

Contribuciones a la morfología comparada de la fauna chilena

I. Observaciones hemato y linfológicas en anuros chilenos.

(Con 7 figuras y 6 tablas)

por

Augusto Latorre Agüero

(Recibido por la Redacción el 10-V-38)

Tomando en consideración que, de la hematología de los anuros existentes en nuestro país, no se ha hecho todavía un estudio completo y que, en la literatura morfológica faltan detalles acerca de la linfa de los anfibios, intentamos con el presente trabajo, no sólo contribuir al mejor conocimiento de la fauna chilena sino que al mismo tiempo obtener datos seguros respecto a la hematología y linfología de estos animales que puedan ser de alguna utilidad a todos aquellos que en el campo de la medicina experimental recurren a estos seres en el curso de sus investigaciones.

I. OBSERVACIONES HEMATOLOGICAS EN ANUROS CHILENOS

Con el objeto de que nuestros resultados se acerquen en lo posible a la realidad y evitar además las variaciones del cuadro hemático como consecuencia de la inanición, desecación o de otras condiciones desfavorables a que están sometidos los animales en cautiverio, hemos verificado todas nuestras experiencias en animales recién capturados de las especies *Calyptocephalus Gayi*, *Paludicola Bibronii* y *Rhinoderma Darwinii*, antes de transcurridas 24 horas en nuestro poder. Después de muerto el animal mediante una pequeña dosis de cloroformo, abrimos la pared ventral y, después de seccionar la punta del

corazón aspiramos con una pipeta delgada la sangre corriente directamente del ventrículo. Las primeras observaciones se realizaron a fines de Marzo, otras en Junio y a fines de Diciembre.

Eritrocitos

Los eritrocitos de las especies examinadas ofrecen, a pesar de que su estructura general es común, diferencias considerables en cuanto a su forma y a su tamaño (véase Tabla 1), de modo que *Calyptocephalus* posee los eritrocitos más grandes, en cambio *Paludicola* los más pequeños. Los eritrocitos de *Rhinoderma* corresponden, en cuanto a sus dimensiones, aproximadamente a las especies europeas *Rana esculenta* (22,8 — 24,4 x 15,7 — 16,3 μ seg. Schulz y v. Krüger 1925) y *R. temporaria* (21,7 — 23,2 x 15 — 16,1 μ). Además de la diferencia de tamaño de los eritrocitos enteros, se constatan que los núcleos difieren en las especies examinadas en sentido homólogo. Los eritrocitos de *Calyptocephalus* (véase Fig. 1) parecen en comparación con los de *Paludicola* (véase Fig. 2), considerablemente más alargados, mientras que los de *Rhinoderma* muestran una forma intermedia entre la de las dos especies anteriores.

TABLA 1

Diámetros de los eritrocitos y de sus núcleos en μ ¹⁾

	n	Eritrocitos						Núcleos					
		longitud			anchura			longitud			anchura		
		M	D	V	M	D	V	M	D	V	M	D	V
<i>Calyptocephalus Gayi</i>	50	29,73	30	24-36;	18,03	18	10-20;	8,13	8	8-10;	6	6	6.
<i>Paludicola Bibronii</i>	50	18,48	18	16,21;	13,95	14	12-18;	6	6	6;	4	4	4.
<i>Rhinoderma Darwinii</i>	50	22,4	22	18-26;	15,5	16	12-20;	8	8	8;	4	4	4.

El recuento de los eritrocitos se hizo en la cámara Thoma-Zeiss. Como se desprende de la Tabla 2, entre las especies examinadas, *Paludicola* ofrece la mayor cantidad de glóbulos rojos por mm. c. Este resultado no nos extraña porque vale la regla general que tamaño y cantidad de los eritrocitos están en proporción inversa. En cambio debe sorprender el hecho que la especie *Calyptocephalus* dotada de los eritrocitos más voluminosos los posee en mayor número que la especie *Rhinoderma* que posee eritrocitos de tamaño más reducido.

¹⁾ En esta como en las tablas siguientes significa: n número de observaciones; M valor medio; D valor modal; V máximo y mínimo.



FIG. 1.

Caliptocephalus Gayi. Eritrocito y linfocito grande.
Coloración panóptica seg. Pappenheim. Aum. 2100 x.

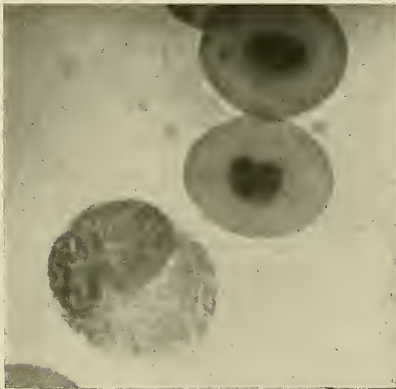


FIG. 2.

Paludicola bibronii. Eritrocito y monocito. Coloración
panóptica seg. Pappenheim. Aum. 2100 x.

T A B L A 2

Número de los eritrocitos por mm. c. ²⁾

	n	M	V
<i>Calyptocephalus Gayi</i>	10	489 000	375 000- 665 000;
<i>Paludicola Bibronii</i> (Marzo)	14	994 714	828 000-1 330 000;
id. id. (Junio)	7	1 063 560	900 000-1 250 000;
<i>Rhinoderma Darwinii</i>	11	363 500	300 000- 500 000;

La determinación de la hemoglobina se hizo con el hemoglobínómetro de Sahli. Desgraciadamente no fué posible determinar la hemoglobina en la especie *Rhinoderma*, debido al tamaño exiguo de ella. *Calyptocephalus* ofrece por término medio 49% (V= 40 — 60%), *Paludicola* 40 — 57%, *Rana esculenta* 52% p. t. m. (seg. Klieneberger 1927). Las diferencias son por consiguiente poco considerables.

Leucocitos

El recuento de los glóbulos blancos tropieza en los anfibios con serias dificultades. Desde luego no es posible aplicar el método corriente en sangre humana porque resulta imposible destruir los eritrocitos de los anfibios por medio de ácido acético, circunstancia que no permite el recuento exacto de los leucocitos. Además, para distinguir bien las células fusiformes de los linfocitos, es necesario aplicar un método de coloración especial. Por eso seguimos una técnica parecida a las empleadas por Klieneberger y Soenksen (1928), para constatar de una manera indirecta el número de los leucocitos.

En primer lugar fué determinado el número de los eritrocitos por mm. c. En seguida se constató en frotis teñidos con la coloración panóptica la relación existente entre el número de los eritrocitos y el de las células sanguíneas blancas y fusiformes. Así fué fácilmente posible calcular el número de células sanguíneas blancas y fusiformes por mm. c. Ahora, para excluir estas últimas, se constató en frotis teñidos con azul de metileno-fuxina seg. Pappenheim (1910; sit. seg. Romeis 1932) la proporción existente entre glóbulos blancos y células fusiformes. Con eso estuvimos en situación de determinar el número de leucocitos por mm. c.

Se constataron los valores siguientes:

²⁾ Numerosos datos más en las tablas de Schulz y v. Krüger (1925).

T A B L A 3

Número de los leucocitos por mm. c.

	n	M	V
<i>Calyptocephalus Gayi</i>	7	17 375	15 200 - 23 035;
<i>Paludicola Bibronii</i> (Marzo)	14	27 630	16 043 - 39 788;
id. id. (Junio)	7	27 725	23 648 - 32 900;
<i>Rhinoderma Darwinii</i>	7	10 097	9 410 - 11 700;

Los valores medios del número de leucocitos muestran notable analogía con los de los eritrocitos (véase Tabla 2). *Paludicola* tiene el número más alto de leucocitos como también de eritrocitos en el mm. c., al revés *Rhinoderma* el más bajo; *Calyptocephalus* ocupa una situación intermedia entre ambas especies.

La diferenciación de las células sanguíneas blancas se hizo en frotis teñidos con la coloración panóptica según los preceptos de Schilling (1922). En vista de la imposibilidad de distinguir exactamente por medio de esta tinción los linfocitos de las células fusiformes, se formó, en la diferenciación, un grupo que abarca ambos tipos celulares. En seguida se constató la proporción existente entre linfocitos y células fusiformes en frotis teñidos según Pappenheim (1910). Así fué posible determinar, con exactitud suficiente, el número de los linfocitos.

En vista de las considerables fluctuaciones cuantitativas que se observan en las distintas clases de leucocitos, no hemos creído conveniente calcular valores medios. Por eso daremos a continuación una tabla con las fórmulas leucocitarias individuales de los animales de cada especie.

T A B L A 4

Fórmulas leucocitarias

(6 ejemplares)

	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5	N.º 6
	%	%	%	%	%	%
Eosinófilos	19	15	50,1	33,4	43	27,6
a) Mielocitos	8,5	8	31,5	22,5	23,2	18,8
b) Juveniles	2,0	2,4	3,8	3,6	5,7	2,1
c) Baciliformes	2,0	0	3,6	2	4,2	2,1
d) Segmentados	6,5	4,6	11,2	5,4	9,9	4,6
Basófilos	10,4	15,5	6,5	10,6	8,8	10,2
a) Mielocitos	8,3	8,2	7,3	16,3	13,1	19,2
b) Juveniles	3,5	2	2	3	2,8	5
c) Baciliformes	2,7	1,3	0	2,4	2	4
d) Segmentados	0	1,8	2	2,4	2	2,5
Linfocitos	48,5	54,2	29,6	28,9	27	30
Monocitos	7,6	2	2,5	3	1,3	1,5

Paludicola Bibronii

(5 ejemplares Marzo)

	N.º 1 %	N.º 2 %	N.º 3 %	N.º 4 %	N.º 5 %
Eosinófilos	6	2,2	8,8	1,5	1,8
Basófilos	13,5	15	16,4	26,5	16,2
Neutrófilos	29,6	7,1	13,1	24	12,6
a) Mielocitos	10,5	3,4	7,6	9	3,6
b) Juveniles	7,5	1,5	2,9	4,5	1,8
c) Baciliformes	3,6	0	1,3	4,5	1,8
d) Segmentados	8	2,2	1,3	6	5,4
Linfocitos	41,5	65,3	55,9	42	47,6
Monocitos	13,5	10,4	5,8	6	21,6

Paludicola Bibronii

(5 ejemplares Junio)

	N.º 1 %	N.º 2 %	N.º 3 %	N.º 4 %	N.º 5 %
Eosinófilos	0	0	2,3	4,2	4
Basófilos	9,1	8,8	8,0	31,1	19,2
Neutrófilos	15,3	10,5	13,6	19	15,8
a) Mielocitos	3	3,2	4,1	3,3	0
b) Juveniles	2,5	1,2	3,2	3,3	3,1
c) Baciliformes	5,5	3,1	2,5	4,2	4,1
d) Segmentados	4,3	3	3,8	8,2	8,6
Linfocitos	70,2	72,5	63,5	44,5	59,3
Monocitos	5,4	8,2	12,9	1,2	1,7

Rhinoderma Darwinii

(5 ejemplares)

	N.º 1 %	N.º 2 %	N.º 3 %	N.º 4 %	N.º 5 %
Eosinófilos	3,5	2,4	3,1	0	2,4
Basófilos	18,7	10,8	16,7	18	11
Neutrófilos	11,1	9,6	11,2	11	11
a) Mielocitos	5,6	4,8	2	6	7,4
b) Juveniles	2,2	2,4	1	2,4	2,4
c) Baciliformes	1,1	1,2	2	1,2	1,2
d) Segmentados	2,2	1,2	6,2	1,2	0
Linfocitos	61,6	72,4	60,7	61,6	71,9
Monocitos	7,1	4,8	8,3	9,6	3,7

Los leucocitos eosinófilos (véase Fig. 3), cuyo diámetro fluctúa entre 11 y 22 y mide p. t. m. 15-16 μ , ofrecen un núcleo de forma bien variable; abundan las formas mielocitarias juveniles según la clasificación de Schilling. Los gránulos eosinófilos son redondos; en el Calyptocephalus son especialmente grandes (1,5-2 μ de diámetro), al revés en las demás especies son más pequeñas. Su cantidad puede fijarse en 50-80 por célula, como término medio; sin embargo se observan a veces también eosinófilos dotados de sólo 20-30 gránulos. Una relación entre la cantidad de los gránulos y la forma de núcleo no se ha podido constatar.

En el citoplasma se observan, con ciertas frecuencias, una o varias vacuolas. Los leucocitos eosinófilos son especialmente frecuentes (véase Tabla 4) en la sangre de Calyptocephalus. En la especie Rana esculenta se encuentran en un porcentaje de 1,8% seg. Loewenthal y de 6% seg. Klieneberger.

El diámetro de los leucocitos basófilos (véase Fig. 4) fluctúa en las especies examinadas entre 8-16 μ , observándose en la mayoría de las células un diámetro de 12 μ . El núcleo es redondo o arriñonado, nunca baciliforme o segmentado. Los datos proporcionados por los autores acerca de su frecuencia en la sangre de los anfibios están lejos de ser uniformes. Mientras que Pentimalli (sit. seg. Loewenthal) los ha observado sólo raras veces en la Rana esculenta y Freidsohn (1910) los ha encontrado en esta misma especie sólo en una frecuencia de 1,9 y 4% respectivamente, Loewenthal indica un porcentaje de 9,4% y Klieneberger una frecuencia de 23%. Entre las especies examinadas por nosotros fueron especialmente numerosos en la Paludicola en la que alcanzaron hasta el 31% del número total de los leucocitos.

Los leucocitos neutrófilos (véase Fig. 5) no ofrecen en los anfibios gránulos ciplasmáticos, llamándose por eso también con frecuencia pseudoneutrófilos. Su diámetro es en el Calyptocephalus un poco más grande (15 p. t. m.) que en las especies Paludicola y Rhinoderma, en las que alcanzan generalmente sólo 12-13 μ . Su porcentaje corresponde aproximadamente en las especies examinadas por nosotros a los que por Loewenthal (25%) y Klieneberger (26,5% p. t. m.) han constatado en la Rana esculenta. Entre los neutrófilos de Calyptocephalus se observan con gran frecuencia las formas mielocitarias.

En los linfocitos (véase Fig. 1) se distinguen formas pequeñas (diámetro 7-8 μ) y grandes (diámetro hasta 13 μ), encontrándose las formas pequeñas con más frecuencia. En comparación con los datos proporcionados para la especie europea Rana esculenta (Loewenthal 54,5%, Klieneberger 44,5% p. t. m.) no se observan en nuestro material diferencias cuantitativas de alguna importancia.

La afirmación de Klieneberger que en la sangre de Rana esculenta no se encuentren monocitos, no vale para las especies examinadas por nosotros. Pues estamos en situación de comprobar monocitos (véase Fig. 2) típicos de 18-20 μ de diámetro. p. t. m. en los tres anuros. A veces el citoplasma ofreció gránulo-

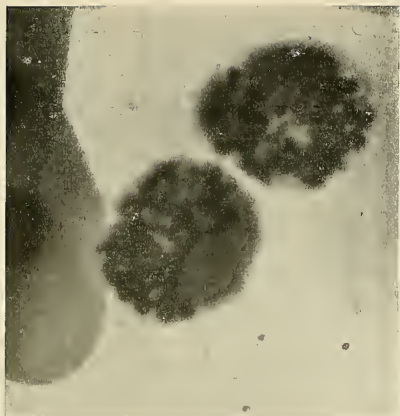


FIG. 3.

Calyptocephalus Gayi. Leucocito eosinofilo segmentado y mielocito eosinofilo. Coloración seg. Pappenheim. Aum. 2100 x.

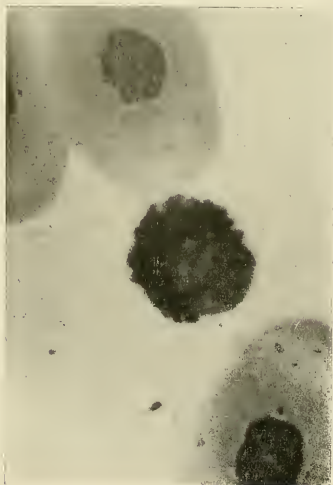


FIG. 4.

Calyptocephalus Gayi. Leucocito basófilo. Coloración panóptica seg. Pappenheim. Aum. 2100 x.

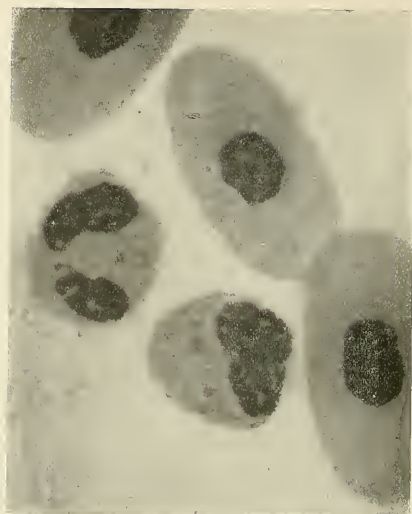


FIG. 5.

Calyptocephalus Gayi. Mielocito neutrofilo y leucocito neutrofilo segmentado. Coloración panóptica seg. Pappenheim. Aum. 2100 x.

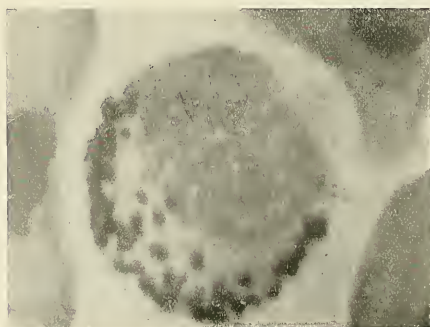


FIG. 6.

Calyptocephalus Gayi. Leucocito pigmentado. Coloración panóptica seg. Pappenheim. Aum. 3300 x.

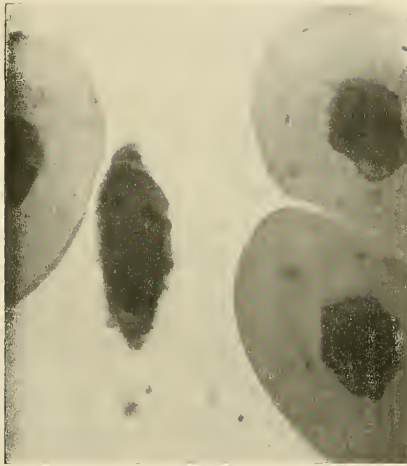


FIG. 7.

Calyptocephalus Gayi. Célula fusiforme. Azul de metileno - fuxina. Aum. 2100 x.

los azurófilos. Loewenthal ha constatado en la especie *Rana esculenta* que los monocitos forman el 9,3% p. t. m. de todos los corpúsculos blancos. Al revés en nuestras especies los monocitos se encuentran en frecuencias bastante variadas: *Calyptocephalus* 2-7%, *Paludicola* 5,8-21% y *Rhinoderma* 3,7-9,6%.

Ya hace tiempo se sabe que en la sangre de anfibios europeos existen **Leucocitos pigmentados** (Prenant, Freidsohn y otros). Loewenthal indica que se trata de linfocitos, monocitos o neutrófilos, dotados de cierta cantidad de pigmento alojado en el citoplasma. En las especies examinadas por nosotros hemos constatado igualmente leucocitos pigmentados, sin embargo, en cantidad bastante escasa. Se trató sin excepción de monocitos bien voluminosos, con un diámetro de alrededor de 18μ . En los frotis tratados con la tinción panóptica, el pigmento ofrece color verde oscuro, brillante; se encuentra principalmente en la periferie del citoplasma (véase Fig. 6).

Células fusiformes

Las células fusiformes, cuya significación morfológica queda hasta la fecha oscura, representan en el *Calyptocephalus* células, cuya longitud oscila entre 14 y 22μ y cuya anchura fluctúa entre 6 y 8μ . El núcleo es relativamente grande, mide 8-12 μ de longitud y 6-7 μ de anchura (véase Fig. 7).

El número de las células fusiformes asciende en el *Calyptocephalus* a 5 500 - 13 900, en la *Paludicola* 5 500 - 19 100, al revés en la especie *Rhinoderma* sólo a 600 - 2 140 p. mm. c. En la *Rana esculenta* su cantidad fluctúa, seg. Klieneberger entre 3 380 y 39 100 por mm. c.

Variaciones estacionales del cuadro hemático en la *Paludicola Bibronii*

Ya hace tiempo se sabe que la sangre de los anfibios experimenta variaciones cuantitativas y cualitativas relacionadas con la estación. De especial importancia fué constatar el verano, que se caracteriza en esta región por temperaturas bastante altas y la ausencia de precipitaciones, tiene influencia en el cuadro hemático de nuestros anuros. Con este fin, a fines de Diciembre hicimos algunas observaciones en la especie *Paludicola Bibronii*.

El número de eritrocitos fué constatado en 6 animales. Resultó un término medio de 1 022 500 por mm. c., siendo el mínimo 875 000 y el máximo 1 240 000. Al comparar estas cifras con las de la Tabla 2, llegamos a la conclusión que el número de eritrocitos queda en el verano completamente dentro de las fluctuaciones constatadas en otras estaciones del agua.

Al revés esta serie de observaciones se distingue de las demás por la ausencia total de eritrocitos en vías de segmentación mitótica, que en los animales examinados en Marzo y Junio se observaron con cierta frecuencia. Igualmente eritrocitos juve-

niles, frecuentes en otras estaciones, se encontraron sólo excepcionalmente en la sangre de los animales de verano.

El número de leucocitos fué constatado en 6 ejemplares. Se constató un término medio de 28 528 por mm. c. ($V=24\ 200-29\ 170$). Mientras que de este modo la cantidad de los leucocitos no difiere considerablemente de las demás estaciones (compárese Tabla 6), resultaron, al revés diferencias cualitativas dignas de consideración.

T A B L A 5

Fórmulas leucocitarias

Paludicola Bibronii. — Animales de verano.

	N.º 1	N.º 2	N.º 3	N.º 4	N.º 5
	%	%	%	%	%
Eosinófilos	2	0,5	1	2	0
Basófilos	10,5	11,5	15	31	12
Neutrófilos	30,5	12	6	8	3
a) Mielocitos	3,5	5	0	0	0
b) Juveniles	3,5	2	0	0	0
c) Baciliformes	5	1	0	2	1
d) Segmentados	18,5	4	6	6	2
Linfocitos	57	76	78	59	85
Monocitos	0	0	0	0	0

Al comparar las fórmulas leucocitarias de los animales de verano con las de Marzo y Junio (compárese Tabla 4) se nota que los neutrófilos mielocitarios y juveniles están bastante reducidos o faltan completamente. Este resultado corresponde totalmente a lo que ha sido constatado en los eritrocitos e indica que no solamente la eritropoyesis sino también la leucopoyesis está paralizada en la estación de verano. Además los linfocitos se encuentran notablemente aumentados en los animales de verano, pero el resultado, que llama nuestra atención especial, es la ausencia completa de monocitos en la serie de observaciones efectuadas en Diciembre. Tampoco han sido encontrados leucocitos pigmentados.

Las células fusiformes de los animales de verano no ofrecen ninguna particularidad. Su número asciende de 14 308 p. t. m. ($V=10\ 500-20\ 400$ por mm. c.).

II. OBSERVACIONES LINFOLOGICAS EN EL CALYPTOCEPHALUS GAYI

La linfa fué extraída del saco linfático subcutáneo lateral por aspiración con una jeringa hipodérmica y aguja fina. Desgraciadamente en la mayoría de los casos es inevitable, al puncionar la piel, abrir pequeños vasos sanguíneos de modo que

la linfa extraída está casi siempre mezclada con sangre. Sin embargo, con cierta práctica resulta posible reducir la cantidad de sangre entremezclada a una cantidad mínima.

Para el recuento de los elementos celulares de la linfa se usó la cámara contadora de Nageotte. En 5 ejemplares de *Calyptocephalus* se determinaron las cantidades siguientes:

N.º 1	95 células por mm. c. de las que	14 fueron eritrocitos
N.º 2	66 células por mm. c. de las que	3 fueron eritrocitos
N.º 3	68 células por mm. c. de las que	6 fueron eritrocitos
N.º 4	72 células por mm. c. de las que	6 fueron eritrocitos
N.º 5	13 células por mm. c. de las que	- fueron eritrocitos

Ranvier (citado seg. Levi, 1931) ha constatado 180 leucocitos por mm. c. en la linfa del saco linfático dorsal de la rana europea.

El recuento diferencial de las células de la linfa fué hecho en frotis teñidos con la coloración panóptica y con azul de metileno-fuxina. Se constataron los porcentajes siguientes:

T A B L A 6

Glóbulos blancos en la linfa de *Calyptocephalus* Gayi

	Linfocitos %	Monocitos %	Eosinófilos %
N.º 1	91	8	1
N.º 2	91	9	-
N.º 3	93	7	-
N.º 4	94	6	-
N.º 5	93	7	-

Entre los linfocitos que representan la gran mayoría de los elementos corpusculares de la linfa, se observan, como en la sangre formas grandes y pequeñas; sin embargo, los grandes linfocitos, que se encuentran en un porcentaje de más o menos 30, no ofrecen en la linfa el tamaño que alcanzan en la sangre (hasta 14 μ de diámetro y más).

Tampoco los monocitos de la linfa que en comparación con los linfocitos se observan en un porcentaje mucho menos considerable (6-9 μ), muestran el tamaño de las células homólogas de la sangre (18-20 μ), alcanzando su diámetro en la linfa generalmente sólo 10-12 μ . En cambio los caracteres citológicos (pseudovacúolas, granulaciones azurófilas, etc.), son completamente iguales en los monocitos de la linfa y los de la sangre. En cantidad escasa se encuentran en el citoplasma de los monocitos de la linfa gránulos oscuros de color café hasta negruzco. Pero no fué posible determinar si las células en referencia son idénticas con los leucocitos pigmentados de la sangre descritos anteriormente.

La presencia de eosinófilos constatados en la linfa de un ejemplar de *Calyptocephalus* tiene que considerarse como accidental, es decir, causada por mezcla con sangre. Pues los eosinófilos, son como hemos visto, en la sangre de este animal sumamente frecuentes, alcanzando hasta el 50% de todos los glóbulos blancos.

Leucocitos neutrófilos y basófilos no han sido observados en la linfa de *Calyptocephalus*. Igualmente las células fusiformes, tan frecuentes en la sangre, faltaron completamente.

BIBLIOGRAFIA

- Klieneberger, Carl, 1927.—Die Blutmorphologie der Laboratoriumstiere. Leipzig. 2.^a Edición.
- Levi, G., 1931.—Tratado de Histología. Madrid.
- Loewenthal, M., 1927.—La formule leucocytaire chez les amphibiens. *Bul. d'Hist.* 4.
- Romeis, B., 1932.—Taschenbuch der mikroskopischen Technik. München y Berlin.
- Schulz, F. und Krüger, F. v., 1925.—Das Blut der Wirbeltiere. En: Winterstein, H. *Handbuch der vergleichenden Physiologie*. T. 1. Jena.
- Schilling, V., 1922.—Das Blutbild und seine klinische Verwertung. Jena.
- Soenksen, O., 1928.—Algunas constantes físicas de la sangre de la rana chilena (*Calyptocephalus Gayi*). *Rev. Chil. Hist. Nat.* 32.
-