

4

67 (04)

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

INVESTIGACION DE CELULAS L. E.
EN SANGRE PERIFERICA
PARA EL DIAGNOSTICO DE
LUPUS ERITEMATOSO

CONCEPCION ALARCON GARCIA.

L. F. B.

MEXICO, D. F.
- 1957 -



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA BERZELIUS

INVESTIGACION DE CELULAS L. E.
EN SANGRE PERIFERICA
PARA EL DIAGNOSTICO DE
LUPUS ERITEMATOSO

T E S I S

*Que con carácter de un trabajo preliminar se
PRESENTA A LA COMISION DE EXAMENES*

por

CONDOMONIO ELECTRO QUIMICA

MEXICO, D. F.

- 1957 -

*Con toda ternura y agradecimiento dedico este
trabajo a mi padre el*

Sr. ANDRES ALARCON C.P.T.

modelo de rectitud y trabajo

y

a mi santa y abnegada madre

Sra. JOSEFINA G. de ALARCON.

*los que con su vida ejemplar y sus sabios
consejos han hecho de mí una persona útil*

A la memoria de mi Tía

Srita. HERLINDA JIMENEZ G.

A mis hermanos:

JAVIER, RAFAEL Y JOSEFINA.

*Con eterna gratitud a mi distinguida maestra
Srta. Q.F.B. MA. de los ANGELES ZALDO.
la que con su valiosa ayuda hizo posible la
realización de este trabajo.*

*A la Facultad de Química Berzelius
a su estimado director*

Dr. QUIM. LUIS M. VERA.

a todos mis maestros

*Que a través de sus cátedras han
descubierto ese campo tan maravilloso
de la Química.*

*A los Colegios del Verbo Encarnado
y a las Srítas. que forman su personal
las que impartieron en mi más tierna edad
la primera luz de la ciencia
y me enseñaron el camino del bien.*

*Quiero expresar mi agradecimiento al
Sr. Dr. Dn. ROBERTO SILVA GONTIA
Jefe de los Laboratorios del I.M.E.S.
por su gentileza en haberme dado toda clase
de facilidades para el desarrollo de este trabajo.*

I N D I C E

- 1.-GENERALIDADES.
- 2.-MATERIAL Y METODO.
- 3.-TRABAJO EXPERIMENTAL.
- 4.-DISCUSION.
- 5.-CONCLUSIONES.

CAPITULO I.
GENERALIDADES.

GENERALIDADES

Desde que Hargraves y sus colaboradores hicieron la primera publicación (1948) acerca de una nueva y rara célula encontrada en la médula ósea de los pacientes con Lupus Eritematoso Diseminado, un gran número de investigadores han efectuado interesantes estudios tanto sobre la célula en sí, como sobre su mecanismo interior de formación, sus anormalidades histológicas y su composición química, ya que el reconocimiento de estas células podría ayudar a establecer un diagnóstico temprano del Lupus Eritematoso.

Aquí cabe señalar que la etiología del Lupus Eritematoso es desconocida y que su diagnóstico es incierto, ya que como se verá a continuación la sintomatología es en parte semejante a la de algunas enfermedades del colágeno.

Ahora bien el Lupus Eritematoso se desarrolla en 2 formas: 1) Aguda y 2) Discoide ó Crónica. La variedad discoide es afortunadamente la más común y se caracteriza por ser estacionaria o lentamente progresiva.

Las lesiones agudas de Lupus Eritematoso pueden ocurrir como una lesión local pasajera a la luz solar, ó pueden ser parte de una fatal sistematización espontánea de la enfermedad, estas lesiones agudas pueden encontrarse en el proceso crónico ó pueden estar latentes sin dañar la piel. En última instancia la piel aparece roja, edematosa y algunas veces purpúrica, con manchas, las cuales pueden juntarse en un flujo malar erisipeloide un tanto moteado; en las manos las lesiones pueden presentarse como eritematosas o purpúricas, manchas ó pápulas. En cualquier otra parte del cuerpo, las lesiones pueden tomar otras formas, como vejigas, flictenas, manchas escamosas y telangiectases, cuando el proceso agudo complica la lesión discoide, pueden ocurrir ulceraciones superficiales frescas ó también, ulceraciones moderadamente profundas su-

mándose a los cambios ya mencionados, particularmente al avance de las viejas lesiones periféricas.

Como se estableció, los fenómenos cutáneos agudos pueden ser una reacción localizada a los rayos solares sin complicaciones sistémicas. En la variedad diseminada, la que ocurre comúnmente en las mujeres jóvenes y raramente en los varones, los síntomas y signos constitucionales incluyen fiebre, leucopenia, esplenomegalia, artralgias, enfermedad valvular (de los Sacos de Libman), anorexia, vómitos, diarrea, disfagia, dolor abdominal y linfadenitis. La muerte puede sobrevenir por insuficiencia renal, endocarditis bacteriana y falla cardíaca, tuberculosis pulmonar o neumonía.

Así como en la variedad discoide, la etiología del tipo diseminado es oscura, aunque por causa de los fracasos clínicos (reacción a la luz solar y porfirinuria ocasional), y los cambios histológicos (degeneración fibrinoide del colágeno, necrosis local de los nódulos linfático), la patogénesis fundamental ha sido atribuida por algunos autores a un mecanismo alérgico inexplicable. Sin embargo la selección dominante de mujeres es difícil de conciliar con un fenómeno tan universal como es la alergia, a menos que, tal vez el alérgeno sea producto de un sistema sexual compuesto.

Los cambios histológicos en la piel son reconocidos por una exageración de la licuefacción, degeneración de la capa basal de la epidermis, con hinchazón del citoplasma de las células basales, edema de las capas papilares y subpapilares, necrobiosis con cariorrexis y distorsión nuclear de las células inflamatorias en la dermis superior, telangiectases, y ocasionalmente, degeneración fibrinoide del colágeno en esta región, así como de las paredes de algunas de las arteriolas. El último cambio es inconstante y seguramente no es responsable de otras alteraciones cutáneas.

En la variedad diseminada los cambios histológicos característicos ocurren en otros órganos. Dichos cambios incluyen: 1) Atípica endocarditis verrugosa (enfermedades de los Sacos de Libman) reconocible por los cuerpos hematxilicos y la extensiva hinchazón fibrinoide de las válvulas cardíacas, especialmente en la frecuentemente descuidada ojuela mitral posterior. 2) Notable alteración fibrinoide del colágeno intersticial del miocardio, la cual puede, pero no es necesario tomarse

por cuerpos de Aschof. 3) Densos anillos concéntricos de colágeno, retículo aparentemente condensado cerca de la arteria esplénica central y 4) Hinchazón local fibrinoide de las paredes de los capilares glomerulares (Wire Loops). Con excepción de la lesión esplénica, estos cambios son prácticamente patognomónicos del Lupus Eritematoso Diseminado y ocurren raramente en enfermedades semejantes, estrechamente relacionadas al colágeno, como el escleroderma y la dermatomiositis. Los cambios esplénicos aparentemente ocurren no muy frecuentemente en forma moderada en otras enfermedades. Las alteraciones glomerulares pueden ser tan difusas hasta causar insuficiencia renal y un cuadro clínico de glomerulonefritis.

La atípica endocarditis verrugosa ofrece un óptimo foco de infección para la implantación y crecimiento de bacterias, así que, la endocarditis bacteriana es un resultado terminante y común a esta enfermedad.

Los patólogos han descrito el Lupus Eritematoso Agudo como una enfermedad vascular generalizada, un desorden del sistema colágeno, ó una enfermedad de dicho sistema. Está relacionada aunque, de ningún modo cierto a la dermatomiositis, periartritis nodosa y a la artritis reumatoide, estas enfermedades tienen el común denominador de una etiología desconocida, un carácter más o menos generalizado y una impotencia progresiva.

Pruebas de laboratorio que no eran específicas para el Lupus Eritematoso, permitieron antiguamente hacer deducciones razonablemente buenas, sumando una combinación de los factores antes mencionados, tales como: debilidad, fiebre articular, esplenomegalia, leucopenia, rápida velocidad de sedimentación y ausencia de alguna evidencia de endocarditis bacteriana subaguda. El descubrimiento de las células L.E. en médula ósea heparinizada, oxalatada ó citratada representa la respuesta al diagnóstico de laboratorio del Lupus Eritematoso. Sin embargo han sido reportadas unas pocas pruebas "Falsas Positivas".

Hargraves encontró en la médula ósea 2 tipos de células no descritas anteriormente. La célula ácida: Un histiocito con un gran núcleo secundario que se encontraba presente principalmente en varias enfermedades debilitantes de diversos tipos, excepto en un caso de mieloma múltiple. Y la célula específica del Lupus Eritematoso y que Hargraves denominó "Célula L.E."

Las observaciones hechas en médula osea usan dicha médula heparinizada, de acuerdo con la técnica de la Clínica Rochester.

En 50 casos de Lupus Eritematoso, Hargraves encontró el siguiente cuadro: envolviendo los granulocitos de la médula y dentro del citoplasma de estas células estaba presente una gran masa de material amorfo; lo cual indica un grado extremo de distorsión de los núcleos dando a las células una apariencia bastante rara.

Las masas fueron entresacadas y empujadas a la periferia de las células por material aparentemente ingestado. La naturaleza de los grandes círculos de masas amorfas engolfadas por los granulocitos ha eludido hasta cierto punto la investigación. Son de color purpurino y bastante homogéneas; Morton mostró que dan positiva la reacción de Feulgen, que en este caso indica un origen nuclear. Otros estudios histoquímicos hechos en el laboratorio revelan que la ribonucleoproteína de origen citoplásmico puede estar también presente y que glicógeno, grasas, ácidos y fosfatasas alcalinas parecen faltar. Estos hechos pueden indicar como Hasserick y Sundberg y tienen ya apuntado, que el material ingestado es de naturaleza linfocítica.

Diversos periodos en el desarrollo de la anomalía celular fueron observados, particularmente en extensiones supravitales.

En sus más recientes estudios, Hargraves puso médula normal en contacto con el plasma de un paciente de Lupus Eritematoso y las células características fueron observadas después de cortos periodos de incubación. Esto indica que una substancia anormal estaba presente en la sangre circulante de pacientes con dicha enfermedad.

Considero indispensable hacer una breve descripción de los leucocitos normales de la sangre, a fin de establecer una relación con las células L.E. entrando así de lleno en el estudio que me llevó a la realización de este trabajo, es decir, la presencia de la célula L.E. en la sangre periférica de los enfermos de Lupus Eritematoso.

Se conocen tres clases de leucocitos:

- 1o. Los linfocitos procedentes del tejido linfático.
- 2o. Los monocitos procedentes del sistema reticulo endotelial.
- 3o. Los granulocitos procedentes de la médula osea y llamados así porque contienen granulaciones en su protoplasma, y están divididos

en tres tipos, según su afinidad por los colorantes, estos son: neutrófilos y eosinófilos.

Linfocitos.—Su tamaño es aproximadamente de 9 micras, con un núcleo redondo que se tiñe intensamente con los colorantes básicos, los más pequeños se tiñen con mayor intensidad y contienen una pequeña porción de citoplasma, los mayores se tiñen con menor intensidad y contienen mayor cantidad de citoplasma. En algunos de ellos se pueden encontrar cierto tipo de granulaciones gruesas de un rojo brillante, que se tiñen intensamente, llamadas granulaciones azurófilas.

Monocitos.—Constituyen el tipo mayor de leucocitos encontrados en la sangre (de 14 a 20 micras) se denominan también grandes mononucleares, su núcleo se tiñe con menor intensidad que el de los linfocitos y aparece hendido a veces en forma de herradura. La cromatina semeja una madeja de hilo.

Neutrófilos.—Son fáciles de reconocer por su forma irregular y sus núcleos lobulados, por esta razón comúnmente se les denomina polimorfonucleares; miden aproximadamente 12 micras, su núcleo puede estar constituido por una cinta en forma de banda o puede estar segmentado, los segmentos varían de 4 a 6 ó 7 y están unidos por estrechas bandas nucleares o por filamentos. El citoplasma contiene numerosas granulaciones que no tienen una afinidad colorante definida y que pueden teñirse de azul (básico) ó de rojo (ácido) y por esta razón se conocen como neutros o neutrófilos.

Eosinófilos.—Son granulocitos similares a los neutrófilos diferenciándose de estos por el tamaño y afinidad de las granulaciones por los colorantes ácidos. Estas granulaciones son grandes, redondas u ovaladas, se tiñen de un color rojo brillante.

Basófilos.—Son granulocitos similares a los neutrófilos contienen granulaciones grandes que se tiñen intensamente con los colorantes básicos, su núcleo es ligeramente unilobulado.

Ahora bien, las células L.E. son característicamente leucocitos polimorfonucleares neutrofilicos, leucocitos que contienen una gran masa de material amorfo engolfado; la masa llena el compartimiento citoplasmico del granulocito y empuja el núcleo al borde de la célula.

Algunos autores encuentran relación estrecha entre el núcleo de la célula L.E. comprimido hacia la periferia y la actividad fagocitaria de

los leucocitos normales, esto se puede confirmar colocando sobre un portaobjetos perfectamente desengrasado unas gotas de sangre dentro de un anillo de caucho poco profundo, e incubando la preparación en una cámara húmeda. Después de 30 a 60' de incubación el anillo es removido, el coágulo adherido a la placa es suavemente lavado con solución salina ó suero, rápidamente secado y después teñido con Giemsa ó Wright. El área teñida, en la que ha reposado el coágulo presenta una densa agregación de leucocitos neutrofilicos y casuales eosinófilos y monocitos. Estas células pueden ser vistas en varias etapas de movimientos amiboideos y obviamente han resbalado fuera del coágulo. Si antes de poner la sangre en el anillo de caucho, se le agrega una pequeña cantidad de almidón finamente pulverizado, puede ser observada una marcada fagocitosis de este material, efectuada por los leucocitos, los que reunidos en la placa se encuentran llenos de gránulos de almidón. Es de importancia hacer notar que el núcleo de los fagocitos llenos de almidón está comprimido contra la pared de la célula y presenta un cuadro que recuerda el núcleo de plano comprimido de la célula L.E. De gran interés fué el agrupamiento de las células polimorfonucleares cerca de una masa de material amorfo aparentemente listo para ser engolfado. Este descubrimiento fué más tarde confirmado por Hasserich y Sundberg; y Sundberg y Lick.

Recientemente se ha demostrado por los cambios citológicos observados a la largo del periodo entero y cuando fueron usadas células normales como material substrato, que el cuerpo incluido de las células L.E. es material nuclear alterado, resultante de los linfocitos y los leucocitos polimorfonucleares. Estudios citoquímicos más amplios de dicho material nuclear, hechos por medio de Feulgen y tinciones con verde metílico indicaron que contiene ácido desoxiriboso nucleico parcialmente depolimerizado y que apareció óptica y químicamente idéntico a los cuerpos teñidos con hematoxilina ya descritos por Klemperer en su estudio de las células mesenquimatosas de los casos autopsiados de Lupus Eritematoso Diseminado.

Existen además anomalías histológicas de las células L. E., a las que se les ha denominado "rosetas", y que consisten en la agrupación de dos o más granulocitos, poco más ó menos un glóbulo de idéntico material, simulando una roseta que a semejanza de las células L.E. toma un color azul pálido con la tinción de Giemsa ó de Wright.



Fig. No 1 Célula L. E. Aislada



Fig. No. 2 Campo de Células L. E.

La aparición de las células L.E. y las rosetas en la sangre periférica, constituye el llamado "Fenómeno L.E."

Parece difícilmente probable que dicho fenómeno sea un artificio causado de algún modo por un anticoagulante. Sin embargo Lee, Michael y Vural hicieron hincapie en el hecho de que ellos nunca habían observado células L.E. en preparaciones de sangre recientemente tomada; Hargraves señaló el caso de un enfermo examinado durante 6 meses, solo tres días antes de su muerte se observaron por primera vez las células L.E., la autopsia confirmó el diagnóstico, en este caso todas las etapas en el desarrollo de la célula L. E. fueron puestas en evidencia y se exponen a continuación:

- 1.—Células polimorfonucleares normales.
- 2.—Células polimorfonucleares con uno o más lóbulos en transformación picnótica.
- 3.—Células polimorfonucleares con todos los lóbulos picnóticos y glóbulos aún intactos.
- 4.—La Pre-célula L.E.: Desaparición de los filamentos interlobulares, quedando células que contienen citoplasma polimorfonuclear normal y uno o cinco gránulos, masas redondas, homogéneas de material nuclear intensamente teñidas.
- 5.—Una o más de las masas nucleares redondas parcialmente arrojadas de las células.
- 6.—Masas nucleares libres.
- 7.—La célula L.E.: Células polimorfonucleares normales con una masa nuclear libre engolfada.

Los factores principales para la formación de dicho fenómeno han sido el tema de muchas investigaciones. Hasserick y Hargraves y sus asociados demostraron que en la sangre de pacientes con Lupus Eritematoso Diseminado estaba presente un factor, el cual causaría el desarrollo del fenómeno L.E. celular cuando fuera adicionado a sangre o suero normal. Hasserick demostró que este factor reside en la fracción gamma globulina de las proteínas del plasma. Así pues el desarrollo de este fenómeno no depende de ninguna anomalía intrínseca de los mismos leucocitos y puede ser causado no solamente en leucocitos enfermos, sino también en individuos normales y en los leucocitos de varias especies mamíferas y aves. Recientemente se ha puesto de manifiesto

to la relación que existe entre la coagulación sanguínea y el fenómeno L.E. Estudios aún más recientes de Zimmer y Hargraves confirmaron y detallaron estas observaciones y concluyeron que algo que impide la coagulación, impide la formación del fenómeno L.E.; de estos últimos estudios los investigadores han deducido que hay un cofactor necesario para la activación del factor L.E., que este factor es en parte derivado de las plaquetas y que es probablemente la tromboplastina ó uno de los productos intermedios formados durante la elaboración de la tromboplastina; esto está de acuerdo con la teoría desarrollada por Zimmer y Hargraves y ayuda a explicar varios hechos acerca del fenómeno L.E. hasta ahora desconocidos ó pobremente conocidos.

1.—Que nunca ha sido observado en manchas directas de sangre ó médula ósea no modificada, aunque todos los factores necesarios para su formación estén presentes.

2.—Ha sido producido "in vivo" en los sitios de lesiones inflamatorias producidas artificialmente. La inflamación es frecuentemente asociada con alguna formación de fibrina.

3.—Los Cuerpos Hematoxilicos (considerados por Klemperer y sus colaboradores, como una manifestación del fenómeno L.E.) está firmemente observado que son frecuentes en la vecindad de lesiones inflamatorias y son siempre muy notables en las vegetaciones endocardiales de los Sacos de Libman.

4.—Incompatibilidades en la intensidad del fenómeno L.E. observadas día a día pueden posiblemente ser explicadas en el principio de acción de la punción venosa y otros detalles de la técnica, hasta aquí, no tomados en cuenta. Kurnich recientemente ha reportado el hallazgo de un co-factor seroso para el desarrollo del fenómeno L.E., las relaciones entre estos factores, es decir, la tromboplastina plasmática de Campbell y Stefanini y el co-factor L.E. derivado de las plaquetas están siendo estudiados en la actualidad.

La activación de las plaquetas con la libertad de su factor trombo-plástico es la iniciación del éxito en el proceso de la coagulación; los descubrimientos han demostrado que por lo menos este paso inicial en la coagulación es necesario para que el fenómeno L.E. tenga lugar.

CAPITULO II
MATERIAL Y METODO

MATERIAL Y METODO

Desde la observación original de Hargraves, los técnicos han demostrado el fenómeno L.E. por varios métodos. En algunos casos, cuando el diagnóstico del Lupus Eritematoso Diseminado es cierto en el terreno clínico, se pueden gastar varias horas infructuosas investigando las células L.E. Por estas razones se ha ideado un método extremadamente sencillo, barato y remunerable, este es descrito más adelante y se conoce con el nombre de método de Lee.

10 pacientes con diagnóstico clínico de Lupus Eritematoso Diseminado y 48 pacientes con diversas enfermedades (incluyendo varias enfermedades febriles, dermatológicas, del colágeno y algunas indiagnosticadas), formaron el material clínico para este estudio. Entre los casos de enfermedades indiagnosticadas se encontraban algunos, en los cuales se trataba precisamente de descartar un posible Lupus Eritematoso Diseminado, en estos casos se hizo una investigación seriada de células L.E., y solo en uno de ellos se logró encontrar dichas células.

Por otra parte el fenómeno L.E. fué estudiado solamente en leucocitos de sangre humana; la aparición de las células L.E. en las preparaciones fue el factor representante, interpretando un caso como positivo cuando la diferenciación de las células era completa.

La técnica que a continuación se cita, fué la elegida por ser no solamente sencilla y rápida, sino que permite la concentración de un gran número de células L.E. en una pequeña área, lo cual permite la fácil investigación de esas células; desde luego esta técnica requiere una pequeña muestra de sangre del paciente y un equipo sencillo.

METODO.—1).—Se obtienen por punción venosa 5 cc. de sangre, la cual es transferida de la jeringa a un tubo estéril de centrifuga con.

teniendo 3 gotas de líquido heparínico (Liquaermin sodium, Organon Inc. 1 cc.—10 mgrs.), a continuación y una vez tapado, dicho tubo se invierte suavemente sobre sí mismo, a fin de asegurar la adecuada mezcla de su contenido.

2.—El tubo se deja en posición vertical y a la temperatura ambiente hasta que las células sanguíneas se han asentado en el fondo; como los pacientes con Lupus Eritematoso tienen una velocidad de sedimentación incrementada, este lapso de tiempo nunca excede de una hora.

3.—La porción sobrenadante de plasma, así como la superficie rasante de las células asentadas, se transfieren a un segundo tubo estéril de centrifuga, este tubo se calienta a 37.5°C por 45' en una incubadora ó en un baño de agua, cuando no se cuenta con dicho equipo, simplemente se deja el tubo a la temperatura ambiente durante dos horas. La porción que queda en el tubo primero, o sea, el paquete globular, se descarta.

4.—El plasma incubado se centrifuga a 1500—2000 revoluciones por minuto durante 3', concentrándose de este modo el sedimento en la estrecha punta del tubo, así se facilita la posterior colección de este con un alambre ó una pipeta de tallo largo. Se evita una excesiva centrifugación a fin de no empaquetar muy estrechamente el sedimento.

5.—El plasma sobrenadante es sacado con una pipeta de Wintrobe y todo, excepto 0.5 cc. aproximadamente, es descartado. El último volumen es conservado para usos subsecuentes como diluyente.

6.—El sedimento es ahora completamente removido, con la pipeta se pone una gota de él en una placa de vidrio; estas placas han sido conservadas en alcohol de 95% y secadas en el preciso momento de ser usadas; una segunda placa de vidrio es puesta encima y suavemente se presiona, manteniéndola así hasta que la gota de sedimento es condensada dentro de una delgada capa de material, entonces las placas son movidas en posición opuesta y paralela. Varias placas son preparadas de la misma manera, generalmente pueden ser liberadas de la pipeta 3 gotas de sedimento, obteniéndose así seis películas. El residuo que ha quedado en el interior del tubo de centrifuga es examinado en busca de masas amorfas cartilaginosas, compuestas principalmente de masas de plaquetas; estas masas son cogidas con un alambre de platino y puestas en una placa de vidrio y emulsionadas con una gota del diluyente (el plasma sobrenadante).

te que se conservó) y se hace una película de la manera previamente descrita.

7.—Todas las preparaciones se secan y se tiñen. En este estudio se usó la tinción panóptica de Papanheim. Se coloca el frotis en colorante de Leishman durante 3 ó 4'. El colorante de Leishman se prepara en la proporción de 1% de polvo de Leishman en alcohol metílico (debe reposar una semana antes de usarse). Después de enjuagar el frotis con agua destilada y neutra se cubre la extensión con Giemsa diluido en agua con pH 6.9 (en la proporción de una gota por cada centímetro cúbico de solución buffer) durante 15', lavar después con agua destilada y dejar secar. Estas películas son examinadas en busca de células L.E., primero se observan con seco fuerte y después con inmersión, las células son más fácilmente localizables en las orillas de las placas.

Observaciones a la Técnica.—La heparina es usada como anticoagulante, ya que, es menos destructora de leucocitos que cualquiera otro anticoagulante; aunque las células L.E. han sido demostradas con el uso de una mezcla de oxalatos de amonio y potasio, y por una simple mezcla de sangre y solución isotónica para prevenir la coagulación, ninguno de estos anticoagulantes ha probado ser tan satisfactorio como la heparina.

El uso de dos tubos de centrifuga tipo standard, elimina la necesidad de un equipo especialmente construido. Los mejores resultados se han obtenido cuando los tubos y pipetas estaban estériles, eliminando así la agrupación bacteriana en los frotis; la esterilización por calentamiento es suficiente.

La incubación no debe ser demasiado prolongada; en dos casos, en los cuales las células L.E. fueron encontradas después de incubar a 37.5°C por 45' no fué posible demostrar dichas células en el mismo espécimen después de 24 horas de incubación.

El almacenaje de la sangre heparinizada en el refrigerador durante 18 horas precedentes a la prueba, no interfiere con la reacción.

MATERIAL CLINICO.

El material clínico utilizado para esta Tesis lo integran:

5 pacientes con Artritis Reumatoide

3 pacientes con Fiebre Reumática

- 5 pacientes con Dermatitis
- 2 personas con Reumatismo Cardíaco
- 1 paciente con Periartritis.
- 1 enfermo con Anemia Perniciosa
- 1 enfermo con Mieloma Múltiple
- 1 paciente con Mononucleosis Infecciosa
- 1 paciente con Fiebre Biliar
- 1 paciente con Dermatomiositis.
- 11 enfermos en los que se trataba precisamente de descartar un posible Lupus Eritematoso Diseminado.
- 10 enfermos Indagnosticados y
- 11 enfermos de Lupus Eritematoso Diseminado.

Estos enfermos fueron suministrados por los Pabellones de Dermatología y Reumatología del Hospital de la Raza; así como por el Pabellón de Infecto-Inteccionos del mismo I.M.S.S. a cuyo personal médico hago patente mi agradecimiento, por haber cooperado a la realización de este trabajo.

CAPITULO III

R E S U L T A D O S

RESULTADOS

En los frotis de sangre periférica obtenida de los pacientes con Lupus Eritematoso Diseminado, los leucocitos estaban comúnmente agrupados en grandes racimos de 10 a 50 células; las células L.E. fueron observadas frecuentemente en estos racimos y también fueron observadas separadamente.

A continuación expongo los resultados que obtuve en la práctica.

TABLE No. 1
RESULTADOS OBTENIDOS EN LOS ENFERMOS DE
DIAGNOSTICO DESCONOCIDO

Caso N°	Resultado
1	Negativo
2	Negativo
3	Negativo
4	Negativo
5	Negativo
6	Negativo
7	Negativo
8	Negativo
9	Negativo
10	Negativo

TABLA No. 2

RESULTADOS EN ENFERMOS EN LOS QUE SE TRATABA
DE DESCARTAR EL LUPUS ERITEMATOSO

Caso N°	Observación	Resultado
1	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
2	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
3	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
4	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
5	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Positivo
6	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
7	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
8	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo

Caso Nº	Observación	Resultado
9	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
10	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo
11	1	Negativo
"	2	Negativo
"	3	Negativo

Todos estos casos se hicieron en serie de tres. Cada observación se hizo en diferente fecha (con un intervalo de más ó menos 20 días entre una y otra).

TABLA No. 3
ENFERMEDADES CONTROL

Caso Nº	Diagnóstico	Resultado
1	Artritis Reumatoide	Negativo
2	Fiebre Reumática	Negativo
3	Periartritis	Negativo
4	Mieloma Múltiple	Negativo
5	Dermatitis	Negativo
6	Reumatismo Cardíaco	Negativo
7	Anemia Perniciosa	Negativo
8	Mononucleosis Infecciosa	Negativo
9	Artritis Reumatoide	Negativo
10	Artritis Reumatoide	Negativo
11	Dermatitis	Negativo
12	Dermatitis	Negativo
13	Dermatitis	Negativo
14	Fiebre Reumática	Negativo
15	Artritis Reumatoide	Negativo
16	Dermatitis	Negativo
17	Fiebre Reumática	Negativo
18	Artritis Reumatoide	Negativo
19	Fiebre Biliar	Negativo
20	Dermatomiositis	Negativo
21	Reumatismo Cardíaco	Negativo

TABLA No. 4
ENFERMOS DE LUPUS ERITEMATOSO

Caso Nº	Observación	Resultado
1	Unica	Positivo
2	1	Positivo
"	2	Positivo
3	Unica	Positivo
4	1	Positivo
"	2	Negativo
"	3	Positivo
5	1	Positivo
"	2	Positivo
"	3	Positivo
"	4	Positivo
"	5	Negativo
"	6	Positivo
"	7	Positivo
6	Unica	Positivo
7	Unica	Positivo
8	1	Positivo
"	2	Positivo
9	Unica	Positivo
10	Unica	Positivo

El caso Nº 5 se controló durante 6 meses y en la observación Nº 5 resultó negativo debido al tratamiento que se le impuso, las dos siguientes observaciones se hicieron poco antes de la muerte del paciente.

CAPITULO IV
DISCUSION

DISCUSION

Con la denominación de Método de Lee es conocido en el terreno clínico uno de los más recientes métodos para el reconocimiento de las células L.E. en la sangre periférica de pacientes con Lupus Eritematoso, que por la sencillez de su técnica es uno de los procedimientos más adecuados para el diagnóstico de dicha enfermedad y está considerado como el método clásico.

Ahora bien existen otros métodos para el diagnóstico del Lupus Eritematoso por medio de la aparición del fenómeno L.E. Entre estos se encuentra en primer término el método llamado de concentración y que utiliza substratos como activadores de el factor L.E. Dichos substratos pueden prepararse ya sea de células polimorfonucleares normales, este se efectúa poniendo en un portaobjetos completamente limpio un anillo de caucho con una abertura diametral interna aproximada de 0.5 cm. y una altura de 0.2 cm. El área de los portaobjetos rodeada por el anillo se llena con una o dos gotas de sangre recientemente extraída. Dicha placa es suavemente puesta sobre una caja de Petri, el fondo de la cual ha sido cubierto con un papel filtro humedecido; la caja es incubada a 37°C durante una hora, después de esta incubación se remueve el anillo y el coágulo, en el área que ocupó el anillo se observa un gran número de células blancas que se han deslizado fuera del coágulo.

También pueden ser usadas como substratos manchas relativamente gruesas de sangre de pacientes con leucemia, ya sea mielóide, linfática, crónica o leucemia aguda.

Finalmente las placas de substratos pueden prepararse de varios carcinomas y también de tejido de Hodking.

Estos substratos tienen la ventaja de poder ser preparados con anticipación y ser usados cuando deba probarse la formación de células L.E.

Ahora bien sobre estas placas se coloca en forma de gota suspendida la sangre del paciente sospechoso de Lupus Eritematoso, después de incubarla dentro de una caja de Petri húmeda durante una ó dos horas, el coágulo formado por la gota se remueve, el área donde reposó se lava con suero, se quita el exceso de este, se seca, se tiñe y se observa.

Dicho método se desarrolló en 10 pacientes con el cuadro clínico de Lupus Eritematoso y en los cuales las células L.E. fueron encontradas por el método de Lee y solamente en 8 de los 10 casos las células L.E. fueron observadas en número variable, sin embargo el resultado decayó notablemente cuando la cuenta blanca original del substrato fué bajo 100,000.

De lo que se deduce que el método de Lee además de ser menos laborioso, tardado y dificultoso es más seguro para el diagnóstico del Lupus Eritematoso.

En 2º lugar se puede citar el que se basa en la relación del fenómeno de coagulación y el fenómeno L.E. Este método se verificó poniendo la sangre venosa de los pacientes con Lupus Eritematoso en tubos conteniendo diversos anticoagulantes. Todos los tubos fueron incubados a 37°C por 60', centrifugados a 300 revoluciones por minuto durante 5' y el plasma se deshechó, el contenido restante se agita 20 ó 30 veces con un aplicador de madera y con él se preparaban los frotis.

Este método se llevó a cabo con una misma muestra de un paciente con Lupus Eritematoso y se pudo apreciar que los resultados son muy variables, la técnica es engorrosa y el método poco eficaz.

El tercer método que cito a continuación tiene como base la relación entre los factores de coagulación, tales como: plaquetas, trombina, tromboplastina y suero; y el fenómeno L.E.

Para llevar a cabo este método se necesita realizar una punción venosa perfecta con equipo siliconizado, la sangre extraída se transfiere a tubos que contengan citrato de sodio y estén cubiertos de hielo, estos tubos se refrigeran hasta que los glóbulos rojos se sedimentan lo suficiente para tener una cantidad adecuada de plasma para las pruebas.

Partes alícuotas de este plasma rico en plaquetas y eritrocitos se agregan a otros tubos previamente preparados, que contienen varios agentes de coagulación se incuban a 37°C durante una hora, al término de este tiempo se centrifugan todos ellos un minuto y del sedimento se hacen los frotis.

Como este método combina varios experimentos los resultados sólo pueden ser expresados en términos generales.

Los resultados varían grandemente de un tubo a otro, aún cuando todos contengan plasma de una misma muestra de sangre de un solo paciente.

Un cuarto método es el que utiliza las plaquetas como co-factor del fenómeno L.F.

Las plaquetas son comunmente de estructura compleja, conteniendo diferentes substancias y factores, el mejor caracterizado de estos es el factor tromboplástico. Así pues la realización de este método requiere una cantidad suficiente de sangre del paciente sospechoso, esta se pone en aparatos siliconizados que contienen citrato de sodio; una parte de la muestra se centrifuga a 300 revoluciones por minuto durante 10' y otra a 3550 revoluciones por minuto durante 30' para producir plasmas ricos y pobres en plaquetas respectivamente. Este plasma se pone en tubos no siliconizados y a 0.5 cc. de cada uno de ellos se agrega una cantidad igual de linfa coagulada de sangre citratada de pacientes con púrpura trombocitopénica ideopática, mezclando cuidadosamente cada tubo, después se efectúa la cuenta de plaquetas; y a cada tubo se le agrega 0.1 cc. de solución 0.1M de CaCl_2 , todo coagula prontamente, los tubos se incuban a 37°C durante una hora, al final de este tiempo se centrifugan, el suero es desechado, los coagulos se agitan con aplicadores de madera y se hacen las preparaciones. En cada caso fué observada mayor intensidad del fenómeno en el tubo con la mayor concentración de plaquetas.

Según queda expresado este método proporciona resultados más precisos, sin embargo el desarrollo de la técnica requiere tiempo, trabajo y material especial.

De los experimentos anotados se deduce que el método de Lee usado en el desarrollo de esta tesis aventaja a los citados en el 1º, 2º y 3º término, ya que, sus resultados son precisos y regulares. Sin embargo

el método a que se hizo referencia en 4º lugar lo aventaja en precisión, pero como es más laborioso y costoso que el de Lee, no se usa frecuentemente en la práctica.

En conclusión, el método que me ha servido de base en la realización de mi trabajo, presenta grandes ventajas, ya que, para llevarlo a efecto se utiliza un material sencillo y standard, pequeñas muestras de sangre y su técnica es bastante fácil, requiere poco tiempo y ofrece resultados eficaces en la mayoría de los casos.

CAPITULO V
CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- 1.—Se encuentra que en la sangre circulante de los enfermos de Lupus Eritematoso existe una substancia anormal que es la responsable del fenómeno L.E.
- 2.—Se presenta un método sencillo para la identificación de las células L.E. en la sangre periférica basado en la formación de las células durante la incubación de la sangre heparinizada de los pacientes con Lupus Eritematoso.
- 3.—De los datos experimentales se deduce que, aunque, el método indicado da resultados excelentes para el diagnóstico del Lupus Eritematoso, hay casos muy especiales en que el desarrollo del fenómeno no procede en forma normal, observándose células de gran semejanza pero de diferente estructura que no permiten distinguir con facilidad a las células L.E.
- 4.—Las pruebas verificadas para identificar el fenómeno L.E. en la sangre de personas normales fueron negativas.
- 5.—Se confirmó la especificidad del fenómeno L.E. para los enfermos de Lupus Eritematoso.
- 6.—Se puso de manifiesto que dicho fenómeno nunca ha sido observado en manchas directas de sangre sin modificar, aún cuando todos los elementos necesarios para su producción estén presentes.
- 7.—Siendo la identificación de las células L.E. tan sencilla y rápida por el método presentado, puede proporcionar datos útiles para el diagnóstico temprano del Lupus Eritematoso.