hacer desaparecer el exceso de color.

Si añadimos á la solución litio-carminada 2—3 partes de una solución saturada de ácido picrico, se obtiene una

---

(1) WEIGERT.—Deutsche Med. Wochenschrift, 1891.—Zeitschrift für wissenschaftliche Microscopie.—1889.

solución picro-litio-carminada, con la que se obtiene una doble coloración de los elementos (1).

Se puede también, según LÖWIT, (2) examinar teñida la fibrina en preparados de sangre fresca, ejecutados del modo siguiente: se espera comience la coagulación bajo el cobre-objetos, y se procura deslizar capilarmente de un lado á otro, por debajo de la laminilla cubre una solución de sal común á 0,6 por 100, hasta que los corpúsculos rojos estén bañados. Los leucocitos y plaquetas quedan en su mayor parte. Se tratan después por el alcohol, y se ejecutan bajo el cobre cuantas manipulaciones se aconsejan en el proceder sencillo de WEIGERT.

Para obtener en gran cantidad fibrina pura, se escoge lo más frecuentemente sangre venosa de vaca. Se le da un gran batido; la materia fibrinosa y elástica que se separa de la sangre batida, se lava encerrada en un trapo en forma de muñequilla, con agua fría previamente hervida y adicionada de una solución á  $\frac{1}{2}$  por 100 de sal marina: se tiran los flecos y grumos rojizos que se decoloran mal; y cuando, gracias á los lavados y malaxados con agua hervida fría, la substancia recogida esté completamente blanca, se espesan los flecos por el alcohol y el éter (GAUTIER). La fibrina así obtenida es susceptible de conservación por medio de un soluto acuoso de glicerina en proporción de  $\frac{1}{2}$  volumen de agua por uno de glicerina.

---

(1) FRIEDLENDER.—Mikroskopische Technik 2.<sup>a</sup> ed. Berlin, 1884.—Ed. Fischer.

(2) LOEWIT.—Studien zur Physiol. u. Pathol. des Blutes u. der Lymphe. Jena, V-141 p.

La fibrina obtenida dejando reposar sangre, es algo diferente de la obtenida del modo antes dicho puesto que es menos soluble en la sal marina. Si el plasma obtenido por reposo hemático se calienta, conviértese en jalea temblorosa por haberse formado la fibrina; si batimos con varilla dicha jalea aparece como flecos ó masa filamentosas.

Es cierto, y conviene tenerlo en cuenta, que no son idénticas las fibrinas de todas las procedencias: la de los animales muy jóvenes, la del caballo, individuos anémicos, etc., es más blanda, menos elástica, y termina por disolverse en el agua tibia, dando una solución que tiene todos los caracteres de la clara del huevo (MAGENDIE—SCHUTZENBERGER); la fibrina de la sangre arterial, (1) como la que ha estado algún tiempo á una temperatura de 80°, es insoluble en la solución de sal marina al  $\frac{1}{10}$  y en las de las otras sales de sosa y potasa; la fibrina de sangre venosa, coagulada en reposo cuando se trata por una solución de sal marina al  $\frac{1}{10}$ , no es filtrable y se pone viscosa. Jamás, dice GAUTIER, se producirá fibrina de plasma hemático si sustraemos á la sangre las sales de cal, por adición de un poco de oxalato amónico. Principio interesante por las reglas técnicas que de él pueden derivarse.

Por último, para obtener fibrina del estroma eritrocítico, podemos ó seguir directamente bajo el microscopio la transformación del estroma del glóbulo rojo de los mamíferos en hacecillos de fibrina, teniendo en cuenta las observaciones en las aves, de HOPPE-SEILER; en el caba-

---

(1) A. DASTRE.—Sur le defibrinisation du sang arteriel. (*Arch. d. physiol.* Enero 1893).

llo, por HEYNSIUS; en la rana por A. SCHMIDT y SEMMER, practicando la experiencia siguiente, recomendada por LANDOIS (1874): se colocó una gotita de sangre de conejo desfibrinada, en suero de rana, y sin remover esta mezcla se observa, apretando de vez en cuando ó deslizando el cubre-objetos, cómo se estiran los eritrocitos decolorados en forma de hilos y hebras viscosas, desapareciendo sus contornos primitivos. Así puede seguirse paso á paso la formación de hilos de fibrina de los estromas de los glóbulos rojos.

También se obtiene la fibrina de estroma por un procedimiento más sencillo: en vaso de reactivo se agitan una disolución al 1 por 100 de sal común con éter, unas gotas de sangre desfibrinada; vuélvese la mezcla rápidamente de color de laca; el éter asciende á la superficie del líquido arrastrando consigo la fibrina de estroma en forma de filamentos (LANDOIS). Conducen estas pruebas á hechos erróneos, con justicia hoy abandonados, pero que son dignos de compararlas con las que BIZZOZERO, HAYEM, S. R. CAJAL han instituido, en demostración del papel que las plaquetas gozan en el fenómeno de la formación de la fibrina. Examínese á este propósito el capilar del mesenterio descubierto de rana viva; una gota de sangre fresca entre dos cristales; ó practíquese la trombosis experimental.

d.)—Obtención de suero hemático.—Para obtener la parte líquida del plasma sanguíneo, bastará el reposo plásmico, de tal modo, que la mayor parte de los procederes que á este fin conducen en ello se basan.

En efecto, dejando en reposo una cantidad dada de

líquido sanguíneo, para que se coagule, se recoge por decantación el líquido amarillento ligeramente verdoso (hombre), ó ambarino (caballo), ó rojizo (buey), ó casi incoloro (conejo), etc., que poco á poco sobrenada y que trasuda el coágulo.

Mil gramos de sangre, en total dan unos 440 — 525 gramos de suero por el reposo.

Cuando se trata de obtener suero en grandes cantidades, hay que dirigirse á un matadero: se recoge en un vaso de vidrio cuidadosamente limpio, la sangre del buey en el momento que por la abertura hecha á la carótida del animal sacrificado, sale la sangre en chorro; una vez lleno el vaso se cierra inmediatamente. Se deja formar el coágulo y cuando el suero está bien separado, se trasiega aspirándolo por medio de pipetas esterilizadas.

Utilizándose el suero como buen medio de cultivo, hánse ideado diversos procederes para obtenerle lo más puro posible, tanto del hombre como de los animales. Entre otros, cuéntanse como los más prácticos y usuales los de KOCH, NOCARD y JAKSCH.

Para obtener suero sanguíneo esterilizado, según KOCH, le someteremos á la acción discontinua del calor, manipulando del modo siguiente: se afeita la región del animal de donde se haya de obtener la sangre, se lava con una solución de sublimado, después con alcohol y éter, y se prepara y abre el vaso con un instrumento esterilizado. Se recoge la sangre directamente desde la arteria, en un vaso de vidrio esterilizado, llenando éste hasta los bordes, y para dar tiempo á que los glóbulos sanguíneos se depositen, se pone el vaso en un aparato refrigerante ó

en el hielo. El suero claro y de color ambar amarillo, se deposita al cabo de veinticuatro á cuarenta y ocho horas, se separa con una pipeta esterilizada y se distribuye en tubos de ensayo esterilizados, según reglas conocidas en técnica microbiológica. Se calientan estos en seguida, de dos á seis horas, á 58° C., y después se somete á una temperatura de 65°—68°, para obtener la solidificación. Para conseguir una superficie de inoculación extensa es preciso que el líquido se coloque en posición oblicua. Una caja de latón de dobles paredes, entre las cuales se pone agua, cubierta de una plancha de cristal, y cuyos dos pies anteriores pueden desplazarse por medio de un tornillo, presta muy buenos servicios; sin embargo, se obtiene el mismo efecto colocando el sustentáculo, con los tubos de reactivo, oblicuamente dentro de una olla llena de agua.

Las sangrías en el caballo se practicarán, según Nocard, en la yugular. Primero se desinfecta y rasura la piel de la región; se hace una ligera é incompleta sección de la misma con el bisturí; se puncionará directamente la vena con un trocar (N.º 10, escala francesa), teniendo cuidado de comprimirla en la base del cuello, lo cual hace se ponga bien manifiesta y evita irregularidades que podrían sobrevenir en la salida de la sangre en caso contrario. Una vez introducido el trocar y cánula—que cual todos los demás aparatos estarán esterilizados—se retira aquél y se enchufa por ajuste á la cánula un tubo de goma, el que en un extremo lleva la pieza metálica de ajuste a la cánula y en el otro un tubo de cristal, que servirá para distribuir la sangre en los frascos preparados para recogerla.

Los recipientes se disponen después de esterilizarlo al calor seco, cubriendo su boca con un papel bien extendido y sujeto por un hilo; se recubre con otro papel en forma de gran cono, en evitación de que le caiga polvo ó gérmenes aéreos. Nos serviremos de dichos frascos separando el cono protector y con el extremo del tubo de cristal ya dicho se perforará el papel atado, dirigiendo el tubo sobre la pared del frasco á fin de evitar la formación de espuma, que se produciría si la sangre cayese al fondo dada la gran longitud del chorro hemático.

Para sustraer el suero humano procede JAKSCH: lavando la piel, según ya se ha mencionado, y practicando escarificaciones cutáneas con escarificador esterilizado á 200°, recoge en seguida la sangre en una probeta pequeña bien esterilizada, y sometiéndola después á las calefacciones ya dichas. Si no se dispone de suero humano hemático, presta análogos servicios el líquido de trasudación esterilizado, ó el que proviene de un exudado seroso.

Puede conservarse el suero, ó añadiéndole tricresol, ó un fragmento de alcanfor previamente quemado, ó guardándolo en tubos de 10 á 20 cm.<sup>3</sup>, cerrados á la lámpara, ó así mismo desecándolo en el vacío sobre el ácido sulfúrico, y en dosis ya medidas guardarlo en pequeños tubitos cerrados á la lámpara, de tal modo, que cuando vayamos á usarlos no hay más que disolver el suero en la cantidad de agua proporcional á la dosis seca.

---

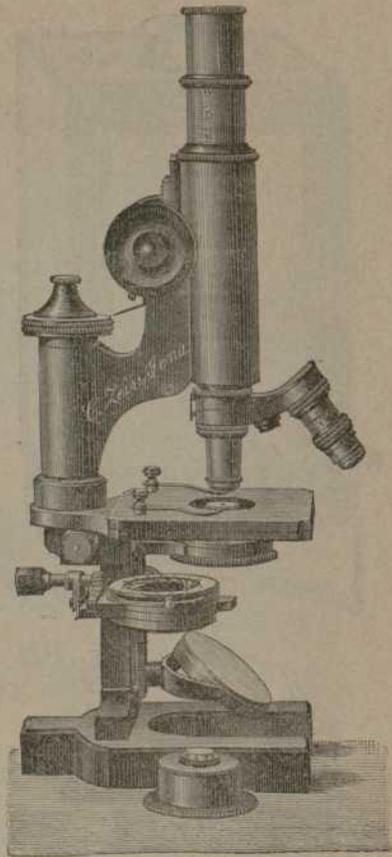
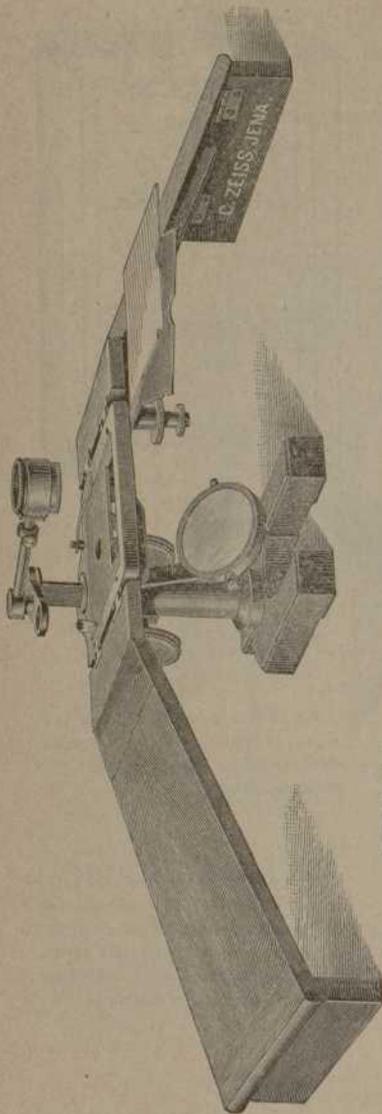


Fig. 26.—Microscopio de preparación de ZEISS ( $\frac{1}{4}$  del tamaño natural).

Fig. 27.—Microscopio de observación; modelo IV.º de ZEISS, con tubo graduado, diafragma iris, iluminador ABBÉ, etc. ( $\frac{1}{4}$  del tamaño natural).

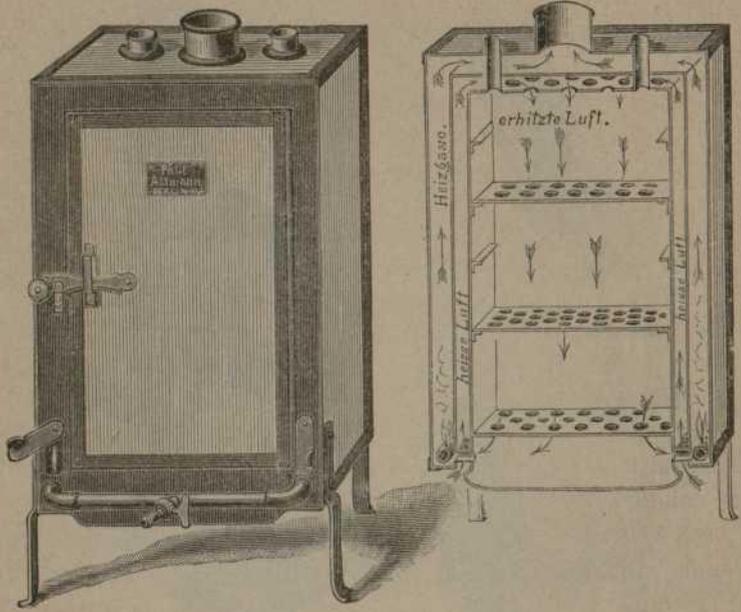


Fig. 28 — Caja esterilizadora de A. R. MANN, en conjunto y en corte esquemático. Las flechas indican las corrientes del aire caliente.

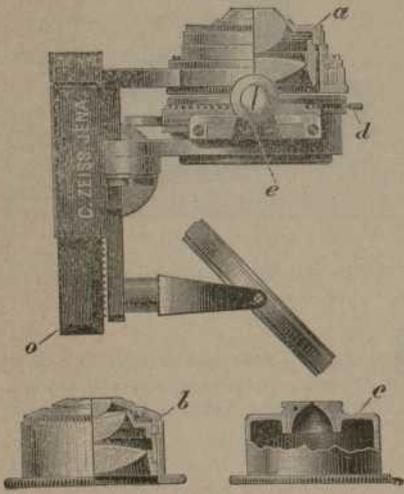


Fig. 29 — Aparato de iluminación Anbé. a condensador 1-20 ab. núm. — b condensador 1-40 ab. núm. — c diafragma cilíndrico — d tornillo para abrir ó cerrar el diafragma iris. — e tornillo que sirve para desplazar el diafragma.

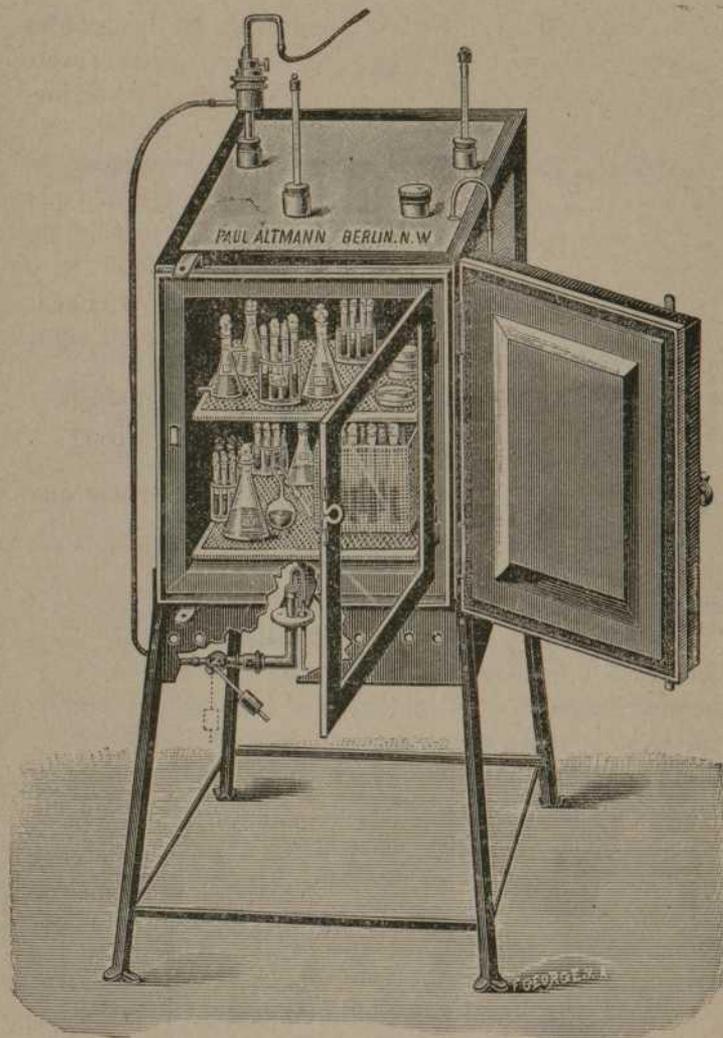


Fig. 30.—Termostato últimamente construido por ALTMANN con los mejores perfeccionamientos.

9 A. G. PRATS.—HEMATOTECNIA.

*A. G. Prats*



## B.

### INVESTIGACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS FÍSICO-MATEMÁTICAS SANGUÍNEAS.

## I.

Ciertamente aquellas condiciones de la sangre como el **color, olor, sabor y consistencia**, no requieren especiales modos de reconocimiento ni investigación, puesto que se manifiestan sencillamente, sin que, de ordinario, tengamos que recurrir á procederes ni aparatos especiales. En su virtud, sólo recordaremos sucintamente algo de lo que á estas características se refiere, antes de explanar los interesantes medios investigadores del **peso** hemático y del **tamaño y número** globular.

El variable *color* rojo hemático, dependiente de las condiciones oxigenadas hemoglobínicas, y consiguientemente ligado á la diferente manera de ser química de la sangre, se estudiará en el extenso capítulo dedicado á investigar aquella materia colorante; es decir, cuando expliquemos los procederes diafanométricos, cromométricos, espectroscópicos, etc. Por otra parte, las reglas técnicas, especialmente destinadas á diferenciar aquellas manchas ó masas líquidas, cuyo color tenga parecido más ó menos cercano al de la sangre, parece deben describirse en la parte destinada á determinaciones médico-legales.

Para cerciorarnos de que no es transparente la sangre, sino que procede cual los «colores opacos» (ROLLET), bastará derramar una porción de ella sobre un cristal, procurando se deslice por su superficie.

El *olor* particular hemático, si bien variable y diferente en cada especie animal (BARRUEL), y aun en cada individuo humano, pónese bien de manifiesto añadiendo ácido sulfúrico á la sangre, toda vez que ocasiona la libertad de los ácidos grasos volátiles, de los que procede el *halitus sanguinis* (MATIEUCI).

El *sabor* salado dependiente de las sales disueltas en la sangre, no precisa emplear técnica especial alguna para aseverarse de ello.

La *consistencia* fluida de la sangre viva circulante fácilmente podemos observarla y cerciorarnos de sus pequeñas variaciones, con solo examinar en vivo—según prácticas ya conocidas—el modo como marcha por sus cerrados y arbóreos canales. Por otra parte, la rapidez mayor ó menor coagulante de la sangre, así como las investigaciones á este asunto encaminadas, cuadran mejor, á nuestro entender, cuando hagamos el estudio técnico médico-legal de dicho punto, y expongamos las deducciones que origina.

## II.—Determinación de la cantidad total de sangre.

Desde hace tiempo se pretende apreciar la masa total de sangre existente en el organismo, sin que hasta ahora

problema tan interesante pueda considerarse como resuelto de modo completo.

Para hacer estas determinaciones, en las que siempre se averiguará también el peso específico del tejido hemático, se han ideado diferentes modos de proceder, contándose entre los más antiguos los de VALETÍN (1838) y ED. WEBER (1850), que ciertamente solo tienen interés histórico. Al lado de los procedimientos por los que se pretende valuar *directamente* la masa sanguínea, hay otros en los que se produce una modificación en la masa hemática, de modo que se juzga *indirectamente* dicha cantidad por el efecto ocasionado.

En las primeras experiencias emprendidas al logro de estas averiguaciones, se recogía la sangre que se derramaba del cuerpo de un animal muerto por hemorragia; pero al operar así no se obtiene la totalidad de sangre encerrada en el organismo, aparte de que la cantidad que sale no está en relación constante con la que queda.

VALETÍN después de sangrar á un animal, inyecta en sus venas una cierta cantidad de agua salada, y poco tiempo después repite la sangría. Compara entonces la proporción de materias sólidas contenidas en las dos masas sanguíneas, y deduce por un sencillo cálculo la masa total de sangre, teniendo en cuenta la cantidad de agua inyectada.

Este procedimiento merece objeciones bastante serias, puesto que en primer término, no hay mezcla uniforme de la solución inyectada y de la masa de sangre; además la totalidad de líquido inyectado no permanece en el ár-

bol circulatorio, á causa de la exhalación plásmica así modificada á través de los vasos.

LEHMANN y ED. WEBER tuvieron la idea de pasar una corriente de agua destilada por los vasos de un animal muerto por hemorragia, hasta que dicha agua salga completamente incolora. Calculaban á continuación la cantidad de sangre que encerraba el agua sanguinolenta y le añadian el peso de la sangre que se había escapado por hemorragia. Puede presentarse cual objeción á este procedimiento que el lavado no extraía toda la sangre.

Hoy en día, por dar resultados más seguros y exactos, se utilizan los preconizados por WELCKER (1854), el de VIERORDT, y otros que á seguida explanamos:

a.)—Método de WELCKER.—Se pesa el animal; se abre la carótida, ligándole previamente una cánula, y se recoge la sangre en una vasija, pesada de antemano, y en la que se desfibrina, agitándola con un puñado de piedrecitas de peso conocido; después se mide. Se toma una parte de la sangre desfibrinada y se la vuelve de color rojo cereza, haciendo pasar por ella  $CO$ , puesto que la sangre normal—según GSCHLEIDEN y HEIDENHAIN—tiene diversa fuerza colorante, según su riqueza de oxígeno.

Á continuación se introduce y liga en los dos extremos de la carótida seccionada una cánula en forma de **┐**, y por ella se hace penetrar de modo constante una disolución de sal común al 0,6 por 100, la cual estará sometida á cierta presión en la vasija que la contenga, y mientras tanto se recoge el líquido que sale por las venas yugulares y la cava inferior, cortadas, hasta que se presente claro como el agua.

Ejecutado esto se pica y desmenuza en pedacitos todo el cuerpo, á excepción del contenido gástrico é intestinal, cuyo peso se sustrae del total, se sumerge en agua y á las veinticuatro horas se exprime. Este agua y el liquido salino que ha lavado los vasos, se mezclan y miden. Una parte de esta mezcla se satura igualmente con CO. Se pone un poco de esta mezcla con CO en una cajita de vidrio de caras paralelas y separadas entre sí un centímetro (el llamado hematímetro del espectróscopo ordinario), y en una segunda cajita igual se diluye sangre pura saturada de CO, echando agua con una pipeta graduada, hasta que los dos líquidos tengan la misma intensidad de color. De la cantidad de agua que sea necesaria para diluir la sangre, hasta que tenga el tono de la que sirvió para el lavado del cuerpo, se deduce la cantidad de sangre que existía en este último.

Al picar aisladamente los músculos, puede considerarse que la substancia colorante que suministren es la propia de ellos, y no computarla en el cálculo (ΚΥΗΝΕ).

Multiplicando el volumen de la sangre por su peso específico, se determina el peso absoluto de dicho líquido. Como la diferencia de color de los líquidos para hacer estas investigaciones, puede apreciarse con bastante precisión es muy recomendable este procedimiento (LANDOIS). Para un mismo peso de organismo, los peces tienen menos sangre que los batracios, éstos menos que los reptiles y éstos últimos menos que los mamíferos. Ha hallado igualmente que en la mujer la cantidad de sangre es menor que en el hombre.

b.)—Método de VIERORDT.—Por él se determina la can-

tividad sanguínea por vía indirecta. En un principio se sirvió de la numeración globular. Practicaba una sangría á un animal, después medía la riqueza en glóbulos de la sangre extraída. Dejaba transcurrir un tiempo bastante para que el volumen de la sangre se restableciera á su valor primitivo; practicaba después una segunda sangría y ejecutaba una nueva numeración. Calculaba en seguida la masa total sanguínea, teniendo en cuenta la disminución globular. Este procedimiento supone (lo que no está demostrado) que la sangre ha recobrado su volumen primitivo, sin que se hayan formado nuevos glóbulos en el intervalo de dos sangrías.

Este mismo autor, en sus notables experiencias en averiguación de la capacidad ventricular cardíaca, tomando por base la velocidad de la corriente hemática, ha tratado de determinar—nuevamente—la cantidad sanguínea total dados los datos siguientes: como en todos los animales de sangre caliente, con 27 sístoles se efectua un movimiento circulatorio completo, la cantidad total de sangre será 27 veces mayor que la capacidad del ventrículo; y por consiguiente, en el hombre será igual á  $27 \times 187,5$  gr. = 5062,5 g. Si esta cantidad de sangre equivale á  $\frac{1}{13}$  del peso del cuerpo, corresponderá á un hombre unos 65,8 kilogr. de peso.

c.)—Método de GREHANT y QUINQUAUD.—Estos autores hacen que respire un animal vivo determinada cantidad de CO<sub>2</sub>; extraen después otra conocida porción de sangre y dosifican en ella su contenido de CO<sub>2</sub>. De este modo se calcula sin gran dificultad la cantidad total de sangre.

d.)—Método de MALASSEZ.—Preconizado cual el mejor

por CARLET. Procede MALASSEZ de diversos modos, siendo los dos más principales los siguientes. Uno de los procedimientos consiste: en inyectar en la sangre de un animal, en el que se ha apreciado la riqueza globular, una cantidad dada de suero. Se aprecia de nuevo la riqueza globular después de la inyección, y así se llega fácilmente á hallar la masa total de sangre.

Sea en efecto  $N$  el número de glóbulos por 1 mm.<sup>3</sup>, antes de la inyección,  $n$  el número después de la inyección,  $V$  el volumen del suero inyectado, y  $x$  el volumen total de sangre. Claro es que tendremos

$$N x = (x + V) n,$$

de donde resultará:

$$x = \frac{V n}{N - n}$$

Existe también en este procedimiento salida del plasma, y no homogeneidad de la mezcla entre el suero inyectado y la sangre.

Otro de los medios propuestos para calcular la masa de sangre, según MALASSEZ, se fundamenta en la relación numérica total de los glóbulos en un mismo peso de animal, por lo que se llama *capacidad globular*, el número de glóbulos correspondiente á cada gramo de animal (1).

e.)—Método de GUBLER y RENAUT.—Ahora bien, resulta

---

(1) MALASSEZ ha obtenido los resultados siguientes en un hombre sano que generosamente dió su sangre en una transfusión:

Volumen total sanguíneo . . . . .	6 150 cm. <sup>3</sup>
Peso total de la sangre . . . . .	6.642 gr.
Relación con el peso del cuerpo . . . . .	$\frac{1}{3}$
Número total de los glóbulos rojos . . . . .	26.445 millares —
Capacidad globular . . . . .	426 millones —

de la exposición de los procederes anteriores, que en realidad no hay ninguno para apreciar la masa hemática en un animal vivo, hasta el punto de que MALASSEZ expresa la desconfianza que le inspiran sus propios métodos. De modo que el médico no podrá jamás al lado del lecho de un enfermo obtener la medida de esa masa total; pero, como la noción de ella es absolutamente indispensable para apreciar la capacidad respiratoria, conviene tener en cuenta los siguientes consejos de GUBLER y RENAUT:

Se sangra un animal; se lavan sus vasos; se cortan sus músculos en lonjas y reducen á una especie de picadillo que se mezcla poco á poco con suero fresco. El líquido así obtenido se mezcla á la sangre; el todo se filtra, cuidando de lavar luego el filtro hasta decolorar su contenido. Se reúnen las aguas de los lavados en un vaso único que se tapa con cuidado.

Supongamos ahora que el volumen total de la mezcla es de 10.000 cm.<sup>3</sup>; en esta mezcla homogénea por la agitación, contamos los eritrocitos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup>, obteniendo una cifra = 1.800.000; como hemos separado por la sangría, por el lavado vascular, y por el lavado del picadillo, cuantos glóbulos existen en el animal, la mezcla que contiene á todos si es homogénea tendrá un número total igual á

$$(1) \quad 1.800.000 \times 10.000 = 18.000.000.000.$$

La masa globular total es, en efecto, igual al segundo miembro de la ecuación (1). Si ahora, antes de sacrificar al animal, se hace una numeración de la sangre de sus capilares, tomándolos como término medio, y si por ejemplo, el número de eritrocitos encerrados en 1 mm.<sup>3</sup> de

esta sangre es de 3.000.000, claro es que el número de mm.<sup>3</sup> de la masa total de sangre será:

$$(2) \quad \frac{18.000}{3} = 6.000,$$

ó sean 6 litros de líquido sanguíneo idéntico á el de los capilares. Esta última valoración no es absolutamente rigurosa; si bien el número total de glóbulos obtenidos por la ecuación (1) es más que posible.

Sean, pues:  $V$  el volumen total de sangre extraída y las aguas del lavado que forman un todo homogéneo;  $n$  el número de glóbulos contenidos en cada unidad de volumen de esa mezcla; y  $n'$  el número medio de glóbulos contenidos en la sangre del animal vivo; la expresión de la masa total  $x$  de sangre, expresada en volúmenes, será necesariamente:

$$(3) \quad x = V \frac{n}{n'}$$

Si ahora queremos saber cuantos glóbulos existen, por término medio, en la unidad de peso del animal, ó sea en 1 kilogr. de su substancia, esta nueva relación llamada por MALASSEZ capacidad globular, estará evidentemente representada, si  $P$  es el peso total del animal escogido para la experiencia, por la fórmula

$$(4) \quad y = \frac{V}{P} \cdot \frac{n}{n'}$$

### III.—Determinación de la cantidad hemática de cada órgano en particular.

Se ha intentado resolver esta cuestión en primer término por P. BRUNS, utilizando partes amputadas de pier-

na, hecha por la contigüidad, después de haberle aplicado por cima de la rodilla una ajustada ligadura de cautchuc para interrumpir la circulación. Se recoge la sangre que se derrama durante la operación, después se le pone al miembro amputado inyecciones de cloruro de sodio á 2 por 100, hasta que salga el líquido incoloro; por último, se desmenuza la pierna para extraerle el resto de sangre que contenga. Conocida la riqueza de la sangre en hemoglobina, antes de la operación, se calcula casi á un miligramo, por medio del espectróscopo, la cantidad de materia colorante hemática contenida en las aguas del lavado, de donde se deducirá la cantidad de la sangre. Según BRUNS, la cantidad media de sangre contenida en una pierna es de 45 gr.

Según RANKE, pueden también realizarse estas particulares determinaciones, ligando rápidamente los vasos de un animal vivo, aislando con fuerza la parte, á favor de ligadura *intra-vitam*, separándola inmediatamente y caliente todavía. Se desmenuza el órgano, se lava con agua y en esta agua de lavado se dosifica la cantidad de sangre, comparándola con otra porción diluida y de titulación conocida. Este proceder tiene el no pequeño inconveniente de ser impracticable con muchos órganos internos. Manipulando del modo antes dicho, ha averiguado J. RANKE la distribución hemática en el conejo vivo y en reposo.

La determinación después de muerto, en un cadáver helado, por ejemplo, debe, según WELCKER, rechazarse, puesto que es procedimiento inexacto, ya que la proporción hemática de las diferentes partes del cuerpo experi-

mentan variaciones muy considerables, entre otras razones, porque dichas partes ni mueren ni se enfrían al mismo tiempo.

Para conocer y registrar en vivo la cantidad de sangre que exista en una extremidad, así como sus oscilaciones, se ha ideado el aparato conocido con el nombre de *Platismógrafo* de Mosso, instrumento que viene á ser un perfeccionamiento del *Pulsómetro de caja* de CHELIUS (1850). En el aparato de Mosso, el miembro está dentro de un recipiente lleno de agua, cuyo movimiento es transmitido á un tambor provisto de una palanca inscriptora de dirección horizontal. FLECHSIG rodea el miembro de un recipiente lleno de aire, y V. KRIES sustituye el tambor registrador por una lámpara de gas, que comunica con el tubo del recipiente, de modo que revelándose en la llama las variaciones del volumen del brazo, pueden fotografiarse.

#### IV.—Determinación del peso específico de la sangre.

Sabido es que la densidad de los líquidos se refiere á la del agua destilada á  $+ 4^{\circ}$  C., tomada como término de comparación. Decir que la sangre tiene una densidad á  $+ 37^{\circ}$  igual á 1,059, equivale á si dijéramos que un centímetro cúbico de sangre á  $37^{\circ}$  pesa 1<sup>gr.</sup>059, en tanto que un centímetro cúbico de agua destilada á  $+ 4^{\circ}$  pesa 1<sup>gr.</sup> Dado que la cifra que expresa la densidad de un líquido á una temperatura determinada, representa al mismo tiempo el peso en gramos de 1 cm.<sup>3</sup> del líquido, se deduce que para averiguar el peso de un litro, basta multiplicar por 1000 dicha cifra, toda vez que el volu-

men del litro es equivalente á 1000 cm.<sup>3</sup> Un litro de sangre á 37° pesará 1059 gramos.

El principio general resulta de la fórmula fundamental  $D = \frac{P}{V}$ . Los métodos generales que conducen á estas determinaciones consisten, en pesar iguales volúmenes de agua destilada á + 4° y del líquido cuya densidad se desea averiguar. En cuanto á los procedimientos que pueden seguirse para obtener estos datos—aparte de los especialísimos á este asunto ideados y que luego explanaremos,—se reducen á los tres principales, utilizando aparatos distintos, que por análisis físico se conocen. Estos procedimientos son: el de la balanza hidrostática, en uno de cuyos platillos va colgando un flotador; el del frasco de densidades, y el del areómetro de FAHRENHEIT. Estos procedimientos ordinarios exigen cantidades de líquido, de las que no siempre podemos disponer en investigaciones hemáticas. Cuando solo disponemos de pequeñas cantidades sanguíneas, nos dará, sino precisas y de gran exactitud, útiles indicaciones, un flotador muy sencillo, llamado *densímetro* de ROUSSEAU, fundado en el propio principio del areómetro, pero diferentemente construido y utilizado. Su gran ventaja consiste en solo necesitarse 1 cm.<sup>3</sup> de líquido para averiguar la densidad, y obtenerse resultados que no sería posible procurarse, usando los proceder ordinarios.

Para manipular con el densímetro de ROUSSEAU procederemos: 1.°, introduciendo en la capsulita que en forma de dedal lleva en su extremo superior, después de vacía y bien seca, y sirviéndonos de pipeta graduada, 1 cm.<sup>3</sup>

de sangre; 2.º, sumergiéndolo en agua destilada á una temperatura lo más cercana á + 4º. Se anota la división ó grado del vástago hasta el que se haya sumergido para obtener el enrase. Si  $n$  representa ese grado ó punto de enrase, tendremos para el peso  $p$  del líquido sanguíneo introducido en la cápsula, dada la construcción del aparato  $p = n \times 0,05$ . Y como este peso se refiere siempre en todos los casos á la unidad de volumen, es decir, al centímetro cúbico, puede considerarse como representando la densidad misma del líquido ensayado.

Aparte de estos procederes generales, que con variables ventajas podemos utilizar en el análisis físico de la sangre, hánse ideados otros, en su mayoría fundados en aquellos mismos principios, pero más interesantes, por sus útiles aplicaciones á la clínica.

Los más dignos de tenerse en cuenta y de conocerse, son los de HAMMERSCHLAG, SCHMALTZ, PEIPER, ROY, etc., que guardan entre sí bastante analogía y se valen en lo fundamental del *picnómetro* capilar (1).

a.)—Método de SCHMALTZ. (2)—Según GILBERT, es ingenioso y preciso. Dispóngase de tubitos capilares, cuya cavidad sea de  $\frac{1}{10}$  de mm.<sup>3</sup> Lávense cuidadosamente con agua, alcohol y éter, y después se pesan en una balanza—sensible á 0<sup>gr.</sup>,00005—y se apunta el número que arroje la pesada. Llénense de agua destilada á la temperatura de la sangre y se pesan de nuevo.

(1) PEIPER.—Centralblatt f. klin. Med. 12. N.º 12, 1891.—HAMMERSCHLAG.—Wiener klin. Wochenschr. 3. 1018, 1890.

(2) SCHMALTZ.—Congrès de Med. int. de Wiesbaden, Abril 1891, y Deutsche med. Wochenschrift, 17, 555, 1891.

La diferencia de las cifras que arrojan las dos pesadas de los dichos tubitos—llenos y vacíos—nos indicará exactamente su capacidad. Una vez conocida ésta, desde luego que nos servirán perfectamente aquellos tubitos capilares, para apreciar el peso específico de la sangre.

Vamos á suponer—y utilizamos el mismo ejemplo que el propio SCHMALTZ graciosamente envió á GILBERT, de París—que el tubito capilar vacío pesa.....0.1203..... y si lleno de agua destilada á la temperatura ya citada, pesa.....0.2234..... su capacidad indudablemente será, pues, de.....0.1031.

Se llena dicho tubito de sangre, y pesa. . . . . 0.2295  
la sangre sola pesa, pues, . . . . . 0.1092

y su peso específico será igual á  $\frac{1092}{1031}$ , ó sea 1,059 que

es, según expresan la generalidad de los hematologistas, el peso normal de la sangre en el sexo masculino.

b.)—Método de ROY modificado por DEVOTO y SIEGL (1).—Este procedimiento ha sido utilizado, con el propio éxito que sus autores, por COPEMAN y SCHERRINGTON (2). Las maniobras que sucesivamente practicaremos son: Se limpian escrupulosamente varias probetas de 80—100 cc. de cabida y de 4 cm. de diámetro. En estas probetas se vierte de 50 á 60 cc. de unas mezclas de agua y glicerina, á diferentes proporciones, de tal modo, que empíricamente medidos, por ejemplo, con un areómetro, vengan á alcanzar una densidad de 1,040 á 1,080. Se

(1) SIEGL.—Wiener klin. Wochenschr. 4, 606, 1891.—DEVOTO.—Zeitschr. f. Heilkunde, 175, 1889.—ROY.—Proc. Physiol. Soc., 84.

(2) British Journal, 5, 161, 1891.

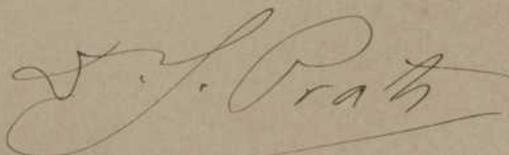
adapta á una jeringuilla de PRAVAZ, por medio de un tubito de goma cautchuc, un tubito capilar de cristal acodado en ángulo recto.

Se practica una picadura en un dedo con aguja esterilizada; la sangre que sale se aspira con la jeringuilla, hasta llenar el capilar de vidrio; se lanzan una á una gotas de sangre, después, imprimiendo ligera vuelta al émbolo de la jeringuilla, en el *centro mismo* de los líquidos glicerolados de diversa concentración previamente preparados en las probetas.

Ahora bien, siempre que la gota sanguínea quede suspendida en el centro del líquido glicérico, sus densidades serán iguales; si es menor ascenderá á la superficie, y al contrario, descenderá al fondo caso de ser mayor la densidad de la sangre. En estos dos últimos casos se vuelven á hacer tanteos, depositando gotas sanguíneas en diferentes líquidos, hasta encontrar aquél en el que quede suspendida la gota hemática sin subir ni bajar.

Cual puede apreciarse, la técnica de este método no tiene nada de difícil. No debemos olvidar el consejo de añadir á la mezcla acuoso-glicérica, un algo de timol, pues de esta manera podemos, sin grandes inconvenientes, utilizarla repetidas veces en tiempo más ó menos largo; caso de hacer esta conservación, es imprescindible, cuantas veces vayamos á emplearla, determinar como la primera vez la densidad, para rectificar ó no.

c.)—Método de Roy modificado por LANDOIS.— Es especialmente recomendable para las observaciones clínicas. El líquido titulador es una disolución de aceite en cloroformo, á distintas concentraciones, que deben oscilar en



tre 1,050—1,055—1,060—1,065—y 1,070 de peso específico.

Se acondiciona un tubo fino de cristal, afilado por un extremo, después de estirarlo y doblarlo en ángulo recto. El extremo opuesto se cierra con una caperuza de cautchuc.

Se obtiene una gota de sangre pinchando en un dedo, y se recoge sumergiendo el extremo afilado del tubo, por el que asciende al dejar de apretar sobre la caperuza.

Inmediatamente se sumerge en el vasito lleno de la solución oleo-clorofórmica el tubito, y apretando la caperuza con cuidado sale la sangre, que se mezcla con el líquido titulador ó determinador.

Aquella solución en la que la parcela sanguínea se mantenga suspendida—sin subir ni bajar, será la que nos indicará que su peso específico es igual á la de la sangre.

Hay que tener en cuenta qué entre las probabilidades de error y de diferenciación, debemos contar con las siguientes: según HAMMERSCHLAG y SCHOLZ, el peso específico depende principalmente de su contenido de hemoglobina, y aunque en menor importancia de el número de eritrocitos.

Disminuye transitoriamente con la ingestión de agua, el hambre, hemorragias, y también es menor en la anemia, clorosis, marasmo, y en la nefritis hasta 1,025.

Por el contrario le aumentan, según LANDOIS, PEIPER, SCHMALTZ, y otros, la sed, la digestión de alimentos muy consistentes, los sudores, las pérdidas repentinas de corto espacio de tiempo, acuosas, por el intestino, los riñones,

y el éxtasis cianósico hasta 1,068. Según SHEIDER, el suero sanguíneo de mujer es más pesado que el del hombre.

Para determinar el peso específico de los glóbulos rojos, se procura con antelación dejarlos sedimentar, lo cual se logra con relativa rapidez en la sangre de caballo. Según SCHNEIDER, parece ser que los eritrocitos de la mujer son un poco más pesados y ricos en hemoglobina que los del hombre.

#### V.—Volumetría hemática.

Hará cosa de unos cuarenta años que se vienen intentando distintos y numerosos procederes, mecánicos y químicos, en averiguación del peso relativo existente entre los diferentes componentes hemáticos, ó sea para dosificar los glóbulos rojos contenidos en una cantidad determinada de sangre, ó para apreciar la proporción, en volumen, existente entre leucocitos y hematíes.

Dejando para otra clase de libros cuanto atañe á la parte histórica de la cuestión, vamos á exponer aquellos procederes más modernos que la experiencia demuestra son de más fácil aplicación, así como de resultados más positivos, ya que no absolutos.

Conviene recordar, que, según parece deducirse de pruebas experimentales repetidas por diversos autores, en general los glóbulos rojos de los mamíferos solo contienen un tercio de su peso de elementos sólidos, por dos tercios de agua.

Los métodos para averiguar la característica volumétrica de los componentes sanguíneos, pueden reducirse á dos: físicos y químicos.

### 1.º—Métodos volumétricos físicos.

Son aquí aplicables los procedimientos, ya conocidos, para obtener el plasma sanguíneo. De modo que para apreciar la proporción volumétrica existente entre leucocitos y eritrocitos nos valdremos de la sedimentación por reposo ó por centrifugación, si bien ahora de un modo cuantitativo.

a.)—Proceder de WEICKER.—Se extrae sangre á favor de una ventosa esca:ificada; se desfibrina; se cuela y se encierra en tubo largo de cristal de un centímetro de diámetro. Al cabo de un corto tiempo se forman por sedimento tres capas; una superior clara y serosa, otra de células blancas y otra, la más inferior, de glóbulos rojos. El espesor relativo de estas dos últimas sirve para apreciar la proporción relativa de sus elementos constituyentes.

A. SCHMIDT aconseja, para facilitar la operación, mezclar la sangre con otro tanto, en volumen, de disolución al 28 por 100 de sulfato magnésico.

b.)—Proceder de HEDIN al hematocrito (1).—Es tan interesante el proceder basado en el empleo de la fuerza centrífuga, que hace decir á JAKSCH que tiene gran porvenir en hematotecnia, pues con él puede medirse, en

---

(1) HEDIN.—Skandinavisches Archiv. f. Physiol. 2, 134, 1890.

bien corto tiempo, el volumen de los glóbulos rojos y aun utilizarse en otras averiguaciones hemáticas.

La descripción que sigue del aparato es la dada por JAKSCH, que difiere algún tanto de la dada por el autor HEDIN en su monografía, por cuanto se ajusta, como aquel dice, al aparato construido, según sus indicaciones, por SENDLING SANDSTROM, de Lung (Suecia), y que hace algún tiempo, si bien no mucho, está utilizando en su clínica. (*Fig. 51*).



*Fig. 31.*—Hematocrito de HEDIN.

El *hematocrito* de HEDIN, modificado por JAKSCH, consta de las partes siguientes:

1.º De un tubito capilar para la medida y mezcla de la sangre, que el autor remite con el aparato. Puede utilizarse en su lugar la pipeta mezcladora, usada para numeración de los glóbulos blancos.

Con el fin de evitar la coagulación sanguínea, HEDIN aconseja aspirar una mezcla de sangre y licor MÜLLER; con este objeto se vierten en una capsulita de platino cantidades iguales de ambos líquidos, agitando luego bien para que resulte buena mezcla. Después de muchos ensayos utiliza, con el propio fin, DALAND, en la clínica de JAKSCH, una disolución de bicromato de potasa al 2,5 por 100, sin que tenga de qué quejarse (1).

(1) DALAND.—Fortschritt der Medicin. 9, 823-867, 1891.

2.º De dos tubitos de cristal de 35 mm. de largo, por uno próximamente de luz ó calibre, y con unas 50 divisiones equidistantes, marcadas en la superficie externa.

3.º De un dispositivo metálico que se coloca en el eje rotatorio de la máquina centrífuga. Dicho dispositivo consiste: en una columna metálica hueca, en donde entra el eje rotatorio. En la extremidad inferior de dicha columna existe una abrazadera de la que parten hacia arriba dos resortes metálicos, fijos por abajo y libres en su extremo superior, donde llevan unas á modo de almohadillas de cautchuc. En la extremidad superior de la columna hueca existe otra abrazadera con dos espigas en los extremos opuestos de uno de sus diámetros; espigas que sostienen 4 varillas metálicas que se articulan por sus extremos, formando á modo de un marco de forma romboidal, de tal modo, que por sus ángulos obtusos se apoyan y sujetan en la armadura, y en los extremos acutangulares, punto de confluencia y articulación de dos varillas, existe una depresión, hendidura ó mortaja revestida de cautchuc, y que se encuentra exactamente enfrente, horizontalmente, de los revestimientos de cautchuc ya dichos que existen en los resortes metálicos. Ambos revestimientos de cautchuc sirven de tapón á los extremos abiertos de los dos tubos de 35 mm. de largo, de tal modo, que no obstante hallarse horizontales y movidos, no se les vierte el líquido de que ya dijimos se llenaban, ó sea sangre y licor de MÜLLER, ó mejor sangr. y la solución DALAND de bicromato potásico al 2,5 por 100.

4.º De un eje vertical en el que se enchufa la columna del depositivo metálico anterior, y anejo á una serie

de ruedas dentadas movidas á mano, de modo que resulte el movimiento rotatorio de aquel eje; el todo fijo por un tornillo al borde de la mesa de trabajo á fin de darle estabilidad á todo el aparato.

La manera de utilizar dicho aparato y de practicar la volumetría hemática que se persigue inquirir con el mismo, es del modo que á continuación expresamos: Se procede ante todo á hacer la mezcla de sangre y la solución cromatada (MÜLLER ó DALAND), para lo cual utilizaremos ó el mezclador HEDIN, ó el mezclador de glóbulos blancos. Hecha la mezcla hay que llenar de ella los tubos capilares, para lo cual le ajustaremos á cada uno respectivamente, un tubito de cautchuc por un extremo; teniendo introducido el extremo libre en la mezcla titulada, y aspirando por el tubo de goma, conseguiremos penetre la mezcla en el tubo y llene toda la extensión de su luz. Una vez lleno se lleva y coloca en el marco metálico del dispositivo; se fija una extremidad en la mortaja del punto acutangular, y la otra se tapa con la planchita de goma que llevan los extremos libres de los resortes. Montados los dos tubos llenos de la mezcla titulada, en su situación respectiva, se coloca el dispositivo por su columna hueca en el vástago rotatorio y se le imprime rápido y fuerte movimiento al aparato.

Fácilmente se comprende que por la fuerza centrifuga así desenvuelta se separan ostensiblemente los eritrocitos, de los leucocitos y del suero. Según DALAND, empleando para la mezcla la solución cromatada que aconseja, al cabo de 60" ó 70" se mantiene constante el volumen de los glóbulos rojos. Sitúanse éstos excéntricamente

en el interior del capilar de cristal graduado, apareciendo en forma de raya gruesa de color obscuro, la que se continúa, en sangre normal, con otra raya turbia, estrecha y un tanto blancuzca, constituida por los leucocitos, y la que se prolonga por rayita límpida que ocupa ya la parte de la luz del tubito más próximo al centro del aparato y formada por el suero, que por el líquido de MÜLLER se colorea de amarillo subido.

Se coloca después el tubo graduado, separándolo con gran cautela del dispositivo, sobre una superficie blanca (hoja de papel), en evitación de errores, y se lee y apunta la cifra que marque el volumen total de los glóbulos rojos. Dicho número se multiplicará por 4 y el resultado representará la cifra total de glóbulos rojos en 100 volúmenes de sangre, cual se deduce de los considerandos expuestos por JAKSCH, y que textualmente transcribimos: «el volumen obtenido de glóbulos rojos está—en una columna líquida dividida en 50 partes y de 35 mm. de longitud—constituido por una mezcla de disolución al 2,5 por 100 de bicromato de potasa y sangre en partes iguales. El total de glóbulos rojos de la sangre pura, será por lo tanto, doble; y en una capa líquida de 70 milímetros de longitud, á la cual corresponden 100 divisiones de la escala doble de la anterior, ó sea cuatro veces mayor que la cifra obtenida. El producto de esta multiplicación da, por lo tanto, la cifra de los glóbulos rojos expresada en el tanto por ciento volumétrico, ó sea el volumen que ocupan estos glóbulos en 100 volúmenes de la sangre que se examina» (1).

(1) JAKSCH.—*Diagnóstico de las enfermedades internas*. Trad. esp. de la 3.ª ed., por M. ZANCUDO. Madrid, 1893, p. 27.

Que es de utilidad este procedimiento, bien lo demuestran los perfeccionamientos que en aparatos y modo de operar vienen haciéndose con creciente interés. Cierto que es útil este medio de investigación para diferenciar algunas formas morbosas hemáticas, pudiendo, tal vez en ocasiones, sustituir á los métodos numéricos, más circunstanciados, y en definitiva cuando solo interese saber el total volumétrico de los eritrocitos. Entre otros, DALAND es el que mejor ha establecido los posibles casos de sustitución entre ambos medios determinativos.

También es indudable se puede la centrifuga utilizar para conocer, si bien solo de un modo aproximado, las relaciones que entre sí guardan hematies y leucocitos. Otra interesante aplicación de la centrifuga es para ayudar al estudio de la leucocitosis, así como también en la fácil demostración y rebusca de los micro organismos de la sangre (JAKSCH) (1) (V. pág. 111-116).

c.)—Proceder de MAYET.—Este Profesor de *Lyon* averigua el peso de los glóbulos en su estado natural de humedad, en un peso dado de sangre, sirviéndose de la centrifugación. Á este objeto ha ideado un aparatito que da 1200 rotaciones por l'. Las probetas que contienen la sangre están encerradas en recipientes metálicos, que se pueden rodear de una envoltura de lana para evitar el recalentamiento. Se coloca hielo alrededor de la probeta, pudiendo de este modo enfriar la sangre hasta 0° C. y evitar toda alteración de los glóbulos y por consiguiente del plasma. Los recipientes llevados en muñones adop-

---

(1) V. JAKSCH.—Prager med. Wochenschr. 16. 195, 1891.

tan espontáneamente la posición horizontal durante la rotación, y vuelven sin sacudida á la posición vertical en el momento de la detención gradual. La coagulación se evita por la adición de 10 cg. de oxalato de potasa por 100 de sangre en el momento de la sangría, según el procedimiento de Arrus. Se puede obtener así en plasma puro, la mitad del volumen de la sangre.

Manipula, en evitación de las pesadas, difícilmente exactas, tomando desde luego un pequeño volumen determinado de sangre, que sirve para apreciar la densidad de este líquido y permite operar el análisis sobre un volumen fijo de sangre, más fácil de apreciar con exactitud. En un volumen dado, de plasma de centrifugación, coagulado en presencia del sulfato de sosa, se deseca el producto líquido al baño-maría, después trata por el alcohol á 60°, deseca de nuevo y trata por el agua, y al final se dosifica la glucosa por un líquido titulado. La misma operación se hace con el cruor, ó parte que contiene sobre todo glóbulos y un poco de plasma. Entonces se podrá apreciar fácilmente el volumen del plasma restado en este cruor.

Si en efecto, se representa por  $P$  el volumen del plasma analizado, por  $G$  el peso de glucosa que contiene, por  $X$  el volumen del plasma restado en el cruor, y por  $G'$  el peso de glucosa que contiene este plasma cruórico, se tiene la ecuación siguiente:

$$\frac{P}{G} = \frac{X}{G'} \quad \text{de donde} \quad X = \frac{PG}{G'}$$

siendo por tanto conocido el volumen del plasma cruórico, se tiene por adición el volumen total del plasma del

volumen dado de sangre; y, por substración, el volumen de los glóbulos; siendo muy fácil conocida la densidad de la sangre, determinar el peso de ésta, de sus glóbulos ó de su plasma.

## 2.º—Métodos volumétricos químicos.

Compréndense en este sitio cuantos procederes se han ideado para determinar la proporción que relativamente guardan los constituyentes hemáticos á favor de ciertos análisis cuantitativos químicos. Los más interesantes procedimientos fundamentados en aquel principio, son los de HOPPE-SEYLER, GAUTIER y BOUCHARD.

a.)—Métodos de HOPPE-SEYLER.— Tiene instituido dos modos diversos para la determinación globular hemática: uno, *por la cantidad de fibrina contenida en la sangre y en el plasma*; y otro, *por la cantidad de hemoglobina y de materiales albuminoides por ellos contenida* (1).

1.º método.—Fundaméntase en que la sangre abandonada al reposo en temperatura baja los elementos globulares se amontonan por debajo del plasma que sobrenada; y por otra parte, dado que al determinar las cantidades de fibrina existentes en el plasma y en la sangre total, se puede calcular el peso de los glóbulos existentes.

Para hacer esta averiguación se procede:

a.)—Recogiendo abundante cantidad de sangre en una gran copa de cristal. Al poco tiempo se separan de 30—50 cm.<sup>3</sup> del plasma, en el que se dosifica la fibrina.

(1) Tr. d'analyse chimique appliquée á la physiologie de HOPPE-SEYLER — Trad. fr. de SCHLAGDENHAUEN. Paris, 1877, p. 441.

b.)—Se dosifica también la fibrina en otros 30—50 cm.<sup>3</sup> de sangre en totalidad.

Ahora bien: si  $f$  es el peso de la fibrina contenida en el volumen  $p$  del plasma; y  $F$  el peso de la fibrina del volumen  $P$  del plasma total de la sangre  $S$ ; claro es, que la proporción siguiente dá sin duda alguna  $P$ :

$$\frac{P}{F} = \frac{p}{f}, \text{ de donde } P = \frac{Fp}{f},$$

el peso de los glóbulos será, por consiguiente, de  $S - P$  ó sea  $= S - \frac{Fp}{f}$ .

Las dosificaciones que exige este método deben ejecutarse con una gran precisión, puesto que debido á la débil cantidad de fibrina contenida en la sangre, los errores hállanse muy multiplicados.

Por otro lado, el procedimiento exige la coagulación lenta de la fibrina, y la precipitación rápida de los glóbulos. De aquí no sea aplicable en absoluto más que en el caballo y en estado fisiológico. Puede, sin embargo, utilizarse en individuos afectos de accidentes inflamatorios.

Obtiénese por este proceder el peso total de los glóbulos rojos y blancos. En general, el microscopio nos demostrará si la proporción leucocítica es despreciable, caso el más frecuente, salvo para la sangre de la vena esplénica, piemia y leucemia.

2.º método.—Fundamentase en el hecho sabido de que los glóbulos sanguíneos no se disuelven en las soluciones de cloruro sódico al 15 por 100, puesto que este no les sustrae ni la hemoglobina ni los materiales albumi-

nóideos. Según esta propiedad se pueden separar los glóbulos del plasma por precipitación y lavado en solución salada. De este modo podremos, según el autor, separar cuatro partes distintas de una misma sangre:

1.<sup>a</sup> *porción*.—El peso A de materiales albuminóideos calculados en el estado seco y pertenecientes á los glóbulos.

2.<sup>a</sup> *porción*.—El peso B de materiales albuminóideos que en total hay en la masa sanguínea.

3.<sup>a</sup> *porción*.—El peso C de la fibrina.

4.<sup>a</sup> *porción*.—Se deja coagular.

Ahora bien: si de la cantidad B restamos A + C, obtendremos una cantidad total D, cifra de los materiales albuminóideos existentes en el suero, puesto que  $D = B - (A + C)$ . El suero S contiene, en efecto, todos los albuminóideos hemáticos (que nos dá la *porción* 2.<sup>a</sup>), menos los correspondientes á los glóbulos y á la fibrina que hay que separarlos. De consiguiente, si otra 4.<sup>a</sup> *porción* de la misma sangre, se ha sometido á la coagulación, produciéndose suero libre, y si le determinamos el peso  $p$  de materias albuminóideas en 100 cm.<sup>3</sup>, podremos establecer la proporción:

$$p : 100 :: D : x \text{ luego } x = \frac{100 D}{p}.$$

Tendremos de este modo la cantidad  $x$  total de suero contenido en la *porción* sanguínea 2.<sup>a</sup> de sangre, que ha dado D como cifra de los materiales albuminóideos calculados cual ya se ha dicho.

Añadiendo á este peso  $x$ , el de la fibrina correspon-

diente C, se tendrá (1):  $x + C = \text{peso del plasma}$ .

Por último, restando  $x + C$  de la 2.<sup>a</sup> porción, se tendrá por diferencia el peso X de los glóbulos hemáticos:

$$X = B - (x + C).$$

*Modo de maniobrar.*—Como consta la operación de cuatro manipulaciones diversas, precisa dividir la sangre en cuatro partes.

1.<sup>a</sup> parte.—Se recogen 20—25 cm.<sup>3</sup> en un vaso de fondo plano cerrado herméticamente y se pesa. En esta cantidad se determina el peso B de materiales albuminóideos y de hemoglobina que en total hay en la masa sanguínea, siguiendo en su ejecución el método que se describirá más adelante, en el análisis del suero.

2.<sup>a</sup> parte.—Otros 20—25 cm.<sup>3</sup> sirven para dosificar la fibrina y obtener la proporción C.

3.<sup>a</sup> parte.—Se batan otros 20—25 cm.<sup>3</sup> de sangre para quitarle la fibrina. Luego se deja enfriar y se pesa; se vierte después la sangre batida en un frasco que contenga 10 volúmenes de solución salina al  $\frac{1}{10}$  de saturación. Se abandona al reposo 12—24 horas, al cabo de las que se separa el suero diluído, de los glóbulos, sobre los que sobrenada. Se lavan aun otras dos ó tres veces más estos glóbulos con la misma solución salina; después se coagulan por el alcohol, y se determina el peso total A de los diversos principios constitutivos de los glóbulos, según proceder que ya más adelante se describirá.

4.<sup>a</sup> parte.—Esta última porción sanguínea de 25—30

---

(1) No el peso de la fibrina seca, sino el de la húmeda, tal cual se separa del plasma por el batido. Aproximadamente se tendrá ese peso multiplicando por 5 el peso de la fibrina seca.

cm.<sup>3</sup>, se abandona á la coagulación en un vaso de extensa superficie, pero cubierto; se decanta una parte del suero S, en el que se dosifican también los materiales albuminóideos D como en la 1.<sup>a</sup> parte.

Todos estos resultados deben relacionarse á 100 de sangre total, antes de entrar en los cálculos que darán la solución del problema.

Puede objetarse á este método analítico, que si bien proporciona resultados precisos, solo es aplicable á las variedades sanguíneas, tales como la de las aves, reptiles y peces, cuyos glóbulos se separan fácilmente después de mezclarse con la solución salina. No es aplicable á la sangre de los rumiantes, ni á la del cerdo. Si bien no puede preverse como se comportarán los glóbulos de la sangre del hombre y mamíferos en la solución salada, el procedimiento da muy frecuentemente excelentes resultados para la sangre humana.

b.)—Método de A. GAUTIER.—Este ilustre químista procede, en primer lugar, á *determinar en peso la fibrina*; averigua, luego, el *peso relativo de los glóbulos y del plasma*; y por último, *determina los materiales de los glóbulos y del plasma* (1).

1.<sup>a</sup> determinación.—Investigaremos, en primer término, la cantidad de fibrina, para lo cual nos serviremos de 30—40 gr. de sangre. Para separar la fibrina procederemos del modo siguiente: prepararemos previamente un frasquito, cerrado por tapón de cautchuc, á el que atraviesa un batidor de madera ensanchado, cual una paleta,

---

(1) A. GAUTIER.—*C. de Chimie*. T. III. *Chim. biologique*. 1892. París, página 438.

por su extremo inferior, que casi toca al fondo del frasco. Presta buenos servicios un junco ó mimbre cuyo extremo inferior se fraccione en unas 7—8 briznas, de modo que forme como una escobilla.

Tarado el frasco — ó copa de cristal — se llena de 30—40 de sangre venosa, ó también de plasma venoso obtenido por reposo á 0° C. Se tapa, agita con la escobilla durante 10' y se pesa; el exceso de peso representa el de la sangre, ó mejor dicho, si el peso de la copa y del junco se conocen de antemano, averiguaremos el peso de la sangre, diferenciándolo por dos pesadas.

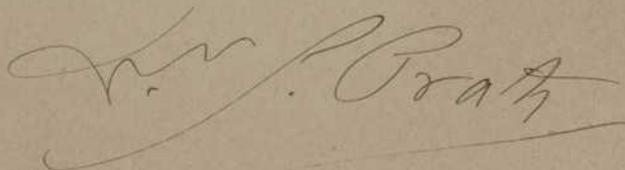
Ya coagulada la fibrina, después de 5'—6' se echa la sangre batida sobre una telita puesta en un embudo; se separan mecánicamente las parcelas de fibrina adheridas á la escobilla, y se lava esta fibrina con agua; se juntan los cuatro picos de la tela donde está depositada, y se hace una buena muñeca de lienzo que se moja en agua corriente de fuente, malaxando ligeramente, y de tiempo en tiempo, para separar con cuidado las materias colorantes. No queda más que separar del lienzo las briznas de fibrina, cuando tengan un color rosa pálido, privarla de grasa por medio de sucesivas inmersiones, para que se empape la muñeca, en agua pura y después en alcohol fuerte caliente. Se recogen entonces de encima de la tela misma las pequeñas porciones de fibrina, auxiliándonos de una lente si fuera preciso.

Cuando se ha contraído por el alcohol, y algunos lavados en éter, se separa con facilidad la fibrina. Se seca á 110° C. y se pesa después de fría, bajo la campana, en la que hay ácido sulfúrico.

Este procedimiento conviene en sangre de mamíferos, cuyos glóbulos no abandonan la fibrina, disolviéndose, ó lo hacen solo en cantidad cortísima de globulina. No es útil para sangre de aves y reptiles, en los que conviene emplear una solución de sal marina de 1—3 por 100, ó mejor de sulfato de sosa para la fibrina, hasta la entera desaparición de los glóbulos y la globulina, que se disuelven en la solución salina. En aquellos casos en que se quiera ó pretenda hacer un análisis completo sanguíneo, se deben conservar las aguas de filtración y de lavados para hacerles entrar en las determinaciones analíticas de la hemoglobina.

2.<sup>a</sup> determinación.—Para averiguar el peso relativo de los glóbulos y del plasma se procede: haciendo una solución que contenga por litro, 12 gramos de sulfato de magnesia y 16 gramos de sal amoníaco puro y seco. Se vierten en una probeta 30 cm.<sup>3</sup> y se tara todo. Se rodea de hielo, y ya bien frío, se echan, poco á poco, 30 cm.<sup>3</sup> de sangre fresca y se vuelve á pesar. Los glóbulos se precipitan al fondo lentamente sin presentarse señales de coagulación. Al cabo de algunas horas se puede decantar; luego se vierte el licor sobre un filtro de papel previamente tarado, después se pesa empapado por el licor salino anterior, si bien se enjugarán para que no chorree, sin presión, entre los cuatro dobleces de un cuádruple papel de filtro ordinario; se cuida de anotar el peso que él aumenta por este empapamiento.

Este filtro humectado del licor salado, colocado en un embudo rodeado de hielo, recibe la sangre salada; su plasma filtra muy rápidamente, siendo su color apenas



rosado ó amarillento si se ha operado bien; los glóbulos quedan retenidos sobre el filtro con un poco de plasma. Se lavan dos veces estos glóbulos con la solución salina antes dicha, enfriada á 0° y estando tapado el embudo.

Cuando el contenido no es ya más difluente, se abre el filtro y se extiende sobre un lecho grueso de papel-Joseph seco, se cubre todo con una campana de cristal, para evitar la evaporación, y se pesa cuando transcurra media hora.

Obtiénese así, un peso  $P$  que es el de los glóbulos, más el del papel seco  $m$ , más el de la solución salina  $s$  que se ha quedado en el papel humedeciéndolo, y el del peso  $p$  de la solución salina, aun adherida á los glóbulos;  $m$  y  $s$  son conocidos; queda por averiguar el de  $p$ .

$$P = m + s + p.$$

Para averiguar  $p$ , se coge el filtro y su contenido, tal cual acaba de ser pesado, se le echa en un vaso de Bohemia, medio lleno de agua, y se le hace hervir; se filtra y lava el coágulo; se recogen por entero las aguas del lavado, y se vierten en una bomboncita y luego se adiciona, en frío, carbonato de barita precipitado. El matraz estará provisto de un tubo de WILL y VARENTRAPP, conteniendo ácido sulfúrico titulado; dicho tubo se calienta cautamente; se recoge, de este modo, en el ácido titulado el amoníaco, debido á la descomposición de la sal amoníaco contenida en el licor que ha quedado interpuesto entre los glóbulos.

Se sabe, en efecto, que 16 gr. de esta sal corresponden á 1 litro del licor salino primitivo. Estableciendo, pues,

una simple proporción, obtendremos el peso del licor interpuesto entre los glóbulos, y por deducción diferencial el de los glóbulos mismos. Deduciendo, en último término, este peso de el de la sangre, con la que se experimenta, se tiene el peso del plasma correspondiente.

3.<sup>a</sup> determinación.—Para averiguar los materiales globulares y del plasma, se vierten, en tercer lugar, sin medir exactamente de 70—100 cm.<sup>3</sup> de sangre, en un largo vaso tarado, de fondo plano, y que pueda taparse con una placa de cristal. Una vez haya tenido lugar la coagulación, se pesa.

Se dispone otro vaso sobre un plano inclinado y se deja en lugar fresco más de veinticuatro horas, hasta que el suero se haya formado bien. Se recoge este suero y se dosifica sucesivamente en pesos determinados, la albúmina, grasa, colessterina, sales.

Ahora bien: sabemos por las dos determinaciones anteriores, en cuánta cantidad de sangre, cuánta fibrina hay, como de glóbulos, y por diferencia el suero que contiene.

Puesto que:

Peso de la sangre = glóbulos + fibrina + suero.

Se puede, pues, tras de las dosificaciones del agua, albúmina, etc., ejecutadas sobre un peso conocido de suero, deducir la cantidad de cada uno de estos principios en la totalidad del plasma ó del suero.

Si por otra parte, se dosifican las cantidades de aquellos materiales (albúmina, sales, etc.), contenidas en la totalidad sanguínea, y si de cada una de ellas se sustraen las cantidades correspondientes de las mismas substan-

cias halladas en la totalidad del plasma, se tendrá el peso de cada una de aquellas en los glóbulos.

El problema general queda, de consiguiente, así resuelto.

No queda más que exponer los métodos que permiten hacer por separado las dosificaciones, bien en la totalidad hemática, bien en el suero, de cada uno de sus materiales constituyentes. Asunto, propiamente químico, que en lugar oportuno y más adelante detallaremos.

c.)—Método de BOUCHARD.—El ingenioso proceder de este autor, encaminado á determinar los pesos relativos de los corpúsculos hemáticos y plasma, se halla fundado en la observación de que la sangre mezclada á una solución de sacarosa de densidad = 1,026 se coagula sin que los glóbulos pierdan sensiblemente de sus principios constitutivos. Se compara después la composición del suero azucarado á la del suero natural, y por dosificación complementaria de la fibrina, se llega á determinar el peso de los glóbulos sanguíneos.

La operación se compone de tres dosificaciones:

*1.<sup>a</sup> dosificación.*—Una primera porción de sangre (15—20 gr.) se abandona á la coagulación en una cápsula. Al cabo de 12—24 horas se dosifica por pesada la albúmina contenida en 4 gr. (sobre poco más ó menos) del suero que sobrenada. Sea *a* el peso de la albúmina de 1 gr. de suero puro.

*2.<sup>a</sup> dosificación.*—Una segunda porción de sangre, igual á la anterior, se vierte en una cápsula que contenga 10 gr. de solución azucarada de densidad = 1,026, y se abandona á la coagulación. También se dosifica la albú-

mina del suero azucarado. Sea  $a'$  el peso de la albúmina de 1 gr. de suero azucarado.

*5.<sup>a</sup> dosificación.*—Una tercera porción de sangre se consagra al batido y se dosifica la fibrina, cuya cantidad será  $f$  por 100 de sangre.

Dados estos términos estableceremos el cálculo del modo siguiente: Sea  $x$  la cantidad desconocida del suero contenida en cada cápsula, y  $p$  el peso de la solución azucarada añadida á la sangre en la 2.<sup>a</sup> cápsula. Las cantidades de suero habidas en cada cápsula contienen respectivamente  $ax$  y  $a'(x + p)$  de albúmina; y como el glóbulo no ha cedido ninguno de sus elementos albuminóideos al suero azucarado, las proporciones de albúmina contenidas en cada suero son iguales.

Se tiene, pues,  $ax = a'(x + p)$ , de donde  $x = \frac{a'p}{a-a'}$ .

Añadiendo al peso del suero así hallado y calculado por 100 de sangre el peso de la fibrina calculado en la 5.<sup>a</sup> dosificación, y restando esta suma de la sangre total, se obtiene el peso de los glóbulos.

## VI.—Numeración hemática.

Interesante para el clínico y el fisiologista es saber valuar del modo más exactamente absoluto la cifra globular que alcanza la sangre, toda vez que constituyendo—cual se sabe—la masa total eritrocítica la reserva, digámoslo así, de oxígeno necesaria á las oxidaciones incesantes que se producen en el organismo vivo, resulta que la masa hemática es nuestra riqueza vital puesto que no podemos vivir sin respirar.

Desde el descubrimiento de los glóbulos rojos sanguíneos por MALPIGHI, hasta hoy, que gracias á MALASSEZ, THOMA, ALFEROW, y otros, que han instituido medios prácticos para establecer la operación numérica que se intenta, han transcurrido más de dos siglos (1661—1872).

Efectivamente, en 1847 PIORRY concibe la idea de numerar los elementos rojos de la sangre, si bien no llega á dar cima á su pensamiento. Según SCHLAGDENHAUFFEN, fué VIERORDT (1) el que en 1852 hizo la primera tentativa de numeración, ideando un complicado y largo procedimiento, por cuyos motivos le abandonó su propio autor, no obstante los interesantes resultados alcanzados. En 1855 el holandés CRAMER (2) imagina un método superior á los anteriores. A él pertenece ciertamente el honor de haber propuesto diluir la sangre en un volumen dado de agua salada, y servirse del microscopio para contar los elementos figurados contenidos en un volumen conocido de sangre, volumen determinado por una cuadrícula hecha de antemano. Desgraciadamente muere á poco; su proceder de numeración publicado en un diario de su país, poco repartido y conocido, llegó á quedar enteramente ignorado del mundo científico.

---

(1) VIERORDT.—Neue Methode der quantitativen mikroskopischen Analyse des Blutes. (Arch. f. physiol. Heilk., 1852, p. 26-46.)

— Zahlungen der Blutkörperchen über d. Menschen. (Idem, 1852, p. 327-331.)

— Untersuchungen über die Fehlerquellen bei der Zählung der Blutkörperchen. (Idem, 1852, p. 354-550.)

— Beiträge zur Physiol. d. Blutes. (Idem, 1854, p. 259-285-408-413.)

(2) CRAMER.—Bijdrage tot de quantitative mikroskopische Analyse van het Bloed Het tellen der Bloedligchaampjes. (Nederlansh Lancet, 1844, p. 453-473.)

De modo que puede decirse que la numeración globular hemática fué abandonada precisamente en el momento en que los principios fundamentales del método acababan de ser descubiertos.

Inténtase reemplazar la numeración por otros procedimientos de investigación menos penosos, tales como la colorimetría de la sangre (WELCKER) y la diafanometría hemática (MANTEGAZZA (1)), sin comprender que las intensidades de color y transparencia ú opacidad de la sangre, no dependen únicamente del número de glóbulos en ella encerrados. Queriendo determinar la exactitud ó inexactitud de este paralelismo WELCKER (2) y GOWERS (3), imaginan más tarde procederes calcados en el primitivo de VIERORDT, y que cual el de éste han sido abandonados; POTAIN establece un método numérico, que si bien poco práctico todavía, es sin embargo superior á los precedentes, puesto que—al menos en sus manos—llegó á ser aplicable á los exámenes clínicos. Finalmente, es en el servicio de POTAIN y en el Laboratorio del Colegio de

(1) MANTEGAZZA.—Del globulímetro.—Milán, 1865.

(2) H. WELCKER.—U. Blutkörperchenzählung (Arch. d. Vereins. f. gen. arb. z. Forderung d. Wissensch. Heilk., Göttingen, 1854, p. 161-195).

— Der Gehalt d. Blutes angefärbstes Körperchen. (Idem, p. 195-208).

— Blutkörperchen Zählung u. farbeprüf methode (Viertel f. d. prakt. Heilk., 1854, p. 11-44).

WELCKER.—Bestimmungen der Menge des Körperblutes & (Zeitsch. f. r. med., 1858, s. III, t. IV, p. 145).

— Grosse, Zahl, Volum, oberfläche u. Farbe d. Blutkörperchen (Idem, 1863, s. III, vol. 20, p. 257).

(3) GOWERS.—On the numeration of blood corpuscles (The Lancet, 1877. vol. 2, p. 797).

Von der HURST.—Centralblatt f. Klin. Med., II, 961, 1890, y la trad. inglesa hecha por el Dr. CAGNEY, s. 11.

Francia, donde MALASSEZ (1) en 1872 (2), llegó á reglar y á instituir un buen método técnico, ulteriormente modificado mejorándolo.

Desde entonces la cuestión de numerar los glóbulos sanguíneos ha sido objeto de la atención y cuidado en todas las Escuelas. HAYEM y NACHET describen un procedimiento muy práctico de numeración, del que son perfeccionamientos los de GOWERS y THOMA-ZEISS.

ALFEROW también propone últimamente un nuevo método.

La numeración de los elementos sanguíneos hasta hace poco tiempo, ha sido de modo bien limitado, patrocinada por los clínicos, á causa sin duda, del largo tiempo que estas operaciones exigían.

Pero hoy, gracias á los procederes de MALASSEZ (el último), HAYEM y THOMA, principalmente, que han logrado sean en verdad más rápidos y expeditos, se recurre con mayor frecuencia; si bien á consecuencia de haber

---

(1) L. MALASSEZ.—Nouv. met. de numeration des glob. sanguins (Soc. d. Biol. 19 oct. 1872)

— Th. de doctorado.—1873.

— Arch. d. Physiologie.—1874.

— Nouv. compte-globules (Soc. d. Biol., 1880, p. 285; Arch. d. Phys., 1880, p. 377).

(2) Con este motivo anota RENAULT la siguiente reflexión: «Debemos hacer notar aquí que el problema de la numeración de los glóbulos de la sangre fué ideada la primera vez en Francia por Piorry (1847), habiéndose en vano intentado resolver en el extranjero, durante 25 años, hasta que también ha recibido en Francia su primera solución práctica con MALASSEZ, en 1872, que dió á conocer su primer método, al cual solo puede reprocharse la delicadeza de sus instrumentos. El descubrimiento de la numeración de los glóbulos de la sangre, es, pues, puramente francesa» (!) J. RENAULT.—Tr. d' Histologie prat. (1.<sup>er</sup> fasc. p. 132) en publicación.

adoptado los perfeccionados métodos determinativos de la cantidad de hemoglobina contenida en los eritrocitos, ha perdido algo de su valor absoluto, no obstante conservar su importancia á los ojos de las patologistas.

Antes de describir estos interesantes métodos, nos parece pertinente apuntar los siguientes datos teóricos que deben tenerse siempre á la vista, con objeto de comprobarlos en experiencias ordinarias, así como también por ser útiles hechos dados por autores de crédito, para los casos de diagnóstico clínico, y como auxiliar poderoso en la resolución de dudas médico-legales.

Según HAYEM, el número de eritrocitos (en sangre extraída de la yema del dedo) es igual á 5.500,000 por 1 mm.<sup>3</sup> en el hombre, y de unos cuatro millones en la mujer. Ahora bien; si un hombre de 70 kilogr. tiene 5 kilogr. de sangre, habrá un total de glóbulos rojos, igual á la cifra de 27 billones 500 mil millones.

El diámetro de un eritrocito es igual á 7,5 *micrón*; su espesor máximo ó marginal igual á 2,5 *micrón*; su espesor menor, en el centro, de 1,8—2 *micrón*. De cada 100 glóbulos, 75 tienen el diámetro término medio de 7,5; 12 eritrocitos son más grandes, 8,6; y 13 más pequeños, 6,5 (HAYEM).

El área de un eritrocito es igual á 0,000,128 mm.<sup>2</sup> De modo, que si admitimos que la masa total de la sangre en el hombre es de 4400 cm.<sup>3</sup>, los eritrocitos que contiene alcanzarán una superficie de extensión de 2.816 m<sup>2</sup>, ó sea un cuadrado de más de 52 metros de lado. Cada segundo atraviesan por los pulmones 176 cm.<sup>3</sup> de sangre; los eritrocitos de esa masa hemática presentan una super-

ficie de 81 m.<sup>2</sup>, ó sea, como un cuadrado de 9 metros de lado (WELCKER).

El volumen de un eritrocito es, sobre poco más ó menos, de (0,000,000,077217 mm.<sup>3</sup>) siete diez milésimas de milímetro cúbico. Volumen de todos los eritrocitos que se calcula por el de uno solo y su número en cierta cantidad de sangre, que es igual á los  $\frac{3}{8}$  de su volumen total (1).

La densidad de un eritrocito es = 1,105, ó sea mayor á la de la totalidad de la sangre, y sobre, todo á la del plasma que es = 1,027.

El peso de un eritrocito, deducido de su volumen multiplicado por el peso específico, es 0,000,000,085325 mg. Son necesarios 12500 hematíes para pesar un miligramo.

Conviene recordar y tener en cuenta las circunstancias que ocasionan variación en el número de glóbulos: su cifra está en razón inversa de la cantidad del plasma, de lo que se deduce que, según el estado de construcción de los vasos, las variaciones de presión y las corrientes de difusión, así cambiará dicha cifra. Un niño recién nacido que ha respirado (5.760000) tiene más que un niño de 5 años (4.950000) que tiene menos también que un adulto (5.500,000). Los capilares llevan pocos eritrocitos. Existen menos en las embarazadas. Aumentan la cifra los músculos durante la contracción, glándulas en reposo, y bazo durante la digestión. Alcanza su máximun (15—18 por 100 bajo la media) una hora después de la comida (2).

(1) KOEFFER.—U d. Volumenbestimmung d. roten Blutkörperchen. (*Munch. med. Wochenscher.* 13 Junio 1893.)

(2) MERCIER.—Des modif. de nombre et de vol. que subi. les erythrocytes, sous l' influence de l' altitude. (*Arch. d. phys. t. VI, p. 769, 1894.*)

Fundamento del método.— Los primeros observadores que se ocuparon de la numeración contaban los glóbulos contenidos en una capa delgada de sangre extendida sobre un cristalito y desecada; pero la imposibilidad de dar á esta capa sanguínea un espesor constantemente igual quitaba á este primitivo método todo carácter de precisión. Sentida, desde CRAMER, la necesidad de practicar la determinación numérica en un volumen perfectamente conocido de sangre, créanse numerosos aparatos numeradores por QUINCKE, MALASSEZ, HAYEM, GOWERS, THOMA, y otros, basados sus distintos métodos, en el mismo común principio fundamental.

El principio fundamental de todos los métodos y aparatos numeradores consiste en: *contar el número de glóbulos contenidos en una cantidad determinada de sangre mezclada con otra porción de un líquido indiferente en titulación conocida.*

De consiguiente, toda numeración globular hemática comprende dos operaciones:

- 1.<sup>a</sup> Fabricar una mezcla sanguínea homogénea y de titulación conocida;
- 2.<sup>a</sup> Numerar los glóbulos comprendidos en un volumen conocido de esta mezcla.

Después se ejecuta con los datos obtenidos en esas dos operaciones principales un sencillo cálculo, por el que deduciremos el número de glóbulos que encierra 1 mm.<sup>3</sup> de sangre, unidad de volumen adoptada generalmente en la especie.

El fundamento de fabricar una mezcla sanguínea de título conocido, hállase basado en la explicación siguien-

te: cuando se toma una gota de sangre pura y se coloca sobre un porta-objetos, cubriéndola con una laminilla, fácil es comprobar á débiles ampliaciones que los glóbulos rojos sanguíneos son tan excesivamente numerosos que no se pueden contar, cualquiera que sea el método ó aparato utilizado.

De aquí una primera necesidad que reglar: en tal unidad volumétrica de sangre son sus glóbulos tan numerosos que no es fácil contarlos; de consiguiente: *diluyamos la sangre en proporciones conocidas*, de tal modo, que sus glóbulos se hallen 50, 100, 200 veces menos numerosos que en la unidad de volumen.

Pero después de hecha la *dilución titulada*, aun los glóbulos son muy numerosos para poder contarlos en 1 mm.<sup>3</sup>; pues, *contémoslos en una fracción conocida de mm.<sup>3</sup>*

Sea entonces  $N$  el número de glóbulos contados;  $\frac{1}{v}$  la fracción conocida de mm.<sup>3</sup>; y, por ejemplo, 1 por 100 la titulación de la mezcla; claro es que el número  $x$  de glóbulos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre será:

$$x = N \times 100 \times v$$

La segunda operación practicase depositando una minúscula parcela de la mezcla sanguínea en aparatos apropiados, diferentemente contruidos, si bien todos tendiendo al fin común de limitar exactamente, y de modo conocido, el volumen de la mezcla titulada hemática, y proyectando sobre esta una red cuadrículada de trazos equidistantes, representando divisiones milimétricas perceptibles por el microscopio.

### 1.º—Numeración eritrocítica.

a.)—Técnica de la dilución hemática titulada.—Para cumplir la primera indicación se aconsejan diversos y numerosos líquidos con la común propiedad de conservar la sangre en la más completa integridad, y proporcionar una diseminación lo más homogénea.

Para diluir la sangre, HAYEM empleó en un principio el suero iodado ó el líquido amniótico de la vaca, ó la serosidad que sale al puncionar hidropneumotorax, adicionándoles iodo. Este último cuerpo, que se añade bajo la forma de tintura (XX gotas por cada 100 cm.<sup>3</sup>), no tiene otro objeto que hacer imputrescibles los líquidos. Según GAUTIER, pudiera también utilizarse, ventajosamente, la orina iodada adicionando 40 gr. de glicosa por litro. También se han empleado los sueros artificiales de SCHULTZE y de KRONECKER constituidos respectivamente por:

SCHULTZE.	}	Clara de huevo . . . . .	30	—
		Cloruro sódico . . . . .	2.50	—
		Agua . . . . .	270	—
KRONECKER.	}	Plasma de la sangre desecada en el vacío		
y redisuelto en agua.				

GRANCHER (1) aconsejaba un soluto de sulfato de sosa cristalizado en agua destilada, en proporción de 1 : 40. Tiene la desventaja de hinchar excesivamente los glóbulos.

(1) FOUSSIER.—De la numeración de los glubules des sang.—Con tres cuadros que permiten calcular rápidamente la cifra de hematies y leucocitos y su proporción relativa.—París, 1876.

MALASSEZ ha aconsejado como líquido diluidor, ó suero artificial, solutos á base de sulfato de sosa, pero de composición diversa. En un principio empleaba la mezcla constituida del modo siguiente:

$$1.^{\text{a}} \text{ fórmula. } \left\{ \begin{array}{l} 1 \text{ vol. de solución acuosa de goma arábica de densi-} \\ \text{dad} = 1,020 \text{ determinada por el pesa-orinas,} \\ 2 \text{ vol. de sol acuosa, á partes iguales de} \\ \text{cloruro sódico. . . . .} \\ \text{sulfato sosa no efflorescente. . .} \end{array} \right\} \text{ de densidad} = 1,020 \text{ á } 15^{\circ} \text{ C.}$$

Actualmente aconseja una sencilla solución de:

$$2.^{\text{a}} \text{ fórmula. } \left\{ \begin{array}{l} \text{Sulfato de sosa. . . . . } 5 \\ \text{Agua . . . . . } 100 \end{array} \right\} \text{ densidad } 1,020.$$

Ésta, es muy fácil de preparar, pues basta utilizar el pesa-orinas, y conserva muy bien los glóbulos durante el tiempo necesario á la numeración. Una solución más débil expone á que se disuelvan los glóbulos; más concentrada los retrae.

Un tercer licor que aconseja MALASSEZ es el constituido por:

$$3.^{\text{a}} \text{ fórmula. } \left\{ \begin{array}{l} \text{Sublimado corrosivo. . . . } 0,50. \\ \text{Solución de sulfato sosa . . . } 1000 \text{ (de densidad} = 1,020) \end{array} \right.$$

Los líquidos á base de sublimado, tales como el de PACINI (v. pág. 18), de ZENCKER (v. pág. 22), conservan admirablemente los glóbulos y fijan su forma indefinidamente; pero alguna vez ocasiona su presencia precipitaciones granulares que estorban para la buena y uniforme repartición de los glóbulos. Razón por la que solo se emplearán en casos excepcionales.

MAYET aconseja, cual suero artificial, el agua azuca-

rada adicionada de 2 por 100 de fosfato neutro de sosa, alcanzando por tanteo una densidad = 1,085. Con este suero consérvase la forma globular de los eritrocitos, leucocitos y plaquetas; la repartición es excelente, si bien los hematíes no se tienden todos sobre el porta-objetos, y, de consiguiente, no se hallan todos en el mismo plano óptico (1).

HAYEM (2) recomienda actualmente las dos fórmulas ya apuntadas en la pág. 18. Estos líquidos, según BIZZAZERO, conservan muy bien los eritrocitos, si bien dan lugar á las precipitaciones que más arriba mencionábam, por lo que, dice, impide en absoluto numerar exactamente las plaquetas. JAKSCH le aconseja sobre todo para usos clínicos, no obstante la opinión de DALAND (3), y cual lo ha comprobado SADLER (4) en la clínica del primero, que dice es más aconsejable y preferible una solución de bicromato de potasa al 2,50 por 100.

THOMA emplea una disolución de cloruro sódico al 3 por 100. Según BIZZAZERO, esta solución retrae á los glóbulos rojos, apareciendo de tal modo que pudieran diagnosticarse como blancos. Pero esto se reconoce fácilmente separando un poco la lente objetiva. á fin de que enfoque la cara superior de los leucocitos que es más rugosa que la de los hematíes. Además, así retraídos éstos, tienden á conglutinarse, formando masas irregulares, lo

---

(1) Societé des sc. med. de Lyon. 9 Noviembre de 1887.

(2) HAYEM.—Leçon sur les modifications du sang. 5. 75. Masson. Paris, 1882.

(3) DALAND.—Forschrítte der Med. 9. 824, 1891.

(4) SADLER.—Forschrítte der Med. 9. 1891.

cual dificulta la numeración y son menos seguros los resultados.

Para conseguir una dilución hemática exactamente titulada, precisa utilizar el aparato aconsejado por la mayor parte de los hematologistas, y que consiste en una pipeta, á modo de cuenta-gotas, ideada por POTAIN, por cuya razón se llama *mezclador Potain*, y de la que no son más que pequeñas modificaciones: las pipetas mezcladoras de THOMA (para hematies y leucocitos), el capilar de RIEDER, la pipeta de MIESCHER, la de GABRITCHEWSKY (forma grande y chica), la de CRONECKER, y otras.

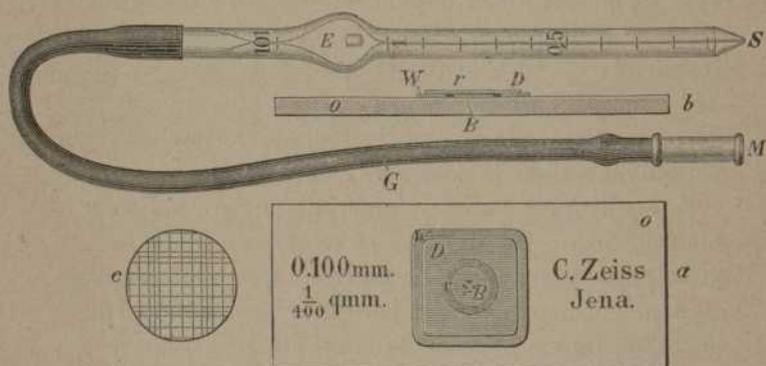


Fig. 32.—Hemocytómetro de THOMA-Zeiss.—M. G. S. Pipeta mezcladora en el interior de cuyo reservorio se vé la bolita E. de cristal que facilita la mezcla.

El mezclador POTAIN, mejorado por THOMA (Fig. 52), consiste en: un tubo capilar de cristal apuntado por un extremo (S), y por el otro continuado con un tubo de goma (G) que termina en una boquilla (M), por la que se hace la succión al ser cogido por los labios. El tubo capilar tiene unos 10 cm. de largo y se le pueden considerar 3 porcio-

nes: la primera, destinada á la captura de la sangre, tiene una luz capilar que se extiende en los  $\frac{2}{3}$  del tubo, y que llamaremos *porción de entrada*, con su extremidad libre afilada en punta, y la otra se continúa con la 2.<sup>a</sup> porción (E), que consiste en un *reservorio* en forma de oliva, y que no es más que una dilatación de la luz capilar en forma de ampolla, y en cuyo interior se hace la mezcla sanguínea auxiliados de la esferita de cristal movable que aloja en su interior. Sigue al reservorio en el  $\frac{1}{3}$  superior de la pipeta la 3.<sup>a</sup> porción ó *tubo de aspiración*, que es el trozo más corto y de calibre más amplio que el capilar, y al cual se adapta el tubo de goma.



Fig. 33.—  
Pipeta de  
MIESCHER

Está construído—ordinariamente—este mezclador de tal modo, que su reservorio, limitado en sus extremos por dos rayas marcadas con los números 1—101, tiene una capacidad 100 veces mayor que la del tubo de entrada, que á su vez está graduado desde 0,1, 0,5, 1,0, cuyas divisiones indican la  $\frac{1}{2}$ ,  $\frac{1}{3}$ ,  $\frac{1}{4}$  de la capacidad capilar.

Análoga á la anterior es la pipeta mezcladora de MIESCHER (1) (*Fig. 55*) cuya porción aspiradora es de igual calibre que el resto del capilar.

El empleo de estas pipetas calibradas no está exenta de inconvenientes, siendo uno de los más importantes el que se coagule en el capilar la sangre antes de aspirar el suero, cuando se empleen sangres no desfibrinadas, ó no se procede con

(1) Corr. Bl. f. Schweiz. Aerzte. J. 23, s. 830, 1893. Cuesta 18 Mk. ZEISS.

*A. G. Prats*

la ligereza que estas manipulaciones requieren, en cuyo caso la columna líquida se rompe más de una vez en aquella maniobra, por cuya razón entendemos útil seguir el consejo de HAYEM, cual es, el de recoger la sangre fresca con pipeta calibrada especial, y verterla en seguida para diluirla en un vasito de cristal, igualmente calibrado, y en el que tengamos ya medido el suero natural ó artificial. La pipeta especial de HAYEM, provista también de un tubo de cautchuc, en un extremo, y afilada en punta por el otro, está graduada en trazos que marcan en volúmenes 2, 2  $\frac{1}{2}$ , 4, 5 mm.<sup>3</sup> de sangre. Para el suero tiene otra pipeta ancha que puede medir hasta 500 mm.<sup>3</sup>

Modo de operar.—La manera de ejecutar la dilución titulada de sangre y otro líquido, comprende—de ordinario—dos manipulaciones:

La *primera* se ejecuta pinchando con aguja esterilizada el pabellón de la oreja, ó la yema del dedo, previamente bien aseados con agua hervida fría, y cuidando sin olvidarlo no es recomendable hacer la limpieza con ninguna mezcla carbólica, etérea ó alcohólica, toda vez que, si tal se hiciera, daríamos lugar á notables alteraciones de forma en los glóbulos que deseamos contar. Son de tener en cuenta las reflexiones siguientes de HAYEM (1): «Cuando se estudia la sangre del hombre en estado fisiológico ó morbosos, se le extrae sangre de la pulpa de uno de los dedos, por ser parte muy vascular y sobre la que es fácil de operar. Pero la manera de obtenerla merece

---

(1) LATTEUX.—Man. d. Technique, microscopique, Paris, 1877, pág. 313.

fijar toda nuestra atención. Se emplea comunmente un proceder, que consiste en pinchar con una aguja la extremidad de un dedo, previamente vendado por la base de la primera falanxe. Se obtiene así un líquido que difiere notablemente de la sangre capilar fisiológica, y que en numeraciones sucesivas hechas en las mismas personas, dan resultados que no concuerdan. Se evita esta causa de error practicando con la ayuda de la punta de una lanceta, sobre el dedó libre, una pequeña herida, lo suficiente para que por ella salgan unas gotas de sangre, en cuanto se ejerza la más ligera presión sobre la pulpa». Investigaciones comparativas han demostrado á HAYEM la importancia de esta manera de operar. La pequeña herida hecha por la lanceta, es por lo demás tan inofensiva como la punción con una aguja.

Por cualquiera de estos modos, obtenida que sea la sangre, se procede á la *segunda manipulación*. El modo más fácil y corriente de lograr la dilución consiste: Se aspira con el mezclador POTAIN la cantidad de sangre que coje hasta su trazo 1; se limpia cuidadosamente el extremo apuntado del capilar, y por nueva succión se aspira suero diluidor en cantidad bastante para llenar el reservorio, de modo que llegue hasta el trazo 101; se tiene así en el reservorio una mezcla de 1 parte de sangre por 100 de líquido, ó sea una dilución hemática exactamente =  $\frac{1}{100}$  ó centesimal.

Para obtener una mezcla =  $\frac{1}{200}$  se tomará la mitad menos de sangre, ó sea llenaremos hasta el trazo 0,5 del

capilar con sangre, y hasta el 101 de líquido, de modo que tendremos en el reservorio una mezcla de  $\frac{1}{2}$  de sangre y 100 de líquido, etc. (*Fig. 55*). La mezcla 1 : 200 es preferible para la sangre normal; la titulación 1 : 300 ó 1 : 400 para las sangres muy ricas en glóbulos; por el contrario, la dilución 1 : 100 servirá para las sangres muy pobres. De modo, que el grado de titulación varía según los casos: á más riqueza globular conviene diluir más la sangre para que su numeración sea más cómoda y fácil.

Conviene no olvidar que todas las operaciones de estos procederes numéricos hay que ejecutarlas tan rápidamente que se evite la coagulación hemática en el tubo capilar. La sangre de perro se coagula mucho más rápidamente que la del hombre, por lo que no nos servirá en la adquisición del adiestramiento que se necesita en estas maniobras.

Para que la mezcla hemática titulada sea bien íntima con el líquido diluidor se agita, haciendo rodar balanceando ó bamboleando horizontalmente con la mano, la pipeta mezcladora, de modo que moviéndose la esferita de cristal alojada en su reservorio, se consiga en lo posible una repartición igual de células sanguíneas en la masa líquida.

Después aconsejan DALAND y BIZZOZERO expulsar insuflando la parte de disolución que no se hubiera mezclado, y que pudiera ser causa de resultados erróneos, así como las primeras gotas de la del reservorio, pues, en efecto, la parte del tubo comprendida entre el trazo 1 y la punta del mezclador, cualquiera que sea la mezcla, solo contiene líquido indiferente puro.

Luego que se haya utilizado el mezclador, deberá limpiarse escrupulosamente, á cuyo objeto, lo más preferible es lavarlo con agua destilada primero, alcohol después, éter por último. Se hace pasar á continuación una fuerte corriente de aire seco, para cuyo efecto, JAKSCH utiliza la bomba de BÖHM.

HAYEM practica la dilución del modo especialísimo que al estudiar sus métodos expondremos.

b.)—*Procederes y aparatos para numerar.*—Si dificultades de ejecución ofrece la importante parte del problema que hasta aquí conocemos, aun más difícil y delicada es la maniobra de contar los glóbulos comprendidos en la mezcla titulada, ó en porción conocida de la misma, con aparatos especiales.

Numerosos son los métodos instituidos, que sucesivamente se vienen aconsejando, así como los aparatos ideados y empleados, si bien todos ellos tienen por común objeto circunscribir un volumen matemáticamente determinado, sin menoscabar por las maniobras de la preparación, la repartición globular.

Cuantos aparatos se han inventado difieren esencialmente, según que el volumen de la mezcla sanguínea investigada, se limite por la proyección de una red cuadrículada ocular ú objetiva. Según este criterio, podemos establecer dos grupos diferentes de aparatos numeradores. Comprenderemos en el primer grupo aquellos métodos en que utilizemos aparatos de tal modo acondicionados, que se limite la parcela sanguínea diluída por medio de una cuadrícula ocular, pudiéndose incluir entre ellos: el de la celda primitiva de HAYEM, el capilar de MALASSEZ,

el hematímetro de ALFEROW. En el segundo grupo incluiremos los procederes en que se limite aquélla por cuadrícula objetiva, perteneciendo á GOWERS el mérito de haber empleado el primero la red objetiva, pues su hematómetro lo ideó en 1877. Comprenderemos en este grupo: el aparato de GOWERS, el hemocytometro de THOMAZEISS, la cámara húmeda graduada micrométrica de MALASSEZ, el hematímetro de HAYEM-NACHET, etc., como los más interesantes y universalmente conocidos.

Todos los procedimientos pueden alcanzar un error de un 20 por 100, que solo en parte se evita en el método de ALFEROW.

a.)—Método antiguo de MALASSEZ (1).—Son precisos tres aparatos: 1.º, el mezclador POTAIN; 2.º, un micrómetro ocular-cuadrulado y lineal; y 3.º el *capilar artificial* de MALASSEZ. Consiste éste en un tubito aplanado de cristal pegado á una de las caras de una lámina gruesa de cristal, á modo de preparado sobre un porta-objetos. Uno de los extremos del tubito está algo doblado y despegado hacia arriba de la lámina, de modo que puede adosársele un delgadito tubo de goma por el que se succiona la dilución hemática titulada que sobre el otro extremo del tubito se echa. Percíbense, en uno de los costados de la cara superior del porta-objetos, dos columnas de cifras; en la columna izquierda se expresan las milésimas de milímetro ó *micrón* de extensión superficial del capilar, y en la derecha las cantidades á que corresponden en fracciones de mm.<sup>3</sup>—Se lee, v. gr.:

---

(1) Arch. d. physiol. 1874.

500 micrón	equivalen á	150 mm. <sup>3</sup>
450 —	>	166 —
400 —	>	187 —
350 —	>	214 —
300 —	>	250 —

Todas estas valoraciones nos las da el fabricante al objeto de que el experimentador conozca la capacidad exacta del número de milésimas del capilar donde los glóbulos han de ser contados.

*Modo de operar.*—Previamente se fijará el valor en milésimas de uno ó varios cuadros del micrómetro cuadrulado ocular, comparándolo con el micrómetro objetivo.

Con el mezclador POTAIN hacemos una dilución sanguínea, utilizando como líquido diluidor la primera de las fórmulas de MALASSEZ; se echan unas gotas de la mezcla al extremo libre del capilar artificial, en el que entrarán por capilaridad directamente, ó ayudado de succiones hechas por el tubo de goma; cuidese de quitar con papel secante el sobrante de mezcla sanguínea depositada sobre el porta, cuando notemos está lleno el capilar artificial.

Se coloca y sujeta la placa portadora del capilar sobre la platina del microscopio; se enfoca la línea sanguínea y observa con una combinación óptica que dé 100 diámetros de aumento, y se comienza á contar. Repitiendo varias veces la maniobra numérica anterior, se deben obtener cifras—si la mezcla es homogénea—que solo difieran entre sí en un 5 por 100 cuando más. Para el cálculo nos serviremos de la cifra media (N).

Para obtener—previamente—una longitud determinada del capilar artificial, opera MALASSEZ de la manera siguiente: provisto el ocular de un micrómetro cuadracu-

lado, se busca qué objetivo y longitud del tubo entrante convienen para que toda la anchura de la cuadrícula cubra, sobre un micrómetro objetivo, una longitud igual á una de las escritas sobre la placa porta-objetos del capilar artificial. Para tener una superposición exacta de los dos micrómetros—ocular y objetivo—se enchufa más ó menos el tubo entrante del microscopio; y cuando se logre tal superposición se traza una señal en el tubo. Si ahora reemplazamos el micrómetro objetivo por el capilar artificial, la cuadrícula del ocular comprenderá igual longitud de la línea sanguínea del capilar. Gracias á la señal trazada en el tubo de deslizamiento del microscopio, se podrá hallar en otras ocasiones inmediatamente la longitud determinada, sin tener necesidad de recurrir de nuevo al micrómetro objetivo.

Después de contar varias veces, cuadrado por cuadrado, los glóbulos comprendidos en toda la porción cubierta por la cuadrícula, se plantea el cálculo cual ahora mencionamos.

Supongamos que el valor relativo de la cuadrícula ocular, empleando tal sistema de lentes es = 300 *micrón*; demos por sentado haber ya contado los glóbulos del capilar artificial en la zona referida, siendo la cifra media obtenida  $N=200$ ; ahora falta leer en la placa la capacidad volumétrica, en fracciones de mm.<sup>3</sup> á que equivalen los 300 *micrón* contados, cuyo coeficiente  $c = \frac{1}{250}$  del ej., ó sólo 250 (fracción de capacidad), se multiplica por  $N$ , y el producto por el título de la mezcla sanguínea  $\left(\frac{1}{100} \text{ ó } \frac{1}{200} \text{ pr. ej.}\right)$ . De modo que puede represen-

tarse toda la operación por cualquiera de estas dos fórmulas:

$$x = N \times c \times 100, \quad \text{ó } x = N \times c \times 200.$$

Con objeto de percibir el enlace de estas distintas operaciones, pongamos el ejemplo práctico siguiente:

$$\text{extensión del capilar} = 300 \text{ micrón} = \frac{1}{250} \text{ mm.}^3;$$

$$\text{eritrocitos hallados} = 200;$$

$$\text{título de la dilución} = \frac{1}{100}; \text{ de modo que:}$$

$$200 \times 250 = 50,000 \times 100 = 5,000,000 \text{ de hematíes en } 1 \text{ mm.}^3 \text{ de sangre pura.}$$

Ahora bien: una buena numeración tolera, cual antes se dijo y vimos, 5 por 100 de diferencia máxima en los resultados, ó sea = 9 el error posible sobre 180 glóbulos hallados pr. ej. Se multiplica esta cifra 9 por los coeficientes  $250 \times 100$  ó bien por  $250 \times 200$ —según sea la titulación al  $\frac{1}{100}$  ó  $\frac{1}{200}$ ; representando los resultados de dichas operaciones 225000—450000 los errores mínimos de que están plagadas estas operaciones. En otros términos, cual se expresan el Dr. GARNIER y SCHLAHDENHAUFEN, de Nancy: «Los números obtenidos por el procedimiento de MALASSEZ, son susceptibles por mm.<sup>3</sup> de sangre de un error, que con el coeficiente empleado 250, puede ascender á la no despreciable cifra de 450,000, ó sea en números redondos, y para que se note más gráficamente, de 500,000 glóbulos.»

De consiguiente, los resultados de este método no tienen ningún *valor absoluto*, por lo que debemos acogerlos

siempre con gran prudencia y extrema reserva; sobre todo cuando ellos provienen de diversos experimentadores. No obstante, tendrán un cierto *valor relativo* en manos de un mismo observador y operando éste siempre de la misma manera.

b.)—Método antiguo de HAYEM (1).—No dando el procedimiento anterior de MALASSEZ numeración exacta eritrocítica, toda vez que la parte líquida del plasma se intro-

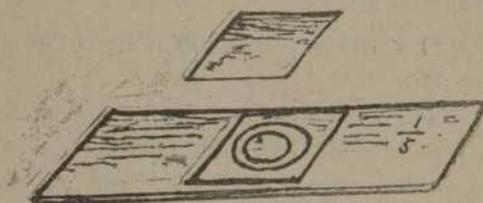


Fig. 34.—Celda de HAYEM calibrada.

duce más fácilmente que los glóbulos en los tubos capilares, ideó HAYEM un sencillo proceder para cuya ejecución se ne-

cesitaban los aparatos que á continuación mencionamos:

1.º *Porta-objetos con celda calibrada* (Fig. 34), que la construía NACHET del modo siguiente: un cubre-objetos cuadrado y de un grosor de  $\frac{1}{5}$  de mm., se perfora en su centro de manera que resulta un agujero circular de 1 cm. de diámetro; cubre que va pegado á una cara bien plana de un cristal porta-objetos. Dicha laminilla cubre, adelgazada de modo bien definido á favor del esferómetro (pudiendo utilizar también el Deskglas-tastes de ZEISS), nos proporciona una celdita ó cavidad de una altura matemáticamente exacta; siendo la preferida de  $\frac{1}{5}$  mm.

(1) Gazette hebdomadaire. 1875, núm. 19.

2.º Una *pipeta especial para medir el suero diluidor*, graduada de modo que puedan tomarse 100, 150, 200, 250, 300, 400, 500 mm.<sup>3</sup> de líquido.

3.º Otra *pipeta para medir la sangre*, exacta y perfectamente calibrada, análoga al mezclador POTAIN. Las divisiones del tubo indican pueden tomarse de sangre 2—2 1/2, 5 mm.<sup>3</sup>



Fig. 35.—Vaso mezclador de HAYEM.

4.º Una pequeña *probeta (Fig. 55)* graduada ó no en mm.<sup>3</sup>, en la que se hace la mezcla titulada hemática, auxiliados de una *varita de cristal*, uno de cuyos extremos está aplastado en forma de paleta para que sea más rápida la agitación.

5.º Un ocular con red cuadrículada micrométrica.

*Modo de maniobrar.*—Se miden 500 mm.<sup>3</sup>—v. gr.—de suero diluidor y se depositan en la probeta; por otro lado se aspira sangre, obtenida, según sabemos (pág. 178), en cantidad—pr. ej.—de 2 mm.<sup>3</sup>, y soplando por el cautchuc se lanzan al suero contenido en la probeta. De este

modo tendremos una mezcla titulada  $\frac{2}{500}$  ó sea  $\frac{1}{250}$ .

Podemos también obtener mezclas cuyos títulos sean  $\frac{1}{201}$ ,  $\frac{1}{101}$ , etc., sin más que variar la cantidad de suero ó tomando más sangre. Para que resulte íntima la mezcla, después de lanzar la gota sanguínea al fondo de la probeta, se aspirará dos ó tres veces el suero con la

pipeta medidora de sangre, con lo que se limpiará bien el capilar. Agítase luego muy rápidamente con la varita de cristal, imprimiendo un movimiento de vaivén muy vivo. Se deposita entonces, usando el mismo agitador, una gota de la mezcla en el centro de la celda calibrada, y se adapta dulcemente un cubre-objetos que se apoya sobre los bordes del cristalito perforado que limita la celda. Se obtiene así una masa líquida de superficies planas paralelas y de un espesor de  $\frac{1}{5}$  de mm. Cuidese de que no sea muy excesiva la mezcla depositada en el centro de la celda, en evitación del desbordamiento, fenómeno que se produce siempre que es abundante la cantidad líquida, ocasionando mala cubicación, y, por ende, errores. Para que se adapte bien el cubre-objetos libre, aconseja HAYEM depositar en sus bordes un poco de saliva, de modo que filtrándose capilarmente entre las dos laminillas, se opone al deslizamiento de la superior, y á la evaporación de la mezcla titulada. Entendemos, con GUBLER, da origen á errores por imperfecta cubicación la interposición de esta capita de saliva.

Terminada que sea la preparación, se lleva al microscopio y se procede á contar. Esta numeración se ejecuta de modo análogo al aconsejado por CRAMER y MALASSEZ. Para ejecutarla se coloca en el ocular un cristal en el que hay trazadas divisiones, de las que una de ellas circunscribe un cuadrado de  $\frac{1}{5}$  mm. de lado; este cuadrado está á su vez fraccionado en 16 cuadraditos iguales, y ellos también tienen trazada su mitad á fin de facilitar los recuentos. El valor  $\frac{1}{5}$  mm. se halla calculado para emplear el objetivo núm. 2 de NACHET con una longitud

convenida del tubo entrante del microscopio, á cuyo fin lleva trazada de antemano éste una señal; valor del micrómetro ocular = al grosor  $\frac{1}{5}$  de la mezcla existente en la celda. De modo que así tenemos bajos los ojos, por la proyección micrométrica, limitado un cubo de masa líquida de  $\frac{1}{5}$  mm. de lado.

Cuando se depositan los glóbulos en el fondo de la celda, se cuentan, cuadrado por cuadrado, los existentes ó comprendidos en los 16 del cuadrado, ejecutando varios recuentos. La cifra obtenida  $N$  se multiplica por 125, ó sea por la 3.<sup>a</sup> potencia de 5—puesto que los cubos son entre sí como las terceras potencias de sus áreas. Obtenida así la cifra de los glóbulos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup> de mezcla, bastará multiplicar esta cifra por el título de la mezcla para obtener el valor  $x$  de eritrocitos encerrados en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre pura.

Podemos formular la operación cual hace GARNIER, así:

$$x = N \times 125 \times \frac{1}{c}$$

es decir  $x = N \times 125 \times \frac{1}{250}$  ó sea  $x = N \times 31250$ .

Pudiendo variar el coeficiente de dilución  $c$  desde  $\frac{1}{50}$  hasta  $\frac{1}{500}$ , el número  $N$  de eritrocitos contados se puede multiplicar por 6,250 ó por 62,500. De donde resulta que los errores de numeración multiplicados en la misma proporción, sean de la misma ó parecida índole que los errores á que expone el antiguo método de MALASSEZ. Á

más de la causa de error por la interposición de saliva, que ocasiona imperfecta cubicación, son también causa de error la no exacta planimetría del cubre-objetos libre, así como el efectuar la mezcla titulada al aire libre, que á causa de la incesante evaporación no es constantemente igual el título de la mezcla.

c.)—Método de ALFEROW (1). — Emplea este autor los aparatos siguientes:

1.º El *hematímetro*, que consiste en un porta-objetos de cristal, en cuya cara superior sobresalen los extremos de 3 cilindritos de vidrio, sobre los que se apoya el cubre-objetos. Este es algo grueso, perfectamente plano y sujeto sobre los puntalitos de vidrio por medio de un resorte. Resulta de este modo un espacio ó cámara entre el cubre y el porta, de altura variable, puesto que se halla en directa relación con lo que sobresalgan los apoyos. Introdúcese la mezcla sanguínea en dicho espacio por capilaridad.

2.º Para contar los glóbulos se vale este autor de una *cámara microfotográfica*, en cuyo cristal deslustrado hay marcada una red cuadrículada, cuyo valor relativo ya de antemano se habrá averiguado y obtenido proyectando las líneas de un micrómetro objetivo.

*Modo de manipular.*—Procederemos en la numeración del modo siguiente: ya fijado el valor de la cuadrícula y enfocada la sangre contenida en la celda globular, se proyecta la imagen hemática sobre el cristal deslustrado y

---

(1) ALFEROW.—Nouv. appareil servant á compter exactement les globules sanguins (Arch. d. Physiol., 1884, p. 629).

con red, en la que podremos contar bien fácilmente, sin más que ir tachando glóbulos, conforme los numeremos, para evitar equivocaciones.

Si suponemos que han sido contados en una extensión de  $\frac{1}{2}$  mm., y dando por sentado que la celda continente de los glóbulos tenga esta misma altura, se comprende claramente que se habrán contado los eritrocitos existentes en un cubo de  $\frac{1}{2}$  mm. de lado. Para obtener el número total multiplicaremos la cifra  $N$ , obtenida por nuestra numeración, por 8 que es la relación de los dos cubos (de  $\frac{1}{2}$  y de 1 mm. de lado), y el producto por el título de la dilución.

$$N \times 8 \times 100 = x.$$

Puede decirse que las ventajas de este modo de proceder son: ejecutarse la numeración mucho más fácil y con seguridad. La altura de la celda globular es tan considerable que evita la desigual penetración de los glóbulos. Además el grosor del cubre impide el natural abombamiento por compresión, resultando así una cámara más uniformemente igual, todo lo cual evita errores.

*d.*)—Método de KRONECKER.—Cual en el de HAYEM, se necesitan 2 buretas, un porta-objetos escavado de  $\frac{1}{5}$  mm. de hondo, cubres bien aplanados y pulimentados, un vaso donde se hace la mezcla y agita con varilla de cristal, y una lámina en la que hay marcada una red cuadrada que se orienta en el ocular (1). Este autor mezcla 2 mm.<sup>3</sup> con  $\frac{1}{2}$  cm.<sup>3</sup> de solución de sal común al 30 por 100, á fin de obtener un soluto titulado = 1 : 250.

---

(1) El aparato de KRONECKER, encerrado en un estuche, lo vende P. ALTMANN de Berlín, por 30 Mk.

Por otra parte, utiliza un ocular provisto de cuadrícula reticular, y sirviéndose siempre para numerar del mismo objetivo de poder medio, pr. ej., el V de HARTNACK.

Previamente procura, auxiliado de un micrómetro objetivo, que cada 1 cuadrado de la red ocular cubra 5 divisiones del micrómetro objetivo, de modo que 10 cuadrados =  $\frac{1}{2}$  mm.; á este fin se irá alargando el tubo del microscopio hasta conseguirlo, y entonces se hace una señal en el tubo para otras veces. De modo que dicha señal indica que para esta longitud del tubo la imagen de la red ocular (utilizando igual lente objetiva) representa en todos los campos  $\frac{1}{4}$  mm.<sup>2</sup> La masa de hematíes numerados será de  $\frac{1}{5}$  mm. de hondo. De esta manera, en todos los campos el volumen de un espacio (paralelepípedo) será de  $\frac{1}{4000}$  mm.<sup>3</sup>  $\left( \frac{1}{400} \times \frac{1}{10} = \frac{1}{4000} \right)$ .

Ahora bien, los glóbulos contenidos en 1 cm. de la disolución antes dicha será =  $250 \times 4000 \times x$ . Se cuentan 16 veces y tomamos la media como valor de  $x$ .

También podemos practicar la operación según la regla siguiente: hecha la dilución de 1 : 250; se cuentan los glóbulos en 16 campos y se divide el número obtenido por 32. El cociente que se obtenga se multiplica por 1.000,000, y el número obtenido serán los glóbulos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup>

e.)—Método de THOMA-ZEISS (1).—El proceder numérico

---

(1) LYON und THOMA.—Ueber die Methode der Blutkörperzählung. Virchow's Archiv. t. 84, p. 131.

THOMA-ZEISS.—Ueber blutkörperchenzählung por ABBE (Sitzungsberichte der Gesellschaft f. Med. und Naturwiss., en Jena, n.º 29, Noviembre 1878).

del Profesor THOMA de Heidelberg, es quizás de los modernos el más cómodo de ejecutar, cual lo prueba su universal utilización en el centro del continente europeo, pero más principalmente en Alemania. En un precioso estuche (*Fig. 56*), ofrece ZEISS, construídos por su im-



*Fig. 56.*—Estuche del aparato numerador de THOMA-ZEISS tal cual lo expende REICHERT de Viena.

portante fábrica, así como REICHERT, cuantos aparatos son precisos para practicar la operación numérica globular que se intenta, y que son: 1.º La *pipeta capilar mezcladora* (M S) de los glóbulos rojos, y calibrada de modo análogo á la conocida de POTAIN. 2.º La *cámara numeradora ó hemocytómetro* (*Fig. 57 a-b*) que siguiendo los consejos de ABBE, y dirigida por THOMA, construye ZEISS (1). Consiste en un porta que lleva pegado un cubre perforado W, sobre el que se adapta el cubre D, limitando así una celda B, cuya margen *r* está deslustrada, al mejor adosa-

(1) ZEISS, de Jena, Cat. 30, 1895, pide 30 Mk. por el estuche con solo la pipeta para hematíes y el hemocytómetro; 44 Mk. con las dos pipetas para glóbulos rojos y blancos. Las pipetas sueltas cuestan 12 Mk. la de los rojos, y 14 Mk. la de los blancos —REICHERT, de Viena, Cat. 1892, pide 14 y 27 Mk.

*A. G. Prats*

miento de los cubres. Queda así exacta y regularmente hecha una cámara de profundidad de 0,1 mm. En el fondo de esta celda hállase trazada cuidadosamente una cuadrícula *c* microscópica, constituida por 400 cuadraditos

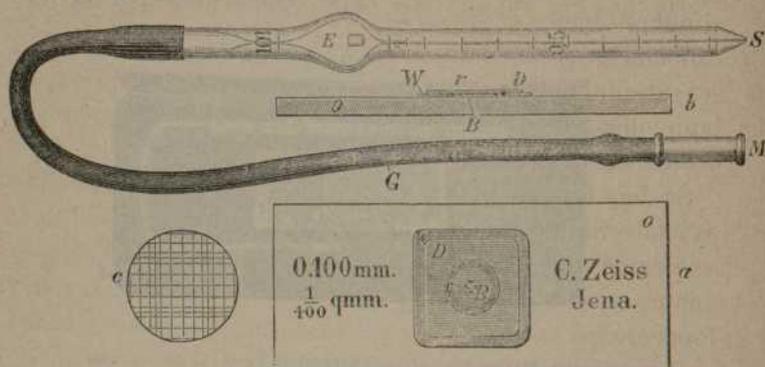


Fig. 37.—Detalles del hemocytómetro de THOMA-ZEISS. M. G. S. Pipeta mezcladora; —a hemocytómetro visto de plano;—b el mismo en corte vertical pasando por su centro; c—red cuadrículada de la celda tal cual se percibe con aumento.=1:20.

exactamente iguales, de tal modo, que cada serie de 16 cuadritos hállanse señalados por líneas más pronunciadas. Cada uno de estos cuadritos mide  $\frac{1}{400}$  mm.<sup>2</sup>, ó sea de superficie; el volumen, por consiguiente, que hay por cima de cada campo cuadrado de la red, será  $= \frac{1}{4000}$  mm.<sup>3</sup>

*Modo de manipular.*—Obtenida la gota sanguínea se aspira con la pipeta; después se llena el reservorio E hasta el trazo 101 de líquido diluidor, que puede ser el cloruro sódico 3 : 100, según THOMA; el bicromato potá-

sico 2  $\frac{1}{2}$ :100, según DALAND, etc., y se procura una íntima mezcla agitando.

Así cargada la pipeta con sangre diluida, se vierte y llena la celda calibrada y graduada del hemocytómetro (que hace el papel de micrómetro objetivo), y se tapa con el cubre-objetos D tan cautamente, y tomando tales precauciones, que ni penetre ninguna burbuja de aire, ni sea absolutamente perfecta la aplicación con el importante objeto de que no se formen ni produzcan los anillos coloreados de NEWTON.

Se deja reposar unos cortos instantes, sobre un plano exactamente horizontal, el preparado, con objeto de que se efectúe una mezcla exacta de sus líquidos constituyentes, y una depositación uniformemente igual en su fondo de los eritrocitos.

Reposado el preparado se coloca sobre la platina del microscopio. Este se dispone primero con lentes que solo proporcionen 30—70 diámetros amplificantes, con objeto de comprobar si existen burbujas de aire, cuerpos extraños, y si la distribución globular ofrece cierta igualdad. Ejecutada esta comprobación se dispone un fuerte aumento, y se comienza la numeración. Los aumentos aconsejados por el autor del método que estudiamos, son los que proporcionan la serie de combinaciones siguientes: oc. 1, obj. C.=105; oc. 1, obj. D.=175; oc. 5, obj. C.=325; oc. 5, obj. D.=540; de ZEISS (*Fig. 27*).—Ó bien: oc. V., obj. 5=280; oc. V., obj. 7=570; de REICHERT.—Ó en fin: el oc. III, obj. V.=610; oc. III, obj. III=200; de SEIBERT.

Se practica la numeración contando siempre por 16 cua-

ditos, y sacando el término medio del resultado obtenido. KAHLDEN expresa que cuantos más cuadros se examinen —no solo del centro si que también de la periferia— tanto más exacta será la numeración. La manera metódica de ejecutar la numeración de los glóbulos contenidos en cada serie de 16 cuadraditos, se ajustará á lo que dicen LYON y THOMA (1): «Una serie vertical de *cuatro* cuadros sirve de unidad para la numeración; se cuentan todos los glóbulos que cubren ó están en contacto con el límite superior de este rectángulo formado por 4 cuadrados —ya estén colocados dentro ó fuera de dicha línea;— después todos los glóbulos que cubren ó están en contacto con las líneas que estos 4 cuadros limitan hacia un lado (izquierdo), y, por último, los contenidos dentro de ellos, excluyendo siempre los situados sobre ó en las líneas que limitan los contornos de la serie de cuadros». De este modo se evita el error de contar dos veces un mismo glóbulo, sobre todo los que están á caballo sobre las líneas de la cuadrícula.

Para deducir el número  $x$  total de glóbulos rojos, procederemos del modo siguiente: Se multiplica el número  $N$  total de glóbulos encontrados y contados en los cuadros examinados por 4000 (cubicamiento de un cuadradito de la red); el resultado por el título centesimal de la mezcla, que será 100—200, según se llene el capilar de sangre hasta la señal 1—0,5, puesto que la dilución estará en cualquiera de las dos proporciones 1 : 100—1 : 200; y se dividirá el resultado por el número de cua-

1) LYON y THOMA: Virchow's Archiv. 84, 131, 1881.—A. HALLA: Zeitschrift f. Heilkunde, 4, 198-331, 1883.—REINERT: Ob. cit.—SADLER: Ob. cit.

drados  $c$  examinados, obteniéndose de este modo la cifra total de glóbulos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre pura.

De modo que 
$$x = \frac{N \times 4000 \times 100}{c}$$

Para hacer más ostensible el orden de estas operaciones, pongamos un ejemplo:

número de glóbulos encontrados . . . . .	$N = 205$
cubicación de un cuadrado. . . . .	4,000
título de la mezcla. . . . .	1 : 100
cuadros contados . . . . .	$c = 16$

y formularemos 
$$x = \frac{205 \times 4000 \times 100}{16} = \frac{205 \times 400,000}{16}$$

$$= \frac{82.000000}{16} = 5.125,000 \text{ eritrocitos en 1 mm.}^3 \text{ de san-}$$
  
gre no diluida.

*f.*)—Método moderno de MALASSEZ (1).—Muy análogo al precedente y originado, por un lado dadas las no pequeñas dificultades de fabricar los capilares artificiales—cual el usado en su primer proceder—en el deseo de obtener una planimetría rigurosa, y de tal índole que presente la capa hemática por todos lados el mismo grosor; por otra parte, sucede con no poca frecuencia, que los glóbulos mezclados al suero diluidor penetran con más dificultad que éste en el interior del capilar, resultando, por consiguiente, una sangre con una dilución mayor que la obtenida y titulada por el mezclador, originando los consiguientes errores en el cálculo. Por estas atendibles razones, y dado los éxitos logrados por THOMA, y los resultados

(1) Soc. biologie. 1879—Arch. d. physiologie, 1880, p. 337.

conquistados por el método de HAYEM, que luego estudiaremos, MALASSEZ ha sustituido su antiguo tubito capilar, sobre el que se proyectaba una cuadrícula ocular, por la cámara graduada húmeda, que es casi igual á la ya descrita de THOMA.

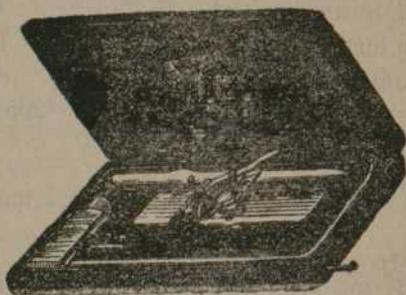


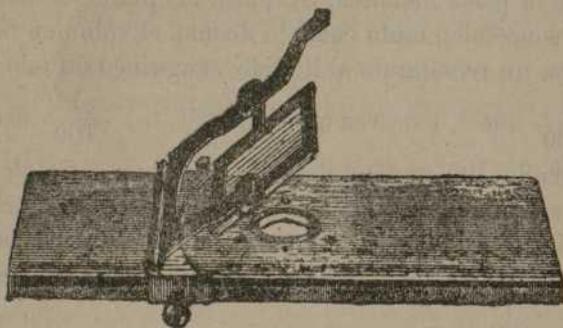
Fig. 38 — Estuche VERICK para contar glóbulos, según MALASSEZ.

Los aparatos precisos para ejecutar este proceder son: la *pipeta mezcladora* POTAIN, ya conocida, y la *cámara húmeda graduada* para contar glóbulos de MALASSEZ, y que expende VERICK, de París (1), juntamente con la pipeta y otros útiles encerrados en una cajita (*Fig. 38*).

Consiste este aparato contador de eritrocitos en una lámina gruesa de metal del tamaño de un porta-objetos grande. Esta lámina está horadada en su centro, y ocupa el hueco un disco de cristal macizo, perfectamente ajustado y empotrado; lleva trazadas en su cara superior, una serie de rayas paralelas que limitan al cruzarse 5 rectán-

(1) El precio de la caja 50 fr., casa de VERICK, hoy STIASSNIE. París, 1892.

gulos, dividido cada uno, á su vez, en 20 cuadraditos iguales y solo perceptibles por el microscopio. De valor matemáticamente conocido ofician de micrómetro objetivo. De tal modo, que la red cuadriculada rectangular tiene  $\frac{1}{4}$  mm. de longitud, por  $\frac{1}{5}$  de latitud, representando, por consiguiente, una superficie de  $\frac{1}{20}$  mm.<sup>2</sup>. Aquellos rectángulos que están más especialmente destinados á la numeración globular, se hallan subdivididos en 20 pequeños cuadrados que miden  $\frac{1}{20}$  mm. de lado.



*Fig. 39.—Cámara húmeda graduada de MALASSEZ.*

Los rectángulos así subdivididos hállanse en el centro de la red y destácanse unos de otros y de sus cuadrados por estar separados por una doble línea.

Lleva la lámina metálica (*Fig. 59*), un dispositivo, á modo de compresor, cuyas láminas-pinzas soportan un marco en el que encaja un cubre-objetos, que se adapta por un resorte de acero. Por la cara inferior de la placa metálica, á poca distancia del disco de cristal central, penetran marcando los tres puntos de un triángulo equi-

látero, 3 tornillitos, que atravesando la placa asoman más ó menos sus puntas por la cara superior, según que á voluntad se les haga penetrar más ó menos. De modo que el cubre-objetos—que es fuerte y bien plano como todos los que para este fin construye el fabricante—se apoya sobre estas tres puntas de los tornillos al adaptarse sobre el disco. Queda, de esta manera, un espacio capilar entre la cara inferior del cubre y superior del disco, igual á la porción de tornillo que sobresalga de la superficie superior de la placa metálica. Si, pues, las puntas de los tornillos sobresalen tanto como  $\frac{1}{5}$  de mm. el volumen reservado en un rectángulo al líquido sanguíneo diluido será  $= \frac{1}{100}$  mm.<sup>3</sup>, toda vez que  $\frac{1}{20} \times \frac{1}{5} = \frac{1}{100}$  mm.<sup>3</sup>.

Existiendo 100 rectángulos, dispuestos en series de 10, resultará que la red entera comprenderá 1 mm.<sup>3</sup>—Si los tornillos sobresalen  $\frac{1}{10}$  mm., el volumen de mezcla correspondiente á cada rectángulo será la mitad menos, ó sea  $= \frac{1}{200}$  mm.<sup>3</sup>

*Modo de maniobrar.*—Úsese como suero diluidor la 2.<sup>a</sup> fórmula del autor (pág. 174). Hecha—cual sabemos—la dilución hemática, se deposita una gota sobre el disco grabado, adáptese el cubre por el compresor, y dispóngase sobre la platina del microscopio, luego que hayamos dejado sedimentar en reposo y en plano horizontal la cámara graduada. Enfóquese con 200 diámetros de aumento, un rectángulo de los subdivididos en cuadros, y procédase con orden á contar los eritrocitos, siendo el modo mejor apuntar los contados en cada cuadro y sumar lue-

go esas cifras parciales. En evitación de los menores errores ejecútese esa misma operación en 3 ó 4 rectángulos, y sáquese la cifra media, con la que estableceremos el cálculo. De esta manera, dice RENAUT, el error medio no pasa de 3 p.  $\%$  y puede ser solo de 2 p.  $\%$ .

Supongamos que la mezcla titulada se ha hecho al  $\frac{1}{100}$ ; que la preparación tiene  $\frac{1}{5}$  mm., y que á cada rectángulo, de consiguiente, corresponde un volumen  $\frac{1}{100}$  de mm.<sup>3</sup> Es evidente que el número de eritrocitos hallados será 100 veces más pequeño que la existente en 1 mm.<sup>3</sup> de mezcla; también es cierto, que siendo el título de la mezcla =  $\frac{1}{100}$ , el número de glóbulos correspondientes á cada mm.<sup>3</sup> de mezcla será 100 veces más pequeño que los que corresponden á 1 mm.<sup>3</sup> de sangre pura. De consiguiente multiplicaremos el número de glóbulos hallados  $\times 100 \times 100$ , es decir, por 10.000, el producto será el número de glóbulos hallados en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre. Sencillamente basta añadir 4 *ceros* al número hallado.

Las ventajas de este método, ó mejor de su aparato, son el que no hay cuidado varíe la cubicación por interponerse alguna brizna extraña atmosférica entre cubre y disco, así como la posibilidad de reglar á voluntad el espesor de la mezcla hemática. En cambio son inevitables los errores dependientes de la fatal imperfección que tiene la máquina que raya la red micrométrica objetiva, así como el ensuciarse por la depositación sobre esta de la sangre evitando su clara visión microscópica.

g.)—Método de HAYEM-NACHET.—Cuantos instrumentos aconsejaba HAYEM en su primitivo proceder para practicar la operación numérica globular, solo uno ha sido modificado y otro suprimido. Este último ha sido el ocular

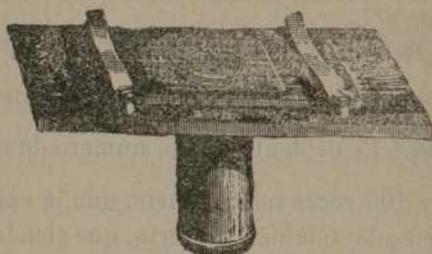


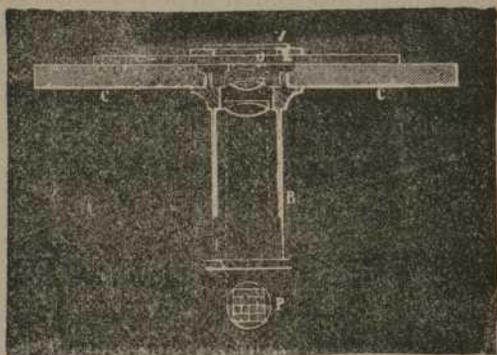
Fig. 40.—Hematimetro de HAYEM-NACHET.

micrométrico, por cuanto la cuadrícula micrométrica que ahora emplea se proyecta de abajo á arriba en la celda calibrada antigua que es la modificada. Denomina á su nuevo aparato *Hematimetro*, y lo ofrece aquel antiguo óptico francés encerrado en una cajita y acompañado de pipeta para medir en mm.<sup>3</sup> la sangre, pipeta para el suero, un recipiente para la mezcla, con su agitador, varios cubres-objetos y un tubo de cautchuc (1).

El hematimetro de HAYEM y A. NACHET (*Fig. 40*), consiste en un porta-objetos con celda, calibrada y construida cual la antigua, pero adosada á un dispositivo especial, dentro del que un sistema de lentes proyectan hacia arriba la imagen de una cuadrícula fotográfica de

(1) NACHET.—Cat. 1892. 50 fr. y 60 fr. con platina deslizando. Paris.

un valor que de antemano dice el fabricante. La imagen de la fotografiada red micrométrica viene á dibujarse en (*O Fig. 41*) el fondo de la celda calibrada, de donde resulta que tiene este aparato, así dispuesto, sobre todos



*Fig. 41.—Corte vertical del Hematímetro de HAYEM; percíbese como se proyecta la red P en O por cima de las lentes, y debajo de la celda V.*

los anteriores, la inmensa ventaja de que no ensuciándose con la sangre, cual ocurre en aquellos, percíbese con manifiesta claridad. Celda calibrada que se sujeta á la armadura por las pinzas metálicas que tiene en su platina; así como el tubo cilindrico, en cuyo interior van las lentes en su extremo superior y la fotografía de la cuadrícula en su extremo inferior, se introduce y cuelga por la abertura de la platina del microscopio. La luz reflejada por el espejo de éste atraviesa primero la fotografía de la red, obteniéndose de este modo una imagen muy negra, y con tantas divisiones cual se deseen, y quedando así suprimido el micrómetro ocular. Este mismo aparato lo

vende el fabricante con el aditamento de una platina que se desliza á favor de un tornillo, de modo que puede hacerse varíe de lugar de un modo reglado ó regular á la celda hematimétrica, con objeto de poder contar metódicamente regiones diferentes de la gota hemática.

En cuanto al modo de ejecutar la preparación, así como la operación de cálculo numérico de los eritrocitos, en nada ha variado de su método antiguo ya descrito.

Limpieza de los aparatos numeradores.— Merece ser llamada la atención de los prácticos acerca de la inmediata limpieza de todos estos delicados aparatos, como del aseo que de vez en cuando, si bien frecuentemente, deben someterse los mismos, si queremos conservarlos en completa buena utilización y siempre dispuestos á servirnos de ellos. Es decir, que dicha limpieza debe hacerse con tal esmero y cuidado que no quede traza alguna de haber servido.

La limpieza de las celdas donde se deposita la dilución hemática, se ejecutará con agua destilada, luego alcohol, y por último, otra vez agua; se enjugará con trapito de lienzo tan fino, y con tales precauciones ejecutada, que no rayemos la superficie sobre que van trazadas ó grabadas las divisiones micrométricas.

La luz capilar de las pipetas mezcladoras, así como la del aparatito primero de MALASSEZ, se vaciarán primero del resto de su contenido, insuflando aire por el tubo de goma y haciendo entrar luego varias veces por succión agua destilada. Después del lavado escrupuloso con agua hay precisión de secar bien el interior de dichos tubos, con objeto de evitar quede parcela de sangre diluida al-

guna que alteraría, ó al menos entorpecería, la titulación de las mezclas que ulteriormente se han de introducir en otras numeraciones. Á este objeto, el modo mejor consiste en expulsar, soplando violentamente, el líquido acuoso que llena la ampulosidad; volver á medio llenar el reservorio de agua, y por aspiración hacer entre una corriente de aire que renueva el líquido y se carga de humedad al atravesar el mismo. Como estas succiones aéreas repetidas fatigan, cuando se practican con la boca, podemos adaptar al tubo de goma una pera de aire, con cuyo medio también aseguramos la entrada de aire seco (JACKSCH).

Se debe no olvidar el consejo de lavar con alcohol y éter, después de hacerlo con agua. Al ser muy volátiles dichos líquidos, se asegura al concluir una desecación completa con solo unas succiones de aire seco.

También es bueno y conveniente lavar de tiempo en tiempo estos instrumentos, con una solución de potasa ó sosa, á fin de que se separen en absoluto los eritrocitos que pudieran por acaso haber quedado adheridos á las paredes del cristal.

Cuando al no operar con la debida rapidez, llegue á coagularse la sangre en el interior del mezclador obstruyendo su luz, convendrá también introducir el tubo capilar en solución potásica ó sódica. Al cabo de unas horas el coágulo retraído puede ser expulsado de su interior por insuflación; después de 48 horas está casi completamente disuelto.

## 2.º — Numeración de los leucocitos.

Algo más difícil que la numeración eritrocítica es practicar la de los leucocitos, dados sus movimientos, su menor número, su transparencia, etc. Mas es cierto que es muy variable su número, según condiciones que no son ahora lugar de apuntar; de consiguiente, es necesario más veces de lo que parece determinar su proporción por el examen microscópico.

Recordemos algunos datos teóricos en corroboración de lo que decimos: MOLESCHOT cuenta en sangre normal 1 leucocito por 377 hematíes; observaciones recientes de BOUCHUT y DUBRISAY, HAYEM y sus discípulos, THOMA, HALLA, etc., dan como resultado medio de 1:420 á 1:800, ó sea de 5000 á 10000 leucocitos por 1 mm.<sup>3</sup> LITTEN en la agonía ha observado con frecuencia una leucocitosis acentuada (1). En determinados estados patológicos aumenta el número de leucocitos tanto que se iguala al de los eritrocitos; de donde imperativamente se impone —sobre todo en este caso— la necesidad de practicar el recuento leucocítico con precisión, para juzgar de los

---

(1) BOUCHUT y DUBRISAY.—De la numeration des globules du sang á l'état normal et á l'état pathologique, chez les adultes et chez les enfants. *Gaz. Méd. de Paris*, 1878, núms. 14 y 15.

CADET.—Et. physiol. des élém. fig. du sang, etc. *Th. de Paris*, 1882.

R. THOMA.—Die Zählung der weissen Zellen des Blutes. *Vichow's Archiv*, t. 87, 201.

MARAGLIANO y CASTELLINI.—*Centralblat. f. Klin. Med.* II, 947, 1890.

LITTEN.—Zur Pathologie des Blutes. *Berl. Klin. Wochens.*, n.º 27, 1883.

HERICOURT & RICHTER.—*C. r. Soc. biol.*, n.º 35, 38, t. V, 1893.

caracteres y marcha de aquel estado. Para hacerse cargo de las variaciones proporcionales de ambos elementos, basta fijar un poco la atención en el cuadro adjunto:

ESTADO NORMAL.	1 : 60 en la vena esplénica.	<i>Aumenta por:</i> digestión, sangría, largas supuraciones, menstruación, puerperio, agonía. Tónicos (quina). <i>Disminuye por:</i> ayuno, mala alimentación.
1 : 335 WELKER.	1 : 2260 arteria id.	
1 : 377 MOLESCHOT.	1 : 170 vena hepática	
1 : 500—800 JAKSCH.	1 : 740 vena porta. En general más numerosos en las venas que en las arterias.	

Mucho se viene trabajando con el intento de probar la proporción respectiva de las dos especies de glóbulos. Debe no olvidarse que semejante proporción no solo prueba aumento de los leucocitos, si que también puede resultar de una disminución en número de los eritrocitos.

Cuantos métodos pueden seguirse, tienen por fin, ó bien investigar la proporción de estas dos clases de elementos después de haber practicado la numeración eritrocítica, ó sea procederes de relación; ó bien determinar el número absoluto de leucocitos en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre ya de modo relativo, ya directamente.

a.)—Método de BIZZOZERO y FIRKET.—Para investigar numéricamente la proporción que guardan leucocitos y hemáties, proceden estos autores del modo siguiente:

Se pincha un dedo y se recoge la sangre que se escapa con un porta; se le añade otra gota, más grande, de solución clorurada sódica á 0,75 p. ‰, y se mezclan las dos gotas á fin de distanciar entre sí los glóbulos sangui-

neos, y se tapa con un cubre. Se deja reposar un momento antes de examinar el preparado, con objeto de que depositándose los glóbulos formen sobre el porta una sola capa plana, lo cual facilita la numeración. Si la sangre se ha diluído convenientemente y los glóbulos se han separado bien unos de otros, pueden contarse fácilmente.

Si hubiese mucho exceso de sangre conviene guardarse de separar una poca, utilizando papel chupón aplicado á los bordes de la preparación, puesto que los glóbulos blancos, en razón de su viscosidad, quedarán pegados á las superficies de los cristales porta y cubre, de tal modo, que el fragmento de papel chupón solo absorberá parte líquida y eritrocitos de la sangre diluída, y por consiguiente se modificarán las proporciones numéricas existentes entre las dos especies de glóbulos. Es preferible en este caso destruir la preparación y hacer otra nueva empleando menos sangre. Desde luego que solo el hábito nos enseñará segura y fácilmente á apreciar de un golpe cual sea la cantidad de sangre necesaria.

No deberemos contentarnos con contar los glóbulos—blancos y rojos—hallados en un solo campo óptico del preparado. Compréndese que si el número de leucocitos está poco elevado, la menor irregularidad en su distribución pudiera, en estas condiciones, determinar errores de cálculo considerables.

El error, por el contrario, será tanto más débil cuando se opere examinando el mayor número de glóbulos, de tal modo, que podremos atribuir á los resultados una cierta exactitud cuando se haga la numeración sobre millares de glóbulos rojos.

Estas numeraciones se facilitan utilizando los *micrómetros oculares cuadrículados*. Son estos unos sistemas oculares ordinarios que llevan entre la lente colectiva y



Fig. 42.—Micrómetro ocular de red. ZEISS.

la frontal un disco de cristal sobre el que están trazadas rayas, con ayuda de un diamante, en dos sistemas de líneas equidistantes, que se entrecruzan en ángulos rectos. Este disco se halla sobre el diafragma en el sitio donde en otros oculares se coloca el micrómetro ocular. ZEISS (Figura 42) (1) los construye de tal modo,

que un cuadrado de 5 mm. de lado se haya dividido, según se le pida, en campos cuadrados de 1,0 ó 0,5 mm.

Cuando se hace el enfoque nótase el campo del microscopio dividido en pequeños cuadrados, y si se mira un preparado sanguíneo, parece que los glóbulos ocupan estos cuadraditos, lo cual facilita no poco la numeración, pues con este aparatito es casi imposible equivocarse, bien dejando de contar ciertos glóbulos, bien contando otros dos veces.

Hecha la numeración total fácil es traducir los resultados por una proporción sencilla. Supongamos—dicen BIZZOZERO y FIRKET—que después de haber examinado sucesivamente muchos campos de la preparación se han contado en total 400 leucocitos por 2800 eritrocitos.

Se establece la proporción siguiente:

$$400 : 2800 :: 1 : x$$

de donde 
$$x = \frac{2800}{400} = 7;$$

(1) Cuesta 5 Mk. según Cat. 1895, ZEISS.

*A. G. Prats*

ó sea, esta sangre contiene 1 leucocito por 7 hemáties.

Si por otra parte se ha determinado el número de eritrocitos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup> de la sangre estudiada, no es difícil deducir el número de leucocitos en absoluto.

Sabiendo, v. gr., que la sangre contiene 4.000.000 de glóbulos rojos en 1 mm.<sup>3</sup> y que por cada 7 de éstos se halla 1 blanco, podremos establecer la proporción siguiente:

$$7 : 1 :: 4.000.000 : x$$
$$x = \frac{4.000.000}{7} = 571.428 \text{ leucocitos en } 1 \text{ mm.}^3$$

b.)—Proceder basado en el empleo de la misma ampli-  
ficación microscópica.—Ciertos autores, creyendo abreviar las manipulaciones, suprimen la numeración de los rojos. Emplean sangre pura, no diluida y solo cuentan el número de leucocitos hallados en el campo microscópico, cuando se hace este examen del preparado con una combinación fija y determinada de lentes objetivas y oculares. Por ejemplo, si se emplea el ocular III y el objetivo 8 de HARTNACK para examinar sangre pura, se hallan 3 ó 4 leucocitos en cada campo óptico; ahora bien, si este número en otra sangre examinada con la misma combinación, observase aumentado, podremos, dicen, deducir que se trata de un estado patológico.

Manipulando solamente de este modo, este proceder no puede ser más dado á engaños inevitables; puesto que aun operando con la misma sangre, el número de leucocitos visibles en el campo microscópico deberá necesariamente variar según sea el espesor de la capa sanguínea sometida al examen. Desde el principio sabemos que los

preparados obtenidos por los métodos ordinarios, nunca es constante su espesor; varía según el volumen de la gotita sanguínea examinada, según las dimensiones y según el peso del cubre-objetos.

Para darle cierta exactitud á este método es preciso lograr una capa de sangre de espesor constante, lo cual puede obtenerse de varios modos: ora interponiendo entre el porta y el cubre una delgada tirita de papel, sobre la que se apoya este último; tirita que deberá tener siempre, naturalmente, el mismo espesor en todos los exámenes sucesivos que puedan practicarse.

Mejor que esto, sería utilizar en operaciones de esta índole un mismo porta escavado, en cuya cavidad se deposita la gota que se va á examinar. De este modo si se ha determinado en un principio examinando sangre de reconocida normalidad, el número de leucocitos visibles en el campo con determinado aumento, se podrá, empleando en todos los casos esta misma combinación, comprobar rápidamente las variaciones numéricas de estos glóbulos en los casos patológicos.

Debemos recordar que la capa sanguínea deberá desde luego tener en estos exámenes un espesor no solamente constante si que también débil, puesto que sin eso los glóbulos se apilan los unos contra los otros, siendo imposible contarlos con exactitud.

Compréndese fácilmente que este método solo nos dá cifras de un valor muy relativo, apreciable solamente por comparación con los que proporciona el examen de una sangre considerada como normal.

Difiere este proceder del de Bizzozero descrito antes

en que este nos dá el número de leucocitos proporcionalmente al de los rojos de la misma sangre que se examina.

c.)—Procedores directos absolutos.—Método de GRANCHER (1).—Dado que las maniobras aconsejadas para numerar eritrocitos son insuficientes para calcular leucocitos, entre otras razones, porque el número de éstos es menor y que aun en el fisiologismo normal esa cifra oscila entre 1 : 300 á 1 : 2000, GRANCHER ha ideado un procedimiento después de hacer notar lo siguiente: Al observar una preparación de hematíes, no se perciben más que uno ó dos leucocitos en cada cuadrícula que se cuenta. Es, pues, imposible sacar conclusiones serias con cifras tan pequeñas.

Además, así como los hematíes se reparten bastante uniformemente, los glóbulos blancos no lo pueden hacer más caprichosa y desigualmente. No es raro observar en preparaciones que no se presenta ni un solo leucocito en el campo microscópico, al pronto, y que en cuanto se le ocasiona un pequeño movimiento ó conmoción aparecen en gran número.

Emplea el autor como suero diluidor:

Sulfato de sosa cristalizado . . . . .	1 gr.
Agua destilada. . . . .	40 »

Hecha una preparación, cual si fuéramos á numerar eritrocitos—por ej. siguiendo el método de HAYEM—contaremos todos los glóbulos blancos que vayan apareciendo en el campo del microscopio. Numeración que no es más difícil que la de los glóbulos rojos, si se tiene en cuenta que son más voluminosos que éstos, que aunque

---

(1) FOUASSIER.—Loc. cit. (p. 173).

transparentes tienen un brillo particular, y que se hallan en plano más superior que los hematíes sedimentados, de modo que aparecen sobre fondo rojizo al enfocar un plano más alto que el que ocupan los glóbulos rojos. Se contarán 10 campos diferentes y se sacará la cifra media del total.

Para obtener la cifra exacta de los leucocitos por  $\text{mm.}^3$  procede FOUASSIER, según los consejos del autor: averiguando, primero, la relación existente entre el campo entero del microscopio y la red cuadrículada con la que se cuentan los glóbulos rojos. Dice que por una serie de cálculos sencillos, se sabe que el campo representa una superficie 8,5 la cuadrícula.

El cálculo que haremos será: sea la cifra media obtenida contando 10 campos =  $a$ ; esta cifra se divide por 8,5 y se obtendrá el número de leucocitos contenidos en la cuadrícula, es decir, en un cubo de  $\frac{1}{5}$  mm. de lado. Solo queda ahora obtener la cifra exacta de células blancas hemáticas contenidas en 1  $\text{mm.}^3$  de sangre pura, para lo que se hará el pequeño cálculo ya sabido por la numeración eritrocítica. Se tiene, así,

$$a \times 125 \times 251 : 85 = 31,375 a : 8,5.$$

d.)—Método de THOMA.—La numeración absolutamente directa de los leucocitos en un volumen dado de sangre (1  $\text{mm.}^3$ ) es desde luego preferible á los demás métodos. Pudieran convenir los métodos numéricos para los eritrocitos aconsejados, pero en aquellas condiciones el examen solo recaería en un pequeño número de células blancas; para llegar á establecer la proporción sobre cifras un tanto elevadas, sería preciso multiplicar los recuentos, lo

que exige un tiempo bastante largo. Habría necesidad de examinar una gota sanguínea de gran espesor, de modo que en un solo campo microscópico hubiera bastante número de leucocitos. Á el Profesor THOMA (1) pertenece el mérito de haber logrado el *desideratum* que se persigue, transparentando la capa de eritrocitos y dejando intactos á los leucocitos, ó tal vez poniéndolos más visibles.

Procede el autor diluyendo, primero, sangre en la proporción de 1 : 10 en agua que contenga  $\frac{1}{3}$  p. ‰ de ácido acético. De este modo se disuelven todos los eritrocitos, quedando intactos los leucocitos y conservables por largo tiempo, y en disposición de ser contados, y de practicar dos numeraciones con intervalo de 12—18 horas sin presentarse alteración alguna en los leucocitos. Para hacer esta dilución construye ZEISS una pipeta mezcladora especialmente graduada (1 : 10).

También puede hacerse la dilución, según JAKSCH, con una pipeta de 1 cm.<sup>3</sup> de cabida y dividida en 0,1 cm.<sup>3</sup> Con esta se aspiran 0,9 cm.<sup>3</sup> de la disolución acética al  $\frac{1}{3}$  p. ‰, ó sea 1 : 300, y se vierten en un cristal de reloj; se añade luego con la misma pipeta 0,1 cm.<sup>3</sup> de sangre; se mezclan intimamente ambos líquidos, y se llena de esta mezcla la celda del hemocytómetro de THOMA, guardando las mismas precauciones y reglas que ya quedaron apuntadas.

El Dr. THOMA, dice que á causa del menor número de leucocitos, respecto al de los eritrocitos, conviene tomar

---

(1) R. THOMA—Zur Zählun der weissen Zellen des Blutes. (*Virchow's Archiv*, t. 87, p. 201.

como unidad, no un cuadrado cual antes, sino el campo visual; colocando el tubo del microscopio de tal modo, que dicho campo comprenda exactamente un múltiplo de la división que hay en el fondo de la celda calibrada y graduada.

Antes de proceder á la numeración debemos cerciorarnos, haciendo girar el tornillo micrométrico, de si todos los glóbulos están separados los unos de los otros y repartidos, por si quedara alguno adherido á la cara inferior del cubre-objetos.

El modo de obtener el contenido cúbico del espacio correspondiente al campo visual, es el siguiente: Se cuentan las divisiones de la cámara de dicho campo, cada una de las que tiene  $\frac{1}{20}$  mm. (si el contenido superficial es de  $\frac{1}{400}$ , el cúbico será de  $\frac{1}{4000}$ ): el diámetro será igual á  $\frac{1}{20}$  mm. multiplicado por el número de líneas contadas: si este es, pr. ej. = 10, el diámetro será  $10 \times \frac{1}{20}$  mm. =  $\frac{10}{20}$ , y el radio  $\frac{10}{40}$  mm.

La superficie, pues, del campo visual (1) será  $\mathbf{p} \left(\frac{10}{20}\right)^2$  mm.<sup>2</sup>; el contenido cúbico (Q) de un campo visual en una celda que tenga 0,1 mm. de profundidad, será

$$= 0,1 \times \left(\frac{10}{40}\right)^2 \mathbf{p} \text{ mm.}^3,$$

---

(1)  $\mathbf{p} = 3 \cdot 1416$ .

puediendo resolverse el problema por la siguiente fórmula

$$\frac{10 \times Z}{M \times Q}$$

si el número de los campos visuales contados se considera =  $M$ , y el de leucocitos =  $Z$ , el centímetro cúbico de un campo visual será =  $Q$  ( $Q = 0,1 \pi R^2$ ,  $R$  = al radio del campo visual en milímetros), y si la dilución sanguínea se ha hecho á 1 : 10, se deducirá el número de leucocitos contenidos en 1 mm.<sup>3</sup> de sangre no diluída.

De esta fórmula general se deduce que cuando la dilución es de 1 : 10, la fórmula para numerar será, cuando se empleen 16 campos visuales (que es lo ordinario):

$$\frac{10.000 \times Z}{314};$$

si la dilución es de 1 : 20 y los campos visuales 16 se numerarán los leucocitos por la fórmula:

$$\frac{20.000 \times Z}{314};$$

esto es: se multiplica el número de glóbulos blancos encontrados en los 16 campos visuales (=  $Z$ ) por 10.000 en la dilución 1 : 10 y por 20.000 en la 1 : 20 y se divide por 314: el producto nos dará la cifra de leucocitos contenidos en un milímetro cúbico de sangre.

Caso de hallarse tan aumentado el número de leucocitos, cual ocurre, v. gr., en la leucemia, que no se hiciera fácil el recuento del modo anterior, emplearemos el proceder del mismo autor ТРОМА para los eritrocitos; en cuyo caso puede también hallarse el número de unos y otros cuando se cuentan los que existen en muchos campos visuales.

A este fin KAHLDEN (1) aconseja, y efectivamente es muy conveniente, emplear una disolución de cloruro sódico al 3 p. ‰, teñida por la adición de violeta genciana, ó de metilo (0,1 gr. de color por 150 gr. de solución sódica) con lo cual, coloreándose los leucocitos, se diferencian y destacan mejor de entre los eritrocitos.

TOISON (2) utiliza con este objeto el siguiente líquido colorante:

Agua destilada . . . .	160	cm. <sup>3</sup>
Glicerina . . . . .	30	—
Sulfato sódico . . . .	8	gr.
Cloruro sódico . . . .	1	—
Violeta metilo . . . .	0,025	—

Al cabo de 5'—10' están teñidos los leucocitos de violeta, y los rojos, de los que se distinguen bien, de verde.

MAYET (3) recomienda con el mismo objeto una mezcla de sangre, ácido ósmico, glicerina y agua, en la cual los rojos se tiñen de un hermoso rojo subido, los blancos quedan sin teñir, y por consiguiente, haciéndose fácilmente el recuento de los primeros, pero nunca el de los segundos.

### 3.º—Numeración de las plaquetas.

No puede ejecutarse ésta con bastante precisión, en razón de su viscosidad, toda vez que empleando los aparatos de numeración hasta aquí descritos, quedan adhe-

(1) KAHLDEN.—Tech. d. hist. Unters. patholog. etc. p. 87. Jena. 1893.

(2) TOISON.—Fortschritte de Med. VII. 411, 1889.

(3) MAYET.—Acad. d. sc.—Wiener sud. Presse, 1888.—BARJON & REGAUD —De la numération des glob. blancs par les sérums colorés. (Soc. des sc. med Lyon, 1895 y en *Lyon Méd.* 1895, n.º 18, p. 20.

ridos durante las manipulaciones sobre las paredes de los instrumentos de cristal que utilizamos para diluir y numerar.

BIZZOZERO (1) dice que es preferible hacer una preparación, conforme ya se dijo para los leucocitos (pág. 207) y determinar la proporción existente entre eritrocitos y plaquetas, después de practicar por medio de cualquier otro aparato la numeración eritrocítica. La combinación de las cifras así obtenidas en esas dos operaciones nos dará la cifra de las plaquetas existentes en 1 mm.<sup>3</sup>

Las precauciones que en estas maniobras especiales numéricas habrán de cumplirse son:

1.<sup>a</sup> Conviene emplear la primera gota hemática que sale por la herida, puesto que las plaquetas se acoplan rápidamente á los labios de la misma;

2.<sup>a</sup> Conviene utilizar para diluir, un líquido fijador conveniente, tal como cualquiera de los ósmicos (solución ósmico-sódica de BIZZOZERO), ó una solución de sulfato de magnesia á 14 ‰, que si bien deforma algo las plaquetas, las mantiene más seguramente aisladas;

3.<sup>a</sup> Nos serviremos de un buen objetivo de inmersión homogénea, imprescindible dada la extrema palidez de los elementos que vamos á numerar, procurando no comprimir el cubre-objetos para que no varíe la cubicación de la mezcla hemática;

4.<sup>a</sup> Se facilitará la numeración empleando un ocular cuadrículado micrométrico; y

5.<sup>a</sup> Convendrá untar de aceite ó vaselina los bordes

---

(1) BIZZOZERO.—M. de Microscopie clinique.—3.<sup>e</sup> ed. Bruxelles, 1888.

del cubre-objetos, en evitación de las corrientes que pudieran producirse en el líquido bajo la influencia de la evaporación y que ocasionaría el que la observación fuese casi imposible.

Del valor que debamos conceder á la operación numérica de las plaquetas sanguíneas, nos lo dice el que hasta ahora ha suministrado muy pocos resultados prácticos, incluso en el orden patológico. HAYEM admite que en la sangre normal existen 240000 plaquetas por cada mm.<sup>3</sup> BIZZOZERO dice que esta cifra es corta.

Parece ser que se aumentan las plaquetas en el embarazo, en el transcurso de las quemaduras, en algunas anemias, si bien no constantemente en tuberculosis, cólera, etc. En el recién nacido y en el transcurso de las enfermedades febriles, disminuye. En el descenso de la fiebre vuelve á aumentar el número de plaquetas, llegando á ser más numerosas que en el estado normal (1).

## VII.—Medición hemática globular.

La medida del diámetro de los glóbulos hemáticos es interesante, no solo al fisiólogo, para conocer las variantes que ofrece el tamaño de los glóbulos, si que también al clínico, en la determinación de los estados morbosos que le perturban, como al perito si quiere extender su informe pericial médico-legal á conciencia.

En la especie humana no todos los glóbulos tienen el

(1) SACERDOTTI.—S. les plaquettes du sang (*Arch. ital. biol.* t. XXI, p. 449, 1894).

ACQUISTO.—Nueva técnica para la conservación sanguínea y sobre multiplicación de las plaquetas. (*Congr. intern. Roma.—Arch. ital. biol.*, t. XXII, f. 1.<sup>o</sup>, 1894).

mismo diámetro. MALASSEZ ha estudiado la proporción globular, según sus diversos diámetros, existente en la sangre de un hombre sano y adulto; después de más de 400 mediciones ha llegado al siguiente resultado:

ERITROCITOS CUYO DIÁMETRO ES:	Número por 100
De 6— 7 micrón. . . . .	3 p. <sup>o</sup> / <sub>o</sub>
» 4 » . . . . .	7 —
» 7—25 » . . . . .	13 —
» 7—50 » . . . . .	18 —
» 7—75 » . . . . .	24 —
» 8 » . . . . .	18 —
» 8—25 » . . . . .	9 —
» 8—75—9'65 . . . . .	3 —
» 9 . . . . .	5 —
<i>Total de eritrocitos.</i> . . . .	100 —

HAYEM en su célebre conocida obra sobre *Sangre*, presenta en forma de lista demostrativa los variables diámetros de los corpúsculos sanguíneos de diferentes animales, mediciones ejecutadas aprovechando las distintas especies animales existentes en el Jardín de Plantas de París, y de consiguiente efectuadas en vivo. Como se notará fácilmente por el examen de las siguientes cifras, y sobre todo si las comparamos con las que después consignamos, dadas por GAUTIER y otros, se notará que no pueden ser más arbitrarios, poco fijos y exactos los datos recogidos en las mediciones globulares hemáticas hasta ahora llevadas á cabo. Inseguridad de dichos datos que hace que sus aplicaciones en los hechos médico-legales no puedan ser más inciertos.

GLÓBULOS ROJOS . . . del	Muy	Grandes	Medianos	Pequeños	Muy
	grandes				pequeños
Cercopithecus ruber. . .	—	7,7	7	6,18	3,25
Cercopithecus cephus. . .	9	8,3	7,1	6	3,47
Cercocebus fuliginosus. . .	9	8,5	7,4	6,25	6,07
Macacus cynomolgus. . .	8,68	7,05	6,4	5,5	4,30
Cynocephalus leucophæus. . .	8,68	8,03	7,06	6,07	5,42
Saimiris sciureus. . .	8,13	7,06	6,68	5,5	4,3
Jacchus vulgaris. . .	8,68	7,4	6,70	6	4,85
Loris gracilis. . .	9	8,05	7,40	6	5,25
Canis familiaris (Examen en más de 20 individuos de diferentes razas) . . .	9	8	7,02	7	6
Gato doméstico adulto. . .	7,15	7	6,2	5	4,6
Gato de 4 á 8 días de edad. . .	8,6	7,45	6,3	4,05	2,75
Conejo doméstico. . .	8	7,45	7,16	6,68	—
Conejillo indiano. . .	8,75	7,9	7,48	6,68	6,3
Capra hircus (cabra). . .	6,2	5,4	4,25	3,25	2,9

	Grandes	Medios	Pequeños
Camelus bactrianus (Came- llo de Asia). . . . .	8,3 por 4,6	7,6 por 4,55	6,85 por 4,25
Anchenia guanaco. . . . .	8,09 por 4,07	7,5 por 4,25	6,85 por 4,25

	Eritrocito	Núcleo
Ciconia alba (Cigüeña de Holanda). . . . .	15 por 8,25	6,5 por 3
Testudo græca (Tortuga). . .	21,2 por 12,45	6 por 5
Lacerta agilis. . . . .	15,75 por 9,10	—
Coluber natrix. . . . .	22 por 13,50	—
Bufo vulgaris. . . . .	21,80 por 15,9	—
Tritón marmoratus. . . . .	31 por 21,5	—

GAUTIER, LANDOIS y otros autores presentan otros cuadros, del que no es más que un término medio el siguiente, que transcribimos al objeto de compararlo con los datos anteriormente apuntados:

**Eritrocitos numulares.**

Del elefante. . . . .	9,4 micrón.
— hombre. . . . .	7,5 »
— perro . . . . .	7,2 »
— conejo . . . . .	7,2 »
— gato. . . . .	6,2 »
— oveja. . . . .	5,0 »
— cabra . . . . .	4,2 »
— almizclero. . . . .	2,5 »

**Eritrocitos elípticos.**

De la llama . . . . .	4,5 micrón	7,5 micrón.
— paloma . . . . .	6,5 »	14,7 »
— sapo . . . . .	13,5 »	24,0 »
— rana . . . . .	16,5 »	24,5 »
— tritón. . . . .	16,5 »	29,3 »
— proteo. . . . .	35,6 »	58,2 »

Los del *Lurches Amphiuma* son un tercio más grandes que los del proteo (RIDDEL).

Después de los precedentes datos fácil es convencerse de que comparando los diámetros de los eritrocitos humanos con los de algunas especies animales, se hallará que muchos ofrecen gran semejanza, y en ocasiones hasta igualdad entre sí. La ejecución de esta clase de experiencias no es fácil en la práctica microscópica, es tarea delicada, pues se trata de fracciones pequeñas, que aun con el auxilio y perfeccionamientos de los aparatos mo-

ernos, rara vez se logra apreciar el diámetro de modo rigurosamente exacto y matemático. Su valor en los dudosos casos de diagnóstico pericial, está muy mermado.

Interesa, no obstante, conocer los procedimientos, por cuya virtud pueden adquirirse tales datos métricos, así como no está demás aconsejar que en todo Laboratorio, á esta clase de tecnicismos dedicado, debe existir, y ejecutados por su mismo personal, preparados microscópicos de sangre de numerosas especies animales, toda vez que estas colecciones serían las mejores pruebas que habrían de servir de término de comparación con la sangre que se estuviera estudiando.

Tanto pueden servirnos para medir el diámetro de los glóbulos rojos, preparados húmedos como secos, si bien son mejores estos últimos por la fijeza del elemento. Si se trata de sangre desecada podemos servirnos del líquido de BOURGOGNE para diluirla, pero siempre será preferible tomarla fresca y diluirla, cual dice GAUTIER, en suero iodado, ó bien, y es mejor, cual aconsejan GREBER y LAACHE, provocar bruscamente su desecación.

Como quiera que sea, deberemos siempre intentar medir el *diámetro* de los *glóbulos medianos*, dejando á un lado los muy grandes y los muy pequeños. Obtiénese así el diámetro medio globular. Si se tratara de medir los corpúsculos hemáticos de ave, camaleón, reptiles ó peces, cuyos glóbulos son elípticos, es preciso medir las dos dimensiones y tomar separadamente la media de las dimensiones máximas para el gran eje, y las mínimas para el pequeño.

Diferentes son los métodos ideados y que podemos seguir para averiguar las dimensiones de los corpúsculos hemáticos. En casi todos ellos figura como aparato esencial y común el micrómetro objetivo, el cual se utilizará unas veces solo y otras en combinación con la cámara clara, ó con el micrómetro ocular.

1.º método.—El sencillo proceder aconsejado por ROBIN consiste: en utilizar un ocular cuya lente superior aumente 10 veces, y que coincida su foco en un cristal plano que lleva trazadas 50 divisiones, de una anchura de  $\frac{1}{10}$  de mm. Se tienen así divisiones largas de 1 mm. En este supuesto, si se escoge, pr. ej., un objetivo cuyo poder amplificante sea de 400, y se percibe que la imagen de un glóbulo rojo de sangre humana cubre tres divisiones del micrómetro ocular, este glóbulo será igual á  $\frac{3}{400}$  de mm. ó  $0^{\text{mm}},007$ . Este procedimiento es muy simple y basta tener una tabla de la amplificación de los objetivos, para obtener inmediatamente el resultado deseado. Por el mismo proceder se ha averiguado que los leucocitos miden 8—9 *micrón*.

2.º método.—Consiste en depositar sobre el mismo micrómetro objetivo la sangre cuyos glóbulos se quieren medir; es decir, hacer un preparado hemático, sirviéndonos del micrómetro como porta-objetos.

Es el micrómetro objetivo, cual se sabe, una lámina metálica del tamaño de un estrecho porta-objetos, horadada en su centro, donde se engasta un cristalito que lleva grabado 1 mm, dividido en 100 partes iguales, apenas visible á la simple vista dicho dibujo, se perciben

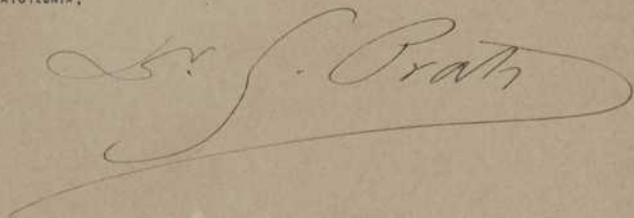
más ó menos separadas las divisiones centesimales milimétricas con el microscopio á diversos aumentos.

Examinando sangre de rana, pr. ej., del modo antes dicho, se percibe que un glóbulo—en su mayor diámetro—ocupa casi división y media del mm. dividido en 100 partes. De modo que dicho glóbulo medirá  $\frac{1}{100}$  + la mitad de  $\frac{1}{100}$  de mm. ó sea = 15 á 16 milésimas de milímetro, ó de *micrón*, que es la unidad acordada por los microscopistas, en sus mediciones.

Son más de uno los inconvenientes de este modo de proceder: haciendo una y otra preparación, con los aseos precisos, sobre un solo micrómetro, no tardarán mucho en borrarse las rayitas trazadas y no servir más el aparato; además, para medir comparativamente elementos diferentes, sería preciso tener á disposición muchos micrómetros; no es fácil cambiar de posición á un glóbulo en aquellos casos en que al hacer la preparación no ha correspondido ninguno con las rayas del micrómetro, y de seguro imposible rectificar dicha posición.

Abandonados estos métodos directos, se recurre hoy con frecuencia á aquellos procederes en que averiguado de una vez para todas el valor del micrómetro objetivo, ó mejor de su imagen, se sustituye éste por el preparado hemático ó preparados que deseamos medir. De modo, que con un solo micrómetro-objetivo—consideración que no debe olvidarse dado el precio del aparatito (1)—hace-

(1) Los micrómetros objetivos cuestan casa de ZEISS (Cat. 30), 10-6 Mk., según tengan 1 mm. dividido en 100 partes iguales, ó 10 mm. cuya última división esté subdividida en 10 partes.



mos todas las mediciones, lo cual hace tengan éstas la misma unidad de medida en absoluto.

3.er método.—Para llevar á cabo la medición son precisos: el preparado hemático, la cámara clara, y un micrómetro objetivo.

MALASSEZ aconseja proceder del modo general siguiente: Se punciona un dedo vendado después de lavarle con alcohol—en evitación de los esporos que siempre existen en la piel—por medio de aguja esterilizada. La gruesa gota saliente se aspira con la pipeta mezcladora de POTAİN, pasando así la sangre desde los vasos al capilar de cristal tan rápidamente que solo sufre el minimum de evaporación posible. Luego se llena el reservorio de la pipeta del suero artificial (1.ª de las fórmulas del autor, pág. 174). Agitada la mezcla se deposita una gota en un porta-objetos, se coloca un cubre y bordea de parafina. Se examina con una combinación de lentes cualquiera.

Enfocados los glóbulos que quieran medirse, se dispone la cámara clara de NACHET, y cuanto es preciso—cual se sabe—para ejecutar dibujos con dicho aparato.

Se escoge para dibujar aquellos glóbulos dispuestos exactamente de plano, aparte de dibujar también aquellos otros que por los azares de la preparación estén colocados de canto; de este modo, obtendremos sobre el bristol, las dos proyecciones, horizontal y vertical, de los eritrocitos que se quieran medir: medición—dice MALASSEZ—que será extremadamente fácil si conocemos de antemano la escala de amplificación de las imágenes así obtenidas. Para llegar á este resultado sustituimos el preparado hemático por un micrómetro objetivo, cuya ima-

gen se proyecta con las mismas lentes y cámara clara sobre el papel bristol donde se dibujaron los glóbulos; dibujamos sobre dicho papel las divisiones y queda terminada la operación. Relacionando con ayuda del compás las divisiones micrométricas sobre los elementos dibujados, y tomando cada una de estas divisiones como unidad, obtendremos las dimensiones reales en centésimas de milímetro. Subdividiendo cada una de estas divisiones sobre el bristol en 10 partes iguales, lo que se hace por una operación geométrica de las más simples, obtendremos milésimas de milímetro, con las que, llevadas por el compás, podremos medir los glóbulos dibujados.

Si se trata de medir sangre de enfermos que no pueden ir al Laboratorio, y como tampoco es cómodo ni fácil transportar los aparatos al lecho del enfermo, habrá necesidad de ejecutar un preparado hemático seco—según maniobras ya conocidas—y bien cerrado, en evitación de impurezas, practicar la medición más tarde en el Laboratorio. Ha ya tiempo que WELCKER procedía de este modo, y sus valuaciones han sido reconocidas perfectamente exactas por los modernos hematologistas. Nada, pues, será más fácil en clínica que recoger diariamente una gota sanguínea de un enfermo, prepararla en seco, pegarle una etiqueta, en la que se indicará fecha, nombre y demás datos interesantes, para obtener de esta manera preparados, que más adelante medidos, nos permitirán establecer, en tiempo determinado, la curva de las variaciones en el tamaño de los eritrocitos.

En vez de la cámara clara de NACHET podemos utilizar las

conocidas de ZEISS, OBERHAUSSER, y el aparato para dibujos microscópicos de ABBE, de nueva construcción. Damos por conocidos esos ingeniosos aparatos que envían la imagen microscópica sobre una hoja de papel que se colocará de tal modo que corresponda al nivel de la platina del microscopio. Conviene recordemos deben observarse las reglas siguientes para emplear provechosamente estos instrumentos:

1.º La intensidad de la luz que ilumina el campo del microscopio y el bristol debe ser lo más igual que sea posible. Cuando la luz que hiere al papel sea más fuerte se interpondrá en la ventana del aparato un cristal coloreado para disminuirla. Si es la del campo visual la más intensa, se disminuirá la abertura del diafragma ó del condensador.

2.º Cuidese de que el ángulo formado por el espejo del aparato de dibujar y el plano del papel, ó sea la mesita donde se trabaja, guarden exactamente 45°. Esto se logra matemáticamente con la ingeniosa y útil mesa de dibujo de BERNHARD (*Fig. 45*), que construye ZEISS (1).

3.º Fijar el papel de modo que no se deslice.

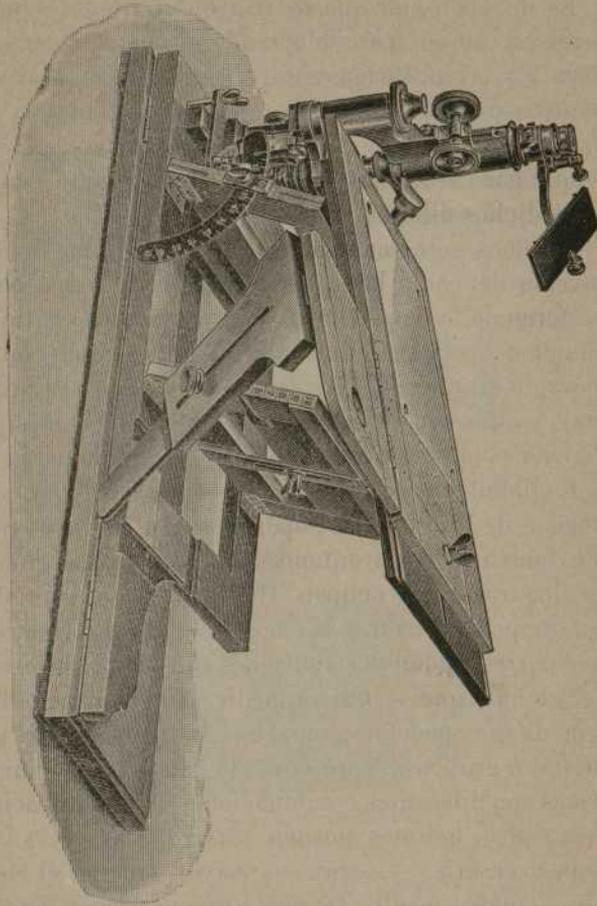
Con cierto hábito pudieran no ser precisos, para dibujar, ni necesarios dichos aparatos. Para ello colocaremos el papel sobre un libro, caja del mismo microscopio, por ej., á una altura igual á la de la platina: mirando con el ojo izquierdo en el microscopio, y luego con el derecho

---

(1) Este acreditado fabricante expende esta mesita al precio de 34—42 Mk. La cámara lúcida al de 21 Mk. El aparato de ABBE, con nuevos perfeccionamientos, al de 60 Mk., y el antiguo por 35 Mk. (Cat. 1895) — *Vergl. Zeitschr. wissensch. Mikr.*, Bd. 9, S. 439, 1892 y S. 298, 1894.

sobre el papel, la punta del lápiz contornea la imagen

*Fig. 43.—Mesa de dibujar de Benvenuto: viéndose la posición que ha de guardar con el microscopio y la cámara clara que lleva el ocular.*



observada. Claro es que no, da este modo precisión matemática.

Es de aconsejar que se utilicen al dibujar lápices de diversos colores, pero adoptando el mismo color siempre para los mismos elementos. De modo que usaremos el negro para trazar las divisiones del micrómetro, el rojo para los eritrocitos, el amarillo para los leucocitos, etc., lo que hace sean más rápida y gráficamente demostrativos dichos dibujos (1).

Creemos será más práctico ejecutar la medición á la inversa de como lo aconseja MALASSEZ, ó sea como de preferencia lo hace DUVAL, que es cual á continuación mencionamos: Acondicionado el microscopio con la cámara de dibujar de ABBE (que merece nuestra preferencia), y enfocado el micrómetro objetivo, se dibujan sus divisiones en negro; se sustituye en seguida por el preparado globular hemático que deseamos medir, y se ve la imagen de los glóbulos superpuestos á las rayas trazadas previamente; basta entonces dibujar dichos glóbulos ó ver los trazos que ocupan. Hay la ventaja, maniobrando así, de poder correr más ó menos el dibujo primero hasta que correspondan sus divisiones con uno de los extremos del glóbulo que se quiere medir. También tiene la ventaja de que podemos construirnos una serie de papeles bristol ó gráficos, representando las divisiones micrométricas con diferentes combinaciones de amplificación microscópica, que nos pueden servir tantas veces cuantas sean necesarias, y según sea mayor ó menor el elemento que se desea medir. De modo que usaremos los dibujos en relación con el tamaño del elemento y siempre aque-

---

(1) A. G. PRATS.—Del dibujo microtécnico (*Bol. Farm. Pícazo*, 11, A. II, 1895).

llos que nos den una idea más aproximada ó menos errónea de lo que pretendemos conocer.

4.º método.—En lugar de la cámara clara y de dibujo del micrómetro objetivo, podemos utilizar para medir glóbulos de un *micrómetro ocular* de conocido valor en relación con uno objetivo.

Cual el más preciso para esta clase de exactas valoraciones nos permitimos aconsejar el que llama ZEISS *micró-*

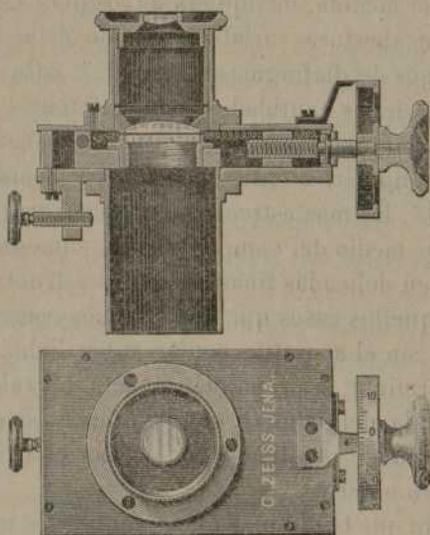


Fig. 44 — Micrómetro ocular de tornillo visto en corte, y por arriba ( $\frac{2}{3}$  de su tamaño natural).

*metro-ocular de tornillo* (1), que consiste en un ocular de RAMSDEN que lleva sobre un cristal trazada una red cru-

(1) ZEISS los ofrece por 70 Mk.

zada, que por medio de el tornillo que se ve á la izquierda de la *Fig. 44*, se conduce y pone sobre la imagen objetiva; de manera que un espacio de la división del tambor del tornillo corresponde á un desplazamiento de 0.01 mm. en la imagen objetiva, contándose las vueltas completas en una escala cifrada visible en el campo óptico, y llegando á medir el aparato hasta 4 mm. en la imagen proyectada por el objetivo.

Según EHRlich conviene utilizar, cuando se usen estos oculares de medida, cualquiera de los diafragmas que en surtido de abertura variable expende ZEISS por 5 Mk. Estos juegos de diafragmas sirven: 1.º, para determinar la relación de las cantidades de las diferentes especies de glóbulos contenidos en la sangre; 2.º, para determinar la relación numérica entre leucocitos y hematíes, ej. en anemia; 3.º, los más estrechos para demostrar objetos enfocados en medio del campo, y para aumentar el poder definidor en delicadas finas imágenes estructurales.

Para aquellos casos que apetezcamos conseguir suma precisión con el aparatito ocular antes dicho, será necesario determinar la proporción exacta del valor absoluto de la escala del tambor, con definida y siempre igual combinación de objetivo y ocular, por el auxilio de un micrómetro objetivo.

De modo que tendremos que ejecutar dos operaciones: la primera, hallar, comparando los dos micrómetros, el valor de las divisiones del ocular; la segunda, sustituyendo el micrómetro-objetivo por el preparado, ver cuantas líneas de las divisiones del micrómetro ocular corresponden al elemento globular que se mide.

La primera operación, que se hará de una vez para todas, se ejecutará colocando en conocida combinación óptica microscópica los dos micrómetros, y viendo cuantas divisiones del objetivo caben en una ó varias de las líneas del ocular. Supongamos el caso más sencillo—ej. del Dr. S. R. CAJAL—posible: *una* línea del micrómetro objetivo llena *otra* del ocular; valiendo aquella una centésima, también valdría lo mismo la del ocular. De modo que una línea del micrómetro ocular tiene un valor relativo igual á una centésima.

Coloquemos ahora en sustitución del micrómetro objetivo el preparado y enfoquémolo de modo que se vean con igual claridad las divisiones del micrómetro ocular y los glóbulos que aquella encierra. Supongamos que estos llenan exactamente una línea del ocular cuyo valor sabemos y tendremos:  $a = b$ ,  $b = c$ , luego  $c = a$ .

Conviene determinar de una vez, con todos los aumentos el valor de las divisiones del micrómetro ocular, cuyos valores relativos escribiremos en una tabla, para de este modo no necesitar más el micrómetro objetivo y ganar tiempo. En aquellos casos en que el corpúsculo medido cubra varias líneas del micrómetro ocular, no hay más que multiplicar el número de rayas cubiertas por el objeto, por el valor relativo de una de ellas. Si el valor de la división del ocular es = 2 centésimas y el objeto abarca 8, su diámetro será =  $2 \times 8 = 16$  centésimas.

Los preparados que han de someterse á este método de medición, conviene ejecutarlos, cual aconsejan GRÆBER y LAACHE (1), en seco. En efecto, conservando el calor

(1) E. GRÆBER.—Zur klin. Diagnostik der Blutkrankheiten.—Hematologische studien. Leipzig, 1888.—LAACHE.—Die Anemie. Crystiania. 1883.

brusco la forma de los hematíes, como sabemos lo han demostrado SCHMIDT, EHRLICH, y otros, aquellos autores proceden: pasando rápidamente un porta-objetos algo caliente por cima de una gota de sangre, que se desecará bruscamente. Percíbense entonces los eritrocitos al microscopio como discos bicóncavos, aislados (*Fig. 45*) en los que fácilmente pueden medirse sus diámetros con el micrómetro ocular.

5.º método.—Averiguación del volumen globular hemático de modo individual. El *volumen* de cada elemento podrá ser determinado aproximadamente cual sigue. Sea  $r$  el radio de un eritrocito bicóncavo;  $H$  su altura medida en un perfil de su figura entre dos tangentes que pasan por cima y debajo respectivamente de la figura;  $h$  el espesor del centro deprimido de estos glóbulos; el volumen, pues, será el de un cilindro de base circular que tiene  $\pi r^2$  por base y  $H$  por altura, disminuído por un doble cono que tenga por base  $\pi r^2$  y por altura  $h$ ; el volumen que tratamos de encontrar será, pues:



*Fig. 45* — Eritrocitos vistos de frente y perfil.

$$V = \frac{1}{3} \pi r^2 (3H - 2h).$$

Se puede, también, por cálculos análogos adquirir noción de la superficie, que en la práctica puede considerarse esta última como variando proporcionalmente á los cuadrados de los diámetros, según ley geométrica conocida, y sustraer de este dato la curva de las variantes de las superficies.

## INVESTIGACIÓN DE LAS CARACTERÍSTICAS QUÍMICO-BIOLÓGICAS DE LA SANGRE.

## I.—Determinación de la alcalinidad hemática.

Sabemos que el tejido hemático, cual la mayor parte de los humores de la economía, presenta en condiciones fisiológicas una reacción *alcalina*, que á causa de las múltiples alteraciones que sufre no solo en el normalismo orgánico, sino que también en circunstancias morbosas ha precisado idear manera de demostrarla y determinar sus variaciones.

Debido á el color que la sangre tiene, haciendo difíciles las averiguaciones obtenidas poniendo en contacto directamente la sangre con el papel de tornasol, se han ideado procederes por virtud de los que tanto puede determinarse la alcalinidad hemática *cuantitativa* como *cuantitativamente*.

a.)—Preceder de ZUNTZ (1).—Válese este autor de tiras de papel tornasol, humedecidas con una disolución de cloruro sódico ó de sulfato de sosa. Sobre dicho papel se echan unas gotas de sangre y después se lava con la disolución de sal muchas veces y de modo rápido.

---

(1) N. ZUNTZ.—*Vertheilung der Kohlensäure im Blute*—En Med. Centralbl., n.º 51, 1867, y en Berlin Klin. Wochenschr., 1870, p. 185.

b.)—Proceder de LIEBREICH (1).—Este utiliza una masa discóidea de yeso ó arcilla, humedecida con la disolución neutra de tornasol. Unas gotas de la sangre que se investiga se vierten sobre el disco y después se lava con agua. En el sitio en que cayeron las gotas aparecen unas manchitas azuladas, si la sangre examinada es alcalina; en caso contrario se ve un color rojizo.

c.)—Proceder de HAYGRAFT y WILLIAMSON (2).—Estos autores determinan la alcalinidad sanguínea cuantitativamente, cual expresamos á continuación: humedézcase una tira de papel tornasol sencillo, con solución de ácido oxálico á diferentes grados de concentración, y obsérvese la cantidad de álcali necesaria para operar la neutralización del papel reactivo y repítase después la propia operación con la sangre. El papel acidulado con tal cantidad ó concentración que no dé reacción alguna, ó sea que no varíe su coloración con la gota de sangre, representará, aproximadamente, la proporcionada alcalinidad que es capaz de neutralizar el grado de acidez que tiene el papel aquel, y nos resultará, por ende, la medida muy aproximada de la alcalinidad sanguínea. Le pone V. JAKSCH, con justo motivo, de reparo á este proceder inglés su dificultad técnica, y el no determinar la cantidad de sangre utilizada en cada experiencia analítica.

d.)—Proceder de LANDOIS (3).—Antes de los autores in-

---

(1) LIEBREICH.—Berichte der deutschen chem. Gesellschaft. 1, 48. 1868.

(2) HAYGRAFT y WILLIAMSON.—Proceedings of the Royal Society of Edinburgh. Suplemento 17 Junio 1888.

(3) LANDOIS.—Real Encyclop. 3-161, 2. Aufl. 1885.

gleses precedentes, ya LASSAR (1), en 1874, propuso un método que tiene el grave inconveniente de ser inaplicable al hombre, por necesitarse crecidas cantidades de masa sanguínea para ejecutarle. Á fin de obviar esta no pequeña desventaja propuso, en 1885, LANDOIS un proceder ejecutable á la cabecera de los enfermos, en la clínica.

Para examinar de modo *caulitativo* la alcalinidad sanguínea, aconseja este autor proceder del modo siguiente: un volumen de sangre se mezcla con otro igual de solución concentrada de sulfato sódico; se deposita un poco de esta mezcla sobre el papel chupón de tornasol, que tenga las buenas condiciones de que sea muy poroso y sensible, y de color lila.

De esta manera conseguiremos que los glóbulos rojos queden en el mismo sitio donde se depositó la sangre diluida; extiéndose el líquido restante por la superficie del papel, produciéndose la reacción que se busca.

La determinación *cuantitativa*, según LANDOIS, se funda en el método consistente en: añadir á 1 volumen de sangre, una solución tenuísima de ácido tártrico, hasta que el papel azul se tiña de rojo (1 cm.<sup>3</sup> satura 3,1 mg. de sosa, ó sea un litro de agua contiene 7,5 de ácido). Según opina V. JAKSCH, 100 cm.<sup>3</sup> de sangre humana tienen la alcalinidad correspondiente á 260—300 mg. de sosa. Según LASSAR, la de los conejos es equivalente á 140 mg. y la de los carnívoros = 180.

LANDOIS dosifica la alcalinidad sanguínea utilizando pequeñas cantidades de sangre—unas cuantas gotas—y

(1) LASSAR.—Archiv. für die gesammte Physiologie, IX, 44, 1874.

procediendo del modo siguiente: Se utiliza para neutralizar, la solución de ácido tártrico en concentración de 7,5 : 1000. Prepara con este líquido y la disolución concentrada y neutra de sulfato de sosa las mezclas del cuadro adjunto:

I. . . . .	10 : 100
II. . . . .	20 : 90
III. . . . .	30 : 80
IV. . . . .	40 : 70
V. . . . .	50 : 60
VI. . . . .	60 : 50
VII. . . . .	70 : 40
VIII. . . . .	80 : 30
IX. . . . .	90 : 20
X. . . . .	100 : 10

Mezcla.	tártrica.	sódica.
	solución	

Al terminar de hacer las mezclas se adiciona á todas las vasijas sulfato sódico cristalizado en exceso hasta que no se disuelva más.

Para juntar sangre con las mezclas I, II, III, etc., como hay necesidad de que sea en volúmenes iguales, es preciso disponer un tubito capilar de cristal, graduado, que se prepara así: se escoge un tubito de vidrio, de luz de 1 mm. de diámetro, y afilado por uno de sus extremos. Se aspira agua hasta la altura de 8 mm.—contando desde la punta afilada al nivel de la columna líquida,—y con una lima se traza una señal al nivel del borde superior del hilo líquido. Sin succionar más líquido, se hace ascienda aquél, hasta que su borde inferior coincida con la señal trazada

con la lima, y con ésta se marca, de nuevo, el borde superior también del líquido, quedando de este modo perfecto y exactamente preparado el tubo medidor.

Para examinar la sangre se manipula del modo siguiente: se introduce por aspiración una gotita de la

mezcla I. de ácido tártrico y de sal de GLAUBERO, hasta la primera marca del capilar; después de secar bien la punta afilada del tubo, se aspira de nuevo la sangre hasta que el líquido llegue á la segunda marca. Se limpia nuevamente muy bien la punta del capilar, y se sopla el contenido en un cristal de reloj; con una varita afilada de vidrio se remueve el líquido y se examina con el papel reactivo, que se dispondrá en tiritas de unos 4 mm. de ancho, que se sumergen por un extremo en el dicho líquido del cristal de reloj.

Al adherirse los glóbulos rojos al extremo de la tirita, permite que la demás parte líquida que asciende por la tirita del papel chupón de tornasol, se produzca la reacción que se trata de investigar.

Como se debe practicar este ensayo de modo sucesivo con las distintas mezclas desde I—X, fácilmente se comprende que se verá en seguida en cual de ellas cesa el tono azul característico de reacción alcalina, y comienza y se acentúa el tono rojo determinativo de reacción ácida.

Fácilmente se comprende que en el hombre se puede, en todas las ocasiones que tratemos de hacer este género de ensayos, utilizar por aspiración la gota sanguínea obtenida pinchando con una aguja el dedo ó cualquier otro sitio del cuerpo.

Para que la aspiración sea fácil y rápida, si bien graduando la ascensión del líquido por el capilar marcado de cristal, puede aconsejarse como procedimiento cómodo y seguro, poner en comunicación su extremo superior con una jeringuita de PRAVAZ, mediante un corto trocito delgado de goma.

De este modo, á favor del movimiento de su pistón, el cual se efectúa girando el vástago como un tornillo, se facilita gradualmente la succión del líquido.

Es condición, que no debe olvidarse en esta clase de ensayos, que deben sus manipulaciones practicarse con tal ligereza que no haya dilación de ninguna índole (por lo que todo previamente se tendrá acondicionado para así proceder), puesto que sino la sangre se descompondría entre tanto.

Exactamente las mismas manipulaciones se irán sucesivamente ejecutando con las mezclas II, III, etc.

e.)—Proceder de JAKSCH (1)—Ciertamente no es más que una modificación del precedente, si bien mejorándolo. Consiste en: hacer mezclas de disolución concentrada de sulfato de sosa, con diluciones al  $\frac{1}{100}$  y al  $\frac{1}{1000}$  de la disolución normal de ácido tártrico, de tal manera proporcional, que cada cm.<sup>3</sup> de este líquido analizador contenga diversas cantidades de ácido. Para hacer la dilución ácida aconseja proceder así: en un litro de agua se disuelven 7,5 gr. de ácido tártrico purísimo, de modo que viene esto á corresponder á la disolución normal al  $\frac{1}{10}$  del dicho ácido. Después se transforma por nuevas adiciones acuosas en diluciones que de modo normal tienen de  $\frac{1}{100}$  á  $\frac{1}{1000}$ .

JAKSCH expresa que para estas investigaciones hay precisión de poseer XVIII diluciones con diferente grado de acidez, constituidas según las proporciones expresadas en el cuadro adjunto:

---

(1) V. JAKSCH—Zeitschrif. f. klin. Med. 13, 350, 1887.



versa. En todas las pruebas de esta índole debe tomarse como norma la cantidad de ácido necesaria para neutralizar siempre 0,1 cm.<sup>3</sup> de la sangre que se analice.

Para hacer más comprensibles las maniobras anteriores presenta JAKSCH el siguiente ejemplo: en un enfermo que padecía tuberculosis y tabes dorsal, se emplearon 0,4 cm.<sup>3</sup> de la disolución normal de ácido tártrico al 1 % para neutralizar la alcalinidad de 0,1 cm.<sup>3</sup> de sangre:

1 cm. <sup>3</sup>	}	De la disolución normal al $\frac{1}{100}$ de	0,0004 gr. Na OH
0,1 —			0,00004 > — —
0,4 —			ácido tártrico corresponden á. . . 0,00016 > — —

Es decir, que corresponden á 0,1 cm.<sup>3</sup> de la sangre analizada 0,00016 gr. de Na OH.

La alcalinidad de una porción sanguínea = 100 cm.<sup>3</sup> corresponden, por consiguiente: á 0,160 gr. de Na OH.

No deja de estar exento este método de inconvenientes y defectos, por lo que su valor es muy relativo, además de que casi es imposible determinar la reacción total, puesto que ésta depende, haciéndole variar, de el color de la sangre y la cantidad de ácido carbónico, según confesión del propio JAKSCH.

f.)—Proceder de SCHULTZ-SCHULTZENSTEIN (1). — Originóse este nuevo proceder, útil en clínica para determinar la alcalinidad hemática, según confiesa el autor, por que le preguntó el Profesor EBSTEIN, cual método escogería que respondiera á las condiciones siguientes: 1.º, dar indicaciones muy precisas con la cantidad de sangre obteni-

(1) C. SCHULTZ.—Centralblatt der Med. Wissensch. n.º 46, 1894. Med. Scien. 1.º, 1895.

da por el proceder usual en clínica puncionando el dedo; 2.º, ser más simple de los hasta aquí empleados.

Por otra parte, el Prof. BUCHKA ha llamado su atención sobre el método de MYLIUS, para la determinación de la alcalinidad á débiles dosis; procedimiento que le parece tanto más apto de experimentarse cuanto que el mismo MYLIUS (1) lo había indicado ya como de titulación de los líquidos de origen animal. Resulta de hechos observados, que mezclando agua perfectamente neutra con una gota de sangre (como con cualquiera de los otros líquidos débilmente alcalinos) se obtiene una coloración rosa con una solución etérea de erythrosina. El grado de alcalinidad de esta solución muy diluida de sangre, puede determinarse, cual puede hacerse con los otros líquidos alcalinos, por la titulación auxiliada del ácido sulfúrico.

En la práctica es preferible determinar esta alcalinidad de la manera siguiente: La solución etérea de erythrosina, preparada según el proceder de MYLIUS, sirve de indicador. SCHULTZ se vale de la «erythrosina para análisis» de E. MERCK, de Darmstadt. El agua destilada que se emplea en estas experiencias debe neutralizarse rigurosamente con antelación, puesto que MYLIUS ha demostrado que ella da siempre reacción alcalina. Los líquidos empleados para la titulación se diluyen en vez de 1 : 10 á 1 : 600 de la solución normal.

La sangre que se va á analizar se obtiene pinchando la yema del dedo, previamente limpia. Dicha sangre se aspira con un tubo capilar análogo al del hemómetro de

(1) MYLIUS.—Berich. d. deut. Chemi. Ges.—24 Enero., p. 1484-85.

FLEICHSL. que puede contener de 5—7 mg. de sangre. Aconseja el autor no valerse de un tubo de 10 mg., á fin de simplificar el cálculo. Se vacía la sangre del tubo capilar en un matracito graduado, de boca esmerilada, en el que se vierte después el líquido neutro, de modo que se obtenga una cantidad de dilución = 12 cm.<sup>3</sup>

Á la sangre así diluída se le adiciona para acidificarla de 1—5 cm.<sup>3</sup> de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$ , hasta hacer al líquido neutro. Se mezclan los líquidos íntimamente sin agitar muy fuerte.

La coloración rosa que aparece al principio límpida, sobre todo en las capas limitantes, desaparece por la adición de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$ . La diferencia entre la cantidad de los líquidos titulados, ácidos y alcalinos, expresa en cm.<sup>3</sup> la cantidad de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$  empleado para neutralizar la alcalinidad de la sangre.

SCHULTZ dice haber notado que después de *haber terminado* la *titulación* aparece en la capa limitante una pequeña mancha rojiza, que ha tomado por fibrina coloreada por la erythrosina. Sería de desear que se hiciese la titulación lo bastante rápidamente, para poder evitar dicha mancha. Si bien esta causa de error es bastante mínima, insistimos en que es mejor evitarla y esto no es difícil.

Para hacer más patente este proceder, á continuación ponemos el ejemplo del mismo SCHULTZ:

Sea N. N., de 27 años, buena apariencia; se le recoge

sangre (7<sup>mg.</sup>,5), á la que se añade agua neutralizada (12 cm.<sup>3</sup>). Se vierte con la pipeta 1<sup>cm.</sup>,5 de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$ ; después 5—6 cm.<sup>3</sup> de una solución de erythrosina.

No aparece la coloración rosada. Se adiciona á la mezcla 1<sup>cm.</sup>,2 de legía de potasa á  $\frac{n}{600}$  y aparece entonces muy limpia dicha coloración.

Para hacer desaparecer rápidamente esta coloración se emplea 0,4 cm.<sup>3</sup> de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$ .

Se han empleado, pues:

$$\begin{array}{r} 1^{\text{cm.}^3}, 5 \\ 0^{\text{cm.}^3}, 4 \end{array} \left\{ \begin{array}{l} \text{de SO}^+\text{H}^2 \text{ y } 1^{\text{cm.}^3}, 2 \text{ de legía de potasa.} \\ \hline \text{Total . } 1^{\text{cm.}^3}, 9 \text{ de SO}^+\text{H}^2 \quad 1^{\text{cm.}^3}, 2 \text{ de legía de potasa.} \end{array} \right.$$

$$\begin{array}{r} 1, 9 \\ 1, 2 \\ \hline 0^{\text{cm.}^3}, 7 \end{array}$$

Para neutralizar una cantidad dada de sangre, es necesario 0<sup>cm.</sup>,7 de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$ , lo que corresponde á 0<sup>gr.</sup>,62 de legía de sosa por 100 gr. de sangre.

Un litro de ácido sulfúrico á  $\frac{n}{600}$  contienen 0<sup>gr.</sup>,0817 de ácido sulfúrico;  $\frac{1}{10}$  de cm.<sup>3</sup> contendrá 0<sup>gr.</sup>,00000817; á siete décimas (cantidad obtenida de resto) corresponden 0<sup>gr.</sup>,00005719 de ácido sulfúrico.

De consiguiente:  $0^{\text{gr.}},0075$  de sangre :  $0^{\text{gr.}},00005794$  de  $\text{SO}^4\text{H}^2 = 100 : X$ .

$X = 0^{\text{gr.}},76$  de ácido sulfúrico.

$98$  gr. de  $\text{SO}^4\text{H}^2$  :  $80$  gr. de  $\text{NaOH} = 0^{\text{gr.}},76 \text{SO}^4\text{H}^2$  :  $Y$  gr.  $\text{NaOH}$ .

$Y = 0^{\text{gr.}},62 \text{NaOH}$ , es decir,  $0,62 \text{NaOH}$  corresponden á  $100$  gr. de sangre.

Esta es, pues, la *cifra*, según SCHULTZ, que *ordinariamente dan los sujetos de buena apariencia*, sobre todo 3—4 horas después de la comida y sin haber bebido grandes cantidades líquidas durante este tiempo.

g.)—Procederes indirectos.—Para determinar el mayor ó menor ó ningún grado de alcalinidad hemática se emplean también los procederes indirectos que tienden á averiguar la cantidad de ácido carbónico existente en la sangre. Entre otros hállase el método aconsejado por KRAUSS, á favor de las pesadas. Tiene, aun siendo exacto, el ser poco hacedero y expedito, por cuanto hay que disponer de considerables cantidades de sangre, lo cual ocasiona indispensables sangrías. También KLEMPERER utiliza en sus investigaciones la determinación del ácido carbónico de modo muy análogo.

## II.—Técnica hemoglobínica.

Al clínico como al fisiólogo, al químico como al perito, interesa conocer cuantos medios se han ideado para determinar la existencia y variaciones cualitativas y cuantitativas de la materia colorante de la sangre, del elemento qui-

mico más principal de los hematíes, de la *hemoglobina* (1) (abreviadamente **Hb**). Desconocida su fórmula estructural, parece ser que su composición centesimal es, según HUFNER =  $H^{7,38} - O^{19,602} - N^{17,43} - C^{54,71} - S^{0,479} - Fe^{0,399}$ . Cuantos procederes tienden á investigar elemento tan interesante, pueden agruparse en dos diversas series: una en la que se reunan todos aquellos cuyo objetivo sea demostrar la existencia de la **Hb.**, sus combinaciones y los cuerpos de ella derivados, ó sea los procederes que determinan cualitativamente esta substancia coloide; otra, muy interesantísima, en la que nos hallemos con cuantos modos y medios se hayan ideado para dosificar ó de determinar cuantitativamente la misma.

Á la mejor inteligencia de las maniobras que vamos á emprender, conviene tener en cuenta, cuando vayamos á establecerlas, sin olvidarlo, que son dos los diferentes estados típicos en que la **Hb.** se halla en el organismo: de *arterina* ú oxihemoglobina, y de *flebina* ó hemoglobina reducida.

### 1.º — Investigaciones cualitativas hemoglobínicas.

Recuérdese que la **Hb.** es el único albuminoide que cristaliza, si bien con desigual facilidad. Así lo hace fácilmente en el ratón, rata, cobaya, peces, aves, conejo, caballo, erizo, gato, turon, cavia, perro; con menos en el hombre, mono; con mucha dificultad en la oveja, buey, cerdo, y apenas se ha podido conseguir en la rana.

---

(1) Hematoglobulina.—Cruorina.—Hematocristalina.

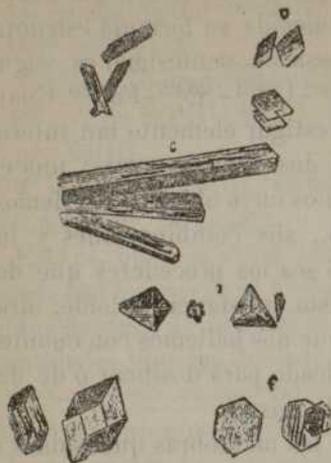


Fig. 46.—Cristales de hemoglobina; a, b, humanos; c, del gato; d, del caviar; e, del tueron y del caballo; f, de la ardilla. (LANDOIS.)

enseñanzas para esta clase de diferenciaciones.

Parécenos oportuno y útil, pr. ej., para las determinaciones legales, —dado que la **Hb.** cristaliza bajo formas geométricas diversas, según la procedencia zoológica, si bien perteneciendo todos los cristales, casi por completo, al sistema ortorrómbico,—presentar gráficamente algunas apariencias de estos cristales en la *Fig. 46*, así como transcribir el cuadro siguiente del *Dict* de WURTZ, que proporcionará positivas en-

ESPECIE ANIMAL.	Forma cristalina.	Solubilidad en el agua fría.	Facilidad en cristallar.
Hombre.	Prismas ortorrómbicos; rectángulos alargados y rombos de un ángulo de 54°,6'—prismas de cuatro caras.	mucho	difícilmente
Mono (cinocéfalo)		Ortorromb. Tablitas . .	mucho
* Ratón . . .	Tablas exagonales, finas agujas . . . . .	mucho (BRJANOWSKI) muy poco (LEHMANN)	cómodamente

Ardilla . . .	{	Tablas ó prismas exagonales—alguna vez cristales rómbicos agrupados frecuentemente en rosetas. . .	muy poco	cómodamente.
Gato >	{	Prismas ortorromb. Cuatro planos . . . . .	poco	} < bien fácilmente
León >				
Perro . . .	{	Prismas ortorromb. Cuatro caras facetadas en la base piramidalmente. . . . .	poco	fácilmente
* Cobaya . . .	{	Tetraedros con ángulos de 60° . . . . .	muy poco	fácilmente
* Rata . . .		Tetraedros y octaedros.	muy poco	muy fácilmente
Caballo . . .	{	Tablas ortorromb. Prismas finos. . . . .	mucho	fácilmente
Conejo . . .	{	Rectángulos.—Rombos alargados. . . . .	{	extremadamente mucho
Carnero . . .		Prismas ortorromb. . .	mucho	bastante difícil
Buey . . . .		Prismas biselados . . .	mucho	difícilmente
Puerco . . .	{	Prismas en pequeñas agujitas. . . . .	mucho	extrema dificultad
Pichón . . .		Esferóides . . . . .	poco	difícilmente
Pato . . . .	{	Tablas rómbicas ó exagonales delgadas. . .	mucho	muy difícil
Rana . . . .		Prismas (?) . . . . .	mucho	{ extraordinaria dificultad
* Carpa . . .		Escamas . . . . .	mucho	{ muy fácilmente por adición de agua
Tenca . . . .		Tablitas delgadas. . . .	mucho	fácilmente
* Lombriz . .		Agujitas muy ténues. .	mucho	fácilmente

Teniendo en cuenta, pues, estos datos, examinemos los procederes más recomendables, no solo para obtener la **Hb.**, si que tambien los derivados de ella y sus combinaciones más corrientes.

a.)—Obtención de los cristales de hemoglobina.—Para obtenerlos perfectamente puros manipularemos de cualquiera de las maneras que á seguida exponemos, si bien conviene advertir que como las diversas sangres de los diferentes animales no contienen la misma variedad de **Hb.**, no son igualmente útiles para la observación.

En aquellas sangres que mejor se logran obtener sus cristales hemoglobínicos (las señaladas con \*) bastará—según GAUTIER, y nosotros hemos podido comprobar—congelar cualquiera de aquellas variedades sanguíneas, y añadir luego á la masa cristalizada otro tanto de su volumen de agua helada y algunas gotas de éter para que la solución mantenida á 0° se transforme rápidamente en una magma cristalina.

Las sangres de perro, gato y caballo, pueden sufrir el mismo tratamiento, si bien adicionando  $\frac{1}{4}$  de su volumen de alcohol. Otras sangres—hombre y mono—exigen más alcohol y refrigerar mucho.

Multitud de procedimientos se han ideado para obtenerla: así unos emplean el agua como REICHERT (1), FUNKE (2), KUNDE (3); otros utilizan la acción del oxígeno.

(1) REICHERT.—U. eine eiweisse Substanz in Krystallform (MULLER'S *Archiv. f. Anat.* 1849).

(2) FUNKE.—U. das Milzvenenblut (HENLE & PFEIFFER'S *Zeitschr. f. ration. Med.* 1851).—Neue Beobachtungen ueber die Krystalle etc. (*Idem*, 1852). Ueber Blutkrystallisation (*Idem*, 1852, p. 228).

(3) KUNDE.—U. Krystalbildung im Blute. (*Zeitschr. f. rat. Med.* Bd. II. 1852).

no seguida del ácido carbónico, cual LEHMANN; ROLLET, las descargas eléctricas unas veces, y otras la congelación y el deshielo repetidos; buscan la acción del éter WITTICH; del cloroformo, BÖTTCHER; del benzol, STARKOW; de ciertas sales, BURSY (1), etc., y cuantos agentes apuntamos en la pág. 55, si bien de notar es que ninguno de estos modos produce un efecto tan completo como los que vamos á continuación á indicar.

a.)—PROCEDER DE ROLLET (2).—Como, según este autor, sepárase la **Hb.** del estroma eritrocítico (pág. 55), á favor de la congelación y deshielo repetidos, aconseja manobrar del modo siguiente, fundado en dicha propiedad: Desfibrinada la sangre (de perro ó de caballo), se somete á la congelación y deshielo inmediato, hasta conseguir se torne aquella de color de laca. En una cápsula poco profunda se vierte este líquido de color laca, en tan corta cantidad que solo forme una capita de altura de 1 1/2 mm., cuando más, y de tal modo que sea gota á gota, procurando solo echarlas cuando esté ya congelada la anterior. Se deja evaporar lentamente en sitio fresco, y al cabo de poco tiempo aparecerán los cristales.

b.)—PROCEDER DE HOPPE-SEYLER (3).—Aconsejable para sangre desfibrinada fresca de caballo, perro, rata, conejo indiano y carpa. Se mezcla la sangre desfibrinada con 10

(1) BURSY.—Influence de quelques sels sur la cristallisation du sang. Dorpart, 1863.

(2) ROLLET.—HERMANN, 's *Handbuch der Physiol.* IV. Bd., I. Th., S. 38, 1888.

(3) HOPPE-SEYLER.—*Medic. chem. Untersuchungen*, Tübingen. 1868-1870; —SCHNEIDER.—*Wiener med. Woch.* 18, N. 14, 99, 102, 1888;—PREYER.—*Die Blutkristalle*, Jena, 1871;—HOPPE-SEYLER.—*Physiol. Chemie.* 275, Berlin, 1881. En *Compt. Rend.* CIX, 156, se describe una modificación.

volúmenes de una disolución de sal común (1 vol. de sol. conc. por 9—19 de agua) y se deja reposar. Pasadas 48 horas se extrae con la pipeta la capa superior del líquido que es la más clara, y el sedimento espeso de glóbulos se lava con una poca cantidad de agua en un matraz de cristal, y después se agita con un volumen igual de éter, hasta que se disuelvan los corpúsculos sanguíneos. Se vuelve á dejar que repose, y se decanta el éter que está en la parte superior de la mezcla, añadiendo á lo que queda, que es de color de laca, y después de filtrarlo, un cuarto de su volumen de alcohol frío (á 0° C.) y se mantiene reposando algunos días á la temperatura de — 5° C.

Procediendo de este modo fórmanse cristales en gran cantidad, que pueden recogerse sobre el filtro y exprimirse entre papel secante. Dice LANDOIS que procurando actue el alcohol con bastante lentitud sobre la disolución de **Hb.** (colocándola en el dializador), ha logrado obtener cristales de algunos milímetros de largo.

c.)—Proceder de LEHMANN (1).—Sángrese un perro y déjese coagular la sangre en sitio muy frío. Después de 24 horas se fracciona el coágulo y se filtra al través de un lienzo. Se añade á la parte líquida algunos cm.<sup>3</sup> de una disolución acuosa de bilis cristalizada, la cual disuelve los glóbulos y deja en libertad la **Hb.** Transcurrido un día más, se filtra y adiciona al licor  $\frac{1}{5}$  de su volumen de alcohol frío. No tardan en aparecer los cristales que se desean, los cuales se purificarán como aconseja HOPPE-SEYLER.

---

(1) LEHMANN.—Cap. *Sangre (Blut)* de su obra *Lehrbuch der phys. Chemie*. 2.ª ed. Leipzig, 1853.

*d.*)—Proceder de RANVIER.—Consiste en agitar una corta cantidad de sangre con éter, hasta que la mezcla se transparente completamente. Se abandona la mezcla y se convierte en una masa sólida, formada de cristales de Hb. entremezclados unos con otros.

*e.*)—Proceder de STÖHR.—Extraída una gotita de sangre de la yema del dedo, según ya sabemos, se deposita en un porta y se agita con una varita de cristal hasta que tome coloración negruzca; se adapta un cubre. Según el autor, al cabo de poco tiempo—de unas horas—los cristales aparecen claramente.

*f.*)—Proceder de REHAUT.—Este autor, teniendo en cuenta que los más bellos cristales que hasta ahora se han podido obtener son los proporcionados por la linfa de sanguijuela oficinal hinchada de sangre humana 3—4 días antes, ha instituido el procedimiento siguiente: Se abre el vaso dorsal de la sanguijuela; se toma una gota de linfa con pipeta, se deposita en porta y se cierra el cubre con parafina. Guárdese la preparación en cámara húmeda de campana y se deja secar muy lentamente. Obtúense de este modo inmensas agujas cristalinas rojas terminadas en punta y entrelazadas entre sí.

*g.*)—Proceder de PASTEUR.—Recomendado por DUCLAUX, consiste en abandonar sangre desfibrinada en matraz herméticamente cerrado y lleno de aire calcinado, preparado del modo siguiente: un matraz de cuello adelgazado y provisto de llave de largo conducto, se calienta por todos lados hasta que hierva el agua que encierra y se enrarezca á la vez el aire interior; cuando solo queden unas gotas del líquido en el matraz se deja enfriar, después de

haber encajado en el tubo de la llave un tubo de platino calentado al rojo, de modo que el matraz se rellene de aire calcinado, y después se cierra la llave antes de que el matraz se enfríe por completo, lo cual da por resultado tenga el aire del interior una presión un poco inferior á la presión atmosférica. Se empalma entonces la llave con una gruesa arteria de un animal vivo, y se abre. Entra entonces la sangre por la mayor presión externa y cuando se haya llenado la  $\frac{1}{2}$  del matraz, se cierra y abandona en paraje seguro. Privada la sangre de todo germen de putrefacción, sufre, al cabo de unos días, en el matraz, fenómenos bien diferentes á los que sufriría al aire libre, viéndosele pronto aparecer cual una verdadera magma cristalina. El líquido examinado al microscopio solo muestra fibrina y cristales de **Hb.**

*h.*)—Proceder de GSCHLEIDEN (1).—Ciertamente corresponde á este autor el galardón de haber logrado obtener los más largos cristales de **Hb.**, hasta de varios cm., á favor de las siguientes manipulaciones que aconseja: sangre desfibrinada y expuesta 24 horas á la acción del aire, se encierra en tubitos de cristal cerrados á la lámpara, durante varios días, y á una temperatura de + 37° C. Abiertos estos tubitos, se vierte y extiende el líquido que contienen en un porta, se pone un cubre y aparecen cristales bien típicos.

*b.*)—Obtención de los cristales de hemoglobina reducida.  
—El mejor proceder para preparar la púrpura de cruori-

(1) PFLUGER'S Archiv, Bd. VII, p. 530, 1873.

na de STOCKES, es el aconsejado por NENCKI y SIEBER, (1) que consiste: en abandonar á + 25° C., con un poco de agua, y en una atmósfera de hidrógeno, los cristales de oxihemoglobina, añadiendo un poco de sangre podrida. Los microorganismos de la putrefacción, ávidos de oxígeno le consumen rápidamente todo el que contienen aquéllos, de tal modo, que la solución de un rojo violeta precioso, solo contiene entonces **Hb.** reducida. Si después se trata esta solución por el alcohol absoluto, añadiéndolo gota á gota, se obtienen cristales típicos de esta substancia.

c.)— Obtención de la metahemoglobina.— Se pueden lograr cristales de esta isómera de la **O-Hb.**, si bien más estable que ella (2), obteniendo primero una disolución de los eritrocitos aislados, según el proceder de HOPPE-SEYLER (pág. 251). Conseguida dicha disolución se mezcla en su doble volumen con otra concentrada de sulfato amónico y se pone esta mezcla á evaporar en frío. Al cabo de un tiempo variable van apareciendo agujas, prismas ó tablas de color castaño-rojizo y de un pleocroismo muy acentuado. HUFNER y OTTO la han obtenido cristalizada tratando la **Hb.** por el ferrocianuro de potasio.

Podemos valernos para obtenerla de cualquiera de las sustancias que la producen, que son entre otras: los medios oxidantes, como el ozono, ioduro de potasio, cloratos y nitratos; las sustancias reductoras, tales como el

---

(1) NENCKI & SIEBER.—Arch. f. experi. Pathol. u. Pharmakol. 18. 401, 1884; 20, 1886; 24, 430, 1888.

(2) HOPPE-SEYLER.—Ob. cit. Physiol. p. 391, 1818.

hidrógeno naciente y el pirogalol, y la calefacción prolongada ó desecación lenta de la sangre.

d.)—Obtención de la hematina.—Por el desdoblamiento de la **Hb.** resulta: hematina teñida y ferruginosa, y un cuerpo albuminóideo incoloro. Descomposición que se efectúa: *a)* añadiendo ácidos, aunque sean muy débiles, como el  $\text{CO}_2$ , en presencia del agua; *b)* con los álcalis fuertes; *c)* con todos los agentes que coagulan la albúmina, y entre ellos el calor á  $+70^\circ$  ú  $80^\circ$ ; *d)* con el ozono.

Podemos obtener la hematina disuelta como en *disolución ácida*: El primero que la extrajo de los glóbulos secos fué LECANU (1) por medio de el alcohol acidulado con los ácidos sulfúrico y tártrico. LANDOIS aconseja añadir á una disolución de **Hb.**, ácido acético, hasta que se forme un líquido de color caoba.

También puede obtenerse en *disolución alcalina* sobresaturando la disolución acética anterior con amoniaco.

En fin, si adicionamos agentes reductores se producirá la *hematina reducida*.

El mejor proceder, no obstante, para preparar este pigmento ferruginoso es el de M. CAZENEUVE (2). En una cantidad de solución saturada de sal marina, igual á 1 vol., se echan 4 vol. de sangre y se enfría á  $0^\circ$ ; la mezcla se conserva á  $-5^\circ$ . No tardan los glóbulos en precipitarse al fondo del vaso. Se decanta el plasma y los glóbulos se echan á un filtro humectado. Se les lava en agua salada al 10 0/0, que separa el plasma restante.

(1) LECANU.—Rech. de hematologie (C. r. Ac. d. sc., t. XXV p. 11, 1852.

(2) CAZENEUVE.—En Soc. d. biol., 19 Mayo 1877 y Gaz. Méd. de Paris, 1877, p. 271.

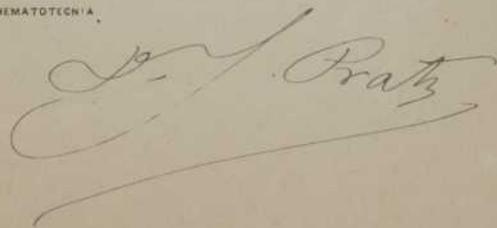
Una vez ejecutado lo anterior, se mezclan, agitando, con éter que contengan 30 % de alcohol; lo cual produce una masa blanduzca que después de 24 horas se vierte sobre un filtro y lava con alcohol etéreo. Se tritura luego la masa con éter alcohólico, al que se adicionan 20 gramos de ácido oxálico por litro; se filtra y se trata de nuevo el residuo por el mismo licor acidulado, y, por último, se lava con éter. Basta añadir gota á gota, y sin exceso, al licor etéreo que ha disuelto la hematina, una solución etérea de gas amoniaco para precipitar el pigmento. Se deja reposar, se lava con éter, agua ligeramente acética y agua caliente, y por conclusión, en el alcohol.

Según GAUTHIER, también puede obtenerse coagulando la sangre por el calor, después de haberle adicionado tanto de su peso de sulfato de sosa cristalizado; se vierte la blanda masa sobre una tela, en la que se esprime y tritura con alcohol ligeramente oxálico que se carga y arrastra la hematina. Se precipita en seguida esta por el gas amoniaco y se purifica cual antes.

e.)—Obtención de la hemina.—Los cristales de hemina extraídos por primera vez en 1858 por TEICHMANN (1), demostróse más tarde por HOPPE-SEYLER eran de clorhidrato de hematina. Según la mayoría de los autores, este cuerpo parece ser que cristaliza siempre lo mismo, cualquiera que sea la sangre original (2), ó lo que es igual, que en la forma cristalina concuerdan los cristales de hemina de todas las especies de sangre que se han exa-

(1) TEICHMANN.—Zeitschr. f. ration. Med. 3, 375, 1853. 8, 141, 1857.—  
FUNKE: Zeitschr. f. rat. Med. N. F. 1, 185.

(2) V. Bull. Soc. chim., XLV, 90, 361-740.



minado (JANKE, FR. HÖGYES). No obstante STÖHR dice que la forma y volumen de los cristales de hemina son extremadamente variables, hasta el punto de que en una misma preparación (según su proceder), hállanse cristales aislados y dispuestos en cruz, ó en forma de verdaderas estrellas; que al lado de esas formas limpias muéstranse pequeñas parcelas apenas cristalizadas adoptando una forma ligeramente elipsoidal. Hemos insistido sobre este punto, por cuanto la obtención de estos cristales desempeña un papel importante, decisivo muchas veces, en las cuestiones médico-legales, y conviene no olvidar pueden obtenerse en su forma más característica hasta con escasos vestigios de sangre.

Aparte de los procederes instituidos para casos periciales, como son los de STRUWE, LANDOIS, SCHWARTZ,

BIZZOZERO, ERDMANN, VAN DEEN, FALK, etc., que daremos á conocer en lugar oportuno, tenemos otros más de este lugar y que pasamos á describir.



Fig. 47.—Cristales de hemina: 1 del hombre, 2 de la foca, 3 de la ternera, 4 del puerco, 5 del cordero, 6 del sollo, 7 del conejo.

Según A.

GAUTIER, se la

prepara cómodamente disolviendo la hematina á un dulce calor, en el alcohol ligeramente clorhídrico, ó que con-

tenga un poco de dicho ácido. Se filtra después para separar la hematina no disuelta y se deja enfriar para que se depositen sus cristales (*Fig. 47*).

Otros, como LANDOIS, consiguen estos cristales desecando la materia colorante hemática por evaporación lenta y cautelosa de gota sanguínea; colocando una par-



*Fig. 48.*—Cristales de hemina obtenidos con vestigios de sangre. LANDOIS.

cela de la masa seca sobre un porta; se adiciona ahora 2—3 gotas de ácido acético anhidro (ó sea del que arde puesto á la llama en una varita de cristal) y además un cristalito de sal común; se calienta á la llama de la lámpara de alcohol, hasta que se formen algunas burbujitas, si bien cuidando no entre en ebullición. Se deja enfriar y aparecen los cristales en el preparado (*Fig. 48*).

Fácilmente se preparan estos cristales, según STÖHR, del modo siguiente: Un trocito de tela, de 3 mm. de lado al menos, empapado de sangre fresca, se coloca sobre un porta bien limpio, con un grano de sal común, como una cabeza de alfiler, ó mejor, cual aconseja BIZZOZERO, sobre el polvillo cristalino obtenido por la evaporación de unas gotas, antes depositadas sobre el porta de la solución fisiológica de cloruro sódico. Se añade luego una gota de ácido acético cristalizado, y entonces todo se machaca con una varilla de cristal, hasta que el ácido acético se ponga par-

duzco. La maniobra se hará lo más rápidamente posible, pues el ácido acético se evapora fácilmente. Después se calienta el líquido en el mismo porta á la llama de alcohol hasta ebullición. Se separa entonces el trocito de tela y se examina á una ampliación de 240 diámetros las manchas parduzcas. Sin cobre y sin líquido alguno adicional de conservación, los cristales parduzcos son visibles al lado de los cristales blancos de cloruro sódico. Si se quiere conservar la preparación depositese una gota de bálsamo sobre el porta y colóquese un cubre.



Fig. 49.—Cristales de hematoïdina.

Para obtenerla en gran cantidad se recomienda (BIKFALVI, LANDOIS, AXENFELD) calentar sangre seca de caballo con 10 partes de ácido fórmico, hasta que aparezcan burbujas. Si los cristales de hemina se suspenden en alcohol metílico, se disuelven: con color purpúreo si añadimos iodo y calen-

tamos; con color pardo si se adiciona bromo, y con color verdoso si se hace pasar gas cloro.

f.)—Obtención de la hematoïdina.— Este derivado de la **Hb.** fué observado primeramente, en 1847, por VIRCHOW (1) en extravasaciones sanguíneas y focos hemorrágicos antiguos, como por ej. kistes apoplécticos, ó en los cuerpos amarillos. Su aspecto cristalino de tablas losán-gicas le hacen muy ostensibles en disociaciones mecánicas, sobre portas, del contenido de dichos sitios.

(1) VIRCHOW'S *Archiv.* 1. 379. 1847.

STOEDELER aconseja para obtener puros estos cristales (*Fig. 49*) tratar por el cloroformo el ovario de las vacas; disuelta la hematóidina cristalizará evaporando aquella solución.

g.)—Determinación de la hemoglobina óxido-carbónica.

—Aparte del examen espectroscópico—del que más adelante nos ocuparemos—puede reconocerse esta anormal combinación hemoglobínica por medio de los procedimientos químicos que pasamos á apuntar.

HOPPE-SEYLER y OTTO (1) decían que si se trata la sangre diluida por una solución de sosa al 10 % y se calienta la mezcla durante breve tiempo, toma un tinte rojo bermellón si existe esta CO-Hb., en tanto que una solución de O-Hb. tratada de igual manera toma un color pardo venoso. Posteriormente ha modificado E. SAL-KOWSKI (2) el proceder anterior del modo siguiente: se diluye la sangre 20 veces en agua y en la copa de reactivo se adiciona igual cantidad de solución sódica de 1,34 de densidad. Si la sangre contiene CO, la mezcla toma primero un color blanco turbio y luego rojo claro; si se deja reposar se separan unos copos rojizos flotantes en la superficie. La sangre arterial normal, tratada de igual modo, da un color moreno sucio.

Recomienda KUNYOSI-KATAYAMA (3) mezclar la sangre que tiene CO con sulfuro amónico, que contenga 2 gr. de azufre por 100 de sulfuro amónico, y adicionar ácido

---

(1) HOPPE-SEYLER.—Virchow's Archiv, XIII, 164, 1858.—OTTO: Anleitung z. Ansmittlung der Gifte, s. 246, 6, 1884.

(2) Zeitschrift für physiologische Chemie, XII, 227, 1888.

(3) Virchow's Archiv, CXIV, 53, 1888.

acético al 30 %, hasta que tome color rojo hermoso; en cambio si es normal la sangre adquiere un color gris verdoso feo.

También presentan diferencias de color ambas sangres con el siguiente tratamiento, según LANDOIS: se añade algo de lejía potásica diluida, luego algunas gotas de ácido pirogálico acuoso, se agita una vez y se guarda al abrigo del aire. Puede añadirse á los reactivos lo mismo sangre color de laca, que aquella en que se hubiesen conservado los hematies por haber mezclado disolución concentrada de sulfato sódico. De igual modo presentan diferencia reaccional, según LANDOIS y RICHTER, si 3 cm.<sup>3</sup> de sangre se diluyen con 100 de agua; de esto se mezclan 10 cm.<sup>3</sup> con 2 de una solución concentrada de azúcar de uva al 20 % y 2 cm.<sup>3</sup> de otra saturada de carbonato de barita (ó de agua de cal) y se calienta hasta la ebullición.

KUNKEL y WELZEL (1) emplean al propio objeto el cloruro de zinc, ó una disolución muy ligera de cloruro de platino, cuyos reactivos tiñen la sangre normal de negro y la que tiene CO de rojo claro. También pueden utilizarse, según WENZEL, el ferrocianuro potásico, el ácido acético y el tanino. RUBNER (2) aconseja tratar la sangre con 4—5 veces su volumen de acetato de plomo, con cuyo reactivo la que tiene CO toma un color rojo, y la normal de chocolate.

---

(1) KUNKEL.—D. Sitzungsberichten der phys.-med. Gesellschaft zu Würzburg, IX, 1888.—A. WENZEL.—Inaug. Diss., Würzburg, 1889.

(2) RUBNER.—Arch. f. Hyg., X, 155, 1890.—CRESER.—Arch. f. exp. Path. u. Pharm., XXIX, 119, 1891.

h.)—Obtención de la substancia incolora de la hemoglobina (1).—Según DENIS, se obtiene añadiendo á sangre desfibrinada de pollo, un volumen igual de solución de sal marina al  $\frac{1}{10}$  y agitando de tiempo en tiempo. Tras algunas horas los glóbulos se aglutinan y forman una masa bastante semejante al engrudo. Se lava esta masa con la solución salada precedente y luego con agua pura hasta que se decolore. El residuo, aun impregnado de sal, se desembaraza lo más posible de ella, resultando una substancia albuminoidea que va mezclada á lecitina, etcétera.

LANDOIS recomienda poner los cristales de **Hb.** en un dializador con alcohol y rodeándolo de éter acidulado con ácido sulfúrico, dice haber conseguido decolorar dichos cristales.

## 2.º—Investigaciones cuantitativas hemoglobínicas.

Por procederes técnicos ya estudiados hemos logrado saber y valuar, cual es, expresada en volumen (que, como dijimos, fácilmente se convierten en determinaciones de peso), la masa entera del líquido hemática. Por otra parte, el número total de glóbulos que nos expresa en cuantos de estos elementos aquella masa se fracciona. Pues bien, como se sabe que la importancia de los eritrocitos reside en su dinamismo respiratorio, y que este depende y no tiene más valor que por la hemoglobina que encierra; y que este título varía, perdiendo y ganando en capacidad respiratoria proporcionalmente á esas variaciones; claro

---

(1) Véase pág. 54 y siguientes.

es que el problema que tendremos ahora de resolver será el *valorar la carga hemoglobínica globular*.

En efecto: si determinamos la masa sanguínea total por un lado, y el número total globular por otro, nos ocurrirá—cual en gráfico simil expresa MALASSEZ—como aquel individuo que contase pura y simplemente el número de piezas que reunidas constituyeran una masa de plata, de la que también averiguase su volumen total y peso por entero, pero sin preocuparse ni del valor individual de cada una de aquellas piezas monetarias, ni de la suma que formarían por su reunión (1). De modo que el conocimiento del número de glóbulos contenido en tal muestra hemática, solo proporciona un dato exclusivamente anatomo-matemático, en tanto que nada nos dice respecto á su valor dinámico. Para lograr este dato, habremos de resolver la triple cuestión siguiente:

1.º *Cuánta masa total hemática encierra tal de Hb.?*

---

(1) Siguiendo la pintoresca comparación de MALASSEZ, dice RENAUT que, los glóbulos son nuestra verdadera *moneda respiratoria*; su conjunto constituye nuestro capital en lo que atañe á la respiración, la masa total sanguínea es nuestra reserva ó tesoro.

a) Si contamos las piezas de este tesoro solo conoceremos su número total, sin saber su valor representativo. Obramos cual el que cerrando los ojos contara las piezas de igual diámetro de oro, plata, bronce encerradas en un saco. *Numeración*.

b) El hombre que cuenta las piezas de un tesoro se preocupa de su valor mirado en masa. Él busca lo que representa para un fin dado, que es el cambio comercial, el conjunto de las piezas contenidas en el saco, cualquiera sea desde luego su valor individual. *Riqueza de un peso dado de sangre en Hb.*

c) Efectuada esta suma total, el hombre que cuenta las piezas de un tesoro trata de saber cuanto metal precioso contiene cada moneda, comparado al metal sin valor que está aleado al primero en el cuerpo mismo de la pieza. *Título de la moneda que contó en bloc para saber su valor total.*

Aplicados estos principios á la sangre tendremos, que después de haber determinado a) el número de glóbulos en porción dada de sangre, y b) la canti-

2.º *Cuánta Hb. contiene cada glóbulo en particular?*

3.º *Cuál es el título de cada glóbulo bajo el punto de vista de la Hb.?*; es decir, si su estroma *S* se considera cual materia inactiva con relación al dinamismo de la **Hb.**,

¿cuál es el valor de la relación  $\frac{\text{Hb.}}{S}$  en cada glóbulo?

Cuestiones son estas que no solo encarnan interés fisiológico, si no que son ciertamente importantes datos clínicos que imperativamente hay que averiguar. Morbidismos hemáticos veremos tal vez análogos en varias características, y que dejan de semejarse si comparamos su *carga* de **Hb.**, su riqueza respiratoria; es decir, que la relación de su volumen total con la substancia activa de que se hallan penetrados (título del glóbulo), no es igual

---

dad de **Hb.** que contiene dicha porción, investigaremos *c)* lo que *vale* el glóbulo considerado individualmente. Porque un glóbulo considerado en particular no tiene más valor, como elemento respiratorio, que: 1.º por la **Hb.** que contiene; 2.º por la relación de ésta con su volumen total, y 3.º por la distribución de ella en su substancia.

Sabiendo que en tal unidad de volumen de sangre dada existe tanto de **Hb.** (sea *H* el peso de esta substancia); sabiendo, por otra parte, que dicha porción sanguínea contiene un número *N* de eritrocitos, averiguado por numeración directa; si dividimos uno por otro dato conoceremos la *carga*, *x* de un glóbulo en particular:  $x = \frac{H}{N}$ , es decir, que determinaremos en peso la cantidad de **Hb.** que contiene; y como sabemos qué cantidad de oxígeno puede absorber tal unidad en peso de **Hb.**, lograremos saber exactamente lo que el glóbulo puede respirar.

Determinando el volumen de cada glóbulo y dividiendo este volumen *V* por su carga en **Hb.**; la fórmula

$$y = V \frac{N}{H}$$

dará la medida de la capacidad respiratoria de la unidad de volumen de la substancia globular, lo cual expresará la repartición hemoglobínica en la masa del glóbulo. Problemas que hoy se resuelven por los métodos numéricos y colorimétricos.

en aquellos dos casos (DUNCAN. HAYEM). De donde se infiere que para hacer ostensibles estos hechos precisa valuar ó dosificar—casi en absoluto—la hemoglobina, tanto más, cual se expresa BIZZOZERO, cuanto que los errores de que son susceptibles los diversos métodos numéricos son mucho más considerables que el error dado por la determinación directa de ella.

Realmente solo existe un proceder exacto dosificador de la **Hb.** encerrada en una parcela sanguínea, cual es el químico, con el inconveniente de exigir cantidades de sangre considerables. Mas como es de tan alto interés conocer, *aproximadamente* al menos, la cantidad de **Hb.** contenida en la unidad de volumen de una sangre dada, á fin de determinar, cual antes decíamos, sino la masa total hemoglobínica, al menos la *carga* de cada eritrocito y su título en **Hb.**, y dado el inconveniente del método químico, ha habido precisión de idear y recurrir á métodos, que si bien son inexactos y aproximados, al menos son entre sí comparables, de tal modo que nos dejan conocer y estudiar la *marcha de las variaciones en Hb.*, sufridas por la sangre en el curso de un ciclo morboso, y establecer datos ligables á los de temperatura, pulso, etc.

Numerosos son, en efecto, los procederes que se han propuesto sucesivamente; pueden agruparse: en aquellos que tienden sobre todo á la facilidad y rapidez de ejecución necesarias á las investigaciones clínicas, y los que responden por el contrario á las exigencias más severas de un trabajo de laboratorio.

La dificultad principal que se hallará siempre en estas determinaciones cuantitativas, será la necesidad impera-

tiva, tanto al clínico como al fisiólogo, de operar solo en pequeñas cantidades de sangre. Por otro lado, desde la casi supresión de la sangría en la clínica, no cabe otro remedio sino disponer de cortas cantidades hemáticas. Aparte de que es un hecho reconocido por los fisiologistas que sustracciones repetidas de sangre— aun relativamente débiles— alteran su composición, y por consiguiente, si en el curso de una experimentación se quieren seguir las variaciones de la **Hb.**, es imprescindible ceñirnos á tasar ó valuar porciones pequeñas de sangre, so pena de alterar notablemente las condiciones de la experiencia.

Resulta de aquí que los procedimientos genuinamente químicos, que de ordinario exigen una cantidad notable de sangre, estén relegados á segunda fila, y se hayan con ventajas positivas sustituido por los procederes cromométricos, espectroscópicos ú *ópticos*, que aunque menos exactos son más sencillos y más rápidos y no exigen más que algunas gotas de sangre.

En su virtud agruparemos cuantos procederes se han ideado para dosificar la **Hb.** en el orden que á seguida expresamos, debiendo advertir que solo insistiremos y detallaremos aquellos que la opinión experimentada de autores de valía recomiendan como más exactos y cómodos (1): *a) métodos colorimétricos, b) diafanométricos, c) espectroscópicos, d) espectro-fotométricos y e) químicos.*

**a.**— Métodos colorimétricos.— Dado que la **Hb.** es la que dá á la sangre su color, se comprende que este crece

(1) MALASSEZ.—Arch. de physiol., 1877.—LAMBLING. Tesis de Nancy, 1882.  
—BRANLY. Ann. d. chim. et d. phys., T. XXVII.

con la riqueza de aquella y *proporcionalmente* á dicha riqueza. Ahora bien; en el principio fundamental—confirmado por la experiencia—de que si dos solutos se examinan en las mismas condiciones de espesor é iluminación y presentan la misma intensidad de coloración, su riqueza en materia colorante es idéntica, se han basado los métodos que pasamos á estudiar. Generalizando aun más—pudiera decirse—que si dos solutos en las mismas condiciones presentan el mismo efecto óptico definido, contienen iguales cantidades de substancia colorante.

Sin embargo, bueno será recordar que este principio no es rigurosamente exacto, en cuanto se refiere á la Hb., por cuanto es una substancia dicroica. Sábese que las soluciones tituladas muy diluidas de cuerpos dicroicos, presentan, en efecto, coloraciones sensiblemente diferentes de los solutos de título más alto, y la variación de la coloración considerada en su conjunto es solamente proporcional á la variación del título; de aquí que convenga en los ensayos cromométricos hacer notar en primera línea la distinción propuesta por MALASSEZ entre la *cualidad* del tono y su *valor* (brillo). Conceptúense estos términos: «un rojo puede ser más ó menos violáceo, más ó menos naranjado: esta es su cualidad; un rojo puede ser más ó menos luminoso, tanto como un violeta, ó como un naranja: este es el *valor del tono*.» MALASSEZ. De esta manera considerados, el *valor* de una coloración es su cualidad primordial, y dos colores cuya cualidad de tono difieran, pueden tener un valor igual; tan exactamente como dos notas, dos *re* pr. ej., proporcionadas la una por un violín, la otra por un oboe, que pueden ser dos notas idén-

ticas por su intensidad, en tanto que su timbre al ser diferente hace que se las distinga.

Con estas reservas, añadiremos, cual hace GUBLER, que para obtener valores de tono exactamente comparables, debe evitarse operar con soluciones de **Hb.** extremadamente débiles—en las que la dicroicidad se exagera y termina trastornando la regularidad en la apreciación de las diferencias,—ó al contrario muy concentradas, en cuyo caso los líquidos no son tan transparentes para que los matices sean apreciados fácilmente ó con seguridad.

Los métodos cromométricos se agrupan en dos series, según dos diferentes maneras esenciales de operar: de patrón ó *marca fija* y de señal ó *marca variable*.

*1.º grupo.*—Los métodos cromométricos de unidad ó señal fija, consisten en diluir la sangre que se vá á examinar en agua hasta lograr una solución de un tinte ó coloración tipo, ó en general de un efecto óptico dado (titulación de un valor de tono fijo) en la que de antemano se tiene averiguado su riqueza hemoglobínica, y que sirve de término de comparación. De modo que una sangre será tanto más rica en **Hb.**, cuanta más agua tengamos que añadirle para igualar en tinte con el soluto con que se compara. Corresponden á este modo de actuar los procederes de HOPPE-SEYLER, PREYER, WORM-MULLER, JOLYET y LAFFONT, BIZZOZERO, GOWERS y LESSER.

*2.º grupo.*—Los métodos cromométricos de unidad ó patrón variable, consisten en diluir la sangre que se vá á examinar en un volumen, siempre el mismo, de agua, y determinar su valor de tono comparando aquella dilución con una serie de patrones ó marcadores, que for-

man una escala cromométrica de valores conocidos, hasta que se encuentre aquel cuyo tinte sea idéntico al de la dilución sanguínea objeto de nuestras averiguaciones. En esta manera de operar se hayan basados los procedimientos de WELCKER, HAYEM, QUINCQUE, MALASSEZ, MANTEGAZZA y FLEICHSL.

Todos los procedimientos cromométricos tienen teóricamente las mismas causas de error, y en la práctica tropiezan todos con dificultades muy semejantes. Parece bien probado que el eritrocito fisiológico no es una unidad de un poder colorante invariable, así como es igualmente inexacto admitir que en el estado normal la riqueza hemoglobínica de la sangre es tan constante que el color de una sangre normal pueda servir de punto de partida en la graduación de un aparato cromométrico (1); resulta de aquí que los procederés así basados dan resultados ó datos inciertos. Por otra parte, es casi imposible comparar entre sí los datos por aparatos diferentes, y aun con el mismo aparato los recogidos por diversos observadores (LAMBLING).

Es digna de tenerse en cuenta la siguiente objeción que BIZZOZERO hace á la colorimetría: dice que puede perder la sangre su capacidad respiratoria, conservando toda ella sensiblemente la misma intensidad y aun calidad de coloración. Saturada de CO, pr. ej., muéstrase incapaz de fijar O, sin que nada se indique al colorime-

---

(1) Proposición que lo demuestran las dosificaciones del Fe ejecutadas por BECQUEREL y RODIER en el hombre sano (GAUTIER. Chim. appliq. à la Physiol.) y las dosificaciones de hemoglobina de LEICHTENSTERN (U. de. Hæmoglobulingehalt d. Blutes in gesunden u. Kranken Zuständen. 1878).

tro de modificación tan profunda, lo cual no ocurre con el método infinitamente más delicado de la espectro-fotometría que lo revela inmediatamente. La septicemia, las supuraciones prolongadas (1), la intoxicación por el nitrato de amilo (2), el clorato de potasa (3), merman la capacidad respiratoria hemática, es decir, descomponen ó alteran una porción de **Hb.**, sin que dicha perturbación se haga sensible por el colorímetro, más que cuando es tan pronunciadísima que cambia el tinte sanguíneo.

Los procederes cromométricos no proporcionan ciertamente el verdadero valor fisiológico de la sangre: dosifican no solo la **Hb.**, si que también cualquier otra substancia contenida en la sangre, cuyo *color se aproxime en demasia* al de la unidad ó señal escogida. En esto estriba, pues, la dificultad práctica que presentan todos estos procederes. Nada es más difícil como hallar un patrón teñido cuya calidad de tono se asemeje sensiblemente al de la sangre vista por transparencia. Aparte de que cual antes apuntábamos, después de un cierto número de observaciones el ojo del hematologista—cada vez más exigente por el ejercicio—cesa desde luego de estar satisfecho de marcador que en los primeros ensayos parecía reproducir perfecta y satisfactoriamente el color sanguíneo.

Con estas reservas, y las que después iremos señalando conforme vayamos estudiando en particular los principales métodos, veamos en qué consisten y de qué aplicaciones son susceptibles.

(1) LEGEROT.—Et. d' Hematologie pathol. Thèse de Paris, 1874.

(2) REGNARD.—Sur les variations pathol. des combustions respiratoires. Tesis de Paris, 1878.

(3) LAMBLING.—Th. de Nancy, 1882.

a.)—PROCEDURE DE HOPPE-SEYLER (1).—Consiste en comparar una solución de la sangre que se va á examinar con otra solución de hemoglobina, perfectamente titulada. Obtenida **Hb.** cristalizada, bien pura, de sangre de perro, pato, ó mejor de caballo, se hace en agua una solución titulada al vigésimo, y se llena una cubetita hematimétrica. Por otra parte, la sangre que se va á examinar, bien desfibrinada, se diluye también al vigésimo en agua destilada y se vierte en otra cubetita. Ambas cubetitas de caras paralelas de cristal, se colocan una al lado de la otra, distanciadas cosa de 1 cm., sobre una hoja de papel blanco, para observar al través los líquidos que contienen. Ahora es necesario para llegar á la igualdad del valor del tono de la solución de **Hb.**, añadir gradualmente agua destilada con una pipeta á la solución hemática, agitando la mezcla con cuidado. Obtenida la identidad en el valor del tono, claro es que la riqueza hemoglobínica es la misma en volúmenes iguales de ambas soluciones, pr. ej. en 1 cm.<sup>3</sup>

De modo, pues, que suponiendo sea por un lado:  $x$  la cantidad desconocida de hemoglobina que posee la sangre analizada por cada unidad de volumen;  $V_0$  el volumen de esta sangre empleado; y  $V_1$  el del agua destilada; y por otro,  $H$  la riqueza en **Hb.** de la solución titulada; la riqueza sanguínea es  $= V_0 \cdot x$  dividida por la masa total de la mezcla  $V_0 + V_1$ , y por otra parte  $= H$ , de donde se deduce

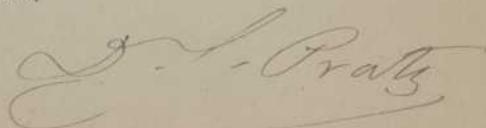
$$x = \frac{V_0 + V_1}{V_0} H.$$

(1) Ob. cit. pág. 437.

Cual se vé, parece muy sencillo este proceder, en cuanto se haya logrado obtener una solución titulada de **Hb.** cristalizada, pero se halla hoy casi abandonado por las razones siguientes: de un lado es poco sensible, por cuanto el fenómeno óptico, común y ya apuntado de toda colorimetría, principalmente aplicada al examen hemático, por el que se absorben enérgicamente los rayos verdes del espectro y débilmente los rojos que se transmiten con gran intensidad, hace que la luz total transmitida sea variable. Además la solución tipo hemoglobínica apenas si se conserva unos siete días; su obtención y preparación exigen mucho tiempo, y casi solo puede hacerse con seguridad en épocas frías, todo lo cual dá lugar á que su empleo en la práctica sea muy difícil y en clínica imposible. El mismo autor del proceder ha sustituido el patrón de **Hb.** por otro de hematina, sin merecerle gran confianza, por cuanto precisa transformar también en hematina la **Hb.** de la sangre que se va á examinar.

RAJESWSKI (1), al intento de remediar aquellos inconvenientes, ha reemplazado el licor normal de oxihemoglobina por una solución de picrocarminato amoniacoal, por cuanto parece desprenderse de sus ensayos comparativos que las soluciones convenientemente preparadas de picrocarminato imitan exactamente las soluciones de **Hb.** Válese del artificio siguiente: 1.º, obtiene un liquido tipo de solución bien titulada de **Hb.** cristalizada: *unidad provisional*; 2.º, el valor del tono de este patrón lo obtiene

(1) Arch. Pflüger's 1875, XII, p. 73.



por tanteos en una solución de picrocarminato de amoníaco, cuya solución, que puede más largo tiempo conservarse, constituye la *unidad definitiva*, que sustituirá en los ensayos cromométricos á la de **Hb.**

Si bien esta modificación de RAJEWSKI es excelente, y hasta pudiera fácilmente ser utilizada en la clínica, por ser mucho menos alterable la solución picrocarminada, no obstante, al cabo de un cierto tiempo palidece de modo tan sensible que precisa á nuevas titulaciones, largas y no fáciles.

*b.*)—PROCÉDER DE PREYER (1).—Fundaméntase en que una solución muy concentrada de **Hb.** puesta tras de la hendidura de un espectróscopo absorbe todos los rayos del espectro, excepto los rojos; pero si se diluye poco á poco la solución, llega un momento en el que los rayos verdes aparecerán. Pues bien, si se determina de una vez para otras, en una solución de **Hb.**, una riqueza en proporción conveniente para que ese tinte verde aparezca en la región de la raya *b* del espectro, es claro que restando otras condiciones (intensidad de la luz, anchura de la hendidura, espesor del líquido) los rayos verdes aparecerán en cualquier otra solución de **Hb.**, gradualmente diluída, en el momento exacto en el que su riqueza de ella llegue á ser la misma que en el caso anterior.

Suponiendo sea *K* la cantidad de **Hb.** por 100 cm.<sup>3</sup> de la solución titulada de la misma procederemos: desfibrinando la sangre que se va á examinar y agitándola luego

---

(1) W. PREYER.—Quant. Bestim. des Farbstoff im Blute durch das Spectrum. (LIEBIG'S ANN., Bd. CXL, p. 187, 1866).—W. PREYER. Die Blutkrystalle Untersuchungen. Iena. 1871, gr. en 8.\*

en el aire; se mide  $\frac{1}{2}$  cm.<sup>3</sup> y se le añade su volumen de agua para disolver los glóbulos; se pone esta sangre así diluida en una cuba hematinométrica, con el mismo espesor que la solución tipo, y se adiciona agua destilada hasta que aparezca el tinte verde. Se deducirá la riqueza desconocida en **Hb.** de la sangre analizada, por una fórmula semejante á la expuesta en el método de HOPPE-SEYLER. Así: siendo  $p$  el peso de agua destilada añadida, el peso de materia colorante para 100 cm.<sup>3</sup> será =  $K(7 + 2p)$ .

Deberá advertirse que jamás variaremos la separación de la hendidura del espectróscopo. Según PLEYER el valor constante de  $K$  será = 0,08. Si comparamos este método con el primer descrito se comprende viene á complicar y dificultar aun más el examen la introducción del espectróscopo.

c.)—PROCEDER DE WORM-MULLER (1).—En lugar de decolorar una cantidad determinada de sangre, diluyéndola progresivamente en agua, cual en los anteriores procedimientos, se colorea una cantidad determinada de agua adicionándole poco á poco la sangre objeto del examen. Se juzga del poder colorante hemático por la cantidad que ha sido preciso añadir. Tórnase cual unidad el color tipo de una solución hemática, y para obtener un valor absoluto, basta emplear, como término de comparación una solución titulada de hemoglobina.

---

(1) J. W. MULLER.—U. d. Spannung des Sauerstoffs der Blutscheiben (Ber. der sächs. Gesellsch. d. Wiss., 1870, y Med. Centralbl., 1871)

d.)— Proceder de JOLYET y LAFONT (1). — Sirvense estos autores del *colorimetro* de DUBOSCQ-LAURENT que consis-

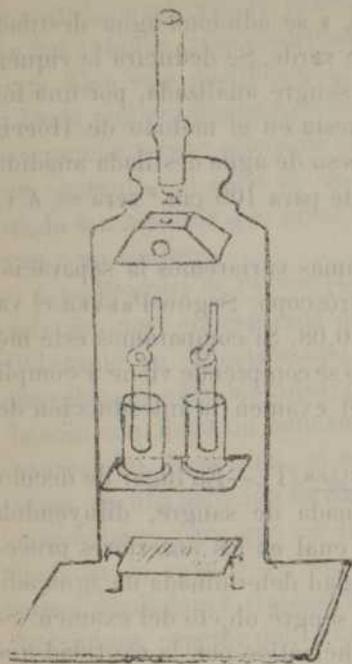


Fig. 50.—Colorimetro de LAURENT-DUBOSCQ.

te (*Fig. 50*): en dos cubetitas cilíndricas de cristal con fondo plano, dentro de las que se introducen, á variable altura, unos cilindros de cristal, á modo de tubo de ensayo, de fondo plano, sostenidos en sus aberturas por armaduras metálicas, paralelas y bruñidas, llenando de la materia colorante el interior de estos tubos. Ambas cubetitas asientan sobre un basar de cristal incoloro, ó mejor coloreado en rojo más ó menos subido. Debajo

existe un espejo de variable inclinación, con el que se ilumina el fondo de las cubetitas.

Mirando de arriba abajo, y en dirección del eje de los tubos llenos de líquido, se verá éste en capa tanto más

(1) JOLYET y LAFONT.—Exp. relat. aux variations de la capacité respiratoire du sang. (*Soc. de biol.* 28 Abril 1877 y *Gaz. méd.* 1877, p. 238) —JOLYET: *Med. exper.* Paris, 1882.—LAMBLING: *Ob. cit.*, p. 75.

delgada, y de consiguiente tanto menos teñida, cuanto el tubo continente esté más introducido en la cubeta. Introducción que se regla á favor de tornillo micrométrico, provisto de escalas y verniers. Si las cubetas contienen líquidos de tintes diferentes, será posible, bajando más ó menos uno de los tubos, igualarlos y leer en la escala el espesor de cada líquido.

Para facilitar la comparación de las dos superficies teñidas, se recoge la imagen de cada cuba por un prisma, de tal modo, que mirando por un ocular situado por cima de los prismas, se ven las dos imágenes en forma de dos semicírculos exactamente contiguos. La menor diferencia de tinte puede ser apreciada y corregida por pequeño movimiento del tornillo micrométrico.

Permite este aparatito oscilar alrededor de la igualdad tintórea, y utilizarlo, de consiguiente, en varias investigaciones, volviendo á hacer la comparación de los líquidos teñidos, sin que sea preciso escoger nueva porción de sangre para analizar. Además, los autores del proceder que estudiamos han sustituido la solución tipo de **Hb.** ó de picro-carminato—siempre alterables—por un cristal coloreado de tal modo que en él se haya determinado, de una vez para siempre, su valor en **Hb.** De ordinario está este cristal que sirve de patrón, graduado sobre poco más ó menos, de tal modo que equivale á 50 cm. de espesor de sangre de buey á 1 : 25. FREMY aconseja preferible escoger un cristal de tinte menos intenso, y correspondiente á un espesor de 40—50 cm. de sangre de buey desfibrinada y diluida á 1 : 40.

En estas condiciones las superficies coloreadas que se

observan son de un rojo pálido ligeramente grosella; la más pequeña variación en el espesor de la solución sanguínea hace aparecer en seguida, bien un tinte rojo vivo, bien la coloración amarillenta de sangre examinada en capa delgada. Realmente no es ni por asomo fácil hallar un cristal con un tono de color análogo, ni con exacta semejanza en calidad con el tono de una solución sanguínea. Se llega, no obstante, tras tanteos más ó menos largos á un resultado bastante satisfactorio, asociando un cristal amarillo rojizo con otro teñido ligeramente de color grosella. Estos cristales, tallados en pequeños discos, se colocan en una de las cubetas y se vierte agua destilada encima. Antes de cada determinación se introduce en el agua el cilindro móvil correspondiente, de modo que los rayos luminosos atraviesen por cada lado espesores iguales de líquido.

Los resultados serán exactos siempre y cuando se cumpla la condición de operar siempre en las mismas condiciones de iluminación y con las precauciones convenientes. Los rayos del foco luminoso—lámpara de gas ó de petróleo—se tamizarán á través de un cristal deslustrado colocado verticalmente entre la lámpara y el colorímetro. Moviendo ligeramente á un lado ú otro la lámpara se terminará por hallar el sitio desde el que se iluminen con igualdad los dos campos. Este es el momento en que se habrá logrado el enfoque ó acondicionamiento útil de los diversos medios para hacer la determinación que intentamos, por cuyo motivo todas esas diversas piezas—lámpara, espejo, cubetitas, cristal deslustrado—se inmobilizarán cuidadosamente durante toda la serie de medidas que vamos á practicar.

Ahora bien; el valor en **Hb.**—ó mejor en **O-Hb.**—del índice ó marcador teñido, está determinado por comparación con soluciones tituladas de aquella substancia colorante cristalizada, bien pura y extraída de sangre de perro ó caballo. Á este propósito se mide el espesor cromométrico de estas soluciones normales, ó sea el espesor con que es preciso observarlas para que su intensidad tintórea sea la misma que la del cristal patrón.

Sean  $h$  y  $h'$  el peso de **Hb.** p. ‰, contenidas en 2 soluciones tituladas;  $e$  y  $e'$  los espesores cromométricos respectivos. Como las riquezas en materias colorantes están en razón inversa de los espesores cromométricos, tendremos:

$$e h = e' h', \quad \text{y} \quad h' = \frac{e h}{e'}$$

es decir, que el producto de los espesores cromométricos para la riqueza en **Hb.** es constante, y que la riqueza en materia colorante de una solución sanguínea dada, es igual al cociente de este producto constante por el espesor cromométrico de la solución observada.

Véase el ejemplo que SCHLAGDENHAUFEN presenta, tomado de la obra de LAMBLING (pág. 85), de una investigación colorimétrica ejecutada con **O-Hb.** de sangre de caballo; los espesores cromométricos  $e$  están expresados en décimas de mm.

$h$	$e$	$e \times h$
0gr.,4037	30,4	12,272
0 ,3100	41,1	12,741
0 ,3299	36,5	12,041
	Media =	12,351

Una sangre que diluida á 1 : 40 presenta un espesor cromométrico =  $e$  contendrá en 100 cm.<sup>3</sup> un peso  $h$  de Hb. igual á:

$$h = \frac{12,351 \times 40}{e}.$$

Uno ó dos gramos de sangre son bastantes, seguramente, para hacer muchos ensayos. Si se estrecha el vaso-probeta en el que está introducido el líquido coloreado, de tal modo que su diámetro apenas sea superior al del tubo que dentro de él se introduce, la cantidad de sangre puede reducirse, cual demuestra LAMBLING, sobre poco más ó menos, á unos 0<sup>cm.3</sup>,05.

La pipeta capilar que sirve para medir el volumen de la sangre debe estar aforada por medio del mercurio.

A este volumen de sangre, se añade, á fin de llegar al grado que se desea de dilución, un volumen conocido de agua que debe estar ligeramente alcalinizada con amoníaco ó carbonato de sosa, con el fin de que permanezca la solución tan límpida cual sea posible; precaución que debe cumplirse imperativamente con sangre de leucocitémicos. De modo, pues, que en estas condiciones llega á ser este proceder perfectamente aplicable en clinica, toda vez que una punción un tanto profunda del dedo nos proporcionará seguramente la cantidad de sangre necesaria.

Con objeto de evitar la preparación de licores titulados de Hb., puede fijarse el valor del patrón coloreado en *volúmenes de oxígeno*. El espesor colorimétrico de una dilución hemática indica entonces la *capacidad respiratoria* de la sangre estudiada. En efecto, cual expresa GARNIER,

la unidad de peso en peso de **Hb.**, fija á la temperatura y presión ordinarias un volumen de oxígeno constante; por otro lado la experiencia demuestra que la riqueza en **Hb.** está en razón inversa de los espesores colorimétricos. Ahora bien: si se determinan, por dosificación con el hidrosulfito ó auxiliados de la bomba de mercurio (1), las capacidades respiratorias  $c$ ,  $c'$ , etc., de diferentes porciones de sangre cuyos espesores cromométricos sean respectivamente  $e$ ,  $e'$ , etc., resultará:

$$\frac{e}{e'} = \frac{c}{c'} \quad \text{y} \quad e c = e' c',$$

es decir, que el producto de la capacidad respiratoria por el espesor cromométrico es constante.

La experiencia demuestra sensiblemente esta proposición, cual lo han demostrado JOLYET, LAFONT y LAMBLING.

Por consiguiente, si se determina desde un principio, y para todas las veces, el valor del producto  $e c$  (del mismo modo como se ha fijado anteriormente el del producto  $e h$ ), la capacidad respiratoria de un líquido sanguíneo cualquiera pudiera obtenerse dividiendo este producto constante por el espesor observado al colorímetro, puesto

que tendremos:  $c' = \frac{e c}{e'}$ .

Se puede así también determinar la capacidad respiratoria hemática con una aproximación que oscila en 2 cm.<sup>3</sup> por 100 cm.<sup>3</sup> de gas. Estos volúmenes por el cálculo, pueden transformarse en peso de hemoglobina, cual

---

(1) Es indispensable indicar siempre por cual procedimiento se ha determinado la capacidad respiratoria, dando más resultados la dosificación por el hidrosulfito, de la que más adelante nos ocuparemos.

veremos en las determinaciones de esta substancia por el oxígeno absorbido.

e.)—Proceder de BIZZOZERO (1).—Este autor utiliza un aparato de su invención, conocido con el nombre de *chromo-cytómetro*, que ha sido, entre otras partes, ensayado satisfactoriamente por SADLER, en la clínica de JAKSCH (2). Este aparato, que recuerda en su construcción al lactóscopo de DONNE, se utiliza en las determinaciones cuantitativas hemoglobínicas, empleándose unas veces como cromómetro y otras cual cytómetro. Tanto en uno como en otro caso, fúndase primordialmente en *hacer variar*, empleando el aparato, *el espesor de una capa de sangre diluida*; del espesor que sea preciso dar á dicha capa hemática, hasta obtener un efecto óptico determinado, se deduce la riqueza en **Hb.** del líquido sometido á la investigación analítica.

*Descripción del aparato* (3).—Su parte esencial está formada por un dispositivo metálico de forma cilíndrica, que se mantiene en posición horizontal por un mango, en el que

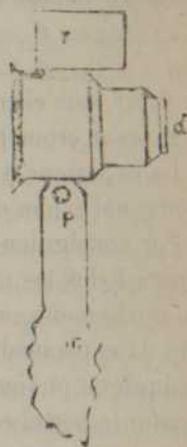


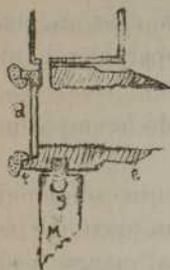
Fig. 51.—Corte vertical del chromo-cytómetro de Bizzozero; r cajita depósito, d discos, p sitio donde se articula la pantalla con el mango m.

(1) BIZZOZERO —Atti della R. Acad. delle Scien. di Torino., vol. XIV, Mayo 1879.—BIZZOZERO y FIRET: *Man. de Microscopie clinique*, 3.<sup>a</sup> ed., págs. 121-130, Manceaux, Bruxelles, 1888.

(2) SADLER —Prager med. wochenschr. XVI, 256, 1891.

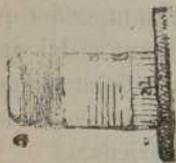
(3) El cromocytómetro del Prot. senador G. BIZZOZERO, en un buen estuche, con todos los accesorios, cuesta 36 L. casa de F. KORISTKA, Milán. Catálogo 1894, y fr. 50 casa de DROSTEN, Bruselas.

se atornilla (*Fig. 51*). Dicho dispositivo consta de dos tubos: uno externo fijo al mango (*Fig. 52*) y otro móvil (*Figs. 53 y 54*) que entra en el anterior, parte por enchufe, parte por tornillo. Ambos tubos están cerrados en uno de sus extremos por un disco de cristal, en tanto que el otro extremo se halla abierto. Introducido un tubo en el otro, sus discos de cristal pueden llegar á ponerse en inmediato contacto. Estos tubos están graduados de tal manera, que á cada instante puede determinarse su separación con precisión, con lo cual se mide el espesor de la capa líquida existente entre los dos cristales.

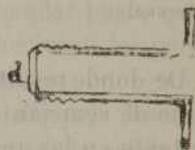


*Fig. 52.*—Corte del tubo fijo ó externo y de la cajita del cromo-cytómetro de Bizzzero.

Por cima del tubo externo, en el punto opuesto al mango, existe soldada una cajita rectangular, abierta en su



*Fig. 53.*—Tubo externo ó móvil del cromo-cytómetro de Bizzzero.



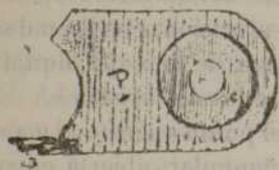
*Fig. 54.*—Corte del tubo móvil con su disco de cristal *d*, del aparato de Bizzzero.

pared superior; en su fondo, cerca de uno de sus ángulos diedros hay un orificio que aboca inmediatamente por

detrás del disco de cristal del tubo fijo. Compréndese fácilmente que introduciendo más ó menos el tubo interno agrandará ó estrechará el espacio que media entre los dos discos de cristal; y si hemos echado líquido en la cajita, penetrará en aquel espacio, formándose una masa líquida cuyo espesor será igual á la separación habida entre aquellos.

Estas son las partes del aparato cuando le empleemos como cytómetro.

Para utilizarle como cromómetro hay que adicionarle una pantalla (*Fig. 55*), escotada y con un apéndice para



*Fig. 55.*—Pantalla del cromómetro de Bizzozero.

empalmarla al mango y adosarse á la superficie externa del tubo fijo. Esta pantalla tiene un anillo de cobre en el que está engastado un cristal coloreado. Cristal teñido por la aplicación de una tenuísima capa de oxihemoglobina, según proceder que se reserva el autor del aparato.

De donde resulta que el tono del color debe ser perfectamente semejante á el de la sangre diluida, condición importante en las apreciaciones cromométricas.

En el mismo estuche donde viene el aparato hay los siguientes accesorios: dos probetas de fondo plano y cabida de 2—4 cm.<sup>3</sup>; una pipeta graduada en cm.<sup>3</sup>; otra más chica graduada por 10—28 mm.<sup>3</sup> y provista de tubo de goma delgado para succionar; un frasco conteniendo solución sódica; una vareta de cristal con extremo

de paleta, y un cartón ennegrecido con dos orificios.

*Modo de emplear este aparato como cytómetro.*—Transcribiremos casi literalmente las reglas dadas por el autor:

a.) Con la pipeta grande medimos  $\frac{1}{2}$  cm.<sup>3</sup> de la solución sódica y se echa en una de las probetas.

b.) Se incinde (2—3 mm.) con lanceta el reborde cutáneo marginal de la uña. Bien ligando, ó si hay práctica, comprimiendo dulcemente, obtendremos una buena gota de sangre.

c.) Se succionan con la pipeta chica 10 mm.<sup>3</sup> de sangre. Para mayor precisión bueno es aspirar más sangre de los 10 mm.<sup>3</sup>, puesto que, después de enjugar la punta de la pipeta, se golpea esta sobre el dedo, de modo que á cada golpe quedará adherida una parcela sanguínea á la piel, y por ende, la altura de la columna hemática descenderá poco á poco; se golpeará así hasta que su límite superior corresponda exactamente al trazo escrito sobre el cristal.

d.) Se mezclan los 10 mm.<sup>3</sup> con el  $\frac{1}{2}$  cm.<sup>3</sup>, soplando por la goma; se volverá á aspirar y soplar hasta que se separe toda la sangre que pudiera adherirse á las paredes del capilar. Después se lava la pipeta.

e.) Esta mezcla se agita con la varilla-pala de cristal.

f.) Así diluída la sangre se vierte en la cajita superior del aparato, cuyos dos cristales se habrán contactado perfectamente antes.

g.) Se da vuelta al tubo interno, á fin de separar los dos cristales y de que la sangre diluída se introduzca en el hueco que entre sí dejan éstos; cesamos de dar vueltas en cuanto alcance unos milímetros de espesor la

capa líquida, y entonces procedemos á la observación.

La investigación se hará en cámara oscura ó habitación perfectamente cerrada, y cuidando no haya corriente aérea alguna para que no oscile la llama de la bujía. El observador se colocará á  $1\frac{1}{2}$  metro de la luz, cogiendo con la mano izquierda el aparato y colocando el eje de éste á la altura del ojo derecho; después con la mano derecha se va dando vueltas al tornillo del tubo interno, á fin de variar el espesor de la capa líquida.

Decíamos antes que se procede á la observación después de destornillar unos mm. Así dispuesto, no se distingue á su través la llama, pero á medida que atornillamos, aproximando los discos, irá vislumbrándose la luz, en forma de punto brillante, cuyos contornos, vagos al principio, se ostentarán cada vez más, hasta percibirse claramente los  $\frac{3}{4}$  superiores de la llama; se destornilla hasta que no se vean y se vuelve á atornillar hasta percibirlos distintamente. Se repiten dos ó tres veces estas maniobras, hasta lograr encontrar el *punto exacto en el que los contornos de los  $\frac{3}{4}$  superiores de la llama sean perfectamente luminosos*, pero de tal modo, sin embargo, que atornillando un poco se vuelvan rápidamente difusos: *la llama entonces no es más brillante, sino que está como velada y de color rojizo*. Conseguido este punto, se procede á leer en el aparato el espesor de la capa hemática que se tiene.

*Modo de emplear este aparato como cromómetro.*—

a.) Se adapta la pantalla con el cristal que sirve de patrón.

b.) Cautamente se miden 10 mm.<sup>3</sup> de sangre y se

mezclan con  $\frac{1}{2}$  gr. de agua destilada, obteniéndose así en un instante una solución transparente de **Hb.** (sangre de color de laca).

c.) Se vierte esa mezcla en la cajita del aparato, y al destornillar penetrará en el espacio de los dos discos.

d.) Se orienta el aparato hacia una superficie blanca bien iluminada, ó hacia el cielo, pero nunca directamente hacia el sol, y se compara el tinte de la mezcla con el marcador. Para facilitar el examen se puede poner un cristal deslustrado ante el reservorio de la sangre, con lo que aseguramos luz difusa. Variando el grosor de la capa sanguínea llegaremos alcanzar á ver el mismo tono en ella que en el marcador. Para evitar perturbaciones dejaremos solo obrar sobre el ojo, aquellos rayos que han pasado por los medios que se van á comparar, para lo que aplicaremos un cartón ennegrecido provisto de dos agujeros; uno para la sangre y otro para el patrón.

e.) Cuando logremos ver aquella igualdad de tono se leerá en la escala graduada el espesor de la capa líquida, y se toma nota, sobre las tablas *ad hoc*, de la cantidad de **Hb.** correspondiente.

f.) En algunas anemias, es tal la palidez hemática, que un espesor de 6 mm. (cifra máxima que puede obtenerse con el aparato) no basta para dar á la capa sanguínea el color del patrón. En este caso, en vez de tomar 10 mm.<sup>3</sup> de sangre se toman 20 y se mezclan con la cantidad ordinaria de 50 cgr. de agua.

Cuando querramos servirnos del aparato en sus dos aplicaciones en una misma sangre, procederemos: vertiendo previamente en las probetas los líquidos diluido-

res; después en una y otra la porción sanguínea respectiva, y haciendo el examen de tal modo, que cuando se haga una observación deberá taparse la otra probeta para que no se evapore y concentre su contenido; y lavando antes de la otra observación y secando todo el aparato, cual á continuación expresamos.

Para *lavar* el aparato se destornilla el tubo móvil y se mete en agua, de modo que esta bañe la cara y parte del tubo que se untó de la mezcla sanguínea, pero cuidando no penetre en su interior, pues sería muy difícil y entretenido el enjugarle; al cabo de un rato se enjuga cuidadosamente con lienzo fino. Para lavar el tubo fijo hay que inyectar, con pipeta, agua en su cavidad, así como también en la cajita de encima, enjugando luego.

*Graduación del aparato para cytómetro.*—Su fundamento reside en las variaciones de espesor de la sangre diluida que se analiza. Cuanto mayor sea el espesor que tengamos que darle para obtener el efecto óptico que se busca, más pobre en **Hb.** será aquella sangre.

Para establecer una escala, precisa hallar el punto de partida, el cual en este caso sería el grado correspondiente á la riqueza media hemoglobínica. Para hallarle, el método más exacto es el químico, pues así nos darían los grados cytométricos la *cantidad absoluta* de **Hb.** contenida en una sangre dada. Mas el análisis cuantitativo exacto de la **Hb.**, es una operación difícilísima; y como para el clínico, después de todo, es casi mejor conocer la *proporción relativa* de **Hb.**, es decir, la riqueza de ella, medida comparándola con la riqueza media en normalidad, puesta como unidad. Obitiéndose así relaciones más

sencillas y más fácilmente comprensibles y comparables.

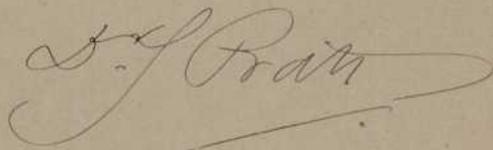
BIZZOZERO ha escogido como base de la escala citométrica la riqueza en **Hb.** de una sangre de hombre sano, deducida después de multitud de observaciones hechas en sujetos de 20 á 40 años. De estas observaciones resulta, según el autor: que la media en sangre normal marca 110 en el citómetro, ó sea que la llama de la bujía comienza á mostrar sus contornos cuando se examina á la distancia de 1  $\frac{1}{2}$  metro, al través del aparato cargado de una capa líquida de 110 centésimas de mm. de espesor.

Si convenimos—dice—tomar esta cifra (110) como unidad, ó para mayor facilidad correspondiente á 100 de **Hb.**, fácil es deducir la proporción relativa de este principio que convienē á los otros términos de la escala: Sea  $g$  el grado de la sangre normal;  $g'$  el de la que se va á examinar;  $c$  la cantidad normal de **Hb.**, y  $c'$  la cantidad desconocida que deseamos saber. Dado que el producto de la riqueza en **Hb.** para el espesor de la capa observada es una cantidad constante, se tiene:  $eg = e'g'$ ; de donde la fórmula  $e' = \frac{eg}{g'}$ . De modo, que si la sangre de tal enfermo señala 180, ó sea que, es preciso darle un espesor de 180 centésimas de mm. para lograr la percepción dicha de la llama, podremos decir que:

$$e' = \frac{100 \times 110}{180} = \frac{11000}{180} = 61,1.$$

La sangre analizada tendrá, pues, 61,1 de **Hb.**, siendo la cantidad de norma = 100.

Para facilitar la operación establece el autor la tabla



adjunta que transcribimos, y cuyos datos si se recogen en un mismo sujeto en varias ocasiones pudieran presentarse en gráficas muy determinativas.

Grado del citómetro.	Hemoglobina.
110	100
120	91,6
130	84,6
140	78,5
150	73,3
160	68,7
170	64,7
180	61,1
190	57,9
200	55,1
210	52,4
220	50,0

*Graduación del aparato para cromómetro.*—Fundamentado cual antes, si bien variando en el punto de partida ó de comparación, que aquí es un cristal teñido. Como en aparatos del mismo constructor la intensidad del color del cristal varía no poco, precisa fijar antes el valor del tinte de cada aparato.

Para hacerlo, se examina una sangre cualquiera, con el aparato adquirido, citométrica y cromométricamente, y se comparan los grados señalados en los dos casos. Si por ej.: tal sangre señala al citómetro 110 y al cromómetro 140, esta será la unidad de partida en este caso, puesto que aquella corresponde, convencionalmente, á 100 de **Hb**. Luego será fácil hacer toda la escala, sirviéndonos de la misma fórmula que antes, con la diferencia de que  $g$  (título de la sangre normal), es factor que varía con el aparato y que habrá de fijarse en un comienzo y de una vez para todas.

Así, por ej.: con el instrumento que el valor de  $g = 140$ , nos dá una sangre, por el cromómetro, la cifra 280; conteniendo 50 de **Hb**. según la fórmula:

$$e' = \frac{100 \times 140}{280} = \frac{14000}{280} = 50.$$

Ó bien, según este otro ej.: ¿si una sangre nos dá con

el citómetro 130 y con el cromómetro 190, ¿cuál será el grado cromométrico correspondiente á la cifra básica 100 de **Hb.**? Pues bien: si 130 (de un lado) corresponden á 190 (cromómetro); 110 grados citométricos (unidad) corresponden á  $x$  grados cromométricos;  $130 : 190 :: 110 : x$ ,

$$x = \frac{110 \times 190}{130} = \frac{20900}{130} = 160,7.$$

De modo que esta cifra 160 será la básica cromométrica de este aparato.

Así, pues, el valor de la escala citométrica es igual en todos los aparatos; el valor de la escala cromométrica es variable, como lo es también el tinte colorante del cristal patrón y difiere en cada instrumento.

Según el autor del método es tanto menor el error, si usamos su aparato con gran precisión y si se opera ligero para evitar evaporaciones y cansancios. El error medio que da el aparatito del Prof. de Turín, es de 0,3 p. ‰, siendo más útil como citómetro, y á lo que debe el éxito de que goza en su patria, tanto en la clínica, cual en las especulativas determinaciones.

f.)—Proceder de GOWERS.—Aconseja utilizar su *hemoglobínómetro*, que se compone de dos tubos de cristal ó pequeñas probetas, con un pie común. Una de ellas, cerrada á la lámpara, sirve de patrón, y está llena de glicerina picrocarminada de tinte que representa una solución de sangre normal al centésimo. El otro tubo, graduado, sirve para echar sobre unas gotas de agua de fuente, la sangre medida (20 mm.<sup>3</sup>) y recogida con una pipeta del dedo puncionado con lanceta. Después se diluye echando más agua con otra pipeta mayor que la anterior, y se agi-

tará varias veces hasta que la solución de **Hb.** que se forma por dilución de los eritrocitos, tenga un color lo más exactamente posible á el de la glicerina picrocarminada del tubo de muestra. De la cantidad de agua necesaria se deduce el contenido de hemoglobina de la sangre analizada á favor del cálculo siguiente:

La glicerina coloreada de muestra es de tal indole, que equivale en su tinte, lo más exactamente, á una solución al 1 % de sangre normal. Las rayas divisorias del tubo en el que se hace la mezcla analizada corresponden á un volumen de 20 mm.<sup>3</sup> Si por consiguiente, diluimos los 20 cm.<sup>3</sup> de sangre hasta la raya 100, tendremos una dilución al 1 p. % de sangre. Si la sangre contiene su cantidad de **Hb.** normal, esta dilución al 1 p. % debe corresponder en su color á el de la glicerina de muestra. Pero si al diluir, echando solo hasta la raya 50, agua, logramos un tinte igual al patrón, tendremos que la sangre examinada solo contiene un 50 p. % de contenido de hemoglobina de la cifra normal.

Compréndese, sin dificultad, que la raya hasta la que debemos diluir para obtener la coloración normal, indica directamente el contenido hemoglobínico de la sangre analizada en tanto p. % de la normal.

La comparación tintórea se hará á luz refractada; para lo que pondremos delante de estos tubos un papel blanco y miraremos hacia la luz solar. De este modo se evitarán los errores que de otro modo se obtendrían, dado el modo de incidir la luz, á consecuencia del diferente poder refractario luminoso en la glicerina y en la mezcla acuosa hemática. La solución normal en su tinte se efectúa

con luz solar; si hubiera de emplearse luz artificial habría de hacerse la dilución de otro modo.

Manipulando cuidadosamente, dice ALTMANN, el resultado solo envuelve un error de un 5 p. %, aproximadamente.

g.)—PROCEDER DE LESSER (1).—Le indicaremos sucintamente por ser poco exacto. Hállase basado en la relación existente entre la concentración de una solución hemática y la amplitud de las bandas de absorción de la O-Hb. Cuanto más concentrada esté la solución, más á el borde izquierdo de la primera banda se aproximará de la raya D.

h.)—PROCEDER DE WELCKER (2).—Este proceder, primero del grupo de los métodos cromométricos de patrón variable, hállase fundado en: relacionar la evaluación cromométrica con una unidad, absolutamente arbitraria, constituida por el poder colorante de un glóbulo dado reputado sano. Término que le sirvió á WELCKER, cual á los que como él han procedido, para idear *las escalas cromométricas* del modo siguiente: por medio de una sangre, de la que conozcamos su riqueza globular, ejecutamos una serie de diluciones en proporciones tales que formen una serie idéntica á la que darían soluciones hechas con el mismo título, pero con sangres continentales de número gradualmente decreciente de glóbulos semejantes á los de la sangre tipo. De esta manera cada solución corres-

---

(1) L. VON LESSER.—U. d. Verth. d. rothen Blutscheiben im Blutstrome. (*Arch. f. Anat. u. Physiol.* 1878.)

(2) WELCKER.—Anweisung zum Gebrauche der Blutfleckenskala. *Giessen.* 1854.

ponde á una riqueza globular dada, y su color puede representarse por esta riqueza globular.

De modo, que WELCKER en estas evaluaciones, adopta como unidad de color, el tinte de un glóbulo de *sangre tipo*.

Adopta dos maneras de proceder: 1) ó bien compara el color de la sangre que se analiza, diluida en proporción determinada, con el tinte variable de las soluciones hemáticas en serie hechas cual antes decíamos; 2) ó bien estableciendo escalas de manchas de sangre, compara, entre sí, las manchas que dejan después de secarse las soluciones ejecutadas según el 1) proceder:

De consiguiente: si el poder colorante de la sangre que se analiza, convenientemente diluida, corresponde á el de la solución de la sangre tipo representada por 3 millones, significa sencillamente que 1 mm.<sup>3</sup> de la sangre en cuestión está coloreada, cual lo estaría un vehículo cargado con 3 millones de eritrocitos de los de la sangre tipo y reputado sano.

Fúndase este proceder en una unidad bien arbitraria, puesto que este elemento es de una variación no calculable, lo cual conviene evitar siempre que tratemos de darle caracteres de exactitud á la ciencia. Aparte de esto las escalas de WELCKER tienen el inconveniente de que en ningún caso pueden ser regularmente reproducidas, por cuyo motivo, cada investigador, para su uso, tendrá que construir su escala, lo cual dará resultados que nunca podrán ser comprobados ni comparados con y por otros observadores. Por todo lo que tienen un valor clínico real tan poco práctico que con justicia se halla abandonado.

i.)—PROCEDER DE HAYEM (1).—La *escala pintada à la aguada* de que se vale este autor, para con su *hemo-cromatómetro* investigar la riqueza en **Hb.** de una sangre dada, se funda en análogo principio que el anterior, si bien este de HAYEM es mucho más preferible, puesto que una escala pintada hecha con colores absolutamente fijos, puede reproducirse indefinidamente y llegar á convertirse en instrumento de exploración corriente.



Fig. 56.—Hemo-cromómetro de HAYEM.

El aparatito (*Fig. 56*) no puede ser más sencillo: un porta-objeto que lleva dos virolas deslustradas, pegadas una al lado de la otra, sobre una de sus caras, formándose así dos cubetitas ó hematinómetros(2). En una se vierte la sangre que se vá á examinar y en la otra agua destilada; ilumínase el aparato por luz reflejada de orientación N., evitando los rayos solares; colócase el aparato sobre una hoja de papel bristol; si se mira directamente, nunca por transparencia, la mezcla sanguínea presenta un tinte que varía necesariamente, según la riqueza hemoglobínica.

(1) HAYEM.—Des caractères anatomiques du sang dans les anémies (*Acad. d. sc.*, 10 Julio 1876) y Recherches sur la coloration du sang (*Soc. de Biolo.*, 1876, 4 Nov.).

(2) Este aparatito lo expende NACHET por 12 fr. (Cat. 1892).

La sangre que se va á examinar se diluye en titulación siempre idéntica, es decir, 4—5 mm.<sup>3</sup> de sangre en 500 mm.<sup>3</sup> de agua destilada.

Por bajo de la cubetita continente de agua destilada, pasaremos sucesivamente redondelitas de papel pintadas á la aguada, de entonación más ó menos fuerte; nos detendremos cuando se vea á la vez sobre el fondo blanco los dos tintes—de la mezcla hemática analizada y del papel pintado que sirve de patrón,—al parecer iguales. Para hacer esta comparación fabrica HAYEM, á la aguada, un cierto número de redondeles pintados, del mismo diámetro que una de las cubetitas ó celditas, constituyendo una escala de tintes coloreados, tan análogos cual sea posible á el de mezclas de sangres (con el mismo título de dilución) diversas, en las que previamente se haya determinado el número de glóbulos.

«Para graduar la escala de las pinturas he escogido—dice HAYEM—cual punto de partida la mayor coloración que dá en el adulto la sangre del dedo. Esta primera pintura, que lleva el núm. 1, corresponde, como máximo de la escala, á 6 millones de hematíes sanos. Haciendo variar las diluciones de sangre normal en proporciones convenientes, hemos podido alcanzar el valor de cada pintura relacionada á 1. Además, se ha podido inscribir, sin temor á error, al lado de este valor el número correspondiente de glóbulos normales.»

Aplicando estos datos M. HAYEM, ha construido la tabla adjunta, por la que se podrá conocer el número globular de la sangre analizada, y aun (gracias á un coeficiente casi invariable para sangre normales) la cantidad

de Hb. correspondiente. Basta esta escala en la mayor

Número de la pintura.	RIQUEZA	
	globular	en Hb.
	1 . . . .	6,000,000
2 . . . .	5,500,000	0,916
3 . . . .	5,000,000	0,833
4 . . . .	4,500,000	0,750
5 . . . .	4,000,000	0,666
6 . . . .	3,500,000	0,583
7 . . . .	3,000,000	0,500

parte de los casos, pues, según dice su autor, cuando las pinturas por bajo del 7 no tengan bastante exactitud, en lugar de hacer la mezcla ordinaria, se toma doble, triple ó cuádruple de la sangre analizada, y la proporción de Hb. es igual enton-

ces á la  $\frac{1}{2}$  al  $\frac{1}{3}$  ó  $\frac{1}{4}$  de la indicada por la tabla. Cuando, por último, la mezcla no es completamente idéntica con las pinturas de la escala, se juzga con el ojo y con «bastante aproximación» de los valores intermediarios.

No obstante lo rápido, y que responde no poco á las exigencias clínicas, pueden hacerse á este proceder las objeciones expuestas á el de WELCKER, respecto á la exactitud absoluta de los datos que proporciona.

*j.*)—Proceder de QUINQUAUD (1).—Utiliza un hemocromómetro en el que la escala de las tinturas, con las que se compara la sangre investigada, está formada por una serie de tubos continentes de soluciones picrocarminadas de concentración decreciente y que sirven de señales.

*k.*)—Procederes de MALASSEZ.—Este insigne hematologista ideó primero un aparato y modo de proceder que en el fondo pertenece á los procederes del 2.º grupo, y

(1) QUINQUAUD.—S. un proc. de dosage de l' Hemoglobine dans le sang.—(C. r. Ac. sc. t. LXXVI, 1873.)

que más tarde ha perfeccionado y modificado, de tal modo, que su nuevo aparato cromométrico entra de lleno en los comprendidos en el 1.<sup>er</sup> grupo. De uno y otro vamos á dar cuenta por fecha cronológica de invención, debiendo advertir que solo el último es el que goza de justificada utilización.

*Método antiguo.*—El principio fundamental de la *escala cromométrica graduada en peso*, ó sea del 1.<sup>er</sup> colorímetro de MALASSEZ, fué formulado por su autor, tras largas interesantes investigaciones en 1876 (1), del modo, si bien sucintamente, que pasamos á exponer.

Sean: S, S', S'', S''', etc., una serie de soluciones tituladas de **Hb.** diferenciadas entre sí en una milésima; si lleva la escala un número suficiente de términos, fácil será tomar estos por gamma cromométrica y dosificar por comparación la riqueza en **Hb.** de tal sangre. Aun admitiendo que en la comparación resulte que el tinte de la muestra examinada es intermediario á el de dos términos de la serie, solo tendríamos un error de  $\frac{1}{2}$  milésima.

Mas siendo muy alterables las soluciones hemoglobínicas y difíciles de obtener, las sustituyó con soluciones acuosas de sangre de perro, continentes de 4 á 16 de sangre por 1000, y diferenciadas en 1 milésima. Así constituía la *escala cromométrica provisional*. Después trató de determinar el valor de cada uno de los grados de esta escala, para lo que de la misma sangre de perro diluida al centésimo se averigua la capacidad respiratoria por la

---

(1) MALASSEZ.—Recueil des travaux du laboratoire d'histologie du Collège de France, 1876, y Arch. d. physiol., 1877.

bomba mercurial (MALASSEZ, PICARD). Obtenida la escala de las soluciones hemáticas y fijado el valor de cada uno de sus grados, se sustituye por otra escala fija persistente, según la opinión de RAJEWSKI. En efecto: asegurado MALASSEZ de que el espectro del picrocarminato es *casi* idéntico á el de la sangre fresca, creyó posible la sustitución, si llegamos á conocer exactamente el tinte de las soluciones picrocarminadas, que responden mejor á el valor del tono de cada uno de los grados de la escala de soluciones sanguíneas, de la escala temporal por otra persistente.

Para concluir esta última, hace una solución de picrocarminato en gelatina, *imitando* cuanto sea posible el patrón de la sangre de perro. Evítase la corrupción de tal mezcla adicionándole unas gotas de ácido fénico, y encerrándola en una caja prismática de cristal, tapada con lámina que se pega con bálsamo del Canadá. Este prisma así coloreado, tiene varias intensidades de color, que van acrecentándose del vértice á la base. Por comparación con las soluciones S', S'', S''', etc., y haciendo variar la posición del prisma, iremos marcando aquellos de sus sitios que tienen un valor de tono igual, para terminar por encontrarnos con un marcador definitivo, sirviéndonos de las señales trazadas como escala.

Con estas diversas partes, de valor ya conocido, del prisma patrón, se comparaba la sangre que se iba á analizar diluida convenientemente y encerrada en una pipeta mezcladora POTAIN, cuyo reservorio está aplastado, á fin de presentar caras paralelas.

El peor inconveniente de este método es que dos solu-

ciones—una de picrocarminato y otra de Hb.—presentando absolutamente el mismo color, sufren variaciones de tintes diferentes sometidas á las mismas variaciones de espesor. M. G. HAYEM (1) dice que la graduación del aparato antiguo de MALASSEZ es tan defectuosa que afirma haber hallado con él, y en solución hemática dos veces más concentrada, una cifra doble de Hb., si bien no sabemos si el aparato usado era ó no de defectuosa construcción.

Como quiera que sea, el mismo MALASSEZ opinando es preferible usar aparatos de patrón fijo y que lo que debe variar es el espesor de la sangre examinada, ha modificado, en este sentido, su hemocromómetro, y le ha adoptado en la construcción de sus dos nuevos aparatos (2) que son de uso muy cómodo y de bastante exactitud para investigaciones clínicas. Uno de estos nuevos aparatos es una modificación del colorímetro de LAURENT. El otro de más universal aceptación es el que pasamos á describir.

*Método moderno.*—El *hemocromómetro* de MALASSEZ se funda: mezclas de carminato amoniacal y ácido pícrico dan colores que imitan exactamente los de la Hb., hasta el punto de que sus propias imágenes espectrales sean muy análogas. Si, pues, determinamos de una vez para siempre la cantidad de Hb. que se halla, por  $\text{cm.}^3$ , en una sangre cuyo color corresponda exactamente, para un espesor dado, al tipo del patrón de picrocarminato, se

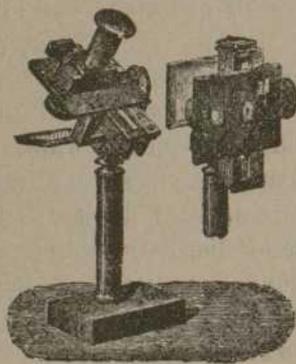
(1) HAYEM.—Dosage de l'hémoglobine par le procédé des teintures colorées. (Arch. d. Physiol. 1877.)

(2) MALASSEZ.—Sur les perf. les plus récents apportés aux appareils hémochromométriques et sur deux nouveaux hémochromomètres. (Arch. d. physiol. nor. et pathol. 2.<sup>e</sup> s., t. X.)

podrá, por comparación con diversas sangres, bajo espesores variables, reproducir el tono del tipo adoptado, de tal manera, que á volúmenes iguales estas sangres contendrán una cantidad de **Hb.** en razón inversa al espesor necesario para obtener el tinte del patrón.

El aparato que este sabio hematologista nos dió á conocer en 1883, sirve tanto para investigar la cantidad de **Hb.** existente en tal sangre en total, si que también se puede con él calcular la cobijada en un eritrocito.

El instrumento—construido por el fabricante **VERICK** (*Fig. 57*)—se compone de las partes siguientes: una pantalla rectangular metálica se halla atravesada en su



*Fig. 57.*—Hemo-cromómetro del DR. MALASSEZ.

línea media horizontal, por dos orificios circulares, de unos 5 mm., y colocados uno al lado del otro, hacia el lado izquierdo. Detrás del orificio izquierdo sitúase el patrón cromométrico, que consiste en: una cubetita de cristal de 5 mm. de capacidad, encajada en armadura de cobre y conteniendo la disolución en glicerina del picrocarmínato, equivalente

á una solución centesimal hemática que contuviera 5 p.  $\frac{0}{100}$  de **Hb.**; cubetita que fácilmente puede reemplazarse. Detrás del orificio derecho existe una cubeta prismática, continente de la mezcla titulada de la sangre que se exa-

mina; mezcla que con agua destilada con antelación habremos titulado al 1 : 50 ó 1 : 200, según los casos. Este prisma tiene el vértice truncado y cerrado hacia abajo, y la base abierta hacia arriba que es por donde se vierte la mezcla; sus paredes metálicas únense por tornillos, siendo susceptibles de distanciarlas mediante una cremallera, á fin de obtener masas líquidas de espesores variables.

La dicha pantalla tiene arriba y á la derecha un agujero cuadrado por el que se percibe y lee la escala colorimétrica que está grabada lateralmente en la cara posterior de la cuba prismática. En uno de los lados de la ventana, que está tallado oblicuamente, hay trazada una raya que sirve de índice de la escala que aparece al otro lado.

Detrás de la pantalla y de sus cubetitas adáptase: ora un cristal deslustrado, si la investigación se hace con luz directa, ora un espejo deslustrado, si se ejecuta á luz reflejada, para proporcionarnos en uno y otro caso luz difusa.

Cubriendo los dos orificios circulares de la pantalla y por su cara anterior, atorníllase un dispositivo cilindrico en cuyo interior existe: una lente, un diafragma muy estrecho, y dos prismas de doble reflexión total. Este dispositivo es muy útil, por cuanto al poner uno al lado del otro, los rayos coloreados que provienen del patrón carminoso y de la solución sanguínea, se facilita la comparación de las dos imágenes; dá una mayor precisión á la observación que se intenta, toda vez que su estrecho diafragma solo deja pasar una superficie limitadísima de la cuba, y por último, amplifica estas imágenes con el auxilio de la lente.

Todo el aparato va articulado á un pesado pie, de modo que pueda bascular en todas direcciones. Expende el fabricante, anejos al instrumento: un mezclador, una lanceta y un vasito (1).

El modo de emplear este aparato consiste esencialmente: en hacer la mezcla acuosa centesimal hemática con titulación exacta y conocida. Se echa en su cubetita, y dando vueltas á la cremallera, se le hace avanzar ó retroceder hasta darle tal espesor, que después de bien iluminado todo, se perciban las dos imágenes con el mismo tono y brillantez. Una escala indica el espesor de la sangre atravesada en este momento por la luz, y una tabla que tiene, cuenta la inversión de los espesores y de la dilución, traduciendo la cantidad de **Hb.**

Con este aparato se puede averiguar, dividiendo el peso de **Hb.** contenida en 1 mm.<sup>3</sup> por el número de glóbulos comprendidos en este volumen, el valor medio de **Hb.** contenida en un eritrocito.

1.)—PERCOTER DE FLEISCHL (2).—Este sabio ha ideado un aparato, conocido con el nombre de *hemómetro*, cuyo fundamento es: que el color de la sangre disuelta en agua es igual que el color de un prisma de cristal teñido por la púrpura de CASIUS.

Este útil aparato, muy recomendable en averiguaciones clínicas, consiste en: un dispositivo (*Fig. 58*), que recuerda la mecánica de un microscopio simple, desprovisto del sostén para el doblote, y cuya platina está acondicionada del modo especial siguiente: en su agujero cen-

(1) Todo esto encerrado en un estuche, cuesta 115 fr., VERICK, 1892.

(2) *Med. Jahrb.*, 1885, p. 425.—*Maly's Jahresbericht*, t. XV, p. 149.

tral aplícase un cilindro de metal de  $1\frac{1}{2}$  cm. de largo, cerrado abajo por un disco de cristal, abierto arriba y dividida su cavidad por un tabique metálico transversal, de modo que una de estas mitades (la anterior), cerrada



Fig. 58.—Hemómetro de FLEISCHL, y pipeta  
puncionadora de LAKER.

por el cristal, se ilumina directamente por la luz reflejada por la placa de yeso que á modo de espejo se articula con la columna sostén del aparato que recibe la luz de una lámpara de aceite ó mechero de gas, puesto que la luz del día no

puede utilizarse. La mitad posterior del tubo descansa sobre el prisma coloreado en rojo-rubí, que se introduce, por debajo, por medio de un tornillo, haciéndole girar según convenga.

Antes de empezar la maniobra se llenan aquellas dos mitades de agua destilada, y después en la mitad anterior se diluye cantidad determinada de la sangre que se analiza. Á este fin se utiliza la pipeta automática del Dr. LAKER, que acompaña á el aparato. El contenido cúbico de la pipeta debe medirse de tal manera, que en sujetos sanos, el color de la sangre disuelta en el tubito sea igual á aquella parte del prisma teñido que lleva el nú-

mero 100. La distancia desde dicho sitio á la arista aguda del prisma, cuyo espesor es 0, está dividida en 10 partes, de manera que en el aparato se encuentran las cifras de 90, 80, etc., perceptibles al través de la escotadura existente en la platina por detrás del tubo dividido (1).

Practicase la observación, después de llenar las dos mitades del tubo con agua, de diluir en la anterior la sangre y de cuidar no se forme ningún menisco, moviendo el prisma hasta que los dos líquidos presenten un color rojo intenso igual. Si se lee entonces en la cuña teñida la cifra 80 de su escala, es que la sangre que se examina no contiene más que 80 p.  $\%$  de **Hb.**

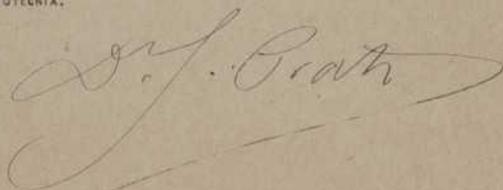
La cantidad de **Hb.** puede también obtenerse por la siguiente fórmula: si consideramos que el contenido de dicha substancia en el hombre sano es de un 14 p.  $\%$  en gramos de sangre (ponemos 14 para simplificar la operación y cual la más próxima á la cifra de 13,77 p.  $\%$  que dá como normal J. G. Orro), la cantidad absoluta de ella será:

$$x = \frac{14 \times R}{100}$$

en cuya fórmula:  $x$  = la cantidad de **Hb.** contenida en la sangre analizada;  $R$  = la cifra obtenida por el aparato; y 14 = la cantidad de **Hb.** en 100 gr. de sangre normal de adulto.

Si bien este aparato no dá cifras absolutamente exactas, es digno de encomio por la facilidad y rapidez con

(1) El hemómetro del Prof. E. VON FLEISCHL cuesta 60 Mk., y la pipeta pinchadora del Dr. LAKER 4 Mk., casa de REICHERT (Wien), según Cat. 18. 1892.



que se ejecuta la operación, y la pequeña cantidad de sangre necesaria á la investigación.

**b.**—Métodos diafanométricos.— Básanse en análogos principios que los precedentemente estudiados, puesto que se busca un efecto óptico definido, cual es la transparencia del líquido coloreado, de tal modo, que tanta mayor cantidad de substancia colorante tendrá este líquido (sangre pr. ej.), cuanta mayor sea la dificultad de percibir á su través cifras grabadas, determinado foco luminoso, etc. Cuéntanse entre estos procederes los que estudiamos á continuación.

**a.**—PROCEDER DE MANTEGAZZA—Siendo la sangre tanto más transparente cuantos menos eritrocitos tenga en suspensión, claro es que dicha variable transparencia proporcionará medio de medir la riqueza en **Hb.**, siempre que nos rodeemos de las siguientes condiciones: si se observa la llama de una bujía al través de una capa de sangre, el brillo de la luz hállase amenguado, tanto más si interponemos luego, entre el ojo del observador y la solución hemática, uno, dos, tres, etc., cristales de colores (azules pr. ej.); de tal modo, que si continuamos interponiendo cristales de esa índole, llegará un momento en el que no será visible la luz de la bujía.

Para medir el grado de transparencia de tal solución sanguínea ideó MANTEGAZZA el aparato que llamó *globulímetro*, y que debía mejor denominarse *hemocromóscopo*. Consiste en dos tubos cilíndricos enchufados uno en otro, y cuyos extremos los cierran unos cristales. Uno de los tubos lleva adosado un embudito que se abre en el interior del tubo; de este modo, la solución sanguínea que en

dicho embudo se vierte, cae en el espacio que queda entre los dos cristales que cierran los extremos; espacio que puede variarse á voluntad, y por ende, hacer variar el espesor de la masa líquida que le ocupa, con solo enchufar el tubo móvil más ó menos. Todo el aparato se sostiene por un mango, para ser manejado con la mano. Por delante de uno de los cristales terminales, dispónese un disco provisto de agujeros de diversos diámetros, y que gira alrededor de un eje que se articula al mango del aparato. Dicho disco se orienta, de modo que sus orificios coinciden con el centro del cristal terminal. Estos orificios llevan engastados cristales azules en número 1, 2, 3, etc., cada uno. Los diversos grados de transparencia hánse evaluado por medio de la numeración globular. Cada cristal azul, sobreañadido, equivale á una sangre que tenga unos 126.000 glóbulos, término medio por mm.<sup>3</sup>

Para manejar este aparato se hace una mezcla de 1 cm.<sup>3</sup> de sangre con 96 cm.<sup>3</sup> de una solución de carbonato de sosa en agua de titulación de 60 p. ‰. La mezcla se vierte en el instrumento tubular. Colocados en la cámara oscura, encendida una bujía, observamos á 1 m. de distancia, haciendo volver el disco hasta la desaparición completa de su llama por la interposición sucesiva de los discos azules.

Por simple lectura valuamos después. Los errores hállanse representados en un 5 p. ‰ para sangres que contienen 3 millones de glóbulos, durando la observación unos 5'. Este aparato, muy análogo al conocido ya de Bizzozero, es de cómodo empleo, y sería aun más reco-

mendable, si cual hace notar MALASSEZ se reglara por medio de una determinación de Hb.

b.)—PROCEDER DE HÉNOQUE (1).—Para llevarle á cabo ha ideado un precioso aparatito, conocido con el nombre de *hematóscopo*, que consiste: 1.º, en una lámina metálica esmaltada (*Fig. 59*) que lleva trazada una escala con ci-



*Fig. 59.*—Placa metálica esmaltada del hematóscopo de HÉNOQUE, sobre la que se ponen las placas de cristal con la sangre. Tamaño natural.

fras desde 0 á 60, en color negro; por bajo de ella hállase otra numeración en negro también, de cuyos números, el primero que es el 15 corresponde próximamente á el 8 de la escala superior, y los siguientes en orden decreciente (14, 13, 12, 11, 10, etc.) van marcando espacios desiguales, pero cada vez más estrechos. 2.º, dos láminas de cristal (*Fig. 60*) de desigual anchura: una del mismo tamaño que la esmaltada y llevando grabada exactamente la misma escala milimétrica; otra la tercera parte de ancha y con los bordes esmerilados. La lámina de cristal más ancha tiene unas abrazaderas metálicas en sus dos extremos, y en las que encaja la estrecha lámina de cristal, por bajo del sitio donde está la escala. La ar-

(1) HÉNOQUE.—*Note sur l'hématoscope*. Masson ed. Paris, 1886.

madura del extremo donde llega el 60 de la escala, tiene un reborde de 300 *micrón*, de tal modo, que al superponer ambos cristales por el extremo del 0, están en contacto, pero se van separando cada vez más hacia el otro extremo, en el que están separados 0,3 mm.; es decir, que se forma un espacio capilar cuneiforme, cuyo vértice corres-



Fig. 60. — Hematóscopo de Hénoch.

A. Corte del aparato al nivel del punto de yusta-posición de los cristales ó de aprisionamiento de la sangre.

B. Vista de plano del aparato lleno de sangre; percíbese arriba la escala en mm. de 0 á 60, y abajo, al través de los dos cristales y del espacio con sangre entre ellos existente, parte de las cifras 15, 14, 13, 12, vagamente la 11, y las demás invisibles.

ponde con el 0 de la escala, y cuya base ó mayor amplitud se halla en el 60. Este espacio prismático está graduado de tal modo, que 1 mm. de la escala corresponde á 0,005 mm. de separación de los cristales, ó sea el espesor del líquido contenido en este espacio.

Manipularemos con este aparatito del modo siguiente: El espacio prismático que existe entre los dos cristales se llena de sangre, tal cual sale pinchando un dedo. Para ello se aplica el dedo puncionado sobre el sitio más grueso de aquel espacio; también puede hacerse pasando el borde de los cristales, varias veces, por el dedo; así penetra

la sangre por sí misma en el espacio capilar, procurando no entren burbujas de aire, para lo que se coloca el aparato verticalmente sobre el dedo. Lleno el espacio capilar se quita la sangre adherida á los bordes del mismo, y ejecutamos la observación á la luz difusa de un medio día despejado.

Apreciamos el contenido en **Hb.** de la sangre introducida, colocando las láminas de cristal sobre la esmaltada, de modo que las divisiones de la escala de ésta se hallen cubiertas por las de la escala del cristal más ancho, y en seguida viendo cual de las cifras de 15 á 4 de la lámina esmaltada, que se encuentran tapadas por el espacio lleno de sangre, se pueden leer todavía fácilmente á través de dicha capa hemática, cuyo espesor es variable de izquierda á derecha entre 0 y 300 *micrón*.

Dada la división de 0 á 60 de la escala superior, para calcular el espesor, en *micrón*, de la capa sanguínea, al nivel de tal división de la escala, basta multiplicar dicha división por 5. Siendo la capacidad total del espacio prismático de 90 mm.<sup>3</sup>, en la práctica son necesarias unas 10 gotas de sangre para llenarlo bien.

Ahora bien, se comprende que cuanto menor sea el número de las cifras de la parte inferior que se puedan leer, tanto más rica en **O-Hb.** será la sangre analizada. Examinando *tal* sangre anémica, leeremos (*Fig. 60*):

En letras: *Hématoscope d' Hén.....*

En cifras: 15, 14, 13, 12, 11, 10, 9, 8.

En mm. de extensión: de 0 á 43.

La escala en cifras la construye HÉNOQUE, de tal modo, que la 14 leída distintamente indica la cantidad de

O-Hb. contenida en 100 gr. de sangre normal. La ha establecido el autor tras múltiples investigaciones sobre sangres de hombre y animales, analizadas espectroscópica y químicamente.

Las determinaciones hemoglobínicas, según serie de investigaciones practicadas por HELLSTRÖM, JAKSCH y LOOS (1), hechas con este aparato, comparadas con las obtenidas por otros procederes, suministran cifras poco exactas y algún tanto elevadas. En efecto; con este instrumento, de manejo bien sencillo, obtenemos enseñanzas en verdad interesantes, pero medimos, ciertamente, un algo muy complejo. La opacidad de la sangre no solo depende de la riqueza en Hb., si que también del número globular. Si es cierto, que dicha opacidad depende del diferente índice de refracción del suero y de los glóbulos, á mayor riqueza en ellos de Hb., también será mayor la diferencia del índice, y de consiguiente la opacidad resultante. Tan cierto es esto, cuanto que la Hb. forma los  $\frac{9}{10}$  en peso de los glóbulos secos. Aun más; si suprimimos, con el pensamiento, la Hb., no queda suprimida á la vez la diferencia del índice y la opacidad de ella resultante; llegando á tener, hasta cierto punto, la apariencia de la leche, aun su opacidad variará con el volumen y sobre todo el número de sus elementos figurados, suponiéndolos incoloros.

Parece probado que á una misma riqueza en materia colorante, pueden corresponder cifras globulares muy diferentes, y de consiguiente, tal vez grados de opacidad

---

(1) Loos.—Wiener klinische Wochenschrift. I. 679. 1888.

diversos. En casos de leucocitemia la medición del grado de transparencia nos dará aun menos exactamente la riqueza en Hb.

También puede utilizarse el hematoscopio en combinación con un espectroscopio (pr. ej. el de BROWNIG) para analizar la O-Hb. y otras combinaciones de la Hb., tanto en sangre circulante como en la extraída de los vasos, según procederes instituidos por el propio HÉNOQUE, de resultados más exactos, y que daremos á conocer en el inmediato estudio del análisis espectral.

**c.**—Métodos espectrocópicos.—De alto interés y utilidad por cuanto á beneficio del análisis espectral se han logrado determinar cantidades tan sùtiles como las de  $\frac{1}{10000}$  de Hb., fúndanse en la común propiedad de los cuerpos coloreados de absorber determinadas irradiaciones luminicas; es decir, que la sangre—pr. ej.—tiene el poder de modificar determinativamente el espectro luminoso que le atraviesa.

En efecto; desde las memorables investigaciones de KIRCHHOFF y BUNSEN sobre los espectros discontinuos emitidos por los incandescentes vapores de los metales alcalinos y alcalino-térreos, así como desde los resultados conquistados al comparar esos espectros con las líneas de FRAUNHOFER del espectro solar, la atención é interés de los químicos no ha cesado de estar solicitada por este novísimo proceder analítico.

Los métodos investigadores de los metales, examinando los *espectros de emisión* (1), sólo merecen interés

(1) En el espectro solar se observan multitud de líneas oscuras de diferente grosor, pero de dirección común y paralela á las aristas del prisma; estas

secundario al quimista biológico, y de consiguiente al hematólogo. No así con la nueva rama del análisis espectral, que gracias á los trabajos de BREWSTER y GLADSTONE, comenzó á desenvolverse y que se denomina de los *espectros de absorción*. ANGSTRÖM, HAGEMBACH, KRAUSS y VALENTÍN, continuando estos estudios dieron á conocer, al mismo tiempo que SORBY, los espectros de absorción de multitud de substancias orgánicas y minerales. Después REYNOLDS, VOGEL y tantos otros, demostraban el partido

---

rayas del *espectro solar* son las *líneas de FRAUNHOFER* y representan los rayos de luz absorbidos, correspondientes á los sitios de conjunción de los rayos de diversa refrangibilidad. Ocupan siempre la misma relativa posición, por lo que pueden suministrar señales útiles para determinar, ora el índice de refracción de un medio transparente, bien la naturaleza de un foco luminoso natural ó artificial. Se ha convenido en designar las rayas más principales, que se hayan distribuidas en los *siete colores* del espectro, por las 8 primeras letras del alfabeto, comenzando la A en el rojo y ocupando la H la porción media del violeta.

Su estudio es de alto interés en análisis químico. Se ha observado—pr. ej.—operando con focos luminosos diversos, que unos producen espectros continuos y otros discontinuos (cual el solar); que los espectros continuos de llamas artificiales nunca presentan rayas oscuras, á menos de interponer vapores metálicos, en cuyo caso aparecerán rayas diferenciables de las vistas en el espectro solar, por ser brillantes y variables en número y posición, según el cuerpo interpuesto, por lo que se convierten en definidoras de él mismo. Así el sodio da una raya amarilla, el potasio una roja y otra violeta, el calcio ofrece bandas naranjadas y una bella raya verde, etc. Por otro lado; su posición comparada con las rayas espectrales solares es constante en cada cuerpo: así la del sodio coincide exactamente con la D, las del potasio con las divisiones 68 y 202, etc. De modo que, teniendo en cuenta el color, y, sobre todo, la posición de las rayas, relativamente fácil será reconocer qué sustancias se hallan en el cuerpo que se calcine en llama de espectro continuo. Este es uno de los procedimientos empleados para investigar la naturaleza de los metales que entran en la composición de las cenizas de casi todos los órganos.—Conviene advertir no es método de universal aplicación (sí solo para los metales terrosos), por cuanto los poco volátiles no alteran la continuidad del espectro de luz artificial á calor grande, y cuando utilizemos calor excepcional (por el arco eléctrico) aparecen sinnúmeros de rayas difícilmente determinables: con el hierro—pr. ej.—se ven más de 20, con el cobalto más de 60.

que el análisis químico podía sacar de aquellas investigaciones, principalmente para examinar alimentos, bebidas y productos orgánicos. No tarda, por último, la química biológica en aplicar á su estudio este método de investigación tan precioso, enriqueciéndose rápidamente de numerosos y nuevos datos del más alto interés. Debido á los notables trabajos de HOPPE-SEYLER, STOKES, SORBY, VALENTIN, VIERORDS, etc., las materias colorantes de la sangre y de la orina, la clorofila, etc., han podido estudiarse y seguirse en sus múltiples transformaciones. Estas investigaciones constituyen la aplicación más importante de la espectroscopía á los estudios biológicos, por cuanto el análisis espectral debe preceder, las más de las veces, al químico, abriéndole camino.

En estos últimos años el examen óptico de las materias colorantes ha llegado á ser más preciso aún por el estudio fotométrico de los espectros de absorción. Este método nuevo, llamado *espectrofotometría*, ha podido aplicarse á la determinación de las substancias colorantes, de tal modo, que en manos de VIERORDS, HUFNER, BRANLY, QUINQUAD, etc., ha servido para estudiar cualitativa y cuantitativamente los líquidos colorantes del organismo, cual más adelante veremos.

La técnica de todas estas aplicaciones de la espectroscopía al conocimiento bioquímico de la Hb., es la que me propongo exponer ahora en el orden siguiente: sucinto conocimiento del espectroscopio en su manejo y variedades, explicación de los métodos más usuales y estudio de la micro-espectroscopía con sus procederes más recomendables.

La espectroscopía hemática por absorción es interesante, no sólo para el conocimiento cualitativo de la Hb., sino también porque completa y dá más concisión á gran número de reacciones químicas. Su origen estriba: cuando en el trayecto de un haz luminoso que nos proporciona un espectro continuo, colocamos una vasija de vidrio de caras paralelas, conteniendo una solución teñida, si examinamos con el espectroscopio la luz así modificada, compruébase siempre que está bien concentrada la solución, que partes más ó menos extensas del espectro han sido absorbidas, marcándose por otras tantas bandas negras aquellos sitios. Estas bandas de absorción variables con brusquedad de una región á otra del espectro, según el grado de dilución, presentan bordes muy limpios unas veces, y otras los tienen como difuminados. Es de notar que su posición recae en las zonas menos refrangibles del espectro, ó sea entre B y F, si bien, cual VOGEL dice, no es constante el sitio, aun dentro de dicha zona, debido á las diferencias de índice de refracción de los disolventes; modificación más notable cuanto menos neutros sean éstos. Los observadores KÜHNE, KRUKENBERG, KUNDT, tras incesantes investigaciones, han demostrado son muchas las causas influyentes en los cambios de postura de las bandas de absorción; actuando, hasta las mezclas de dos materias colorantes (tal vez por producirse cuerpos nuevos), cambios térmicos, etc., por lo que jamás nos contentaremos con una sola inspección espectral, sino que siempre tendremos en cuenta para la interpretación de los fenómenos que se observen, el hecho deducido por VIERORDT de que dos substancias colorantes mezcladas

con el mismo vehículo, siempre que no haya reacción química entre ellas dos, existe independencia absoluta en el efecto absorbente que cada una de aquellas ejerce sobre la luz.

a.)—Del espectroscopio y su manejo.—El espectroscopio ordinario, aparte de los numerosos perfeccionamientos que ha recibido, compónese esencialmente (*Fig. 64*) de las partes siguientes: de un tubo que en su extremo periférico tiene una hendidura vertical (*mira luminosa*), estrechable á voluntad, y en su extremo interno lleva una lente colectora (*colimator*) dispuesta de tal modo, que su foco coincide exactamente con la hendidura, por lo que los rayos del haz de luz natural ó artificial que por la mira entran, salen por el colimator perfectamente paralelos hacia el prisma. De un *prisma* muy puro, de flint-glass, colocado verticalmente en un tambor ennegrecido por dentro, y horadado por tres orificios redondos; prisma que refracta los rayos paralelos y los descompone, produciéndose un espectro que, dada la posición del prisma, sigue la dirección de desviación mínima (con relación á la que trajeron los rayos paralelos), y cae sobre una lente existente en la extremidad interna de un *anteojo astronómico*, por el que mira el observador. De modo que se verá una imágen invertida muy limpia del espectro, ampliada seis ú ocho veces. Otro tubo que en su extremo externo existe un vidrio que lleva reproducida fotográficamente una escala ó micrómetro de gran número de divisiones, perfectamente equidistantes y numeradas; apenas visible á simple vista, y colocada horizontalmente es movable en cuatro direcciones. El extremo interno

lleva una lente ó sistema de ellas colocadas de manera que dan una imagen ampliada de la escala. De modo que si iluminamos con una bujía la escala, proyéctase su imagen aumentada sobre la cara del prisma que emite la luz descompuesta; cara que refleja dicha imagen hacia el

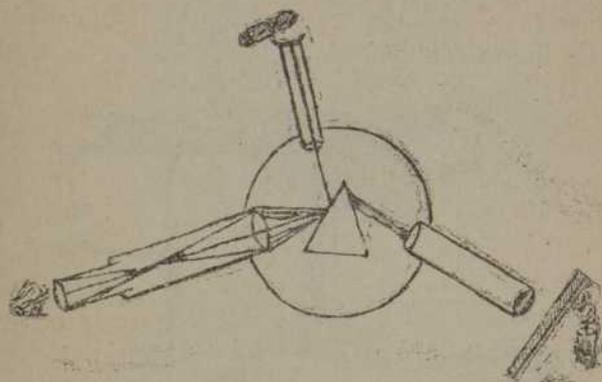


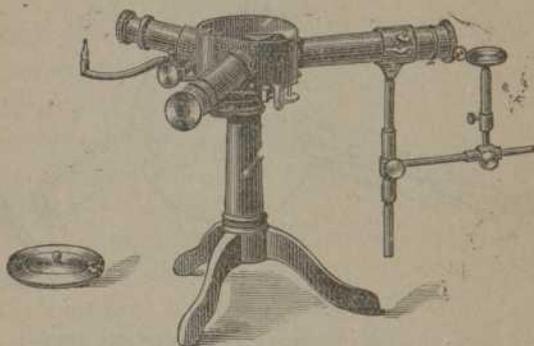
Fig. 61.—Espectroscopio: corte esquemático del ordinario.

anteojo, de tal modo, que el observador ve á la par el espectro y la escala. Esta, por efecto de los movimientos de que goza el cristal que la lleva, podemos hacer que ocupe un sitio más alto ó más bajo del espectro, ó en la misma altura llevarle á la derecha ó á la izquierda, de manera que coincida su trazo 100 con tal ó cual raya espectral; elígese de ordinario una raya muy aparente que se halla en el amarillo y se llama raya D.

Tales son las piezas de refracción y reflexión que esencialmente componen los espectroscopios de BUNSEN y KIRCHOFF, universalmente conocidos. (Figs. 62 y 63).

*A. G. Prats*

El espectroscopio ordinario se maneja cual sucintamente vamos á expresar: se quita el prisma, y se mira en el primer tubo por el colimador hacia la hendidura, para darle á ésta una abertura media, y á la par se desenchufan más ó menos sus tubos hasta percibir claramente los bordes de la hendidura. Se da al antejo tal longitud que se vea limpiamente un objeto lejano. Colocado el prisma

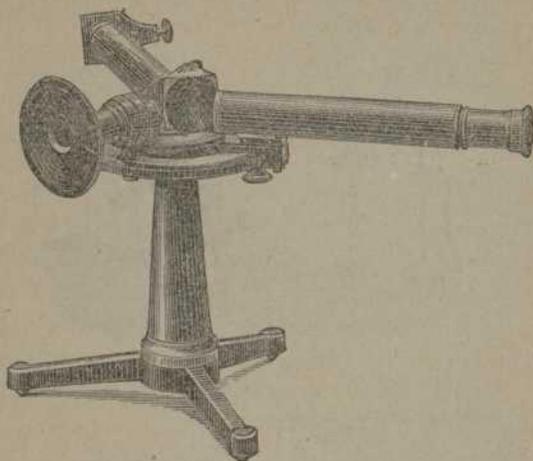


*Fig. 62.—Espectroscopio de KIRCHHOFF-BUNSEN última construcción, gran modelo, con prisma cubierto y prisma de comparación.  $\frac{1}{4}$  del tamaño natural.*

en su lugar é iluminado el micrómetro con una lámpara, deslizaremos más ó menos su tubo portador, hasta que sus divisiones se vean bien con el antejo. Orientamos luego el espectro é interceptamos el trayecto luminoso con una cajita de cristal continente del líquido coloreado, es decir, de la solución hemoglobínica. Quedará, pues, todo el dispositivo colocado cual se ve en la *Fig. 64*.

Para la orientación nos valdremos del micrómetro, de modo que la posición de una raya—pr. ej.—pueda ser

indicada, bien por una división micrométrica, ó mejor por la anchura de onda de los rayos correspondientes á la región espectral modificada (1). Las escalas varían de un aparato á otro, como también el poder dispersivo de los



*Fig. 63.—Espectroscopio; pequeño modelo de Kirchhoff y BUNSEN con un prisma muy pesado de flint de 42 mm. de altura, sobre platina de bronce de 35 mm. de diámetro, columna de hierro y trípode.—Anteaja con escala. Prisma de comparación, mira de 20 mm. de abertura.*

prismas para los diversos colores; de esto resulta que las indicaciones de dos diferentes aparatos no podrán ser comparadas.

Dado el alto precio y no fácil manejo de los espectros-

---

(1) La transformación de las indicaciones micrométricas en anchuras de onda se practica con certeza, siguiendo el proceder de SALET, sobre un papel cuadrículado al efecto. (M. SALET.—*Agenda du Chimiste.*)

copios ordinarios, se idearon los que se apellidan de *visión directa*, en los que el anteojo y el colimador están juntos, de donde resultan más baratos y de manejo más cómodo. El sistema de prismas dispónese de modo que disperse la luz sin desviación sensible del rayo medio,

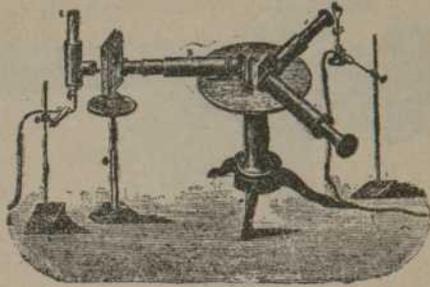


Fig. 64.—Espectroscopio ordinario tal cual debe instalarse al practicar un examen.

cual se obtiene anulando la desviación de un prisma de flint colocado en medio de dos de crown (*Fig. 65*) de dispersión menor (AMICI). Mejores resultados se logran aún en los que se construyen combinando cinco prismas, de los que dos son de flint y tres de crown (*Fig. 66*) (HOEMANN, JANSEN). Otros, como HERSCHELL, BROWNING, obtienen el paralelismo de los rayos emergentes y dispersos por un solo prisma, tallado de modo, que su ángulo inferior es muy agudo, lo cual ocasiona que al penetrar el rayo incidente por la base ó cara opuesta sufre dos reflexiones.

Uno de los más recomendables es el gran espectroscopio-

pio de visión directa de JANSSEN-HOFMANN (*Fig. 67*) soportado por un estativ de bronce, que goza de movimientos en todas direcciones y trípode de hierro (1). El anteojo y el tubo que le continúa, que es el del colimador y la hendidura, miden 16 líneas =  $21 \frac{2}{3}$  mm. abertura, 7 pulgadas = 182 mm. abertura focal y cerca de 6 veces



*Fig. 65.—Prisma de AMICI.*



*Fig. 66.—Prisma de HOFMANN.*

de aumento. Hendidura con tornillo micrométrico y prisma de comparación. En la porción media cilíndrica donde se halla el sistema de prismas, existe lateralmente un tubo con escala fotográfica. El enfoque del anteojo para percibir el espectro muy extendido, efectúase por medio de tornillo micrométrico y de una cremallera. Dispersión  $12^{\circ}$ .

Últimamente se ha simplificado aun más la construcción de estos aparatos con el fin de hacerlos más portátiles, suprimiendo el anteojo además de toda la parte mecánica de sostén, con lo cual se acorta y facilitase su manejo. Los primeros aparatos así contruidos fueron los de BROWNING, y se llaman *espectroscopios de bolsillo* ó transportables. Su longitud puede reducirse á diez centímetros, y se componen esencialmente de la hendidura, lente del colimador y los prismas, mirando el observador directamente en el prisma, percibiendo un espectro virtual. Para enfocarles bastará dirigir el aparato hacia una

---

(1) Su precio, casa de KAEHLER & MARTINI, es de 240 Mk.

nube y alargar el tubo ocular hasta que las líneas E y *b* del verde, ocupantes del centro del campo, aparezcan con claridad.

Estos espectroscopios de mano son muy empleados en Alemania, por cuanto son de cómodo manejo, al poderlos

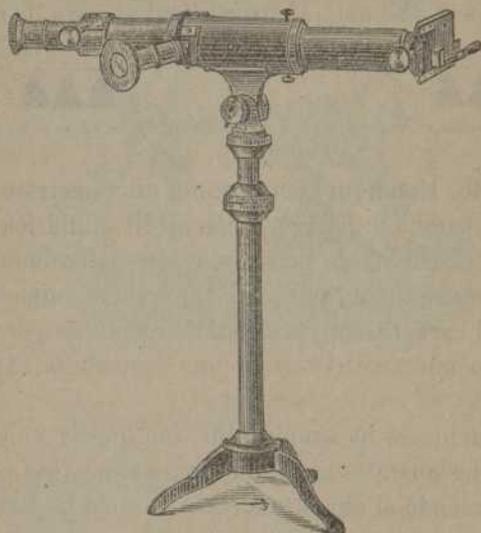
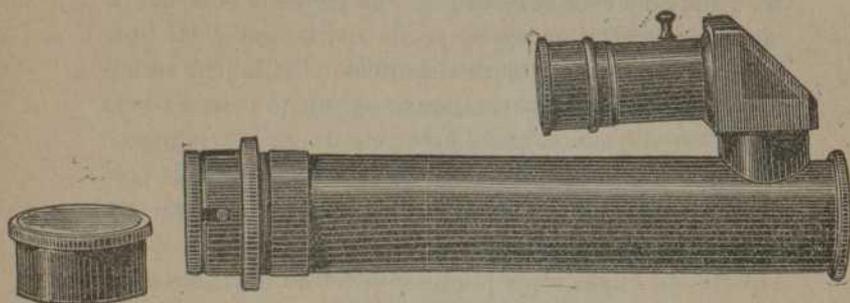


Fig. 67.—Espectroscopio de visión directa de JANSSEN HOFMANN.

dirigir y mirar con ellos en todas direcciones. Entre estos aparatos los más recomendables son los de BROWNING y VOGEL, construidos esmeradamente por P. ALTMANN, de Berlín, y por K. FRITSCH v. PROKESCH, de Viena. El de BROWNING (1) está graduado y tiene prisma de compara-

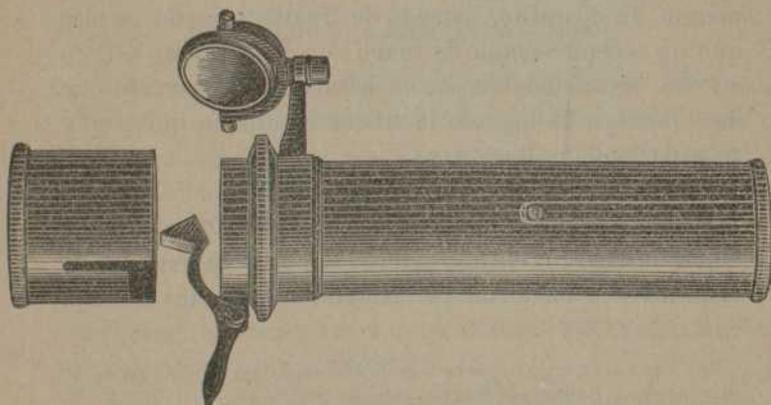
(1) Cuesta el espectroscopio de BROWNING, casa de KORITSKA, de Milán, 38 L.; casa de KARL FRITSCH v. PROKESCH, de Viena (VI Gumpendorferstr. 31), de 28 á 35 fl.; y casa de ZEISS (Jena), de 30 á 40 Mk.

ción y hendidura simétrica (*Fig. 68*), proporcionando un extenso espectro en el que las rayas naturales y de absorción están muy marcadas. El de VOGEL, con ó sin escala graduada, es el que actualmente se emplea con mayor



*Fig. 68.*—Espectroscopio de bolsillo de BROWNING.

frecuencia, por su más fácil enfoque y fuerza luminosa. Cuando no lleva escala, ésta la sustituye el autor con un



*Fig. 69.*—Espectroscopio de bolsillo de VOGEL, sin escala.

espejo, como se ve en la *Fig. 69*, tal cual le construyen SCHMIDT & KANSCH, en Berlín (1). El espejo, con su armadura en estribo, pende de un anillo metálico giratorio al rededor del eje del tubo, de tal modo que puede separarse. El prisma está colocado en una pequeña palanca, de manera que si es necesario puede apartarse y dejar libre la hendidura rectangular existente en el cilindrito terminal y separable del aparato, cuyo cilindrito tiene á su vez una ventana lateral por donde penetra el haz luminoso reflejado por el espejo. Así se obtienen dos espectros, uno directo para la observación y otro para la comparación. Para utilizarle se cogerá con una de las tenacillas de un soporte, en cuyas otras pinzas se pondrán los tubos ó vasijas continentales de la solución coloreada que vaya á examinarse.

Por último, á tal grado de simplicidad se ha llegado en la construcción de estos aparatos, que existe en el comercio un aparatito, llamado de HERING, que no es más que un espectroscopio de mano sin lentes, muy útil en clínica, recomendable por su baratura (2), y con el que dice JACKSCH ha logrado idénticos resultados que con el transportable de BROWNING.

Consiste el económico aparato de HERING (3) en dos tubos enchufados de latón amarillo (*Fig 70*), con 2 1/2 cm. de diámetro; el tubo externo tiene en un extremo un dispositivo á modo de paralelógramo, con una rendija

---

(1) Cuesta el espectroscopio de bolsillo de VOGEL, casa de P. ALTMANN, 80 Mk., y los Sres. KAHLER & MARTINI piden de 70 á 80 Mk.

(2) El Dr. ROTHE, de Praga, lo vende por 5 florines.

(3) E. HERING.—Prager med. Wochenschr. 1886. 97.

cuya magnitud puede variarse, y el otro extremo truncado oblicuamente, es por el que mira el observador. Sobre la placa metálica (*m*) cuadrada de la hendidura hay dos pinzas-resortes, con las que se sujetará la cajita de cristal de caras paralelas continente del líquido objeto del examen. El tubo interno lleva, por el extremo próximo al truncado del tubo externo, un prisma montado de tal modo que al mirar se percibe el espectro, siguiendo la prolongación de una recta perpendicular al sitio por donde está el ojo examinador. El otro extremo del tubo interno tiene un diafragma, con el fin de impedir que los rayos luminosos reflejos entorpezcan el examen. Ambos tubos están ennegrecidos en su interior.

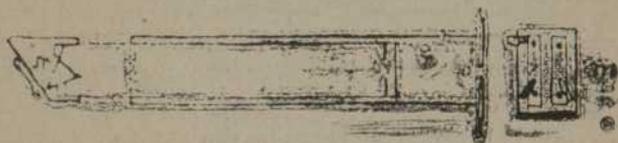


Fig. 70.—Espectroscopio de mano, sin lentes, de HERING.

Cuidese al manejar el instrumento de HERING, de que el espectro no aparezca en su eje longitudinal, para lo que conviene mirar, no en esa dirección, sino perpendicularmente á la oblicuidad del extremo del tubo externo, opuesto al que sujeta el líquido que se examina. Es preciso además procurar sea rectangular la imagen espectral, para lo cual giraremos el tubo interior, de modo que deslizando ambos tubos uno en otro consigamos detallar visiblemente aquella imagen.

Según clínicos de crédito, adiestrándose en el manejo de tal aparatito, percíbese un espectro, si bien estrecho,

muy claro, aunque el amarillo no está muy desarrollado. Á pesar de esto, destácanse fácilmente las bandas de absorción de la oxihemoglobina, por lo que es útil en investigaciones hemáticas.

Conocido el espectroscopio en sus variedades, veamos de qué manera nos valdremos de él para practicar el examen hemático. Los modos de operar varían, según queramos estudiar la **Hb.** en la sangre viva y circulante, en diluciones más ó menos abundantes de sangre extravasada, ó en diminutas cantidades de ésta, ó sea la microespectroscopia, feliz combinación de estos dos importantes instrumentos ópticos.

*b.*—Examen espectroscópico de la sangre circulando.—

Si colocamos—decía **VIERORDT**—ante la hendidura de un espectroscopio dos dedos aproximados ó juntos, de modo que el punto de contacto corresponda á la hendidura, y empleamos la luz solar, se verán las dos rayas de la **O-Hb.**; y si ligando ambos dedos con una goma—pr. ej.—retardamos la circulación, percibiremos cómo se sustituyen por la banda de **STOKES** aquellas dos rayas.

Otros proceden según los consejos de **HOPPE-SEYLER** y **STROGANOFF**, aislando primero un tronco vascular—carótida ó yugular del conejo—que se coloca luego entre dos láminas de cristal, que pueden aproximarse lo bastante hasta lograr se aplanen las paredes vasculares, de modo que llegará un momento en que adquieran tal transparencia que se verán aparecer las rayas dichas (1).

Estas maneras de estudiar la sangre en el seno de los

(1) *Arch. d. PFLUGER*, t. XII, p. 23.—pl. 2.

tejidos vivos, examinando por transparencia la oreja del hombre, la del conejo, la luz difusa transmitida por la palma de la mano, la pata de la rana, dedos ligados ó no, etc., cual lo hicieron FUMOUZE y VIERORDT; ó las metamorfosis hemoglobínicas en animales asfixiados, cual STROGANOW, no presentaban más interés que el de simples experiencias de curiosidad. En 1883, el ilustre hematologista HENOCQUE demostró su importancia y le convirtió en método, extendiendo sus aplicaciones hasta el punto de poder comprobar en los tejidos vivos de diferentes animales la presencia de la oxihemoglobina, apreciar la transformación de ésta en Hb. reducida, y determinar por el examen espectroscópico de los tejidos vivos, no sólo la cantidad de oxihemoglobina contenida en la sangre, si que también el tiempo que dura su reducción en el seno de aquellos tejidos, de modo que puede utilizarse cual medio medidor de la actividad en los cambios entre el pábulo nutritivo y los tejidos.

En el hombre puede examinarse con el espectroscopio de visión directa y á la luz difusa la superficie de la palma de la mano, la oreja, los tegumentos de la cara, el lóbulo de la nariz, la conjuntiva palpebral, los labios y los dedos. Se percibe una banda ligeramente obscura, como nebulosa, colocada entre el rojo y el verde. Escóge-se de preferencia el pulgar, á cualquier otro dedo, pues, á la facilidad de aplicar pronto la ligadura, ofrece la ventaja de presentar una falangita fácil de aislar y una lunula subungueal más desarrollada que en los otros dedos. Antes de ligarle, se percibe claramente la 1.<sup>a</sup> banda de la O-Hb., pero con dificultad la 2.<sup>a</sup>; si se aplica rápida-

mente la ligadura con una goma, y se sigue observando, se verá á la 2.<sup>a</sup> banda palidecer pronto y desaparecer en cortos segundos; la 1.<sup>a</sup> banda comienza también á palidecer, y á los 30" se pone tan delgada que al fin se ve el amarillo bruscamente; momento llamado del *virage* ó cambio, pues á partir de él, y como al cabo de un minuto, desaparece también, dejando el espectro solar reflejado por la uña. La reducción quedó ultimada. Si se quita la ligadura vuelve á aparecer esa banda con intensidad mayor que antes.

La aparición de las rayas de absorción de la **Hb.** reducida ocurre—según HENOCQUE—en el estado normal á los 70" (término medio), en tanto que, en los estados anémicos dicho espacio de tiempo queda reducido á 30".—Para simplificar las observaciones clínicas de estos hechos ha propuesto HENOCQUE la siguiente fórmula:

$$E = \frac{M}{D} \times 5$$

E = energía de reducción;

M = cifra media de la cantidad de **Hb.** obtenida por este método;

D = tiempo (en segundos) necesario para la reducción.

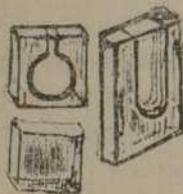
Esta ecuación se apoya en los siguientes datos: en una sangre que tenga 14 gramos de oxihemoglobina por 100 de sangre, la reducción aparece á los 70"; y en una que contenga 13, á los 65". Así, pues, en ambos casos será la  $\frac{1}{5}$  parte la cantidad de tal cuerpo reducida, en 100 grm. Para medir el valor de E debemos multiplicar por 5 la cantidad de oxihemoglobina y dividirla por el tiempo que ha sido necesario para que aparezca la reducción.

c.—Examen espectroscópico directo de la sangre.—

Para investigar directamente la materia colorante hemática, puede procederse de dos modos fundamentalmente distintos, según diluyamos más ó menos la sangre, ó si la examinamos con variables espesores, pero sin mezclarla con ningún menstuo extraño á ella.

Para ejecutar la observación hemoglobínica, según la manera primera, debemos indicar ante todo las cubas hematinométricas y luego dar las reglas á que nos ajustaremos en la confección del soluto y en el modo de hacer la determinación que se pretende.

Ahora bien, desfibrinada la sangre y diluida, cual luego diremos, se vierte en unas vasijitas de cristal llamadas *cubas de absorción ó hematinométricas*. Estas transparentes cubetitas se colocan sobre un soporte ó plataforma movable, y se aplican directamente ante la hendidura del espectroscopio. Inalterables al agua, alcohol y ácidos, se fabrican en las más variables formas y tamaños (*Fig. 71*), si bien siempre presentando dos opuestas caras perfecta-



*Fig. 71.*—Cubas hematinométricas de varias formas.

mente paralelas: las hay en forma de cubo y de prisma rectangular, en forma de **U** y de botella aplastada, de tubo aplastado más ó menos largo y ancho, de una sola cavidad ó de dos (*Fig. 72*), en cuyo caso se llaman de doble absorción, y utilizables en comparativas observaciones ejecutadas á la par; con ó sin tapadera movable ó fija; de

capacidad mayor ó menor, pero fija, ó bien de capacidad

variable, dada la construcción de sus paredes paralelas, que al ser movibles pueden distanciarse cual se desee.

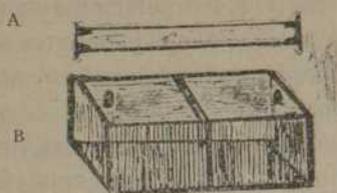


Fig. 72.—A. Tubo aplastado de cristal  
B. Caja de doble absorción.

HERMANN utiliza una cubetita que á favor de un tornillo pueden aproximarse sus caritas paralelas, indicándose el grado de aproximación, y de consiguiente, el espesor de la capa sanguínea allí encerrada, por medio de una escala graduada externa.

Á falta de estas cubetitas, pudiéramos utilizar los frascos diminutos de caras paralelas que se expenden en el comercio de perfumería, ó bien el lactoscopio de DONNÉ, el cromómetro de BIZZOZERO (*Figs. 51 á 53*), ó cualquier otra vasija análoga.

Para hacer la mezcla acuoso-hemática procuraremos disponer de sangre recientemente extravasada (DRAGENDORFF), y que el agua que empleemos esté destilada hace poco tiempo. Las diluciones deben ser muy limpias, pues una simple opacidad ocasiona pérdidas luminosas considerables. Al comenzar conviene sea la dilución muy concentrada, con objeto de al diluir cada vez más observar las progresivas modificaciones, frecuentemente muy características, que sufre el espectro. Dilución progresiva que cesará cuando adquiriera un color cual el de la flor del melocotón. Es operación incómoda, cuanto que al comenzar la observación precisa diluir una nueva cantidad de la primitiva mezcla, lo cual constituye un gran inconveniente, en lo que respecta á las precisas investi-

gaciones biológicas, y en donde, por otra parte, no se dispone de ordinario más que de cantidades muy cortas de líquido.

En resumen: si mezclamos 1—2 gotas de sangre, con 4—5 gr. de agua destilada, y depositamos la mezcla en una cubetita, que enseguida se coloca frente la hendidura del espectroscopio, se reconocerá en el espectro producido dos anchas bandas oscuras de posición constante é invariable. Ambas están situadas entre las rayas D y E; una en el amarillo, otra en el verde. Disponiendo el aparato de modo que el espectro total ocupe 100 divisiones y que el punto 40 del micrómetro coincida exactamente con la raya D del espectro solar, puédesse determinar con precisión el lugar y número de divisiones ocupadas por cada una de esas bandas características de la Hb. oxigenada.

QUINCKE y RAJEWSKY instituyeron un proceder (1) que no es otro que el de PREYER (pág. 274) modificado, por lo que tan solo diremos que consiste en examinar el espectro de un haz luminoso *constante*, pasando, primero á través de una solución titulada de Hb., y después á través de la solución hemática que se desea analizar, y determinar los espesores de cada solución necesarios hasta la aparición del espacio verde intermediario entre las dos bandas. Las soluciones pueden introducirse, ó en un prisma hueco movable (QUINCKE), bien en un lactoscopio de DONNÉ (RITTER). Conviene adicionar á la sangre un trocito de potasa cáustica. Según PREYER, una disolución

---

(1) LAMBLING: *loc. cit.*—HENNING.—*Pogendorfs. Ann.*, t. CXLIX.

de 1 cm. de espesor y 0,8 p. % de Hb., manifiesta el efecto óptico antes dicho.

Esta manera de obrar dá unos resultados muy variables, á causa de las oscilaciones del haz luminoso, y sobre todo, por la inconstante sensibilidad de la vista, dado que se opera sucesiva y no simultáneamente con las dos soluciones que se van á comparar. El error medio representado por 2,5 gr. p. % de Hb., puede en ciertos casos elevarse hasta 10 p. %.—Hoy está abandonado, por cuanto contamos con el perfeccionado de HENOCQUE, por el que se examina la sangre sin mezclarla y en diversos espesores, y con precisión mayor sin dificultad grande.

Proceder hemato-espectroscópico de HENOCQUE.—Es un perfeccionamiento del método diafanométrico del mismo autor y de más positivos resultados que los espectroscópicos antes estudiados, por cuanto en ellos, al tener que diluir la sangre, es imposible permanezcan intactos sus componentes químicos y los asociamientos de ellos, en tanto que en éste al obrar sobre sangre pura, pocos daños sufrirá ésta en color, transparencia y reacciones espectroscópicas (1).

Colocando—dice el autor—el hematoscopio cargado de sangre pura delante de la hendidura de un espectroscopio (pr. ej. el de VOGEL), podrá observarse con variables espesores el espectro de absorción de la sangre, y comprobarse fácilmente la mezcla de oxihemoglobina, la pre-

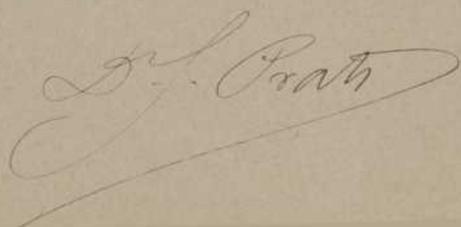
(1) HENOCQUE: Notice sur l'hématoscope, indications techniques, de ses applications. París. Masson ed. 1886.

A. HENOCQUE: Spectroscopie biologique. Spectroscopie du sang. Masson ed. 1894.

sencia de la metahemoglobina, hemoglobina oxicarbonica, etc.; de modo, que puede, en estas condiciones, servir el hematoscopio también para dosificar la Hb. de modo exacto.

Para ello se llena de sangre el aparato, según ya sabemos (pág. 309), y se somete al análisis espectral; en la escala milimétrica de la placa de cristal, se determina el espesor de la capa sanguínea indicadora de modo característico del contenido oxihemoglobinico. Para leer con facilidad la cifra de la escala, se colocará el aparato sobre una hoja de papel y ante una ventana por la que entre luz clara y difusa solar. El espectroscopio se colocará como á 1—2 mm. de distancia del prisma hemático, y luego se determina repetidas veces el punto de la escala en que se señalen con claridad las rayas de absorción. De las cifras obtenidas, que ordinariamente suelen presentar una variación de 2—3 mm., se elige el término medio que ha de servirnos para las determinaciones más adelante expuestas. Es cierto—cual dice JAKSCH—que todas estas apreciaciones tienen algo de arbitrarias, siendo siempre discutible el punto preciso en que se marcan las rayas con tinte negro, igualmente obscuro; pero, cuando se tiene costumbre de apreciar con la vista una intensidad determinada de las mismas, no es difícil apreciar dicha intensidad en cada caso particular.

Teniendo en cuenta el sitio de la escala, en el que se leen las rayas, fácil es apreciar el espesor de la masa sanguínea, y por tanto, la cantidad de materia colorante contenida en la sangre. La normal que guarda 14 p. %, muestra claramente las rayas en la división 14 de la es-



cala. Según lo dicho en otro lugar, esta división corresponde á un espesor de la capa sanguínea de  $14 \times 0,005$  mm. = 0,07 mm.: suponiendo que las rayas no aparecen claramente hasta la división 20 de la escala, el espesor de la capa sanguínea corresponderá á  $20 \times 0,005$  mm. = 0,1 mm. Con estas cifras se puede calcular el contenido de oxihemoglobina de 100 gr. de sangre por medio de la proporción:  $x : 14 :: 0,7 : 0,005 \times y$

$$x = \frac{14 \cdot 0,07}{0,005 \times y}$$

En cuya ecuación:

$x$  = la cantidad de oxihemoglobina buscada;

14 = la que normalmente encierran 100 gr. de sangre;

0,07 = el espesor de la capa sanguínea en la que una sangre que contuviera 14 p. % (sangre normal) presentaría claramente las rayas de absorción;

0,005 = el espesor de la capa sanguínea que corresponde á 1 mm.;

$y$  = la cifra leída de los milímetros, en la que son claramente visibles las rayas.

Ahora bien; aplicando esta fórmula á nuestro ejemplo:

$$x = \frac{14 \times 0,07}{0,005 \times y} = \frac{196}{y}; \text{ si } y = 20, \text{ tendremos } \frac{196}{20}$$

= 9,8. Lo que quiere decir que la sangre examinada contiene por cada 100 gr. 9,8 de oxihemoglobina.

Hay que advertir que el fenómeno de las dos bandas iguales se percibirán en general con un espesor, tanto más pequeño, cuanto mayor sea la riqueza en materia colorante. En evitación de cálculos, el autor ha trazado unas tablas de concordancia en las que están expuestas

las cantidades de **Hb.** que corresponden á espesores diferentes de masas hemáticas.

Este proceder merece un favorable juicio á JAKSCH y á Loos, después de ensayarle numerosas veces en la clínica del primero, y de compararle con el antiguo hemato-espectróscopo de M. THIERRY, que apenas si ya se usa.

*d.*—Micro-espectroscopia.—Habiendo demostrado HOPPE-SEYLER, VALENTÍN, PREYER, STRICKER, que es posible combinar el microscopio y el espectroscopio, al intento de reconocer las propiedades ópticas hemáticas, se instituyó este proceder investigador, del que ya en 1870, FOUOZE, se ocupó con gran lujo de detalles y puso de relieve las seguras condiciones de exactitud en que el médico se halla al practicar cuantas observaciones clínicas y médico-legales apetezca, aun contando con mínúsculas cantidades de sangre, que es su principal ventaja.

La combinación de estos dos aparatos ópticos puede hacerse de los modos siguientes:

1.º—Método alemán—(VALENTÍN-STRICKER.) Antiguo, incómodo y poco definidor. En un principio se manipulaba así: sobre el espejo de un microscopio se proyectaba el espectro proporcionado por un haz luminoso que atravesaba un prisma. Espectro que reflejado por el espejo, atravesaba una lente situada bajo el agujero de la platina y el preparado hemático sobre ésta colocado; aquella lente tenía por objeto reunir los colores espectrales en una imagen muy pequeña, perceptible al nivel de la cara superior del porta-objetos. Practicábase la observación haciendo pasar poco á poco diversos campos del preparado, de modo que se compararan á la vez la sangre, el espectro

sobre ella proyectado y las modificaciones sufridas en éste. Esta ejecución es incómoda; tanto que ya FOUZOZ, así comprendiéndolo, decía: «aparte de que es preciso lograr y buscar por tanteo la respectiva posición que conviene dar al prisma, espejo y microscopio, necesitase operar en cuarto oscuro, á fin de evitar lo más en absoluto, la mezcla de luz blanca. En fin, deja mucho que desear el empleo de la lente».

En evitación de tales inconvenientes, hánse ideado disposiciones especiales que facilitan el estudio de las actuaciones espectrales sobre preparados hemáticos. Tales son las imaginadas por HARTNACK y por ENGELMANN, que construye C. ZEISS con la precisión que acostumbra.

El *iluminador monocromático* de HARTNACK produce por medio de un sistema de dos prismas de gran dispersión, un extensísimo espectro que se proyecta bajo la preparación. Prismas encerrados en un cilindro encorvado que en sus extremos tiene lentes plano-convexas (con las caras planas dirigidas hacia fuera), y en un extremo una hendidura variable de sitio y tamaño. Así construido, y con fuertes aumentos, todo el campo se halla iluminado por una luz casi cromática. Púedese á voluntad, y por medio de dos tornillos diversos, variar la anchura del haz luminoso y la posición del color espectral que se quiere hacer actuar. Adáptase el aparato fabricado por ZEISS (1) á la montura del aparato de ABBE.

Para observar y medir los efectos ejercidos por los colores del espectro sobre porciones microscópicas hemáti-

---

(1) Cuesta 80 Mk. casa de C. ZEISS, de Jena.

cas, construye también ZEISS, según instrucciones de ENGELMANN, un *objetivo micro-espectroscópico* (1), consistente en un tubo de unos 77 mm. de largo, que tiene una hendidura de mecanismo ordinario en su extremo inferior y enfrente de un espejo movable, un colimador y un prisma de AMICI en su interior, y un objetivo proyector en su extremo superior. Este tubo se coloca en el eje óptico, bajo la platina del microscopio, desde donde proyecta un espectro real en el preparado hemático que se desea observar. Las dos planchitas de la hendidura se mueven simétrica y paralelamente por tornillo de vueltas opuestas; gracias á esta disposición, el centro de la hendidura no cambia de sitio. Dicho tornillo lleva un tambor graduado, cuyas divisiones nos dicen, en centésimas de milímetro, la anchura de la hendidura.

2.º—*Método inglés*.—(BROWNING, SORBY.) De más universal utilización por lo cómodo y exacto, cuando se trata de examinar los espectros de absorción de una parcela hemática constituyente de un preparado histológico, y que consiste en la feliz combinación del espectroscopio de visión directa y el ocular de un microscopio, de tal modo, que la hendidura de aquél coincide exactamente con la imagen real que el ocular debe ampliar.

Este instrumento llamado micro-espectróscopo, imaginado y empleado primero por SORBY, ha sido perfeccionado después por ZEISS, según los sabios consejos del gran físico ABBE, que le denomina *ocular-espectroscópico*, (*Fig. 75*) está constituido por dos diferentes monturas ó

(1) *Botan. Zeitung*. 1882, núm. 26.—*FLUGER'S Archiv*, Bd. XXVII y XXIX. Cuesta 134 Mk. casa de ZEISS.

tubos unidos á distancia por un tornillo K, que facilita el desplazamiento de ellos, pr. ej., para hacer el enfoque previo, y una palanca L, por la que se inmoviliza el tubo superior al inferior y se mantienen acordadas sus posiciones axiales (1).

El tubo superior J, pieza principal del aparato, encierra un sistema de prismas de AMICI, de fuerte dispersión y equilibrados en su posición vertical y axial por un resorte Q. Dos diafragmas cierran los extremos del tubo. Existe en la parte superior y lateral un tubito R. N, que lleva una escala graduada en fracciones de micromilímetro, la cual, iluminada por el espejo O, sirve para indicarnos, proyectada sobre el espectro, la longitud de la onda de aquella porción espectral sobre que se halle. Un tornillo P, más abajo situado, sirve para orientar exactamente la escala sobre el espectro.

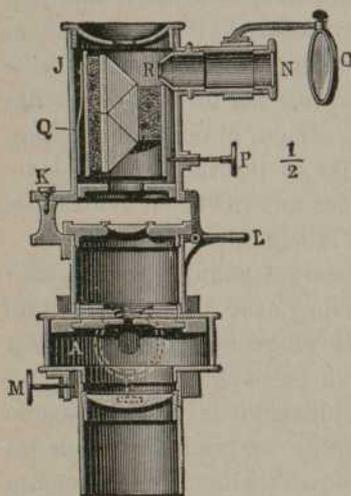


Fig. 73. Micro-espectroscopio de ABBE-ZEISS  
Corte vertical;  $\frac{1}{2}$  del tamaño natural.

La montura ó tubo inferior del aparato, es un ocular entre cuyas dos lentes, de las que la superior es acromá-

(1) Su precio casa de ZEISS = 200 Mk.; R. & J. BECK piden de 6 á 7 L.; HARTNACK pide 96 Mk.; KORITSKA, pide 205 fr.

tica y con ella se puede enfocar la hendidura, existe un ensanchamiento á modo de tambor A, que se compone de (Fig 74): dos placas B, C, que por un movimiento (sistema MERZ) simétrico y simultáneo, producido por un tornillo F, dejan entre sí una hendidura variable (á voluntad) de anchura, hasta el punto que se puede agrandar tanto que se vea todo el campo. Por medio de otro tor-

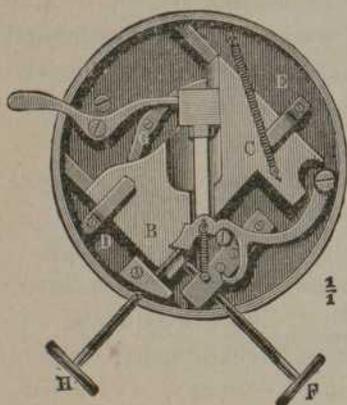


Fig. 74.—Disposición interna del tambor y hendidura del ocular espectroscópico de ABBE-ZEISS.

nillo H, se puede acortar más ó menos la hendidura, de modo que cuando no se utiliza el prisma de comparación, puede la abertura estar completamente ocupada por la imagen hemática que se investiga. En este tambor existe un prisma de comparación con soporte lateral y resorte de presión que sirve para fijar los objetos de comparación y el espejo iluminador.

Todo el aparato se coloca en el sitio de los oculares ordinarios, introduciéndolo por arriba en el tubo y fijándolo por un tornillo M, en tal posición, que los dos espejos O y A iluminan á la vez por reflexión de la misma luz solar, el prisma de comparación y la escala.

Supongamos ahora que se trata de observar las modificaciones que en el espectro se presentan al examinar una parcela hemática. Colocada ésta en un porta-objetos,

pr. ej., y situado éste en la platina del microscopio, se separa una de otra las dos porciones del aparato, haciendo girar la superior J, Q, N, P, al rededor del tornillo K. Se enfoca y examina la sangre con el ocular; cuando tengamos una imagen clara se vuelve y fija en su posición axial la porción desplazada; se dispone la escala y da á la hendidura la magnitud conveniente. Se utiliza el prisma de comparación por medio de una palanquita que permite penetrar á la luz á través de la ventanita lateral correspondiente á este prisma. Se *anota* entonces la *posición* y el *número* de bandas de absorción que en el espectro se manifiesten.

Constrúyense instrumentos más sencillos que el anterior, en los que se ha suprimido la escala graduada y el prisma de comparación. Puede asegurarse que los ópticos que construyen mejores aparatos de esta índole son ZEISS, en el continente europeo y R. J. BECK, de Londres, que ofrece dos microespectroscopios, modelo SORBY, diferentes: uno para microscopios mono-oculares, y otro para binoculares con escala adaptable y separable á voluntad.

La sangre que vayamos á examinar se acondicionará en delgada capa y sin menestruo extraño alguno, bien entre un porta y un cubre-objetos, bien en un tubito capilar. Si hubiere precisión de diluir la sangre, deberán filtrarse escrupulosamente. Si vamos á examinar esta solución por el espectro lateral, se verterá en un tubito ó probetita que incluyen los fabricantes con el aparato. Se cierran con tapón de goma y se fijan horizontalmente por los resortes laterales. BIZZOZERO, dice, que es mejor sostener la probeta con la mano en posición vertical, toda

vez que basta escasa altura de capa hemática para modificar el espectro. El espejo lateral inferior se encarga de iluminar dicha probeta.

Para el examen por el espectro vertical, se vierte la solución en un cristal de reloj con planicie en su cara convexa, y coloca éste en la platina. De este modo, vertiendo más ó menos solución en el cristal se hará variar el espesor de la capa líquida, y se modificará diferentemente el espectro. Para aquellos casos—ej. algunos periciales, cual en su lugar veremos—en que el líquido es poco abundante y necesitamos disponer capa gruesa, uti-

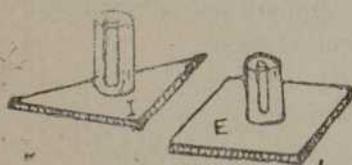


Fig. 75.—Celdas para exámenes micro-espectroscópicos. (Prelio 8 e).

lizaremos en sustitución del cristal de reloj, ó de un portaobjetos escavado, ó unos pequeños recipientes de cristal, construidos con diversas formas y espesores, siendo los más



Fig. 76.—Porta-objetos con celda oblicua de Beck.

recomendables los de BECK (Figs. 75 y 76). Podemos construir uno por nosotros mismos, con solo pegar cuatro pequeños y cuadrados cubres á un porta, por medio de la laca KROENING (pág. 43) ó bálsamo del Canadá seco, de modo que nos resulte una cajita cúbica análoga á la celda de BIZZOZERO (Fig. 77).

**d.**—Métodos espectrofotométricos—Este proceder óptico determinativo de la **Hb.**, consiste en medir la dismi-

nución de intensidad que sufre un fascículo de luz homogénea, pasando al través de una solución de Hb., y deducir de esta debilitación la concentración del licor.

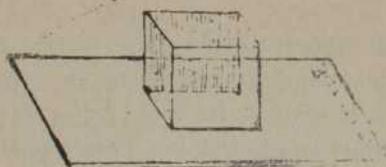


Fig. 77.—Celda de BIZZERO para investigaciones microespectroscópicas.

Partiendo del hecho, demostrado por la experiencia, de que para un mismo espesor de cuerpo colorante la debilitación relativa de la intensidad luminosa es constante, cualquiera sea la intensidad inicial, fácil será establecer la relación

$$I' = \frac{I}{n^e}$$

en donde  $I'$ , indica lo que sería la intensidad  $I$  del rayo inicial á su salida de una lámina de espesor  $e$ , si para un espesor  $= 1$  la intensidad llega á ser  $\frac{I}{n}$  (1).

Si se supone la intensidad inicial  $I = I$ , se tiene

$$I' = \frac{I}{n^e} \quad \text{ó} \quad I' = n^e \quad (a)$$

Tal es la ley de absorción de la luz para espesores variables de una solución colorante cualquiera.

Denomina BUNSEN *coeficiente de extinción*  $\epsilon$  de una solución coloreada, la trasposición del número que expresa el espesor bajo el cual es necesario examinar esta solu-

(1)  $n$  es, pues, el número que expresa la inversión de la intensidad adquirida después que la luz ha atravesado un medio de espesor  $= 1$ . Se toma generalmente el espesor de 10 milímetros por unidad.

ción para que ella reduzca á 10 de su valor primitivo la intensidad del fascículo original.

Este coeficiente  $\varepsilon$  se calcula por observaciones fotométricas y de una vez para siempre.

Si suponemos, en efecto,  $I' = \frac{I}{10}$ , la ecuación (a) anterior dá  $n^e = 10$ ; de donde, según los logaritmos vulgares:

$$e \log. n = I, \text{ ó } \log. n = \frac{I}{e}.$$

Para un espesor  $e$  cualquiera se tiene por consiguiente:

$$\varepsilon = \frac{\log. I'}{e}.$$

En particular, si se observa bajo un espesor de 1 centímetro (siendo  $e = 1$ ), se tendrá

$$\varepsilon = - \log. I' = \log. \frac{I}{I'}. \quad (b)$$

Fácil es probar y comprender que el *coeficiente de extinción* de una solución es proporcional á su riqueza  $c$  en materia colorante.

De modo que si designamos por  $c, c', c''$  las concentraciones respectivas de una misma substancia y por  $\varepsilon, \varepsilon', \varepsilon''$  los coeficientes de extinción correspondientes se tendrá

$$\frac{c}{\varepsilon} = \frac{c'}{\varepsilon'} = \frac{c''}{\varepsilon''} = A.$$

Esta cantidad  $A$  constante, tal cual se ve para cada substancia colorante, ha sido designada con la denominación de *relación de absorción*.

Como se acaba de demostrar, se tiene:  $A = \frac{c}{\varepsilon}$ , y

es fácil de determinar, una vez para siempre,  $A$  para una concentración  $c$  igual á la unidad. Relación que varía un poco con cada clase de luz, y es más práctico, según los casos, relacionarla á tal ó cual región del espectro.

Se determina midiendo el coeficiente de extinción  $\varepsilon$  de una serie de soluciones de concentraciones conocidas (*Concentración = peso de substancia activa por centímetro cúbico de licor*).

Se ha hallado así para la luz que responde á la banda  $\beta$  de la oxihemoglobina, un valor de  $A = 0,00100$  para la oxihemoglobina del perro;  $0,001105$  para la de la rata;  $0,001014$  para la del puerco;  $0,0010$  para la del hombre.

Para la hemoglobina reducida del perro se tiene  $A = 0,001351$ ; para la carboxihemoglobina  $A = 0,001000$ ; por último, para la metahemoglobina  $A = 0,002798$ .

Se tendrá, pues, (según la igualdad  $A = \frac{c}{\varepsilon}$ ),

$$c = A \varepsilon; \quad (e)$$

ecuación que dá la concentración  $c$  cuando se conoce  $A$ , y cuando se ha determinado  $\varepsilon$ , cual acabamos de decir según la ecuación (b).

Como comprobación experimental,  $\varepsilon$  no resulta más que de la determinación de la intensidad  $I'$  de una luz de intensidad  $I$ , después que ella ha atravesado una capa de substancia colorante, de espesor igual á la unidad, y conteniendo la unidad de peso de esta substancia bajo la unidad de volumen.

Todas las anteriores consideraciones son aplicables á

medir la intensidad de las substancias coloreadas en general.

Particularizando al examen hemático, la determinación de esta intensidad dará proporcionalmente la cantidad de Hb. que contenga.

Manipúlase del modo siguiente, según el sabio químista GAUTIER: Se miden, con las precauciones dichas al tratar de la numeración hemática, 0<sup>cc</sup>.02 de sangre y se diluyen al 1 : 200; se coloca la dilución en cubetitas de unos 11 mm. En la  $\frac{1}{2}$  inferior de esta cuba se habrá sumergido un paralelepípedo de flint de 1 cm. de espesor. Dos haces de luz, procedentes de una cestita de zircón incandescente, atraviesan: el primero la parte superior de la cuba, que allí tiene 11 mm. la capa líquida; el segundo la inferior, que solo tiene 1 mm. de espesor la dilución colorante. Ocurre, pues, en este caso cual si la luz blanca atravesara por lo alto 1 cm. de materia colorante, y en cambio por abajo permaneciera inalterable. El doble haz así obtenido penetra por la hendidura de un aparato especial espectroscópico que se llama *espectro-fotómetro*, de los que luego describiremos alguno.

Se trata de medir la intensidad relativa de dos haces: para lo que es necesario comparar, no los espectros completos, sino una de sus partes homogéneas.

Ha demostrado la experiencia que es mejor escoger la región donde se forma, para la sangre oxigenada, su 2.<sup>a</sup> banda de absorción ( $\lambda = 540$  aproximadamente). El resto del espectro queda oculto en el aparato por pantallas especiales.

Percibe el operador, de consiguiente, dos regiones lu-

minosas en la lente: una inferior, que corresponde á una luz casi blanca y brillante; otra superior, iluminada por el mismo fascículo luminoso, pero después que ha atravesado 10 mm. de dilución hemática. Trátase, pues, para calcular  $c$ , según la ecuación (e) anterior ( $c = A \varepsilon$ ), de recoger los elementos de medida del *coeficiente de absorción*  $\varepsilon$ , haciendo que el brillo de la región luminosa inferior sea igual á la de la superior.

Consíguese este fin de modo diferente con los diversos procederes y aparatos espectro-fotométricos empleados: el primero fué el de VIERORDT, y después se han ido perfeccionando por TRAMIN, de VIOLLE, BRAULY, HUFNER y ENGELMANN, cuyos dos últimos son los más precisos, de resultados más exactos y más fáciles de manejar.

a.)—Proceder de VIERORDT.—Decía este autor: si se deja caer luz blanca sobre un sitio  $a$  de una superficie coloreada, pr. ej., una región del espectro solar, aquel sitio  $a$  aparecerá tanto más blanco, cuanto más intensa sea aquella luz; si luego debilitamos poco á poco dicha luz por medio de cristales diferentemente ahumados, pero cuyo poder absorbente sea perfectamente conocido, el sitio  $a$  recobra más y más el *tono* del color primitivo, de modo, que en determinado grado debilitante de luz blanca, el color de  $a$  no es distinguible del color del fondo. Cuanto más haya necesidad de debilitar la luz blanca, para lograr tal resultado, tanto más el color correspondiente tiene una débil intensidad.

Para lograr la verdadera intensidad luminosa precisa obtener un *espectro típico*, que es una modificación del prismático en el que las líneas de FRAUENHOFER se apro-

ximan al violeta y separan del rojo. Para facilitar lo cual establecía unas tablas (1) que daban las intensidades de los diferentes colores espectrales.

Basados en estos datos, imaginó VIERORDT, el análisis espectral fisiológico aun para aquellas sustancias coloreadas que no presentaban rayas de absorción de ninguna clase, determinando el coeficiente de absorción para diferentes regiones espectrales.

Para determinar la cantidad de Hb., VIERORDT empleaba un espectroscopio modificado del modo siguiente: el antejo llevaba un mecanismo que podía ocultar todo el espectro, menos la región que se quería observar; la hendidura estaba dividida en dos partes, á voluntad cambiables de magnitud por tornillos micrométricos; tornillos que graduados de 0 á 100 en su cabeza marcarían la anchura de la hendidura; el líquido coloreado le colocaba en una celdita (cajita de SCHULTZ), análoga en su disposición á la descrita en la pág. 330.

Para apreciar la luz absorbida por la capa líquida, basta estrechar la  $\frac{1}{2}$  inferior de la hendidura hasta igualar la intensidad luminosa; de modo, que si la hendidura inferior está en el 25° de la escala, y la otra tiene un anchor de 100°, la intensidad luminosa restante será = 0,25. Tomando la intensidad luminosa primitiva como unidad, el líquido hemático ha absorbido, pues, 0,75 de luz.

Para conocer el *coeficiente de extinción* de una sustancia, bastará extraer de la unidad el logaritmo de la cifra

---

(1) BEAUNIS.—N. el. de Physiologie humaine, t. I., p. 194.

que representa la intensidad luminosa restante: así, si esta última, después de atravesar una capa de dilución de 1 centímetro de espesor, es = 0,36, cuyo logaritmo es = 0,77815, el coeficiente de extinción será  $1 - 0,77815 = 0,2218$ .

b.)—PROCEDER DE HÜFNER.—La dosificación de la Hb., según este proceder, exige la fijación previa de la relación de absorción de la substancia colorante para región espectral dada. Relación obtenida la primera vez por HÜFNER (1) en el perro. Válese de un espectrofotómetro que presenta una mejora del anterior. La principal modificación consiste en utilizar luz polarizada, gracias á la que el color de la región espectral observada queda perfectamente pura.

En efecto, la hendidura del espectrofotómetro de HÜFNER da paso á dos haces contiguos, de los que uno polarizado por un nicol llega directamente al aparato y al ojo, en tanto que el otro permanece en el estado de luz natural y atraviesa la dilución hemática. El ocular posee á su alrededor un nicol analizador, cuya rotación se mide en un círculo graduado. Estando colocado el analizador en el cero, se interpone sobre el trayecto del haz no polarizado la cuba continente de sangre. Cubetita de caras paralelas de 10 mm. de espesor, que se coloca por delante—arriba ó abajo—de la hendidura que no recibe haz polarizado. El fascículo polarizado, no habiendo atravesado sangre diluida, aparece más brillante; de modo que el observador restablece la igualdad entre los dos fas-

---

(1) Zeitschr. f. physiol. Chem., t. III.

cículos, superior é inferior, volviendo el analizador de un ángulo  $a$ , que se medirá sobre la periferia graduada.

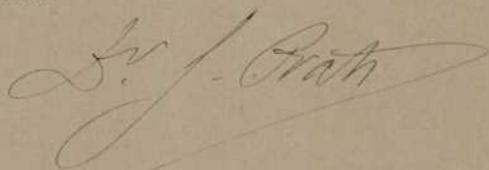
Según lo que al comienzo decíamos, y dada la ley que subordina la intensidad  $I'$  del haz polarizado á la intensidad  $I$  primitiva y al ángulo  $a$ , que forman las dos secciones de los dos nicols, se tiene  $I' = I \cos.^2 a$ . Si la observación tiene lugar con 1 cm. de espesor, cual antes dijimos, y se hace  $I = I$ , tendremos:

$$\varepsilon = -\log. I' - 2 \log. \cos. a.$$

Habiendo sido determinados los valores  $\varepsilon$  y  $A$  de una vez por todas, para la **Hb.** de diversos orígenes, se calcula concentración  $c$ , antes definida, por la ecuación  $c = A \varepsilon$  que ya se estableció.

La dificultad mayor del proceder que nos ocupa estriba en lo delicada que resulta la operación de fijar el título de disolución oxihemoglobínica. Para ello sírvense HÜRNER y v. WOORDEN de una jeringa que aspira la sangre y luego la vierte en un tubo lleno de mercurio, donde se desfibrina al abrigo del aire por agitación, y se diluye convenientemente en agua purgada de oxígeno, y útil, de consiguiente, para el examen fotométrico. Para estas manipulaciones, sirve un aparatito de cristal en forma de bola y con triples llaves, lo cual facilita operar sin aire. Aparatito que su espacio mayor esférico se llena de agua, y el menor de sangre desfibrinada; ambos espacios al ser previamente tarados con mercurio en sus respectivos volúmenes, nos proporcionarán luego un grado conocido de dilución hemática.

Una vez obtenida la dilución titulada, se lleva al aparato espectral y se averiguan los coeficientes de extinción



en dos regiones diferentes del espectro. La escogida en primer término, y más frecuentemente, es la correspondiente á la 2.<sup>a</sup> banda que va de D 63 E á D 84 E.

Ahora bien, para la simultánea dosificación de la **Hb.** y la **O-Hb.**, si designamos:

$A_o$  y  $A'_o$  las relaciones de absorción de la oxihemoglobina en dos regiones espectrales;

$A_h$  y  $A'_h$  las de la **Hb.** en las mismas regiones;

$E$  y  $E'$  los coeficientes de extinción del líquido hemático;

v el volumen ( $m + n$ ) de los espacios del aparatito de bolas;

los pesos de la **Hb.** y de la **O-Hb.** por 100 cm.<sup>3</sup> de sangre, nos los darán las fórmulas siguientes:

$$\text{Hb.} = \frac{v \times 100}{m} \cdot \frac{A_h A'_h (E' A'_o - E A_o)}{A'_o A_h - A_o A'_h};$$

$$\text{O-Hb.} = \frac{v \times 100}{m} \cdot \frac{A_o A'_o (E A_h - E' A'_h)}{A'_o A_h - A_o A'_h}.$$

Doble dosificación que puede comprobarse fácilmente agitando al aire la sangre, de modo que se oxide toda la materia colorante y determinando al espectro-fotómetro la riqueza en **O-Hb.**

HORNER y sus alumnos han aplicado igualmente este método á estudiar cualitativa y cuantitativamente la metahemoglobina también.

Conviene tener en cuenta, que poseyendo la sangre un poder colorante considerable, precisa hacer una gran dilución de ella: 1 : 150 ó bien 1 : 200, para facilitar el análisis espectral. Conviene hacer estas investigaciones con varios espesores diferentes (de 1—2—3 cm.) para

comprobar y hallar más exactitud. Hay quien aconseja que, con objeto de dar á la dilución una mayor limpidez, se le adicione una parcela de sosa ó carbonato de sosa seco.

Han demostrado KERNLOFF y LEICHTENSTERN que dicha adición disminuye ligeramente el coeficiente de extinción. La diferencia, sobre todo sensible para sangres leucémicas, débese á que la sosa aumenta la claridad del líquido al disolver los corpúsculos grasosos en suspensión.

Por último, según manifiesta FREMY, el error medio de cada investigación con el aparato de VIERORDT es de unos 2 gr. por 100; y con el de HÜFNER de 1,2 por 100. BRANLY se aproxima, según su testimonio, á 1 : 50.

c.)—PRECEDER DE ENGELMANN—Sirvese este autor (1) de un espectro-fotómetro construido esmeradamente por ZEISS, según los mismos principios que el de VIERORDT, pero de más fácil manejo y precisión (2).

Consiste (*Fig. 78*) en la caja A que se coloca sobre el tubo del microscopio en lugar del ocular ordinario y se fija por medio del cilindro R. Dicha caja lleva en su interior dos hendiduras movibles, independientes una de otra, superpuestas de modo que sus ejes se continúan, y que por medio del tornillo M, de dos vueltas opuestas, pueden ensancharse ó estrecharse simétricamente. Las anchuras de cada hendidura se indican exactamente en décimas de mm. sobre los tambores T y T', y se traducen

---

(1) Zeitschr. f. wiss. Mikroskopie 5, S. 289, 1889.

(2) Cuesta 480 Mk. casa de C. ZEISS, de Jena.

en milésimas. Una de dichas hendiduras se halla ocupada por la imagen hemática observada; la otra recibe la luz del haz luminoso que sirve de término de compara-

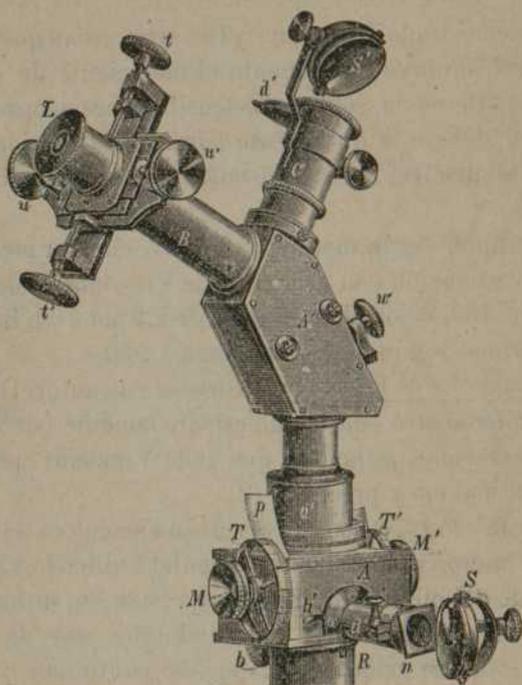


Fig. 78.—Micro-espectro-fotómetro de ENGELMANN.

ción, por medio de un prisma de reflexión y de un tubo *d* con lente colimador, porta-diafragma *n* y espejo *S*, que puede sustituirse por lamparita incandescente.

En la abertura superior de la caja *A* se enchufa un ocular que enfoca á la hendidura, ó bien—después de

enfocar la imagen de la preparación en la hendidura objetiva—el aparato espectroscópico  $a' A' B C$ , el cual se mantiene exactamente en vertical regularidad, y cual un compás abierto hacia arriba, por un resorte. Este aparato

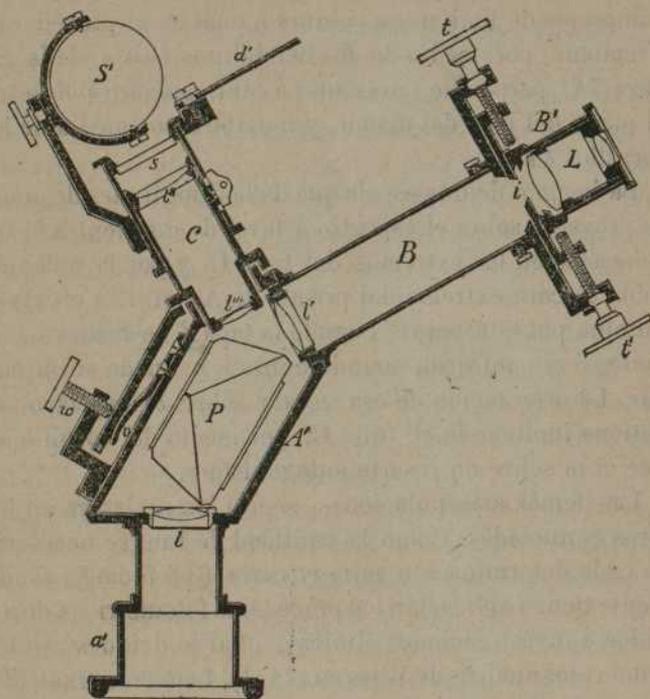


Fig. 79.—Micro-espectro-fotómetro de ENGELMANN visto en corte vertical.

(Fig. 79) se compone de la caja  $A'$ , que lleva en su unión con la extremidad superior de  $a'$  un colimador  $l$ , el cual paraleliza los haces originarios de la imagen antes de

caer sobre el prisma de RUTHENFOR P de gran dispersión. Los haces paralelos, al salir del prisma, son concentrados de nuevo por una lente  $l'$  adaptada en la extremidad inferior de B, de modo que el espectro real así obtenido, se observa finalmente á través del ocular L. El campo puede limitarse á voluntad, cual en el proceder de VIERORDT, por medio de dos hendiduras  $i$  ( $u u'$  de la *Figura 78*) perpendiculares una á otra, encontrándose en el plano del foco del ocular, y movibles por medio de los tornillos  $t t'$ .

La imagen de una escala que dá las longitudes de onda, se proyecta sobre el espectro á favor de dos lentes  $l' l''$ , colocadas en los extremos del tubo C, y por la reflexión sobre la cara extrema del prisma de AMICI. Esa escala se ilumina por el espejo S' cuando la tapa  $d'$  se desliza hacia fuera, ó al contrario, cuando cubre á s, queda sin iluminar. La orientación de esa escala sobre el espectro, se obtiene inclinando el tubo C, por medio del tornillo w, que obra sobre un resorte antagonista v.

Las demás manipulaciones, según las reglas ya en los otros enunciadas. Como la cantidad de sangre necesaria en cada determinación es muy corta (3 ó 5 cm.<sup>3</sup>), fácilmente tienen aplicación los procederes fotométricos destinados á investigaciones clínicas, cual lo demuestran los numerosos análisis de WISKEMANN (1), LEICHTENSTERN (2), BRANLY y QUINQUAD (3), OTTO (4), etc.

---

(1) Zeitschri. f. Biol., t. XII.

(2) Ueber den Hämoglobulingehalt des Blutes.

(3) Arch. gen. de méd. (VII) X.

(4) Arch. d. PFLUGER, t. XXXVI, p. 12.

e. — Métodos químicos determinativos de la Hb. — Los métodos técnicos dosificadores de la hemoglobina, basados en procedimientos químicos más ó menos perfeccionados, son los que van á ser objeto de estudio á continuación, si bien no con la extensión concedida á otros métodos ya conocidos anteriormente, dada la índole de este libro.

a.) — Determinación de la Hb. por el cloro. — Debido á QUINQUAUD, básiase en la decoloración sufrida por la sangre cuando se le adiciona agua de cloro. Para dosificar la Hb. total, basta conocer, una vez para todas, cuál volumen de agua de cloro decolora tal cantidad de hemoglobina cristalizada. En cuyo caso podremos servirnos de aquel licor titulado para decolorar un volumen dado de sangre.

b.) — Determinación de la Hb. por la cantidad de hematina formada. — Para efectuarla se transforma la Hb. en hematina y se pesa después de secarla. Hay que tener en cuenta que se admite que 1 gr. de hematina corresponde á 21,31 de hemoglobina (BROZET).

G. MÜLLER combina este proceder con el espectroscópico, del modo siguiente: mezclada la sangre con glicerina, se hace obre ácido nítrico diluido que hace desaparecer las rayas de oxihemoglobina, dejando las de hematina. Dosifica la oxihemoglobina por la cantidad de ácido necesaria para que ocurra la desaparición indicada.

Los procedimientos de CL. BERNARD y GREHANT, así como el de SCHUTZENBERG, mediante el hidrosulfito de sosa, los conoceremos más adelante, cuando describamos las determinaciones de los gases hemáticos, y principalmente de su oxígeno.

c.)—Determinación de la Hb. por la cantidad de hierro que entra en su composición.—Sábese, según los análisis de C. SCHMIDT (1), HOPPE-SEYLER (2), KOSSEL (3), BUCHELER (4), que las proporciones de hierro que encierran las diversas especies de Hb. son las siguientes:

Hombre. . .	0,42 p. <sup>o</sup> / <sub>100</sub> de hierro	Ahora bien, si admitimos que todo el hierro contenido en la sangre procede de la Hb., y designamos por F la cantidad de hierro recogida en
Buey. . .	0,42 —	
Perro. . .	0,43 —	
Ganso. . .	0,43 —	
Caballo. . .	0,47 —	
Cobaya. . .	0,48 —	

las cenizas de 100 gr. de sangre, el peso *p* de Hb. que corresponde á este peso de hierro será, si se trata, pr. ej., de sangre humana:

$$p = \frac{100}{0,42} F = F \times 235,1.$$

Para llevarla á la práctica la determinación que nos ocupa, seguiremos los consejos técnicos propuestos por PELOUZE, que es cual sigue: En una cápsula de platino de  $\frac{1}{4}$  de litro de capacidad, se evaporan dulcemente unos 100—130 gr. de sangre. El residuo se calcina al rojo oscuro durante dos horas; luego se mezcla con 10 cm.<sup>3</sup> de ácido clorhídrico, en caliente, diluido en su peso de agua. Adiciónase este licor poco á poco y después de filtrarle. Cada agotamiento deberá ser seguido de nueva calcinación; operaciones que se repetirán hasta que el

(1) A. BÖTTCHER.—Ueber Blutkrystalle. Dorpat. 1862.

(2) HOPPE-SEYLER.—Med. chem. Unters. Tübingen.

(3) KOSSEL.—Zeitschr. f. physiol. chem. t. II, p. 150.

(4) BUCHELER.—B. z. Kenntniss d. Plerde blutfarbstoffis. Tübingen. Dis. inaug. 1883.

carbón haya desaparecido enteramente. Por último, se calcina el mismo filtro, haciendo obrar sobre sus cenizas agua acidulada, de modo que el licor claro resultante se suma directamente á los anteriores.

Este licor total se diluye hasta 500 cm.<sup>3</sup>, y se le añaden 10 cm.<sup>3</sup> de solución de sulfito de sosa á 10 p. <sup>o</sup>/<sub>o</sub>. Luego se calienta y se hace hervir 3'—4'. Enfriado el líquido se mide 1 litro, y la sal ferrosa (cloruro) que contiene, transformada en férrica, se titula por medio de una disolución de permanganato de potasa.

Conviene ventajosamente operar la calcinación del residuo en hornillo de muflas de WIESNEGG, y no traspasar del rojo debil. Cuando la calcinación se hace á una temperatura muy alta, ó durante mucho tiempo, la disolución del óxido férrico es muy lenta, y exige para ser completa todo un día ó más. Por otro lado, bueno será recordar que la determinación del hierro por el permanganato no es muy exacta, cual le ocurre á la solución sulfúrica como lo ha demostrado FRESSENIUS (1).

Con las soluciones clorhídricas solo es posible la dosificación en presencia de cantidades ácidas muy débiles y muy diluidas. De aquí sea preferible actuar sobre las cenizas con diluciones sulfúricas, á las que se echará corta cantidad de clorato de potasa. Se calienta después durante el tiempo suficiente para eliminar todos los productos clorados, y se procede á la reducción por medio de un fragmento de zinc purgado de hierro. Bueno será escoger una solución de permanganato titulada, de modo

---

(1) Tr. d. anal. química cuantitativa. Trad. esp. del Dr. SERRET.

que 1 cm.<sup>3</sup> corresponda aproximadamente á unos 0 gr.,002 de hierro; de consiguiente, 25 cm.<sup>3</sup> de la solución son bastantes para peroxidar el hierro de unos 100 gr. de sangre. Sirviéndonos de una probeta graduada en 1 : 20 de cm.<sup>3</sup>, podremos limitar la cantidad de sangre en 50 gr. y disolver las cenizas en una cantidad volumétrica total de líquido de unos 100 cm.<sup>3</sup> De este modo podremos hacer 3—4 ensayos sucesivos con 20—25 cm.<sup>3</sup> cada vez.

El inconveniente que presenta este proceder es el de necesitarse grandes cantidades de sangre para ejecutarle, siendo largo, y poco seguro de manipular, y muy delicado. Su error es tal, que cualquiera sea la cifra obtenida deberemos multiplicarla por 238. Aparte de otros defectos señalados por MAGNIER (1), este proceder determinativo puede constituir y servirnos de contraprueba de otros métodos.

También se ha propuesto actuar sobre la sangre con una mezcla sulfúrico-nítrica, en tanto permanezca el residuo sensiblemente coloreado. Luego filtrar, saturar el licor, y adicionarle sulfocianuro potásico; comparar el tinte rojo así obtenido con las soluciones tituladas de comparación (2).

d.)—Determinación de la Hb. por el oxígeno absorbido.

—Sabido es que la Hb. y el O. forman el definido componente oxihemoglobina, que á una temperatura y presión determinada se desdobra, de tal modo que á la temperatura de 35° la de la sangre del perro comienza bajo una presión de 25 mm. de mercurio. En el vacío, y con

(1) MAGNIER.—Ber. d. d. chem. Gesellsch., VII.

(2) Bull. 3.ª serie, t. II, Julio 1889.

alto calor, esa disociación ocurre rápida y completamente, estando de modo evidente en relación la cantidad de oxígeno recogida con el peso de la materia colorante productora. De donde resulta que todo proceder determinativo del oxígeno hemático podrá servir para enseñarnos teóricamente la oxihemoglobina, si bien á condición de que sea conocido el volumen de **O.** fijado por la unidad de peso de la **Hb.**

Si bien es cierto que el suero tiene en disolución, según HUFNER, por cada 100 cm.<sup>3</sup> á 16° unos 0,38 cm.<sup>3</sup>, la proporción de gas disuelto á 37° es más débil y perfectamente despreciable, dadas las otras causas de error que llevan en sí las averiguaciones de los gases hemáticos.

Ahora bién; precisa averiguar la cantidad de **O.** que puede fijar 1 gr. de **Hb.** Esta cifra se puede teóricamente suponer así: si se admite que á 1 átomo de Fe. en la **Hb.**, corresponde 1 átomo de **O.**, la relación constante que *á priori* debe existir entre estos dos elementos será

$$\frac{\text{Fe.}}{\text{O.}} = \frac{56}{16} \text{ de donde } \text{O.} = \text{Fe.} \times 0,2857.$$

De modo: que si 100 gr. de **Hb.** (de tal especie animal), contiene 0gr.,42 de Fe., la cantidad de **O.** fijada será: 0gr.,42  $\times$  0,2857, ó 0gr.12 de **O.**, lo que dá 0cc.,8369 de **O.** por 1 gr. de **Hb.** Volumen gaseoso á 0° y 760 mm.

Por consiguiente, esta cifra es menor á todas las que ha proporcionado la experimentación.

Mas si no queremos admitir la relación complicada entre el **O.** y la **Hb.**, puédesse suponer que á 1 átomo de Fe. corresponden 2 de **O.**; lo que dará 0gr.,24 de **O.** puro

por 100 gr. de **Hb.**; ó 1<sup>cc.</sup>,67 de **O.** por 1 gr. de materia colorante.

Han intentado verificar estas miras teóricas por la experimentación directa los sabios HOPPE-SEYLER (1), DYBKOWSKI (2), PREYER (3), HUFNER (4), bien sometiendo á la acción del vacío ó del óxido de carbono soluciones tituladas de oxihemoglobina, y midiendo el volumen de oxígeno eliminado; bien determinando, al revés, por vía de absorción métrica, el volumen de oxígeno absorbido por soluciones de hemoglobina de riqueza conocida.

Las más exactas experiencias, que son debidas á HUFNER y sus discípulos, arrojan los siguientes resultados: 1 gr. de **Hb.**, al transformarse en oxihemoglobina, fija las cantidades de **O.** que á continuación apuntamos: en perro 1<sup>cc.</sup>,58; puerco 1<sup>cc.</sup>,68, y caballo 1<sup>cc.</sup>,83. Los procederes dosificadores los estudiaremos más adelante.

Para determinar la **Hb.** por el **O.** absorbido, GREHANT y GAURIER (5) aconsejan proceder así: por medio de una continua corriente de hidrógeno que pasa al través de sangre mantenida á 40°, se arrastra primero todo su **O.** disuelto ó combinado. Al cabo de 2—3 horas se trata esta sangre, en un aparato *ad hoc*, con un volumen conocido de **O.**, y se mide el volumen de este gas que haya sido absorbido. Sustrayendo entonces tantas veces tres décimas de cm.<sup>3</sup>, cuantos sean los cm.<sup>3</sup> de sangre empleada,

(1) Med. chem. Untersuch.—C. III.

(2) Med. chem. Untersuch.—C. I.

(3) De hemoglobine observationes, etc., diss. Bona.

(4) Journal f. prakt. Chem., t. XXII.—J. Otto. Zeitschr. f. physiol. Chem. t. VII. HUFNER & BUCHELER. Zeit. f. physiol. Chem., t. VIII, 1884.

(5) \* C. Rendu. LXXV, 697.

se tendrá el volumen V. de oxígeno transformado en oxihemoglobina. Este volumen, expresado en  $\text{cm.}^3$  y multiplicado por 0gr., 633, dará en gramos el peso de la **Hb.** contenida en el volumen de sangre investigada. Este procedimiento expedito es delicado para aplicarlo exactamente.

### III.—Quimiotecnia hemática.

Comprendemos en este capítulo, que convencionalmente denominamos *quimiotecnia*, los procederés, propiamente químicos, determinativos de los componentes sanguíneos. Abárcanse, pues, en esta parte los métodos investigadores de los principios inmediatos integrantes químicamente, no sólo del suero, si que también de los elementos morfológicos que al complejismo sangre constituyen.

De uno de ellos, del más interesante, de la **Hb.** ya de modo preferente la hemos dedicado antes de ahora un largo capítulo especial, dada su innegable importancia dinámica. Aparte de que—cual habrá podido apreciarse anteriormente—los métodos químicos investigadores de ella ocupan lugar inferior á los primordiales, sobre todo los ópticos, con los que la escudriñamos y determinamos en calidad y cantidad con inapreciables errores que le dan gran exactitud.

Así, pues, dejando por su peculiar carácter para más tarde y en capítulo aparte la determinación investigadora, los modos técnicos para obtener los gases hemáticos, veamos de qué maneras el agua, sales, albuminoides, hi-

drocarbonados y grasas sanguíneas pueden lograrse de-terminativamente.

Mas antes de exponer los especiales procederes dosifi-cadores de los materiales hemáticos de modo sucesivo y particular, conviene determinar el peso de cada uno de los grupos naturales que se pueden de la sangre separar ó aislar, bien por coagulación, ora diluyendo por disol-ventes diversos, bien por incineración.

Datos que nos permitirán—si antes se ha determinado por los métodos ya estudiados (pág. 155) los pesos relati-vos existentes entre glóbulos y plasma,—alcancemos una idea bastante exacta de la participación que los diversos materiales constitutivos tienen en la construcción globu-lar y en el liquido donde aquellos hemocytodos nadan y circulan.

### 1.º—Determinación en total de los materiales hemáticos.

Según testimonio de FREY y GAUTIER, el mejor método conducente á determinar en común cuantos materiales integran químicamente á la sangre, es el de HOPPE-SEY-LER (1), el cual vamos á explanar, tanto más, cuanto que —aparte de sus aplicaciones para análisis de igual índole de las serosidades—es el que deberemos emplear en las operaciones (*a* y *c*) del segundo procedimiento de dosage de los glóbulos, del mismo autor (véase pág. 156).

El modo de proceder es:

Se pesan 20—40 gr. de sangre, de suero, ó de glóbu-

---

(1) *Jahresbericht de Maly*, 1882-1886.

los lavados con agua salada,—según tratemos de determinar la composición del suero ó de los glóbulos,— y se les diluye en 4 vol. de alcohol frío á 83° C., previamente adicionadas 2—3 gotas de ácido acético. Se deja reposar 3—4 horas, transcurridas las que se vierte todo sobre un filtro sin pliegues empapado de alcohol. Se lava lo precipitado en el fondo con

alcohol caliente..... **Licor a**

después con una mezcla de alcohol y éter..... **Licor b**

y por último, con agua caliente hirviendo..... **Licor c.**

Después de estos sucesivos lavados, sólo quedan sobre el filtro las substancias albuminoideas, de las que en ocasiones pasan algunas porciones al licor **a**, donde más adelante las hallaremos. La albúmina coagulada que queda sobre el filtro es de nuevo lavada por el alcohol, y después por el éter, para separar por completo el agua de impregnación. Tras estas diversas actuaciones queda retirada, y entonces se puede con pinzas cogerla y llevarla á un cristal de reloj, que se pondrá en la estufa para desecarla á 120°—140°, y por último, se pesa después de enfriada bajo una campana con ácido sulfúrico. (**Precipitado A**)

Se opera enseguida con los diversos líquidos del lavado del modo siguiente:

El **licor a** se evapora á sequedad al baño-maría y el residuo se pone en digestión en el **licor b**. Queda un escaso residuo insoluble que se echa en un filtro chiquito sin pliegues, y después de lavar con alcohol absoluto se lava con éter. Consiste este residuo en materia albuminoidea mezclada á sales que se separan por medio del

**licor c**, y después otro lavado con agua fría. Se seca el residuo insoluble y se reúne al precipitado **A**, obteniéndose, así, una nueva solución alcohólica-etérea **b'** y una solución acuosa **c'**.

Aquella materia albuminoidea seca, total **A**, se incinera entonces, en capsulita de porcelana, con las precauciones ordinarias y con mechero de gas á baja temperatura, primero á carbonización, para que se separen las materias minerales solubles en el agua, y después al rojo, para obtener las cenizas insolubles. Ahora bien: si al peso **A** restamos el de las cenizas solubles é insolubles, así obtenidas, tendremos el peso de las substancias albuminoideas totales, secada á  $110^{\circ}$  = fibrina, hemoglobina, seroalbumina.

La solución acuosa **c + c'**, obtenidas cual hemos dicho por el lavado del primer coágulo con agua hirviendo, más el lavado último del residuo del **licor a**, contiene todos los principios hemáticos solubles en el agua é insolubles en el alcohol y en el éter, que son principalmente las sales minerales ú orgánicas. Si se evapora y luego se deseca tal residuo á  $110^{\circ}$ — $115^{\circ}$  y se pesa, y después se incinera lo restante, se podrá conocer la naturaleza y peso de las cenizas—sales minerales solubles—y por diferencia el de las materias orgánicas.

Las soluciones alcohólico-etéreas **b** y **b'**, que llevan consigo urea, glucosa, cloruro sódico, colesteroína, lecitina, grasas, se evaporan á sequedad en el baño maría, á temperatura menor de  $70^{\circ}$ , después en el vacío y el residuo se espesa por el éter seco, se echa sobre un filtro y se vuelve de nuevo á lavar con éter. Esta solución etérea

d encierra las materias grasas, la colessterina y la lecitina. El residuo seco á 100° e, contiene trazas de urea, glucosa, sales de ácidos orgánicos, sal marina.

El residuo e, insoluble en el éter, se separa del filtro por medio de una pincita y se recoge en una capsulita donde se evapora á 100° y luego á 110°, y por último, se espesa. Se incinera á seguida el residuo y se pesan las cenizas, cuyo peso, adicionado al del residuo del extracto acuoso c + c', representa las sales solubles.

La solución etérea d se evapora, y el residuo desecado se pesa luego.

Este método general que tanto es aplicable á la sangre en total, cuanto á cada una de sus partes—plasma, glóbulos—proporciona una primera determinación aproximativa de sus principales materiales constituyentes, que según GAUTIER son:

*Materias albuminoideas totales*

*Grasas, lecitina, colessterina*

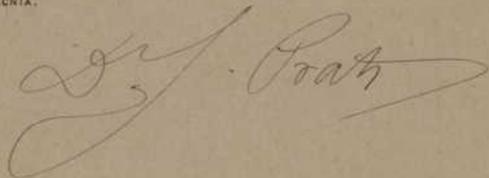
*Materias orgánicas solubles en alcohol*

*Materias minerales solubles*

*Materias minerales insolubles*

} urea  
} glucosa  
} jabones  
} sales orgánicas

Si estas comprobaciones preliminares se han ejecutado sucesivamente sobre los glóbulos y sobre el suero separadamente, y se ha determinado el peso relativo, cual ya sabemos, de unos y otro, podremos también relacionar en cada una de estas partes lo que le corresponda de todos esos principios. Veamos ahora, cómo se dosifican separadamente y de modo especial cada uno de esos principios inmediatos de la sangre, según sus peculiares características.



## 2.º—Determinación parcial de los materiales hemáticos.

Los constituyentes bioquímicos de la sangre son, cual se sabe: sustancias albuminoideas como son la globulina, nucleo-albúmina, seroglobulina, seroalbúmina, caseoserina; materias extractivas, positivos derivados de desintegración de los anteriores, cual la urea, creatina, alcaloides y pigmentos del plasma; sustancias hidrocarbonadas, cual la glucosa; sustancias grasas, como la lecitina, colessterina; sales sódicas, potásicas, cálcicas; y en fin, agua en la alta proporción de 90 p. 0/0. Aíslanse unos de otros para su investigación analítica, manipulando en cada uno de ellos, cual enseguida explanamos.

a.)—Obtención de los albuminoides.—Para obtener aislados los diferentes albuminoides del plasma sanguíneo, recurriremos al proceder de HALLIBURTON (1) algo modificado, y que consiste en los tiempos siguientes:

1.º tiempo: Satúrese plasma con sulfato amónico y fíltrese. Todos los albuminoides quedan sobre el filtro, pasando disueltos los demás componentes plásmicos.

2.º tiempo: Se lava el precipitado en solución saturada de sulfato amónico y se disuelve en agua destilada. Luego se satura con sulfato de magnesia y se ocasionará de este modo un precipitado de globulina. Se filtra y quedará en

---

(1) HALLIBURTON.—Chemical Physiology. Londres. 1891, pág. 250.

el filtro la globulina, pasando disueltos los otros albuminoides.

3.º tiempo: El líquido filtrado se calienta, y á los 73°, 76° y 85° se precipitarán respectivamente las tres sero-albúminas que luego se van separando por filtración.

De donde resulta que la sero-globulina se dosifica antes que la sero-albúmina, si después de filtrada y neutralizada se purifica en el dializador.

Para obtener la globulina, podemos recurrir al proceder de HAMMARSTEN que consiste en saturar plasma hemático con polvo fino de cloruro sódico; el precipitado se disuelve en ténue soluto de cloruro sódico y se vuelve á precipitar por la misma sal en sustancia, repitiendo varias veces la operación. Es difícil obtenerla pura.

Según HOFMEISTER y KANDER añadiendo al suero un volúmen igual de una solución saturada en frío de sulfato amónico se precipita por completo la globulina.

Para conseguir la sustancia fibrinógena, aconseja HAMMARSTEN mezclar sangre de caballo con  $\frac{1}{4}$  de su volúmen de una solución saturada de sulfato de magnesia, filtrar luego y precipitar el residuo filtrado con volumen igual de solución saturada de cloruro sódico. Se prensa después lo precipitado entre dos hojas de papel chupón, se disuelve en agua destilada y se vuelve á precipitar por la solución saturada. Repitase varias veces la operación.

Para lograr la caseo-serina aislada, se diluye el suero en seis veces su volumen de agua y se le somete á una corriente de ácido carbónico que precipitará la globulina (SCHMIDT). Luego se filtra y se adiciona, gota á gota, ácido acético diluído, hasta neutralizar la alcalinidad del plas-

ma. Ocasiónase entonces la precipitación en copos de la caseoserina.

b.)—Dosificación de la urea.—Hállase ésta en el residuo insoluble en el éter (e) de la solución alcohólico etérea b' obtenida antes (pág. 364), según el proceder general de HOPPE-SEYLER. Dicho residuo se vuelve á disolver en agua y se trata por el licor mercúrico de LIEBIG (después de neutralizar previamente el líquido por el carbonato de sosa), que precipita la urea, así como otras substancias, y particularmente la creatina y creatinina. Lavado el precipitado, se pone en suspensión en el agua, y se descompone luego por una corriente de hidrógeno sulfurado. El líquido filtrado incoloro encierra urea que se dosifica por medio del hipobromito de sosa.

En ciertos casos la operación puede simplificarse. Para ello se ejecuta un extracto alcohólico del producto sometido al análisis; se evapora á sequedad y se le adiciona alcohol absoluto en frío. El extracto alcohólico evaporado, nuevamente disuelto en agua, se trata por el subacetato de plomo. Se filtra y sustrae el exceso de plomo por una corriente de hidrógeno sulfurado ó por sulfuro de amonio. Se filtra de nuevo para separar el sulfuro de plomo; se concentra el líquido al baño-maría y se dosifica luego la urea por el hipobromito.

También podemos valernos para dosificar la urea del proceder de HAYCRAFT (1) que consiste: en colocar la sangre, objeto del análisis, en un dializador y en sumergir este en un baño de alcohol. Pasa entonces la urea al

(1) Comunicación privada al Dr. GAMGEE y publicada por éste en su *Physiology Chemistry*, pág. 192.

alcohol y éste á la sangre, ocasionando un coágulo de los albuminoides allí contenidos. Se añade agua á la sangre y se dializa de nuevo en otro baño alcohólico. Después se añade ácido oxálico al alcohol y se evapora hasta sequedad; el residuo se trata con petróleo que disuelve las grasas y los pigmentos, pero no el oxalato de urea. Se disuelve éste en agua, se neutraliza la disolución con carbonato de barita y se evapora de nuevo. Este segundo residuo se trata con el alcohol hirviendo, y tras nueva evaporación de esta solución alcohólica queda la urea pura.

Para demostrar la urea en sangre normal podremos recurrir al siguiente método (JAKSCH), que es también utilizable para investigar este cuerpo en las secreciones y excreciones: se mezcla la sangre con 3—4 veces su peso de alcohol, se filtra después de 24 horas, lavando nuevamente el precipitado sobre un filtro con alcohol; se reúnen los líquidos filtrados en varias veces y se destila el alcohol; se precipita el residuo con ácido nítrico y se dejan reposar los cristales, que en ocasiones se forman, durante algunas horas; se recogen en papel de filtro, se disuelven en agua y se hace actuar el carbonato de barita, mientras se desarrolle ácido carbónico. Se evapora enseguida el líquido al baño-maría hasta la desecación y se extrae el residuo seco con alcohol absoluto caliente. Durante la evaporación, cristaliza la urea en cristales romboédricos muy largos y delgados.

Si dispusiéramos de cantidad bastante de sangre (200 — 300 cm<sup>3</sup>) ó fuese ésta muy rica en urea, podríamos ejecutar las manipulaciones siguientes:

*a)*—Una pequeña cantidad de cristales se disuelven sobre un porta-objetos en una gota de agua, y adicionándole otra gota de ácido nítrico, se adapta un cubre-objetos y se somete al exámen microscópico. Se percibirán tablas exagonales características de nitrato de urea.

*b)*—Una ténue disolución de cristales se calienta con un poco de mercurio metálico y una gota de ácido nítrico, y se producirá un abundante desprendimiento de gases ( $\text{CO}_2$  y  $\text{N}$ ).

*c)*—Si calentamos en un tubo de ensayo cristales secos mas corta cantidad de legía de sosa, y una gota de disolución de sulfato de cobre, la presencia del color rojo (biureto) demuestra la existencia de la urea.

*d)*—Si vertemos sobre un cristal de urea una gota de solución acuosa saturada de furfurool y adicionamos enseguida una gota de ácido clorhídrico de peso específico=1.10, obtendremos sucesivamente las diversas entonaciones amarilla, verde, azul, y rojo-púrpura (SCHIFF). El ácido úrico no da esta reacción; mas si bien la da la alantoina, no lo hace tan intensa y rápidamente cual la urea. (1)

Cuando no obtengamos el resultado apetecido con ninguno de los anteriores métodos. podremos determinar la urea en la sangre valiéndonos del proceder de MUNZER consistente: en tratar la sangre por el alcohol absoluto; filtrar cual antes; evaporar el extracto alcohólico; disol-

---

(1) H. SCHIFF. — Berichte der deutschen chem. Gesellschaft. 1877. —  
UDRANSKY. — Zeitschr. f. physiol. Chem. 1888.

ver el residuo en el agua, y en este soluto determinar la cantidad de urea por el método de HUFNER (1) recomendable para investigar y dosificar la misma en la orina. Este método —sucintamente expresado— se funda en la descomposición de la urea por la legía brómica; de modo que el nitrógeno desprendido se recoge para deducir de su volumen el peso en gramos de la urea después de anotar la presión barométrica, la temperatura del agua y la tensión del vapor de agua á temperatura dada; por otro lado, el ácido carbónico que se desprende á la vez se absorbe por una legía sódica, que según las observaciones de PFLUEGER y SCHENCK (2) dan mejores resultados las soluciones concentradas que las diluidas cual antes se empleaban.

Para hacer bien este análisis es preciso disponer por lo menos de dos aparatos HUFNER. Los resultados conseguidos con este proceder son aproximados, según observación de PFLUEGER, si bien según JAKSCH tiene la ventaja de la rapidéz por lo que es utilizable en determinaciones clínicas, toda vez que en éstas sólo necesitamos averiguaciones necesariamente diferenciables de un día á otro, y no el valor absolutamente exacto. Con este sencillo método llegó á demostrar MUEUNZER un enorme aumento en la sangre de urémicos. Por último, pudiéramos utilizar el método más exacto de SCHROEDER, (3)

---

(1) HUFNER.—*Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1877.—JACOBI.—*Zeitschr. f. analyt. Chem.* 1885.

(2) PFLUEGER y SCHENCK.—*Pflüger'Archiv.* 1886.—SALKOWSKY.—*Zeitschr. f. physiol. Chem.* 1886.

(3) V. SCHROEDER.—*Archiv. f. experim. Pathol. u. Pharmakol.* 1882.

que tiene la desventaja por sus dificultades de ser inaplicable en clínica.

c.)—Investigación del ácido úrico.—Sólo existe en cantidades pequeñísimas en la sangre normal, pero aumentando su proporción notablemente en determinados morbidismos, según demostró, el primero, GARROD (1) en los gotosos, conviene sepamos cómo se demuestra su presencia.

Para investigar el ácido úrico podemos valernos del método poco exacto de GARROD, que consiste: en tomar 30—35 gr. de sangre del coágulo espontáneo; colocar 6—8 gr. de suero en un vaso de fondo plano y de unos 8 cm. de diámetro, donde se mezcla con 4—6 gotas de ácido acético diluido, y sumergir unos hilitos delgados de lino en la mezcla, dejando todo abandonado en la oscuridad y en sitio caliente para que el suero se evapore con lentitud. En una proporción de suero al menos de 0,025 por 1,000 de ácido úrico, los cristales de este cuerpo (*Fig. 80*) se precipitan sobre el hilo pasadas 24—48 horas. Al cabo de este tiempo se saca el hilo, se coloca sobre un porta, se le examina al microscopio y se le somete á las reacciones del *murexido*, que consiste en hacer actuar sobre aquellos cristales unas gotas de ácido nítrico, y calentar luego hasta sequedad, en cuyo momento se forma una mancha amarilla que se cambia en azul violada en cuanto se hace actuar la sosa ó la potasa, ó se transforma en rojiza si se hacen actuar los vapores amoniacales.

---

(1) A. B. GARROD.—Medical surgical transactions, 183, 1848, 1854, y The nature and treatment of gout, *Schmidt's Jahrbücher*, 124, 1861.

La presencia del ácido úrico en la sangre libre de albúmina la ha comprobado ABELES (1) por el método de

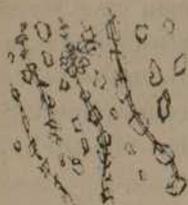


Fig. 89.—Cristales de ácido úrico obtenidos por el proceder del hilo según GARROD.

SCHMIDT-MUHLHEIM con arreglo á las experiencias de SALKOWSKY y LUDWIG. De tan buenos resultados es también el método aconsejado por JAKSCH que consiste (2) en: 100-200 gr. de sangre logrados con la ventosa escarificada, se diluyen en una cantidad de agua 3—4 veces mayor, inmediatamente después de recogida; se agrega al comenzar la coagulación en el baño-maría unas gotas de ácido acético de 1,0335 de densidad á 15°C., hasta obtener una reacción ácida débil. Se deja 15'—20' con el baño del agua hirviendo y se filtra. El residuo que queda en el filtro se lava repetidas veces con agua caliente y se reúne al filtrado. Este líquido resultante, de ordinario de un color amarillento, se hierve á fuego desnudo, después de adicionarle de nuevo ácido acético, y luego se filtra y analiza por el método de SALKOWSKY y LUDWIG, después de agregarle un poco de fosfato de sosa. Si no quisiéramos obtener la coagulación al baño-maría, único modo por el que lograremos recoger un filtrado claro, adicionaremos un poco de cloruro sódico.

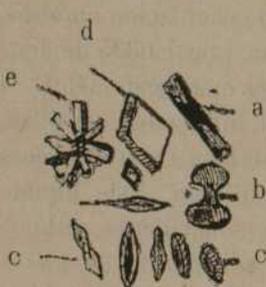
Los filtrados obtenidos por el método de SALKOWSKY-LUDWIG (empleado para dosificar el ácido úrico en las

(1) ABELES.—*Med. Jahrbüch.* 497, 1887.

(2) R. V. JAKSCH.—*Zeitschr. f. Heilkunde* 415, 1890.

orinas, y basado en la obtención de una doble combinación argéntica amoniacal de ácido úrico (1) de escasísima solubilidad mezclados con ácido clorhídrico y reducidos por evaporación á 10 cm<sup>3</sup> se dejan en reposo durante 24 horas, al cabo de las que se filtran de nuevo por filtro de amianto. Los cristales así obtenidos se tratan con agua fría, luego se lavan con alcohol (HOPPE SEYLER) y se procede á experimentar sobre ellos del modo siguiente:

a) —Examinada corta cantidad de ellos al microscopio, se percibirán las agujas y tablas romboédricas características del ácido úrico. (*Fig. 81*).



*Fig. 81.*—Diversas formas cristalinas de ácido úrico.

- a. forma en pinceles.
- b. en forma de violín.
- c. de lente biconvexa
- d. romboedrales.
- e. estrella de cristales.

b) —Parte de los cristales, se someten á la prueba del murexido. En vez de ácido nítrico (véase más arriba) puede emplearse el agua de cloro, ó bromo, ó ácido nítrico (JAKSCH). La reacción con el último es muy característica; con los primeros se aprecian principalmente las diferencias entre el ácido úrico y las bases de xantina.

Y ya que las bases de xantina mencionamos recordaremos, que este cuerpo, tan análogo al ácido úrico, se ha demostrado su presencia en la sangre por SCHEERER, MOSLER, SALKOWSKY, SALOMON y JAKSCH del modo siguiente: En el líquido

(1) E. SALKOWSKY. Zeitschr. f. physiol. Chemic, 31, 1890.—E. LUDWIG. Wiener med. Jahrbücher, 597. 1884.

resultante del filtrado del ácido úrico ocasionando la reacción modificada del murexido y haciendo además actuar el agua sobre el residuo coloreado obtenido con los reactivos antes indicados, se han puesto de manifiesto algunas bases de xantina é hipoxantina en la sangre.

d.)—Investigación de la leucina, tirosina, creatina y creatinina.—Para ejecutarla manipularemos según aconseja RITTER (1) del modo siguiente: Los líquidos separados de los precipitados plúmbicos originarios de operaciones (c) precedentemente ejecutadas en el método general de HOPPE SEYLER, se desembarazan del exceso de plomo por el hidrógeno sulfurado, se filtran y luego se condensan ó concentran mucho hasta lograr tengan consistencia de jarabe, y se espesan aun más por el alcohol. La parte insoluble lleva en su mayor parte *tirosina* de la que se intenta demostrar su presencia por sus reacciones características. Por otro lado, en el extracto alcohólico evaporado, diluido en agua y tratado por el acetato de plomo amoniacal se precipita la combinación insoluble de *leucina* y de óxido de plomo, que se lava con corta cantidad de agua y se descompone por el hidrógeno sulfurado. Después se filtra, concentra y enfría para recoger leucina bastante pura. Hay que tener en cuenta que estos dos compuestos, tirosina y leucina, rarísima vez se hallan en la sangre normal.

Para determinar la *creatina* y *creatinina* pudiéramos recurrir á los métodos de WEYL y JAFFÉ empleados en el análisis cualitativo de dichos cuerpos en la orina. El

---

(1) RITTER.—*Man. de chim. prati.* p. 337.

proceder de WEYL (1) se reduce á provocar la reacción cromática por medio del nitro-prusiato de sosa y legía de potasa en solución débil y reciente. El de JAFFÉ (2) consiste en el empleo de una solución algo concentrada de ácido picrico y algo de legía de potasa.

Para el análisis cuantitativo de la creatinina, servirá la propiedad que tiene este cuerpo de formar con el cloruro de zinc una doble sal difícilmente soluble. Tal es el método de NEUBAUER modificado por SALKOWSKI. Según experiencias de este último en las orinas, un gramo de cloruro zinco-creatinina corresponde á 0,6242 gr. de creatina, por lo que para determinar la cantidad de esta bastará multiplicar la cifra obtenida de cloruro doble por la miligrámica anterior. (3)

e.) — Investigación del amoniaco.—Se comprueba fácilmente—según SCHLAGDENHAUFEN—la presencia de este cuerpo en la sangre, abandonándola durante 6—8 horas en un vaso de fondo plano y bordes redondeados, cerrado por una lámina de cristal en la que se fija con cera un cristal de reloj untado con ácido sulfúrico. Se examina luego el ácido con el reactivo NESSLER. Si bien BRUCKE con este proceder ha encontrado siempre amoniaco, bien pudiera este resultar de la descomposición pútrida de la sangre.

Proceden KUHNE y STRAUCH haciendo pasar á través de la sangre, primero en frío y después en caliente al

---

(1) TH. WEYL.—*Berichte der deutschen chem. Gesellschaft*, 217, 1878.

(2) JAFFÉ.—*Zeitschrift f. physiol. Chemie*, 399, 1886.—*COLASANTI*—*Maly's Jahresber.* 132, 1890.

(3) TANIGUTI & SALKOWKI.—*Zeitschr. f. Physiol. Chemie*, 471, 1890.

baño-maria una corriente de hidrógeno lavado en el nitrato de plata, y luego haciendo pasar el gas por una solución del reactivo NESSLER. Conviene neutralizar la sangre con un poco de magnesia (RITTER).

f.) — Investigación de alcaloides y materias colorantes anormales en el suero.—Las *plasmínas* aisladas por WURTZ exigen manipulaciones largas y complicadas cuya detallación excusamos. Someramente consiste el procedimiento: en combinar los alcaloides con el ácido oxálico, precipitarlos después con la cal y transformarlos al fin en cloro-auratos y cloro-platinatos.

Por otra parte, la determinación de la materia colorante amarilla del plasma, probablemente idéntica á la luteína, no presenta gran interés.

g.)—Determinación de los hidratos de carbono.—Contiene la sangre en el estado normal cantidades, si bien pequeñas, de *azúcar de uva* (melitemia) que se comprueba cualitativamente, previa la separación de la albúmina, por el antiguo buen método de C. BERNARD (1) para cuya ejecución son precisos los útiles siguientes: seis cápsulas de porcelana taradas y de 20 gr., un soporte con lámpara de alcohol, balanza, una prensita para estrujar el coágulo, una bureta graduada, cristalitos de sulfato de sosa, no eflorescentes, licor de BARRESWILL, y pastillas de potasa cáustica. Se pesan previamente en cada cápsula 20 gr. de sulfato de sosa; se recogen con geringuita de cristal ó se vierten en cada capsulita, conforme va saliendo de las venas, 20 gr. de sangre que se van

(1) C. BERNARD.—*Compte rendu*. LXXXII, 1356-1406 y LXXXVIII, 754, 1876.

mezclando íntimamente con los 20 de sulfato. Adicionando ó no unas gotas de ácido acético se pone todo á hervir á fuego desnudo. Se quitará de éste cuando la espuma sea blanca y el coágulo no presente puntos rojizos; se lleva á la balanza y se restablece el primitivo peso adicionando agua. Se exprime el coágulo esponjoso en la prensa, y el líquido que escurre se vierte en el filtro existente por cima de la bureta. En tanto el líquido filtra, se vierte en el matraz situado bajo la bureta, 1 cm<sup>3</sup> del licor azul, más 10—12 pastillas de potasa y 20 gr. de agua destilada. Se purga ahora la bureta y cierra con pinza su extremo inferior. Se cierra el matraz con tapón de goma, por cuyos dos conductos respectivamente se ponen el extremo de la bureta y un tubo acodado con pinza de presión continua y que sirve de seguridad. Se calienta hasta ebullición el contenido del matraz; y entonces se hace caer el líquido de la bureta dentro del matraz, primero rápidamente, luego gota á gota; percíbese cómo el licor cuprosódico azul se vá decolorando más y más hasta quedar completamente claro, lo que se reconoce mejor observando las burbujas de vapor. Entonces está terminada la dosificación, y basta leer en la bureta la cantidad de líquido derramado, que supondremos sea  $n$  cm<sup>3</sup>. Ahora bien: la fórmula  $S = \frac{8}{n}$  nos dará á conocer en gramos el peso de azúcar contenida en 1 kilogr. de sangre.

Puede emplearse también el proceder de SERGEN (1) que se basa en la precipitación de los albuminoides por

---

(1) Arch. de PFLUEGER, t, XXXIV, p. 391.

el acetato de hierro. Se ejecuta mezclando 1» de sangre con 8—10» de agua y unas gotas de ácido acético, y calentar la mezcla. Cuando la precipitación de los albuminoides empieza, se adiciona acetato de sosa y percloruro de hierro hasta que la reacción sea debilmente ácida. Se hierve, enfría después, y filtra al través de una tela no almidonada. Si la cantidad adicionada de sal de hierro ha sido la conveniente, el líquido que filtra es claro. El coágulo que queda en el filtro se lava muchas veces y comprime luego hasta sequedad. Los líquidos de los lavados se unen al filtrado y si aun conserva un tinte rosado (debido á la **Hb.**) se añaden algunas gotas de sal férrica para precipitar los restos albuminoideos que quedan. Concentrado el líquido al baño-maría, se dosifica con el licor de FEHLING la glucosa.

También es muy cómodo el proceder de mezclar la sangre con sulfato amónico y en el producto filtrado de la mezcla, que está exento de albúmina, ejecutar las operaciones siguientes: si hacemos el ensayo de MOORE con el filtrado y tiene riqueza de azúcar los resultados son positivos; el reactivo de TROMMER dá la separación característica del oxidulo de cobre; si utilizamos el clorhidrato de fenil-hidracina demostraremos mejor la presencia del azúcar.

Para sustraer la albúmina ABELES (1) emplea una disolución alcohólica de cloruro de zinc. Más práctico es el proceder de MERING, que se reduce para dosificar este hidrato de carbono, á tomar un volúmen determinado

---

(1) ABELES.—Zeitschr. f. physiol. Chemie, 495, 1891.

de sangre (15—20 cm<sup>3</sup>), diluirle en dos veces su volúmen de agua, y adicionar á la mezcla unas gotas de ácido acético. Luego se hierve por espacio de 5' y se filtra. El residuo que queda en el filtro se lava en agua destilada y el agua del lavado se añade al líquido que antes filtró. Se mide el total de líquido, que se coloca en una bureta y se dosifica la glucosa por el licor de FEHLING.

En vez de los anteriores procederes pudiéramos utilizar el aconsejado por JAKSCH, que es de buenos resultados y consiste: después de sustraída la albúmina por los medios indicados, se mezclan 5 cm<sup>3</sup> de líquido filtrado, formando una solución salina concentrada, caliente todavía, con 5 cm<sup>3</sup> de otra solución preparada en caliente de clorhidrato de fenilhidracina (lo que se pueda coger dos veces con la punta de un cuchillo), y acetato de sosa (doble cantidad que la anterior), en una probeta llena de agua hasta la mitad; se calienta 1/2 hora al baño-maría y se deja en reposo. Aún mejor es adicionar al filtrado caliente un poco de las sales antes dichas en substancia, procediendo luego á la investigación cual antes. Por el enfriamiento se forman á la vez que cristales de sulfato de sosa, los típicos de fenilglicosazono de color amarillento aglomerados é irradiados (*Fig. 82*) cual una estrella, que es la imágen microscópica que presentan.



*Fig. 82.*—Cristales de fenilglicosazono irradiados.

La titulación cuantitativa del azúcar se hace por el licor de FEHLING ó mejor aún ha-

ciendo la inspección polarimétrica empleando siempre que la ejecutemos polarímetros muy sensibles, cual es pr. ej. el de SIPPICH, construido por ROTHE que es de una gran exactitud.

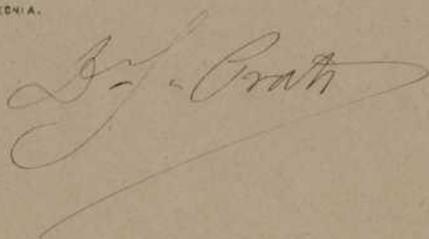
SALOMON y FRIEDRICHS (1) han llamado la atención sobre el *glicógeno* contenido en los glóbulos blancos. También le encontró GABRITSCHESKY (2) en los leucocitos, y libre bajo la forma de granulaciones y lo mismo en hombres sanos que enfermos. Para descubrirle se extiende una capita de sangre entre dos cubres, se deseca al aire libre y se le añade una gota de un soluto muy concentrado de goma, que en 100 partes contenga 1 de iodo y 3 de ioduro potásico. La existencia del glicógeno en los leucocitos (pertenecientes á la variedad neutrófila  $\epsilon$ , pág. 95) se revela por adquirir un tinte más ó menos moreno intenso.

La prueba del azúcar y demás hidratos de carbono hemáticos puede hacerse, últimamente, por el procedimiento de BAUMANN y v. UDRANSKY fundado en la propiedad que tienen estos cuerpos puestos en contacto con las soluciones acuosas de cloruro de benzoilo y lejía de sosa, de formar compuestos insolubles.

h.)—Investigación de los ácidos grasos volátiles.— Encuéntranse en la sangre si bien en muy escasas porciones. Para determinar su existencia procede JAKSCH así: por medio de ventosa escarificada se extrae 10—30 gr. de

(1) SALOMON.—Deutsche med. Wochenschr. 92, 421, 1877.—Fr. v. FRIEDRICHS.—Zeitschr. f. klin. Med., 33, 1885.

(2) GABRITSCHESKY.—Archiv. f. experiment. Pathol. u. Pharmakol.—272, 1891.



sangre que se hierva con igual peso de sulfato de sosa; se filtra, y evaporado el filtrado hasta sequedad se hace actuar alcohol absoluto. Solo indicios se hallan entonces en ese extracto alcohólico de aquellos ácidos grasos así como también ácido láctico.

Según BERLINERBLAU, que tiene un proceder determinativo especial (1)—contiene la sangre venosa humana 0,0079 por  $\%$  de estos ácidos orgánicos.

Pueden extraerse dichos ácidos por simple destilación hemática en el ácido sulfúrico diluido. Previamente conviene eliminar los albuminoides y la Hb. cuyos productos de descomposición volátiles pudieran enmascarar, viciando los resultados. El mejor proceder que debe emplearse según SCHLAGDENHAUFEN consiste en añadir á la sangre, ó á los órganos ricos en ella cortados en menudos pedazos, alcohol frío, batirla, y mezclar fuertemente el todo, filtrándolo en frío y tratar el líquido alcohólico con carbonato de sosa á saturación, destilar y evaporar el residuo al baño-maria en presencia del ácido sulfúrico.

La destilación con el ácido sulfúrico se llevará hasta lograr consistencia pastosa en el residuo. En este se procede luego á separar cada uno de aquellos ácidos grasos según los métodos instituidos por HOPPE-SEYLER que por lo complicados excusamos su explicación.

Para la investigación del ácido láctico se trata el residuo por el alcohol, se decanta la solución alcohólica, se espesa y se le adiciona lechada de cal. Se cuece el liqui-

---

(1) Archiv. für experiment. Pathol-und Pharmakol. 333, 1887.

do filtrado, se adiciona alcohol caliente, se enfría y luego se mezcla con éter para que se precipiten cristallitos de lactato de cal, reconocibles al microscopio por su forma de agujitas radiadas.

i.)—Investigación de la lecitina, colessterina y grasas hemáticas.—Encuéntranse en la sangre pequeñas cantidades de grasa, acrecentada durante la digestión. Cuando se examina esta sangre macroscópicamente aparece algún tanto enturbiada y algo más pálida. Al exámen microscópico aparecen gotitas pequeñas muy refringentes que nadan entre los elementos propios hemáticos. Alguna vez se observan gotitas grasientas en los leucocitos; para determinar si lo son, depositaremos una gota de éter en el borde del cubre y al entrar el éter en el preparado desaparecerán si realmente son de grasa.

Para la obtención de la lecitina y colessterina recurriremos al método general de HOPPE-SEYLER, haciendo sufrir al extracto etéreo d otras nuevas manipulaciones que omitimos por impropias en este libro. Parece ser que el análisis de dicho extracto etéreo proporciona: por una parte el peso de las sustancias sólidas, por otra el de la colessterina y al final el del pirofosfato de magnesia que multiplicado por un coeficiente dado (7,2748) da el correspondiente peso de la lecitina de donde proviene.

j.)—Investigación de los ácidos biliares.—Dado que su presencia en la sangre debe contarse cual hecho patológico, en su sitio correspondiente de la segunda parte de este libro explanaremos los métodos de HOPPE SEYLER, PENTENKOFER, MACKAY, HUPPERT, JAKSCH, etc. para investigarlos, así como los otros productos constitutivos de la bilis.

k.) — Determinación de las sales y del agua. — Para obtener directamente la cantidad de materiales sólidos contenidos en la sangre é indirecta la del agua en el volumen del líquido evaporado, relacionando los resultados á 100, se procederá según consejo de SCHLAGDENHAUFEN, así: en una pequeña cápsula de platino de fondo plano se ponen 10—30 cm<sup>3</sup> de suero, se tapa con una plaquita de cristal y se pesa. Se evapora durante 6 horas, al baño-maría primero, y luego durante unos días en la estufa á 100° ó mejor en el vacío con presencia del ácido sulfúrico ó del anhídrido fosfórico. Se calienta más tarde en la estufa á 100°—120° y se pesa de nuevo después de enfriado, volviendo á pesar y calentar hasta que no encontremos diferencia sensible entre dos sucesivas pesadas.

Para la determinación de las sales minerales hemáticas recurriremos á la incineración según reglas dadas en los especiales tratados de química, y cual ya indicábamos al explicar el método de HOPPE-SEYLER para la investigación en total de los materiales sanguíneos (b. c. e.)

#### IV. — Análisis de los gases hemáticos.

La técnica averiguadora de la naturaleza y proporcionalidad—absoluta y relativa—de los gases que en la sangre existen, es problema de resolución asaz difícil, por lo que se acrecenta aún más el interés del conocer que intenta al fisiologista, en cuyo extremo entreveé, tal vez, la solución ó mejor explicación de las combustiones respiratorias.

Desde 1670 en que por primera vez, MAYOW vió esca-

parse gases de la sangre, colocando este liquido en el vacío; desde 1799 en que DAVY logró extraer por primera vez un algo de oxígeno en sangre arterial á beneficio del calor; hasta 1837 en que MAGNUS examinó su composición centesimal evacuándolos por desalojo, se han intentado variadisimas investigaciones y diferentes procederes por numerosos experimentadores, entre los que descuellan PRIESTLEY, VAUQUELIN, PREYER, CL. BERNARD, NAWROCKI y otros, si bien ninguno llegando á conquistar satisfactorios resultados, sin duda por la imperfección de los medios empleados. Hay que llegar á 1857 en cuyo año LOTHAR MEYER mejora el proceder fundado en el vacío obtenido por una bomba de mercurio construida según indicaciones de sus alumnos SETSCHENOW y SCHOFFER, y modificada más tarde por LUDWIG. A partir de entonces y por las mejoras sugeridas á PFLÜGER, HELMHOLTZ, GEISSLER, GREHANT, GAUTIER y otros de nuestros tiempos, se ha llegado á alcanzar un gran perfeccionamiento en el análisis gaseoso hemático, principalmente auxiliado por el vacío barométrico seco.

Sabido es que los gases evacuados de la sangre son el O, CO<sub>2</sub> y N; que el N se halla en disolución física y es el menos importante; que el CO<sub>2</sub> está en disolución física en parte, y en parte en estado de combinación con los carbonatos y fosfatos alcalinos (FERNET); y que el O hállase en su mayor parte combinado (bien inestablemente) con la Hb, y en una mínima porción disuelto en el plasma. Ahora bien, teniendo estos datos en cuenta, compréndese que solo en el vacío es donde se conseguirá extraerlos lo más completamente posible; mas como es operación—cual

luego veremos—que exige por su gran delicadeza numerosas precauciones para ejecutarla con toda la perfectibilidad posible, ha tenido que tardar largo tiempo su casi definitiva adquisición.

### 1.º—Métodos de extracción de los gases sanguíneos.

Para desalojar los gases de la sangre y recogerlos á fin de practicar su determinación química pueden emplearse tres métodos diferentemente basados en el empleo de: *el calor*, *el desalojo por otro gas*, y *el vacío*. Precisa advertir que dichos medios pueden utilizarse aislados y asociados ó auxiliándose mutuamente.

**a.**—Extracción por el calor.—Este método utilizado por HUMPHRY DAVY, modificado, para las demostraciones, por BERT (1) está hoy del todo abandonado por cuanto es considerable la pérdida de O á causa de los fenómenos de oxidación producidos durante el largo rato que dura la operación. Sólo como ayudante de otros procederes es como hoy se utiliza el calor.

**b.**—Extracción por desalojo con otro gas.—Antiguos y poco exactos hay algunos procedimientos de esta índole que modificados ventajosamente aun se aconsejan y emplean por algunos químicos; por cuyos motivos solo vamos á ocuparnos de ellos muy á la ligera.

*a.*)—Procedimiento de PRIESTLEY.—En 1776, este autor, desalojó por primera vez los gases hemáticos á beneficio del nitrógeno, ó del hidrógeno, y demostró asi-

(1) Leçons sur la respiration. p. 78.

mismo la presencia del oxígeno en aquellos por la acción del O sobre el bioxido de nitrógeno.

b).—Procedimiento de VAUQUELIN.—Este autor demostraba, en su cátedra, la salida del ácido carbónico de la sangre por la influencia de una corriente de hidrógeno. Este proceder, empleado más tarde por MAGNUS y BERTSCH, no dá, cual ha demostrado PREYER, más que resultados incompletos.

c).—Procedimiento de CL. BERNARD.—Este insigne fisiologista descubrió que el óxido de carbono tiene la propiedad de evacuar completamente el oxígeno sanguíneo y formar combinación con la Hb.

Para recoger la sangre al abrigo del aire, BERNARD introducía en un tronco vascular (extremo central de arteria, ó periférico de vena) una sonda elástica empalmada á una jeringa de émbolo graduado; jeringa que llena de sangre se aislaba cerrando una llave que tenía en el pico, del que se quita la sonda entonces. En lugar de esta adaptaba después un tubo metálico encorvado. Introducía el extremo corvo de este en probeta continente ya de óxido de carbono; abría la llave y empujaba á la sangre dentro de la atmósfera de este gas; agitaba sangre, mercurio y óxido de carbono, y dejaba en reposo 24 horas todo, á una temperatura de unos 30° y al cabo de este tiempo, traspasaba el gas á un eudiómetro. Recogidos y medidos los gases, procedía á su análisis ó determinación; el CO<sub>2</sub> absorviéndolo por la potasa: el O dosificándolo por el ácido pirogálico; y el N por diferenciación después de absorber el exceso de óxido de carbono por una bola de cook impregnada de cloruro de cobre amoniacal. Se ha

comprobado por NAWROCKI que esta manera de proceder da resultados exactos con tal de dejar bastante tiempo á la sangre en contacto con el óxido de carbono, cuya condición por lo que después diremos es contraproducente.

A fin de evitar los escapes gaseosos ESTOR y SAINT-PIERRE han modificado el procedimiento anterior del modo siguiente: introducen 15-20 cm<sup>3</sup> de sangre en un dispositivo ó campana en forma de  $\cap$  cuyas dos ramas están graduadas y de cabida de 40 cm<sup>3</sup> llenos de mercurio. Metida la sangre, introducían un exceso de CO puro. Removida la mezcla, se deja reposar 1-2 horas á unos 25°6. Se procura pase luego el gas á una probeta graduada donde cual antes se dosifican los gases desalojados.

El método de CL. BERNARD es defectuosísimo ante todo por lo largo, en cuyo tiempo los materiales orgánicos sanguíneos absorven indudablemente cantidades sensibles de oxígeno. El de ESTOR y St. PIERRE es más rápido, pero en cambio proporciona resultados menos precisos y expone á numerosas causas de error, de tal modo que ellos mismos han ideado un aparato especial en el que puede asociarse la extracción por el vacío y el desalojo por el óxido de carbono.

c.—Extracción por el vacío.—Puede efectuarse de tres maneras diferentes: por la máquina neumática (*vacío neumático*), por la ebullición del agua, y por las bombas de mercurio (*vacío barométrico*). Cada uno de estos modos han originado diversos procedimientos.

a.)—Extracción por el vacío neumático.—Los principales son dos que solo vamos á mencionarlos:

a.)—Procedimiento de MAGNUS.—Este colocaba á la sangre en un tubo que era ampuloso en su centro, y cuyo extremo superior comunicaba con un eudiómetro, y cuyo extremo inferior se sumergía en una cubeta llena de mercurio. Todo el aparato se colocaba bajo la campana de una máquina pneumática.

b.)—Procedimiento de SETSCHENOW.—El aparato de este autor era más complicado que el anterior, pero con la ventaja que era factible ejecutar al mismo tiempo, con ligeras modificaciones, muchos análisis gaseosos hemáticos.

Ni uno ni otro se emplean hoy día.

b.)—Extracción por el vacío ocasionado al hervir agua.—Esta manera de obtener los gases sanguíneos, ya empleada por BUNSEN y BAUMERT, ha sido utilizada por L. MEYER en sus investigaciones, si bien por lo defectuosa ha sido abandonada por completo, yaciendo en el olvido los aparatos que sus autores idearon.

c.)—Extracción por el vacío barométrico.—Las bombas de mercurio son actualmente, debido á su comodidad y rapidez analítica, los exclusivos aparatos que se utilizan para hacer estas extracciones.

De los primeros que le utilizaron, aparte de HOPPE-SEYLER que parece fué el primero, para perfeccionarle cuéntase á MEYER el cual hacía pasar la sangre por 10—20 veces su volumen de agua caliente hirviendo y mantenida la mezcla á 40° someterla á la acción del vacío, obteniendo así O y CO<sub>2</sub>. Los restos de este último eran sustraídos por los álcalis y de esta combinación por el ácido tártrico, ejecutando todo esto siempre en el vacío.

Los resultados logrados de este modo hallábanse muy piagados de un error muy sensible debido á la imperfección del vacío utilizado.

La bomba de mercurio ha sido modificada sucesivamente por casi todos los autores que se han ocupado de los gases de la sangre, aportando cada uno un nuevo perfeccionamiento: las principales de estas bombas son las de LUDWIG modificada por SCHOFFER, SZELKOW, SETSCHENOW y KOWALESKY; la de LOTHAR MEYER; la de HELMHOLTZ; la de SCHMIDT; la de GREHANT; la de MATHIEU y URBAIN; la de BUSCH; la de ESTOR y SAINT PIERRE; la de FRANKLAND-SPRENGEL; etc., en todas las que el vacío barométrico está saturado de humedad. A fin de obtener vacío perfectamente seco, absorbiendo enseguida y á la par el vapor acuoso escapado de la sangre, imprime nuevos perfeccionamientos PFLUGER con la bomba de su invención; la cual POKROWSKI y BUSCH mejoran á poco, y perfeccionan luego cada vez más: GREHANT, GEISSLER, ALVERGNIAT, GEPPERT, GAUTIER y otros.

Cual se ve su número es muy considerable, y de consiguiente solo deberemos describir y conocer detalladamente aquellas que estén más en boga por su universal aceptación, cual ocurre con los aparatos de ALVERGNIAT y GAUTIER, si bien antes en honor al recuerdo apuntaremos, y como tipo de las primeras bombas, el modelo de LUDWIG modificado por HELMHOLTZ.

En el hombre, según LEPINE, se puede hacer también el análisis de los gases hemáticos, recogiendo la sangre bajo el aceite, con lo que se evita el contacto del aire.

a).—Procedimiento de LUDWIG modificado por HELMHOLTZ.—

La bomba de estos autores se compone de un recipiente cilindroideo afilado en sus extremos y con una llave cerca de su parte inferior. Este recipiente se pone en comunicación por su extremo superior y á favor de un tubo encorvado cual una S con una probeta eudiométrica mercurial colocada en cubeta tambien con mercurio. Por el extremo inferior y á beneficio de un tubo de goma de 1 metro, comunica el recipiente con una esfera móvil, abierta y continente de mercurio. Por la llave del recipiente se pone en comunicación con el matraz lleno de la sangre cuyos gases inténtanse examinar.

El modo de operar con tal aparato era bien sencillo: al salir del tronco vascular la sangre se recogia en un matraz; previamente se hacia entrar todo el mercurio en el recipiente, para bajar la esfera y caer en ésta el mercurio, ocasionando el vacío en el recipiente. Conseguido esto, se abre la llave entonces, y se calienta el matraz á 40° - 50° para que se expulsen más fácilmente los gases. Se cierra la llave y se coloca á nivel alto la esfera, con lo que y abierta la comunicación pasan los gases por el tubo encorvado al eudiómetro. Manipulaciones que se repiten varias veces hasta lograr el desembarazamiento completo de los gases en la sangre.

b).—Procedimiento de PFLÜGER—ALVERGNAT. — El aparato empleado en Francia con universal aceptación hasta el punto de que raro es el laboratorio que no le posee es el de ALVERGNAT construido según las indicaciones de PFLÜGER al logro del vacío seco. (1)

---

(1) WURTZ.—Chimie physiologique, p. 343.

Las partes principales de este aparato son el tubo extractor ó recipiente para la sangre, el tubo desecador, y la bomba de mercurio con uno ó varios manómetros. (1)

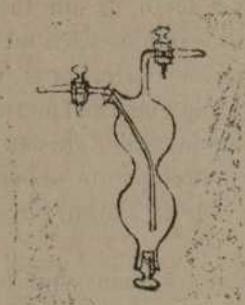


Fig. 83.— Recipiente extractor de sangre para la bomba de GEISLER.

El recipiente en el cual se introduce la sangre ha sufrido cambios en su forma muy varios: primeramente se servían de tubos rectos cerrados por un extremo (HOPPE-SEYLER), que después estaban abiertos por ambos extremos, ó soplados inferiormente en forma de gran esfera que es como se usan de ordinario ahora. Los más usuales hoy día, son los de GEISLER (Fig. 83) (de doble esfera) y de GEPPERT (Fig. 84) con triples esferas que

no son más que el mismo de PFLÜGER más ó menos reformado.

Conviene advertir que el cuello de estos recipientes, debe estar rodeado de un manguito recorrido por corriente de agua fría, con el objeto de que descienda la espuma que se levanta muy abundantemente durante la extracción de los gases. (2)

El recipiente hemático de PFLÜGER es una esfera de cristal de cabida de 250—300 cm<sup>3</sup>, la cual se continúa por sus polos con dos tubos rectos que se pueden comunicar por medio de una llave que respectivamente

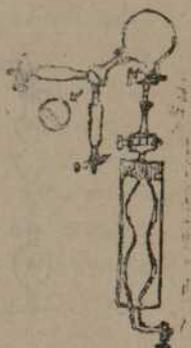
(1) Hay varios modelos en tamaño y complicación, costando de 170—380 fr. en la casa belga R. DROSTEN de Bruselas.

(2) LAMBLIG.—*Proc. de dosage de l'hémoglobine*. Nancy, 1882, p. 33.

cada uno lleva. La llave superior es una llave común (*Fig. 85*); la inferior (*a*) está perforada en su eje de donde resulta un taladro ó conducto acodado cuya abertura externa está en el eje del tallo de la llave, y su abertura interna desemboca hacia la mitad y en la pared del mismo tallo, adoptando todo el conducto la figura de una larga **L**; de tal manera que según sea su posición, así establece diferentes comunicaciones: en posición **—|** (*x a*) conduce hacia el recipiente (A) ó sea hacia arriba, y en posición **—|** (*x' a'*) inversa hacia abajo ó con el tubo inferior.

Con este recipiente manipularemos del modo que sigue: primeramente se le extrae por completo el aire poniéndolo en comunicación varias veces con la bomba aspirante mercurial que luego veremos, y conseguido se cierra cuidadosamente y se pesa. (1) Luego se enlaza el extremo agujereado de la llave inferior (*x'*) con la arteria ó con la vena de un animal, adoptando á dicha llave la posición **—|** (*x a*) conveniente para que penetre y llene de sangre la esfera del recipiente (A).

Una vez lleno de la cantidad necesaria se invierte la posición de la llave **—|** (*x' a'*); se limpia cuidadosamente toda la sangre que quedó untada en la parte exterior, y



*Fig. 84. — Nuevo extractor de sangre para su análisis gaseoso según GERHART.*

(1) Para hacer el vacío más perfecto, GERHART, llena previamente el recipiente extractor de agua destilada hervida que se expulsa también por la misma serie de manipulaciones ejecutadas con la bomba.



perfecto para lo que tienen sus superficies respectivas esmeriladas; y por el tubo superior, también esmerilado, ajústase un tubo acodado en ángulo recto que le pone en comunicación, si su llave (*e*) está abierta, con el aparato desecador.

El aparato desecador (C) es un tubo en U que de su codo pende una esferita de cristal comunicante con la luz del tubo. Este globo está mediado de ácido sulfúrico; en las ramas de la U hay trocitos de piedra pomez empapados del mismo ácido. En sus extremos superiores acodados en ángulo recto y de dirección opuesta, existen sus correspondientes llaves, (*e*, *f*) bien para incomunicarse; ó bien si se abre la (*e*) del extremo que empalma con el vaso de la espuma, pasan los gases al través del tamiz sulfúrico, dejando en este consiguientemente todo el vapor acuoso que hubiesen arrastrado; y los cuales salen completamente secos si se abre la otra llave (*f*) opuesta á la anterior y comunicante con el tubo manométrico que ahora veremos.

En la prolongación del codo donde se halla esta última llave (*f*) ajusta perfectamente (por hallarse esmerilados) un tubo corto y recto (D) que comunica y sostiene, hacia su mitad, un pequeño barómetro (*y*) en el cual se puede leer el grado de enrarecimiento del aire.

Desde este tubo recto (D) pasamos á la parte del aparato que constituye la verdadera *bomba*. Esta se halla formada por dos grandes esferas de cristal (E, F) que por sus polos continúanse con dos tubos de cristal respectivamente abiertos en sus extremos. Las aberturas (*x*, *w*) de los tubos de sus polos inferiores se enlazan y comuni-

can entre sí mediante un tubo de goma (G). De donde resulta posible: que tubo de goma (G), tubos de cristal polares, y mitad inferior de ambas esferas, ó sea, hasta su ecuador (E, F) puedan, como lo están, estar llenos de mercurio.

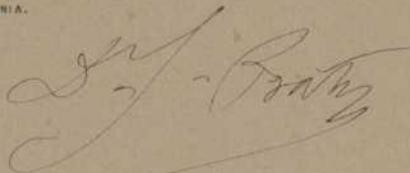
De estas dos esferas, una, la que empalma con las partes del aparato antes conocidas, es fija (E); y la otra (F), es movable, por lo que puede cambiar de altura y lugar, moviéndose ya arriba, ya abajo, mediante una cuerda que se desliza por un juego de poleas, uno de cuyos extremos sostiene una caja (contínente de la esfera) que se desliza por un bastidor, y el otro se enlaza y arrolla en un tambor que mueve un manubrio con rueda de escape. Al ascender la movable (F) se llena la esfera fija (E), y al revés cuando descende aquella se vacía ésta.

El tubo del polo superior de la esfera movable se divide en dos conductos: uno que sigue la dirección (H) vertical hacia arriba del primitivo, hasta cierto trecho en el que afilándose se acoda (h) para descender de un modo oblicuo á inmergirse en una cuba de mercurio (e) por su extremo (i) terminal en forma de ganchito dirigido hacia arriba, en corta extensión, que desemboca bajo la abertura del endiómetro ó tubo colector de gases lleno de mercurio y graduado; el otro conducto (g) horizontal y perpendicular al anterior, se empalma y continúa con el (D) que lleva el manómetro. En el punto de ramificación existe una llave con doble taladro, que según cual sea su posición así hace se comuniquen de diversos modos las partes del aparato ya conocidas: en determinada posición (H) se comunican con la esfera fija E las partes A, B, C,

D; en posición contraria (K) se cierra esta comunicación y se establece con el eudiómetro la continuidad con E.

Para manipular procederemos así: (1) se hace primero el vacío en B. C. D. (entiéndase separado el vaso extractor) para lo cual, puesta la llave de doble taladro en posición (K) comunicante con la cuba mercúrica, se eleva la esfera movable (F) hasta que penetren algunas gotitas de mercurio de la cuba por el ganchito (i) del tubito afilado (h) que aún no se habrá colocado bajo la abertura del tubo eudiométrico (J). Se cambia la posición de la misma llave poniéndola en (H) comunicación con vaso desecador, etc., y se procura descienda la esfera F; después, vuelta á lo primero poniendo en posición K la llave, elevando F; otra vez en postura H y descender F; y así se continúa hasta que el barómetro nos indique haberse efectuado el vacío. Logrado el cual se sitúa el ganchito del tubo afilado por bajo, y en el interior del tubo eudiométrico (J). Se adapta entonces el recipiente ya lleno de sangre (cual sabemos) al vaso de la espuma, y se abren las llaves todas, de modo que entonces penetran tumultuosamente y formando espuma los gases hemáticos al vaso de la espuma, de éste al desecador y en fin á la esfera fija E, que se llenará de todos ellos cuanto más bajemos la esfera movable F.—Se cambia, ahora, la posición de la llave de doble taladro (poniéndola en K) y se eleva la esfera F á fin de que los gases habidos en E pasen por el tubito afilado al eudiómetro colocándose sobre el mercurio.

(1) A. G. PRATS.—Obtención de los gases hemáticos mediante la bomba de PFLÜGGER, 1896.



Se vuelven sucesivamente á ejecutar varias veces estas maniobras, hasta conseguir pasen todos los gases al eudiómetro. Las últimas veces se favorece y activa la expulsión de los gases hemáticos sumergiendo el recipiente extractor (A) en una vasija continente de agua á 60°C.

c).—Procedimiento de GAUTIER.—En 1875 imaginó el sabio biólogo A. GAUTIER (1) un sencillo, y más seguro aparato; de tamaño más reducido por cuyo motivo es de mayor comodidad y de manejo no tan difícil cual los precedentes. Dado que la manera de construirlo y manejarlo la ha perfeccionado el mismo autor varias veces, solo describiremos aquí las más recientes innovaciones que á nosotros han llegado.

El recipiente hemático del aparato consiste, en una larga pipeta de cristal provista de amplia dilatación cilíndrica en su porción inferior—de cabida de unos 150 cm<sup>3</sup>—; termina por abajo en pico afilado provisto de llave, y por arriba sigue un tubo largo que tiene en su trayecto dos ampulosidades esféricas por cima de las que hay una llave de luz ancha en su extremo; de modo que la cabida total del recipiente es de unos 300 cm<sup>3</sup> aproximadamente.

Se liga al extremo superior un tubo de cautchuc por el que se establece la comunicación del recipiente con un grueso tubo refrigerante, el cual está cerrado por un tapón atravesado por un tubito de cristal encorvado en su otro extremo libre, y por el que se empalma con otro tubo en **U** lleno de esponja de cristal empapada en ácido sulfúrico que absorberá todo el vapor acuoso; tubo en **U** que

---

(1) WURTZ.—Dict.: art. *Sang*, p. 1430.

se continúa, por medio de un tubo en  $\neg$  con la bomba de mercurio hacia abajo y con el tubo eudiométrico por arriba.

Maniobraremos del modo siguiente: se comienza por vaciar de aire todo el aparato, estando todas las llaves abiertas excepto la inferior del recipiente extractor, hasta que solo exista una burbuja gaseosa en la cámara barométrica al ascender la cuba mercurial movable. Para asegurarnos de que el aparato no tiene aire, así como para evitar cuanto sea posible la coagulación sanguínea en tanto dura la operación, se adapta á la extremidad de la pipeta sanguínea un largo tubito de goma flexible completa y cuidadosamente relleno de cualquiera de las soluciones siguientes: ó bien solución hirviente de sal marina al 20 por  $\frac{0}{0}$ ;

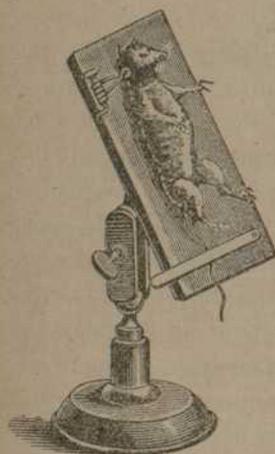


Fig. 86.—Tablita de vivisecciones sobre ratones, nuevo modelo de KITASATO. (59 fr.)

ó ya solución acuosa de oxalato neutro de potasa al 1 por  $\frac{0}{0}$ .

Dicha goma se liga entonces directamente—con las precauciones que son del caso—con doble ligadura al vaso (arteria ó vena) del que se quiere extraer la sangre. Adaptado el tubito de goma á la extremidad inferior (también llena de la solución sanguínea) de la pipeta se abre poco á poco su llave inferior, y la sangre se precipitará en su interior vacío. Cuando esté lleno su  $\frac{1}{3}$  ó  $\frac{1}{2}$ , ó sea

cuando la espuma que se forma alcance todo el interior de la ampulosidad esférica inferior, se cierra la llave de entrada inferior; se separa rápidamente el tubo de goma lleno de sangre, y se traslada la pipeta suspendida verticalmente y llena de sangre á una probeta de pie llena de agua á 36°—37° C. en la que se sumerge, y cuya temperatura que puede elevarse á 40° C. se mantiene teniendo introducida la probeta en un depósito-caldera de agua calentada por mechero de gas; un termómetro sumergido dentro del agua de la probeta nos dirá su temperatura.

Luego se cuelga este recipiente, lleno de sangre y bañado en caliente, del tubo refrigerante, para que al abrir la llave superior se ponga en comunicación con todo el aparato. Al abrir esta comunicación, y subiendo y bajando cautamente la cámara mercurial movable, se separan los gases hemáticos y pasan al interior de las otras partes del aparato, dado que también al verificarse el escape y removerse el líquido se forma espuma que tiende á ascender. Para evitar este inconveniente, aconseja GAUTIER, antes de adaptar la pipeta al tubo refrigerante, introducir una gotita aceitosa en la pequeña esfera superior del recipiente. Este modo de proceder es bastante para destruir la espuma que sube, y permite el agotamiento de los gases sin que la sangre penetre en el recipiente de la máquina, ni aun en los condensadores de humedad.

Una vez terminada la extracción gaseosa se separa el recipiente, se abre la llave inferior y se recoge en una probeta graduada. Al volumen obtenido restaremos el de la solución salina utilizada (para rellenar el tubito de go-

ma, y el pico de la pipeta) para evitar la coagulación, y obtendremos así la cifra de la sangre total experimentada.

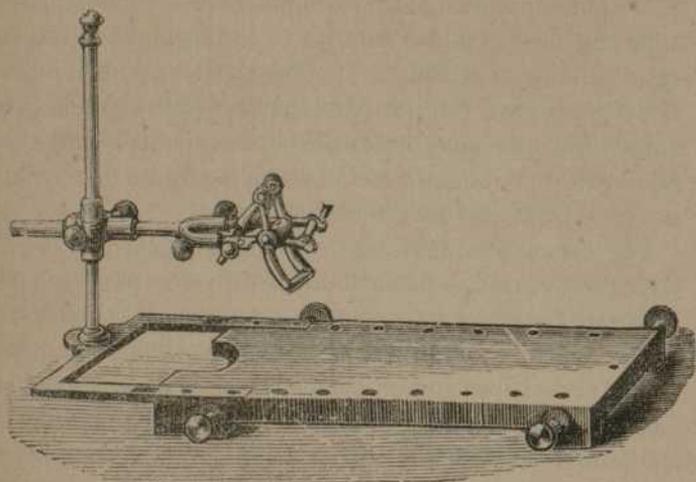


Fig. 87.—Mesa de vivisecciones sobre conejos, según CZERMAK, con soporte níquelado y pinza móvil sujetadora (60 fr.)

Preciso es no olvidar que debemos tener en cuenta al calcular este volúmen la proporción acuosa que se ha condensado en el tubo en **U** continente de ácido sulfúrico, el cual se pesará antes y después de la operación.

Este proceder operatorio de GAUTIER presenta entre otras, las positivas ventajas siguientes:

La sangre pasa *rápida y directamente* del tronco vascular al vacío, sin experimentar ningún contacto con el aire. Gracias á la prontitud de la experiencia y al licor de oxalato, jamás se coagula en tanto se le están extrayendo los gases. Esta sustracción se efectúa con una

temperatura de 37°—38°, y muy rápidamente dada la escasa capacidad de la pipeta en la que se efectuó el vacío.

Después de agotados directamente todos los gases, basta sumergir la extremidad inferior de la pipeta receptoriz, en agua caliente acidulada con ácido tártrico, y abrir ligeramente su llave inferior para sustraer todo el ácido carbónico que quedaba combinado con los álcalis hemáticos. Dos ó tres movimientos en la bomba aspirante mercurial, son muy bastantes para recogerlo.

Por último: en lugar del recipiente —pipeta con doble esfera de GAUTRIER,—puede también utilizarse para recoger la sangre (en casos excepcionales y necesarios) un frasco de dos bocas al que previamente se hace el más completo vacío, al haberle comunicado con la bomba. Se llena luego de sangre mediante un largo tubito de goma flexible lleno de la solución salina y ligado á los conductos vasculares del animal. A éste le tendremos sujeto á favor de cualquiera de los aparatos propios al caso, cual el de KITASATO (*Fig. 86*) para ratones, ó el de CZERMAK (*Fig. 87*) para conejos etc. (V. pág. 37).

## 2.° — Métodos determinativos de los gases sanguíneos.

Cuantos gases existen en la sangre, y que mediante el vacío barométrico hemos expulsado y extraído con la bomba, hallanse en el tubo eudiométrico, que cual sabemos está exactamente calibrado, y tiene en su extremo superior cerrado y esferoidal dos hilitos de platino.

Veamos ahora, cómo se determina cada uno de aquellos gases de modo independiente.

a.) — Determinación del ácido carbónico. — Para ello se

introduce mediante un alambre de platino al través del mercurio y por el extremo inferior del eudiómetro, una bola de potasa cáustica mojada de agua en su superficie. Introducida dicha bolita en el seno de la masa gaseosa se combina con el  $\text{CO}_2$  formándose carbonato potásico. Después de largo rato se extrae la bolita por el mismo camino que entró, y con idénticas precauciones que al principio. La disminución en el volumen de la mezcla gaseosa, nos enseñará el del  $\text{CO}_2$  que ha desaparecido.

b.)—Determinación del nitrógeno.—Esta resulta por exclusión, toda vez que eliminados los volúmenes del  $\text{CO}_2$  y del O (según procederemos que ahora estudiaremos) por sus peculiares métodos, la diferencia resultante será la del N.

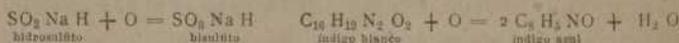
c.)—Determinación del oxígeno.—Aparte del poco práctico método antiguo de QUINQUAUD (pág. 355), podemos valernos para ejecutar esta interesante operación de los que á continuación apuntamos:

a.)—Por el fósforo.—Cual antes practicamos la introducción de la bola de potasa para valorar el  $\text{CO}_2$ , se mete también auxiliados de un alambre de platino, una bolita de fósforo (BERTHOLET), que se apoderará del O para formarse ácido fosfórico. También pudiéramos valernos de una bolita seca de cook, ó de papel *moche*, impregnada en una disolución de ácido pirogálico en legía de potasa que se apodera con avidez del O existente en el tubo eudiométrico. Extraída la esferita, la disminución en el volumen gaseoso indica también la cantidad de oxígeno.

b.)—Por la mezcla detonante.—El método más exacto y rápido para determinar la proporción de oxígeno es la

producción de la mezcla detonante ú óxido-hídrica, dentro del eudiómetro (VOLTA, BUNSEN).—Para conseguirlo se introduce en el tubo eudiométrico un volúmen abundante pero exactamente conocido de hidrógeno; seguidamente se pasa una chispa eléctrica por los alambres que en su extremo cerrado y penetrando en su interior lleva aquel tubo; combinanse el O y el H formándose agua, lo cual origina una reducción en el volúmen de la mezcla gaseosa existente en el eudiómetro, y en cuya reducción corresponde una tercera parte al O gastado para formar agua (H<sub>2</sub> O).

c.)—Por el hidrosulfito de sodio y el indigo.—Básase el método más preciso de SCHOTZENBERG y RISLER, (1) modificado por QUINQUAD (2) para los usos clinicos, en la fácil reducción del indigo azul por el hidrosulfito de sodio, que se transforma en bisulfito, y en la propiedad que posee el O de la Hb en volver á oxidar el indigo reducido al transformarlo de nuevo en indigo azul, cual resulta de las fórmulas siguientes:



Son necesarios para llevar á cabo este proceder los reactivos siguientes obtenidos tal cual se expresan:

1.)—Para lograr buen *hidrosulfito de sodio*, se rellena por completo de recortaduras de zinc, un frasco de unos 200 cm<sup>3</sup> de cabida, sin tararlo; y se adicionan hasta el borde, aproximadamente 100 gr. de bisulfito de sosa de 1,26 de densidad. Se tapa herméticamente, y al cabo de

(1) *Bull. de la Soc. chimique.*

(2) *Quinquad: chim.*

una  $\frac{1}{2}$  hora se vierte el líquido en 5 litros de agua, adicionando de 50 á 200 gr. de lechada de cal constituida por 200 gr. de cal viva por litro. Se agita y deja en reposo; luego se decanta el líquido claro en frascos bien llenos y tapados para preservarlo del contacto del aire. Débese titular cada vez la solución.

2.)—Como será necesario disponer de *sulfato de cobre amoniacal*, le obtendremos puro, disolviendo 4 gr., 46 de sulfato de cobre puro, cristalizado y no eflorescente en un poco de agua, añadiendo amoniaco hasta redisolución completa del precipitado primeramente formado, y después se adiciona hasta un litro á 13°.

Conviene advertir que una avo parte del líquido cede al hidrosulfito, decolorándose 1 décimo de  $\text{cm}^3$ , de oxígeno á 0° y 760<sup>mm</sup>.

3.)—Para obtener previamente la *solución de carmin de indigo*, se disuelven al baño-maría 100 gr. de dicha sustancia (sulfo-indigato sódico) en pasta, en 2 litros de agua; se agregan luego hasta 10 litros mezclando intimamente. Se reparte en frascos de 1 litro y se conserva la solución tintórea al abrigo de la luz en evitación de posibles alteraciones.

Obtenidos los anteriores reactivos, todas las operaciones deben hacerse en vasijas perfectamente vaciadas de aire, y ocupadas por atmósfera de hidrógeno, lo cual se consigne por medio del aparato construido por ALVERGNAT (1) compuesto esencialmente: 1.° de un sistema de frascos y probetas; 2.° de un generador grande de hidró-

---

(1) LAMBLING—loc. cit. pág. 39.

geno preparado por la reacción del ácido clorhídrico sobre el zinc.

El aparato propiamente dicho se compone de un frasco de tres bocas de capacidad casi de un litro. Su abertura media la cierra un tapón doblemente agujereado, en cuyos agujeros se fijan las extremidades de dos buretas de МОНА divididas en décimas de  $\text{cm}^3$ , y mantenidas por un soporte común. Las aberturas laterales están cerradas por taponés cada uno con dos agujeros; en uno de los orificios se pone un embudo esférico con llave, de unos 100  $\text{cm}^3$  cuyo tubo de derrame llega al fondo y constituye el tubo conductor del gas hidrógeno; el otro lleva el tubo de salida del gas, cuya extremidad dirigida hacia un vaso lleno de agua tiene el papel de un sifón vaciador, terminando su extremidad inferior en un tubo de cautchuc para poderlo cerrar con solo plegar sobre sí mismo dicha goma.

El hidrosulfito se halla contenido en un frasco cerrado por tapón de cautchuc con dos agujeros, por los que penetran dos tubos acodados en ángulo recto y sumergidos por completo en el líquido; uno de los tubos se cierra por un tubo de goma y una varilla de cristal maciza; el otro está ligado á uno que conduce gas del alumbrado desembarazado de su oxígeno por un lavado al través de piedra pómez impregnada de pirogalato potásico. Un conveniente dispositivo permite dejar pasar el líquido á la bureta evitando el contacto del aire. La bureta con hidrosulfito está cerrada por tapón de cautchuc á cuyo través un tubo de cristal conduce y mantiene por cima del líquido una atmósfera de hidrógeno. La segunda bu-



La solución de indigo así titulada servirá más adelante para dosificar las de hidrosulfito.

Veamos ahora cómo se ejecuta la *dosificación del oxígeno* contenido en la sangre. Para ello se introduce en el frasco lavado 200 cm<sup>3</sup> de agua hervida, y enfriada á + 45° teniendo en suspensión 10 gr. p.  $\frac{0}{6}$  de kaolin destinado á atenuar el tinte rojo de la sangre y á que se haga más visible la aparición y desaparición del tinte azul al terminar la reacción; y después 50 cm<sup>3</sup> de indigo el cual se decolorará por el hidrosulfito después de haber pasado la corriente de hidrógeno. El tubo del embudo esférico está lleno exactamente de agua hervida purgada de aire.

El líquido amarillo no debe azularse en la superficie si la atmósfera del frasco no encierra oxígeno. Se vierte entonces el indigo hasta que aparezca con tinte azul, después algunas gotas de hidrosulfito hasta decoloración, obteniéndose así un medio que encierra indigo blanco sin exceso de hidrosulfito.

La sangre desfibrinada, por el batido con una varita en un vaso casi lleno y cerrado con membrana de cautchuc provista de un agujero por donde pasa el agitador, se aspira de una sola vez con una pipeta en cantidad de unos 2—5 cm<sup>3</sup> (RITTER) y se introduce en el embudo esférico, desde el cual vá al frasco del indigo blanco; se lava la pipeta con agua hervida, y esta también se vierte en el embudo, y se deja pase todo el líquido sanguíneo al contenido del frasco por medio de agua hervida.

Se puede también, cual hace QUINQUAUD, aspirar directamente la sangre de la vena ó de la arteria con una pipeta-jeringa cuyos huecos se llenan de agua purgada

de aire y se introduce directamente en el embudo. El líquido turbio toma á poco un tinte azul por la influencia del oxígeno hemático; se destruye con el hidrosulfito hasta lograr un tinte amarillo-rojizo franco sin mezcla de verde.

Exigen 5 cm<sup>3</sup> de sangre examinada unos 8,5 cm<sup>3</sup> de hidrosulfito, por ej.

Se titula ahora el hidrosulfito vertiendo á la mezcla 50 cm<sup>3</sup> de índigo que exigen para su decoloración 9,2 cm<sup>3</sup> de hidrosulfito.

Se establece el cálculo siguiente:

$$\begin{aligned}
 & 50 \text{ cm}^3 \text{ de índigo ceden } 50 \times 0,0235 \text{ de oxígeno á } 9,2 \text{ cm}^3 \text{ de hidrosulfito.} \\
 & 1 \text{ cm}^3 \text{ de hidrosulfito absorbe } \dots \dots \dots \frac{50 \times 0,0235}{9,2} \text{ de oxígeno.} \\
 & \text{y } 8,5 \text{ cm}^3 \text{ de hid. ó } 5 \text{ cm}^3 \text{ de sangre corresp. á } \frac{50 \times 0,0235 \times 8,5}{9,2} = 1,097 \text{ cm}^3 \text{ de O.} \\
 & 100 \text{ cm}^3 \text{ de sangre contienen pues, } 1,097 \text{ cm}^3 \times \frac{100}{5} = 21,94 \text{ cm}^3 \text{ de O.}
 \end{aligned}$$

Tal es el procedimiento analítico que goza de mejor reputación, por cuanto comparando las cantidades de O proporcionadas en el análisis de una misma sangre por la bomba mercurial ó por el hidrosulfito, obsérvase ordinariamente una sensible diferencia ya hecha notar por el mismo SCHUTZENBERGER. El proceder al hidrosulfito dá siempre de 4 á 5 cm<sup>3</sup> de oxígeno por  $\frac{1}{100}$  de sangre más que el del vacío.

Divergencia explicada fácilmente «por la rapidez con la que la sangre abandonada á si misma consume el O que encierra. Una extracción de los gases hemáticos con la bomba, exige, al menos, un cuarto de hora ó 20', y no es extraño ver desaparezcan de 4 á 5 cm<sup>3</sup> de oxígeno á

la temperatura de 40° ó 50°, en tanto que con este procedimiento de hidrosulfito la dosificación es instantánea».  
SCHÜTZENBERGER.

LAMBLING (pág. 51) dice á este propósito: que la experiencia ha demostrado que la reducción de la oxihemoglobina por el hidrosulfito se detiene, produciéndose solo **Hb.** reducida, sin llegar al hemocromógeno, cual ya lo pensaba HOPPE-SEYLER, de donde resulta que el procedimiento determinativo del oxígeno sanguíneo según SCHÜTZENBERGER es el solo exacto para la sangre.

FIN DE LA PRIMERA PARTE.

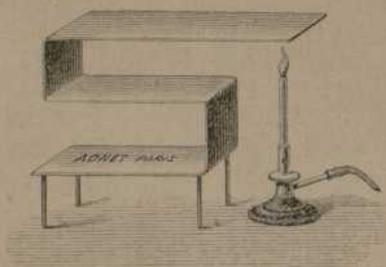


Fig. 88.—Platina caliente de MALASSEZ de cobre  
niquelado y de temperaturas varias.—Cuesta sin  
pico de gas 17,51 fr. (V. pág. 66).

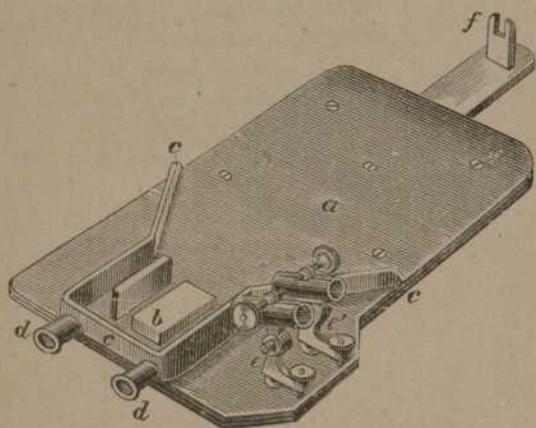


Fig. 89.—Platina de THOMA para observar la circulación hemática en  
la lengua de la rana viva.—36 fr. (V. pág. 34).



# ÍNDICE DE MATERIAS.

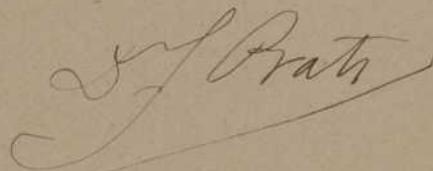
Páginas.

CONSIDERACIONES PRELIMINARES. . . . .	1
---------------------------------------	---

## PRIMERA PARTE.

### HEMATOTECNIA NORMAL.

A. Investigación de las características morfo-genéticas. . . . .	9
I. Obtención de sangre. . . . .	10
II. Medios de conservarla y fijarla. . . . .	16
1.º Líquidos conservadores:	
a. Solución clorurada sódica. . . . .	16
b. Sueros naturales. . . . .	17
c. Licor yodo-yodurado. . . . .	17
d. Solución picrica. . . . .	17
e. — argéntica . . . . .	17
f. Licor de Pacini . . . . .	18
g. — de Hayem . . . . .	18
h. — de Boullard . . . . .	19
i. Suero artificial colorante . . . . .	20
j. Licor de Graeber . . . . .	20
2.º Líquidos fijadores:	
a. Ácido acético . . . . .	20
b. Solución ósmica. . . . .	21
c. Solución cromo-osmo-acética. . . . .	21
d. Líquido de Zencker . . . . .	22
e. Calor. . . . .	23
III. Examen de la sangre viva circulante. . . . .	25



	<i>Páginas</i>
1.º Larvas de batracios. . . . .	26
2.º Peces . . . . .	28
3.º Rana adulta viva. . . . .	29
a. Pulmón . . . . .	29
b. Mesenterio. . . . .	31
c. Lengua . . . . .	33
d. Membrana interdigital. . . . .	36
4.º Mamíferos. . . . .	37
IV. Obtención de preparados húmedos de sangre. . . . .	38
V. Obtención de preparados hemáticos secos. . . . .	41
VI. Examen de la sangre en cortes. . . . .	43
VII. Eritrocitotecnica. . . . .	46
VIII. Leucocitotecnica. . . . .	57
IX. Procederes de coloración de hematíes y leucocitos. . . . .	80
Métodos generales. . . . .	80
Métodos especiales de:	
Batcher . . . . .	81
Wissowsky, Tanhaufer y Gierke . . . . .	82
Moore . . . . .	83
Harris . . . . .	84
Tolson . . . . .	84
Heidenhain . . . . .	85
Ehrlich . . . . .	86
X. Obtención, examen y coloración de las plaquetas . . . . .	98
XI. Investigación del origen y evolución de las células hemáticas . . . . .	103
XII. Plasma sanguíneo. . . . .	109
a. Obtención del mismo sin mezcla alguna . . . . .	109
Por sedimentación tranquila . . . . .	110
Por centrifugación . . . . .	111
b. Su obtención mezclando la sangre á otros líquidos. . . . .	116
c. Obtención, examen y demostración de la fibrina . . . . .	118

	<u>Páginas.</u>
Investigación microscópica . . . . .	119
Obtención de grandes cantidades . . . . .	121
Obtención de la fibrina de estroma . . . . .	122
d. Obtención de suero hemático . . . . .	123
<b>B. Investigación de las características físico-matemáticas . . . . .</b>	<b>131</b>
I. Examen del color, olor, sabor y consistencia . . . . .	131
II. Determinación de la cantidad total de sangre . . . . .	132
a. Proceder de Welcker . . . . .	134
b. — de Vierordt . . . . .	135
c. — de Grehant y Quinquad . . . . .	136
d. — de Malassez . . . . .	136
e. — de Gubler y Renaut . . . . .	137
III. Determinación de la cantidad hemática de cada órgano en particular . . . . .	139
IV. Determinación del peso específico de la sangre . . . . .	141
a. Método de Schmatz . . . . .	143
b. — de Roy modificado por Devoto y Stegl. . . . .	144
c. — de Roy modificado por Landois . . . . .	145
Determinación del peso específico del eritrocito . . . . .	147
V. Volumetría hemática . . . . .	147
1.º Métodos volumétricos físicos . . . . .	148
a. Proceder de Welcker . . . . .	148
b. — Hedin . . . . .	148
c. — Mayet . . . . .	153
2.º Métodos volumétricos químicos . . . . .	155
a. Proceder de Hoppe-Seyler . . . . .	155
b. — de Gautier . . . . .	159
c. — de Bouchard . . . . .	164
VI. Numeración hemática . . . . .	165
Fundamentos del método . . . . .	171
1.º Numeración de los eritrocitos . . . . .	173
a. Técnica de la dilución titulada . . . . .	173
Sueros diluidores . . . . .	173
Aparatos mezcladores . . . . .	176

	<i>Páginas.</i>
Modos de manipular. . . . .	178
b. Procederes y aparatos para numerar . . . . .	181
<i>a.</i> Método antiguo de Malassez . . . . .	182
<i>b.</i> — — — — — de Hayem. . . . .	186
<i>c.</i> — — — — — de Alfierow . . . . .	190
<i>d.</i> — — — — — de Kronecker. . . . .	191
<i>e.</i> — — — — — de Thoma-Zeiss . . . . .	192
<i>f.</i> — — — — — nuevo de Malassez . . . . .	197
<i>g.</i> — — — — — moderno de Hayem-Nachet . . . . .	202
2. <sup>o</sup> Numeración de los leucocitos. . . . .	206
<i>a.</i> Método de Bizzozero y Firket . . . . .	207
<i>b.</i> Proceder basado en el uso de la misma amplificación . . . . .	210
<i>c.</i> Método de Grancher . . . . .	212
<i>d.</i> — — — — — de Thoma . . . . .	213
3. <sup>o</sup> Numeración de las plaquetas . . . . .	217
VII. Medición globular hemática. . . . .	219
1. <sup>o</sup> . método: ocular micrométrico . . . . .	224
2. <sup>o</sup> — — — — — micrometro objetivo solo . . . . .	224
3. <sup>o</sup> — — — — — micrómetro objetivo y cámara clara. . . . .	226
4. <sup>o</sup> — — — — — los dos micrómetros . . . . .	231
5. <sup>o</sup> — — — — — volúmen de los glóbulos aislada- mente. . . . .	234
<b>C. Investigación de las características químico-biológicas . . . . .</b>	<b>235</b>
I. Determinación de la alcalinidad hemática. . . . .	235
<i>a.</i> Proceder de Zuntz . . . . .	235
<i>b.</i> — — — — — Liebreich . . . . .	236
<i>c.</i> — — — — — Haycraft y Williamson . . . . .	236
<i>d.</i> — — — — — Landois . . . . .	236
<i>e.</i> — — — — — Jacksch . . . . .	240
<i>f.</i> — — — — — Schultz-Schultzenstein . . . . .	242
<i>g.</i> — — — — — Kraus y Klemperer . . . . .	246
II. Técnica hemoglobínica . . . . .	246
1. <sup>o</sup> Investigaciones cualitativas hemoglobínicas . . . . .	247

a.	Obtención de los cristales de hemoglobina.	250
a.	Proceder de Rollet.	251
b.	— Hoppe-Seyler . . . . .	251
c.	— Lehmann . . . . .	252
d.	— Ranvier . . . . .	253
e.	— Stöhr . . . . .	253
f.	— Renaut. . . . .	253
g.	— Pasteur . . . . .	253
h.	— Geschleiden . . . . .	254
b.	Obtención de los cristales de Hb. reducida.	254
c.	— de la metahemoglobina . . . . .	255
d.	— de la hematina . . . . .	256
e.	— de la hemina . . . . .	257
f.	— de la hematoidina . . . . .	260
g.	Determinación de la Hb oxicarbonica	261
h.	Obtención de la sustancia incolora de la Hb.	263
2.º	Investigaciones cuantitativas hemoglobínicas . . . . .	263
a.	Métodos colorimétricos . . . . .	267
a.	Proceder de Hoppe-Seyler . . . . .	272
b.	— Preyer . . . . .	274
c.	— Worm-Müller . . . . .	275
d.	— Jolyet y Lafont . . . . .	276
e.	— Bizzozero . . . . .	282
f.	— Gowers . . . . .	291
g.	— Lesser. . . . .	293
h.	— Welcker . . . . .	293
i.	— Hayem. . . . .	295
j.	— Quinquad . . . . .	297
k.	— Malassez . . . . .	297
l.	— Fleischl . . . . .	303
b.	Métodos diafanométricos. . . . .	306
a.	Proceder de Mantegazza . . . . .	306
b.	— Henocque . . . . .	308
c.	Métodos espectroscópicos. . . . .	312

	<i>Páginas.</i>
a. Del espectroscopio y su manejo . . . . .	316
b. Exámen espectroscópico de la sangre circulando . . . . .	361 326
c. Exámen espectroscópico de la sangre extra-corpús . . . . .	329
d. Microespectroscopía . . . . .	335
Método alemán. . . . .	335
— inglés . . . . .	337
d. Métodos espectrofotométricos . . . . .	341
a. Proceder de Vierordt . . . . .	346
b. — Hűfner. . . . .	348
c. — Engelmann . . . . .	351
e. Métodos químicos de hemoglobintecnia. . . . .	355
a. Determinación de la Hb por el cloro . . . . .	355
b. — por la cantidad de he- matina formada . . . . .	355
c. Determinación por el Fe que entra en su composición . . . . .	356
d. Determinación por el oxígeno absorbido. . . . .	358
III. Quimiotecnia hemática . . . . .	361
1.º Determinación total de los materiales sanguíneos . . . . .	362
2.º Determinación parcial de cada uno. . . . .	366
a. Obtención de los albuminoides. . . . .	366
b. Dosificación de la urea . . . . .	368
c. Investigación del ácido úrico . . . . .	372
d. Investigación de la leucina, tirosina, creatina . . . . .	375
e. Investigación del amoniaco . . . . .	376
f. Investigación de los alcoloides y materias colorantes anormales . . . . .	377
g. Determinación de los hidratos de carbono. . . . .	377
h. Investigación de los ácidos grasos volátiles. . . . .	381
i. Investigación de la lecitina, colestestina y grasas . . . . .	383

j. Investigación de los ácidos biliares.	383
k. Determinación de las sales y del agua	384
IV. Análisis de los gases hemáticos.	384
1.º Métodos de extracción	386
a. Extracción por el calor	386
b. Extracción por desalojo con otro gas	386
a. Procedimiento de Priestley	386
b. — Vauquelin	387
c. — Cl. Bernard	387
c. Extracción por el vacío	388
a. Por el vacío neumático	388
a. Procedimiento de Magnus	389
b. — Setschenow	389
b. Por el vacío al hervir agua	389
c. Por el vacío barométrico.	389
a. Proceder de Ludwig Helmholtz	390
b. — Pilüger-Alvergriat	391
c. — Gautier.	398
2.º Métodos determinativos.	402
a. Determinación del ácido carbónico	402
b. — nitrógeno	403
c. — del oxígeno.	403
a. Por el fósforo.	403
b. — la mezcla detonante	403
c. — el hidrosulfito y el índigo	404



## ÍNDICE DE FIGURAS.

	<i>Páginas.</i>
1 Murciélago con alas extendidas. . . . .	25
2 Larvas de rana . . . . .	26
3 Circulación en el mesenterio de la rana. . . . .	32
4 — en la membrana interdigital de la rana. . . . .	36
5 Glóbulos sanguíneos. . . . .	42
6 Alambre doblado para bordear. . . . .	43
7 Eritrocitos humanos . . . . .	49
8 — deformados . . . . .	50
9 Glóbulos sanguíneos humanos. . . . .	51
10 Poikilocytosis . . . . .	53
11 Movimiento amiboideo de los leucocitos. . . . .	64
12 Amibocytos. . . . .	65
13 Leucocitos y tabletas de hematoidina . . . . .	67
14 Platina caliente de Ranvier . . . . .	68
15 — caliente de Pfeifer . . . . .	70
16 — nueva de Reichert . . . . .	71
17 — de Reichert colocada en el microscopio . . . . .	72
18 Tubo calentador de Francotte . . . . .	74
19 Caja calentadora de Zeiss . . . . .	76
20 — de Krönnig para calentar y teñir. . . . .	98
21 Baño de aire caliente de Krönnig . . . . .	102
22 Capilares en vías de crecimiento. . . . .	104
23 Leucocitos en segmentación directa. . . . .	108
24 Centrifugo manual de Altmann . . . . .	111
25 Red de fibrina hemática humana . . . . .	119
26 Microscopio de preparación Zeiss . . . . .	127
27 — de observación Zeiss . . . . .	127
28 Caja esterilizadora de Altmann . . . . .	128
29 Aparato de iluminación Abbe . . . . .	128

30	Termostato perfeccionado por Altmann.	129
31	Hematocrito de Hedin	149
32	Hemocytómetro de Thoma-Zeiss	176
33	Pipeta de Miescher	177
34	Celda de Hayem calibrada	186
35	Vaso mezclador de Hayem	187
36	Estuche con el aparato numerador Thoma-Zeiss	193
37	Detalles del cuenta-eritrocitos de Thoma-Zeiss	194
38	Estuche con cuenta- glóbulos Malassez-Verick	198
39	Cámara húmeda graduada de Malassez	199
40	Hematímetro Hayem-Nachet	202
41	Corte vertical del hematímetro de Hayem	203
42	Red ocular cuadrículada	209
43	Mesa de Bernhard para dibujar y medir	229
44	Ocular micrométrico de tornillo	231
45	Eritrocitos de frente y perfil	234
46	Cristales de hemoglobina	248
47	— de hemina	258
48	— de hemina	259
49	— de hematóidina	260
50	Colorímetro de Duboscq-Laurent	276
51	Cromocytómetro de Bizzozero	282
52	Tubo externo del cromocytómetro de Bizzozero	283
53	— interno del cromocytómetro	283
54	Corte del cromocytómetro de Bizzozero	283
55	Pantalla del aparato de Bizzozero	284
56	Cromómetro de Hayem	295
57	Hemocromómetro de Malassez	301
58	Hemómetro de Fleischl	304
59	Hematoscopio de Henocque	308
60	— funcionando	309
61	Esquema del espectróscopo ordinario	317
62	Espectroscopio de Bunsen-Kirchoff gran modelo	318
63	— pequeño modelo de Bunsen-Kirchoff	319

	<i>Páginas.</i>
64 Espectroscopio ordinario funcionando . . . . .	320
65 Prisma de Amici. . . . .	321
66 — de Hoffmann . . . . .	321
67 Espectroscopio de Jansen-Hofmann . . . . .	322
68 — de bolsillo de Browning. . . . .	323
69 — de Vogel de bolsillo . . . . .	323
70 — de Haring en corte . . . . .	325
71 Cubas hematinométricas. . . . .	329
72 — de absorción . . . . .	330
73 Micro-espectroscopio de Abbe-Zeiss . . . . .	338
74 Tambor del aparato anterior . . . . .	339
75 Celdas para exámenes microespectroscópicos . . . . .	341
76 Porta-objetos con celda oblicua de Beck . . . . .	341
77 Celda de Bizzozero . . . . .	342
78 Microespectrofotómetro de Engelmann. . . . .	352
79 Corte del aparato de Engelmann . . . . .	353
80 Cristales de ácido úrico según Garrod . . . . .	373
81 Diversas formas cristalinas de ácido úrico . . . . .	374
82 Cristales de fenilglicosazono . . . . .	380
83 Extractor de gases de Geisler . . . . .	392
84 — — — — Geppert . . . . .	393
85 Bomba mercurial de Pflueger . . . . .	394
86 Tablita vivisecciones de Kitasato . . . . .	399
87 Mesa de vivisecciones de Czermack . . . . .	401
88 Platina caliente de Ma'asso . . . . .	411
89 Mesa de Thoma . . . . .	411



## PUBLICACIONES DEL DR. A. G. PRATS.

---

- 1 **Granulaciones de la conjuntiva.**—Tesis de Doctor calificada con nota de Sobresaliente. Madrid, 1884.
- 2 **Del hipopión.**—Granada, 1885. (Publicado en la «R. de Especialidades de Madrid» y en «La Clínica» de Granada).
- 3 **Del orzuelo.**—Granada, 1887.
- 4 **Más sobre el hipopión.**—Granada, 1888. (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»).
- 5 **Preparación anatómica de la válvula existente en la desembocadura del conducto torácico.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»), 1887.
- 6 **Modo de plantear las Colonias escolares en Granada.**—Trabajo laureado con el *primer premio* en Certamen público de la R. S. Económica de Granada, é impreso á su costa. Granada, 1891.
- 7 **Hojas antropológicas de los niños que formaron la 1.<sup>a</sup> Colonia escolar de vacaciones de Granada que costeó la R. S. Económica.** Granada, 1891.
- 8 **De la reproducción fotográfica en la ciencia médico-quirúrgica.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada 1891.
- 9 **Discurso-Memoria de los trabajos llevados á cabo en la Sección de Estudios para la Enseñanza de la mujer que costeó la R. S. Económica de Granada. Leído en su sesión inaugural como Profesor Secretario de la misma.** Granada, 1892.
- 10 **Programa de un curso de lengua alemana.**—Granada, 1894.
- 11 **Examen de la sangre viva circulante.**—(Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada, 1895.
- 12 **De la Sueroterapia.**—(Publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1895.
- 13 **Medicación dermatica.**—Granada, 1895.

- 14 **Numeración eritrocítica con el hemocytómetro de THOMA-ZEISS.**  
—Granada, 1895 (con figuras).
- 15 **Técnica de las inyecciones antidiftéricas.**—Granada, 1895.
- 16 **Del dibujo micro-técnico.**—Granada, 1895 (con figuras).
- 17 **Metodología histológica.**—Introducción á un Programa de oposiciones á Cátedras de Histología (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada, 1895.
- 18 **Higiene en las peluquerías.**—(Publicado en el «Defensor de Granada»). Granada, 1896.
- 19 **Del anestésico bromuro de etilo.**—(Publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1896.
- 20 **Memoria de los trabajos de la Sección Científico-Profesional del Colegio de Médicos de Granada;** leída en su sesión de apertura de 1896.
- 21 **Radiaciones røtgenianas.**—Granada, 1896.
- 22 **Obtención de los gases sanguíneos mediante la bomba de PFLÜGER.**  
—Granada, 1897 (con figuras).
- 23 **Hematotecnia normal.**—Granada, 1897 (con figuras).
- 24 **Dos observaciones de Spondilochisis, subsiguiente Spondilolistesis y diartrosis interespinosas.**—Comunicación leída en la sección científica del colegio de Médicos, 1897. (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada», con figuras).
- 25 **Cómo se elige una buena nodriza.**—Publicado en el «Defensor de Granada». Granada, 1897.
- 26 **Últimos estudios sobre el tricofitón.**—(Estudio crítico publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1897.





- 13 **Medicación dermatica.**—Granada, 1895.
  - 14 **Numeración eritrocítica con el hemocytómetro de THOMA-ZEISS.**  
—Granada, 1895 (con figuras).
  - 15 **Técnica de las inyecciones antidiftéricas.**—Granada, 1895.
  - 16 **Del dibujo micro-técnico.**—Granada, 1895 (con figuras).
  - 17 **Metodología histológica.**—Introducción á un Programa de oposiciones á Cátedras de Histología. (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada»). Granada, 1895.
  - 18 **Higiene en las peluquerías.**—(Publicado en el «Defensor de Granada»), Granada, 1896.
  - 19 **Del anestésico bromuro de etilo.**—(Publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1896.
  - 20 **Memoria de los trabajos de la Sección Científico-Profesional del Colegio de Médicos de Granada; leída en su sesión de apertura de 1896.**
  - 21 **Radiaciones røetgenianas.**—Granada, 1896.
  - 22 **Obtención de los gases sanguíneos mediante la bomba de PFLÜGER.**  
—Granada, 1897 (con figuras).
  - 23 **Hematotecnia normal.**—Granada, 1897 (con figuras).
  - 24 **Dos observaciones de Spondilochisis, subsiguiente Spondilolistesis y diartrosis interespinosas.**—Comunicación leída en la sección científica del Colegio de Médicos, 1897. (Publicado en la «Gaceta Médica de Granada», con figuras).
  - 25 **Cómo se elige una buena nodriza.**—Publicado en el «Defensor de Granada». Granada, 1897.
  - 26 **Últimos estudios sobre el tricofitón.**—(Estudio crítico publicado en el «Boletín farmacéutico Picazo»). Granada, 1897.
-

Esta obra se halla de venta al precio de **SIETE** pesetas casa del Autor y en la librería de la Viuda é Hijos de Paulino V. Sabatel, Mesones, 52, Granada, y en las principales de España.



A. 6

Pr

HEMA

TOTI

NO

RM

7

es

7

<p>B 8 122</p>
------------------------