

Cincuentenario del descubrimiento de la célula L.E. (1948-1998)

Antonio Iglesias-Gamarra*

La década de 1940, fue un período de intensa investigación citológica en la hematopoyesis de la médula ósea y Malcolm H. Hargraves en 1945 vivió la época en la cual la hematología tenían un progreso acelerado, pero a la vez se encontraba en un período de transición entre su dependencia de la morfología de la sangre periférica y el avance en los conocimientos de la citología de la médula ósea; como auxiliar para el diagnóstico exacto de muchas patologías hemato-oncológicas.

En 1929 M.L. Arinkin en la Folia Hematológica¹ introdujo el método de la aspiración con aguja en la médula ósea, antes de esta época y por muchos años se realizaba una incisión a nivel de la tibia. Cuando se inició el método de la aspiración con aguja a nivel del esternón, con agujas modificadas de punción lumbar, se presentaron punciones pericárdicas accidentales y en muchos centros hospitalarios no aceptaron el procedimiento como de laboratorio hospitalario y sólo lo continuaron realizando los cirujanos ortopedistas. Hargraves trabajaba en la Clínica Mayo en Rochester y los aspirados de médula ósea sólo lo realizaban los ortopedistas y hematólogos; pero los métodos eran bastante rudimentarios y con alguna morbilidad.

Después de discutir con algunos colegas hematólogos y los comités administrativos, el hospital aprobó el estudio de las modificaciones de este método y encargó al profesor Hargraves del servicio de hematología para que se dedicara a los problemas de la médula ósea durante seis meses. Hargraves contó con la ayuda de la doctora Lydia Seebach quien tenía las bases hematológicas suficientes para darle asistencia a los pacientes. Así de esta forma Hargraves en compañía con la señorita Helena Richmond visitaron durante dos días al profesor Emil Schleicher del Hospital General de Minneápolis, quien desarrolló durante varios años en Detroit y Chicago algunas técnicas para la aspiración esternal y publicó dos artículos en 1942 y en 1945;²⁻⁵ posteriormente regresó a Rochester e introdujo esta metodología en la Clínica Mayo.

Así de esta forma Hargraves y Richmond empezaron la ardua tarea de mejorar las técnicas del aspirado de médula ósea a nivel de esternón. Dice Hargraves que "le tocó ser promotor de ventas con el objeto de conseguir pacientes y obtener así el material para el estudio y además muchos pacientes se beneficiaban de tener diagnósticos más acertados"; pero siempre que se lleva a cabo alguna investigación, no está exenta de errores como ocurrió con este descubrimiento histórico de la célula LE, ya que se hizo específicamente el 20 de abril de 1943, mientras Hargraves examinaba una preparación de médula ósea realizada con la técnica antigua y él mismo hizo el informe sin saber del Fenómeno LE. El informe era de una paciente de 9 años de edad, con un diagnóstico oscuro, a quien se practicó estudio de médula ósea con la esperanza de establecer el diagnóstico preciso. El informe (figura 1) dice: "Hay aumento de células plasmáticas, se

Sternal
CLINICAL LABORATORY REPORT
HEMATOLOGY

No. _____ Name _____
Date *4 20 - 43* Dr. *H. H. Hargraves*

Hemoglobin _____
Erythrocytes *2.78*
Leucocytes *46,400*

| | |
|-----------------|----------------------|
| Leucocyte Count | Poikilocytosis |
| Lymphocytes | Hypochromasia |
| Monocytes | Anisocytosis |
| Neutrophils | Polychromatophilia |
| Eosinophils | Normoblasts |
| Basophils | Howell-Jolly Bodies |
| Metamyelocytes | Basophilic Stippling |
| Myelocytes | Megaloblasts |
| Promyelocytes | Reticulated Cells |
| Leucoblasts | Platelets |
| Stem Cells | C. S. (C. S. 1943) |
| Immature Lymph | |

Plasma cells increased
Some are plasma
cells - peculiar
structure of globules
purple stain (diplacyt)
this is not diagnostic
176 Hargraves

Figura 1. Facsímil del informe firmado por el Dr. Hargraves el 20 de abril de 1943 de sus observaciones en una preparación de médula ósea.

* Profesor Asociado. Facultad de Medicina. Universidad Nacional de Colombia. Santa Fe de Bogotá, Colombia.

aprecian cuerpos globulares sin estructura definida, muy peculiares que toman coloración morada (artificio? Esto no es diagnóstico). Hargraves reconoce que no examinó a la niña, pero sus colegas pensaron que era un mieloma múltiple a pesar de la edad, ya que presentaba plasmocitosis, hiperglobulinemia y huellas de proteína de Bence Jones en la orina, conjuntamente con otros datos que lógicamente contradecían este diagnóstico. Hargraves estaba intrigado por sus observaciones sobre los "corpúsculos morados" que se encontraban tanto intra como extracelularmente. De nuevo en octubre 15 de 1945 le solicitaron un estudio hematológico de médula ósea en una niña de 9 años, gravemente enferma con púrpura, anemia grave y otras alteraciones hematológicas. Se demostró en ese entonces que el extendido de la médula podía excluir el diagnóstico de leucemia y otras discrasias sanguíneas, se observaron los corpúsculos morados en una lámina adecuada y técnicamente bien realizada; de todas maneras estas láminas fueron guardadas en una caja de cartón "para ser revisados posteriormente" por el excesivo trabajo del profesor Hargraves y no se concluyó nada. Como un "deseo histórico" otro paciente que consultó a la clínica en febrero de 1946 al parecer por una disproteinemia del tipo de las crioglobulinemias, con dolor exquisito en las extremidades, asociado a cambios de color y temperatura, pero además el paciente tenía lesiones induradas periféricas y con esta sintomatología fue examinado por Hamilton Montgomery dermatólogo extraordinario de la Clínica Mayo quien llamó al doctor Hargraves y le sugirió hacer una aspiración esternal. Durante la revisión del aspirado de la médula ósea, se observaron células fagocíticas reticuloendoteliales, cuyo contenido era semejante a un material hialino, teñido de azul, que no se había observado antes. "Hay células rotas y el material se presenta diseminado en forma de glóbulos entre las otras células con un tinte azul que va del tono claro al oscuro"; también observó neutrófilos fagocíticos. Al día siguiente, Montgomery y Hargraves discutieron el aspirado y Montgomery le comentó que se trataba de una de las enfermedades del colágeno, seguramente un lupus eritematoso sistémico y Hargraves le solicitó a Montgomery que le enviarán el siguiente caso de lupus para realizarle otro aspirado; 3 días después, el 18 de febrero de 1946, Montgomery le envió un caso de lupus comprobado y en el extendido de la médula ósea se observaron tanto en los extendidos gruesos como en los delgados numerosos neutrófilos maduros con tendencia a reunirse en grupos en donde se evidencia destrucción celular y gran actividad fagocitaria con abundante pigmento azul y verde. Al día siguiente Montgomery observó otro paciente con lupus en el Hospital Santa María en el servicio del doctor J.M. Strickney y le

practicó un aspirado de médula ósea; en los extendidos pocos concentrados se notaba una disminución de la celularidad. Se observó una gran actividad fagocítica de los neutrófilos que contenían un material homogéneo morado. Muchos campos presentaban numerosas células de este tipo, algunas de las células están llenas de esta sustancia y notó que el núcleo está rechazado a la periferia. Se observaron estas alteraciones en todas las preparaciones de médula ósea, pero no en los frotis periféricos. Así de esta forma Hargraves durante los años de 1946 y 1947 examinó ejemplos de este fenómeno en las preparaciones de médula ósea de pacientes con lupus y de esta forma fue integrando las piezas del rompecabezas para describir este fenómeno.

Ya en 1946 Hargraves pensaba que había descubierto un fenómeno asociado al lupus, pero el problema fundamental permanecía sin solución, y era el factor relacionado con la célula L.E. El primero de enero de 1946, el doctor Robert Morton, becario de la escuela de graduados de la Clínica Mayo, para especializarse en medicina interna y hematología fue asignado al laboratorio de Hargraves por un trimestre. El entusiasmo con el cual se trabajaba en el laboratorio de Hargraves por el fenómeno L.E. contagió también a Morton y así de esta forma se integró el equipo de trabajo para obtener, preparar y estudiar las médulas óseas. Morton decidió escribir una tesis basada en el estudio de sangre periférica y médula ósea en casos de lupus eritematoso sistémico. Hargraves aprobó y fue director de la tesis, pero Morton terminó sus tres meses con Hargraves y durante otros 9 meses trabajó obteniendo muestras e interesado en la investigación en otros servicios de la Clínica Mayo. El continuó independiente y pudo demostrar, como ya lo había indicado Hargraves que la coloración de Feulgen reaccionaba con el material de las células LE y se pensó que eran elementos del núcleo celular los que se teñían. Con estos datos Morton regresó al servicio de Hematología un año después (1 de enero de 1947) para completar sus observaciones y escribir la tesis. La doctora Dorothy Sundberg, experta hematóloga de la Universidad de Minnesota y miembro del comité examinador verificó los hallazgos de Hargraves, Richmond y Morton. El doctor John Haserick experto dermatólogo de la misma universidad encontró tres casos de lupus y confirmó los hallazgos de Hargraves. Pero Hargraves muy riguroso en sus observaciones no quería publicar sus hallazgos, porque durante dos años mostraba las fotografías a los colegas hematólogos del famoso Hematology Club en Chicago de los años 1946 y 1947, es decir del medio oeste y visitantes de la Clínica Mayo y ninguno había observado estos hallazgos en sus preparaciones. Esto lo demostró un poco, pero el hecho de que Haserick y Sundberg

reproducido sus experiencias le indujo a publicarlas el 21 de enero de 1948 en la edición del Proceedings of the Staff Meetings of the Mayo Clinic, constituyéndose en uno de los artículos clásicos en la historia del lupus.^{6,7} (Fig. 2 y 3). El título del artículo se denominó "Presentation of Two Bone Marrow Elements: the "tart" cell and the L.E. cell" del que lo único desafortunado del fue la inclusión de las "tart cell".

Este artículo marca un hito en la historia de la medicina y de la autoinmunidad. Como lo expresaba Hargraves, esta publicación abrió la caja de Pandora de la autoinmunidad y se inició una gran actividad investigadora en E.U.A. y en el mundo. De todas partes del mundo le solicitaron los reimpresos y le enviaron cartas personales de felicitación; muchos laboratorios remitieron las preparaciones y otros laboratorios le remitieron informes



Figura 2. Imágenes de las células. Cita número 6 en las Referencias.

sobre la incapacidad para reproducir la información. Al revisar esta información, Hargraves observó que en los casos en que no se reproducía la información, era porque los investigadores realizaban el frotis inmediatamente después de tomar la muestra y el mismo Hargraves no pudo demostrar el fenómeno LE en estos casos.¹⁷

El procedimiento desarrollado por Hargraves después de practicarse el aspirado de 1 o 2 ml de la médula esternal, lo colocaba en un tubo con heparina hepática de perro como anticoagulante y después se preparaban los extendidos. Después de practicar varias lecturas con tiempos diferentes, se observó que cuando la lectura se realizaba con mayor tiempo de lectura y mayor tiempo de incubación, con la lectura directa se encontraban mayor muestras con resultados positivos. A partir de estas

Proceedings of the STAFF MEETINGS OF THE MAYO CLINIC

Published Fortnightly for the Information of the Members of the Staff and the Fellows of the Mayo Foundation for Medical Education and Research
Volume 23 ROCHESTER, MINNESOTA, WEDNESDAY, JANUARY 21, 1948 Number 2

CONTENTS

| | Page |
|--|------|
| Presentation of Two Bone Marrow Elements: the "Tart" Cell and the "L.E." Cell | 23 |
| MALCOLM M. HARGRAVES, HELEN RICHMOND and ROBERT MORTON | |
| Report on Surgery of the Stomach and Duodenum for 1946 | 29 |
| WALTMAN WALTERS, HOWARD K. GRAY AND JAMES T. PRIESTLEY | |
| Discussion: WALTMAN WALTERS | |
| Recent Publications by Members of the Staff | 37 |
| Annual Surgical Report on the Stomach and Duodenum for 1946: Medical Aspects | 38 |
| G. B. EUSTERMANN | |
| Annual Report on Surgery of the Biliary System and Pancreas for 1946 | 40 |
| WALTMAN WALTERS, HOWARD K. GRAY AND JAMES T. PRIESTLEY | |
| Annual Surgical Report on the Biliary System and Pancreas for 1946: Medical Aspects | 46 |
| JAMES F. WEIR | |
| An Evaluation of Thionolene [N,N-Dimethyl-N'-(α -Pyridyl)-N'-(α -Thienyl) Ethylenediamine Hydrochloride] | 48 |
| ROBERT R. KIERLAND AND ROBERT T. POTTER | |
| Procedure for Distinguishing Drugs Effective against the Tubercle Bacillus by a Combined <i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> Method | 52 |
| ELISSON F. WHITE AND ALBERT G. KARLSON | |
| Multiple Meningitis: Report of Case and Surgical Considerations | 54 |
| JORGE A. PICAZA AND GEORGE S. BAKER | |

PRESENTATION OF TWO BONE MARROW ELEMENTS: THE "TART" CELL AND THE "L.E." CELL

Malcolm M. Hargraves, M. D., Division of Medicine, Helen Richmond, B. S., Special Hematology Laboratory, and Robert Morton, M. D., M. S. in Medicine, Division of Medicine: In the last two years we have been observing a phenomenon in our bone marrow preparations which, to our knowledge, has never been described in the literature. Actually there are two phenomena involved and, while their significance is not definitely understood, it seems wise to record a description of the involved cells so that others may contribute their observations on bone marrow to clarify the significance of these findings further. During this period we have shown preparations containing

Figura 3. Portada de la publicación original de Hargraves et al. Cita número 6 en las referencias.

observaciones y conociendo Hargraves que la célula LE no se había observado en sangre periférica, se anticoaguló la sangre venosa de pacientes con lupus y se incubó un tiempo y así de esta forma también se empezaron a describir las células LE en sangre periférica.⁷ Un año después Dorothy Sundberg y Norma Liek⁸ publicaron un informe preliminar de 3 pacientes con células LE, inducidas por centrifugación e incubación de sangre periférica. Esta experiencia de Sundberg y Liek sirvió a Hargraves para revisar su primer artículo "Two Bone Marrow Elements of the Médula Ósea" que en él se describen las células LE se producían *in vitro* y la descripción de la introducción de las células tart que fue el primer artículo de Helen Richmond y era la nucleofagocitosis. Este "tart" tiene características morfológicas de



Figura 4. Dr. Malcolm H Hargraves.

núcleo englobado no posee los cambios descritos en la célula LE; los mismos autores pensaron que esto podría ocasionar mayor confusión y error a los que no tenían experiencia en la observación de la nucleofagocitosis y el nombre de "tart" fue por el nombre de un paciente, cuya médula ósea mostró muchas de estas células.⁷ Para analizar el factor sérico, el siguiente paso desarrollado por Hargraves fue obtener plasma de sangre periférica de un paciente con lupus eritematoso sistémico agudo e incubarlo con material obtenido de la médula ósea de un enfermo que no tuviera lupus sistémico. Al seguir este proceso, se observó que a la temperatura corporal y haciendo preparaciones concentradas, se logran observar células LE; así como todo el resto del fenómeno LE, así se inició el conocimiento de los anticuerpos antinucleares que en esa época se conoció como factor de célula LE y Hargraves demostró el fenómeno LE in vitro realizando su segunda publicación en abril 27 de 1949 en *Proceedings Staff Meet of Mayo Clinic*.⁹ Antes de esta publicación, el 14 de febrero de 1949, Hargraves participó en el tercer curso de médicos del Colegio Americano para entrenamiento en Medicina Clínica con énfasis en la hematología, que se realizó en la Universidad del Estado de Ohio, su antigua *alma mater*, donde no solo discutió la presencia de la célula LE en material de médula ósea como originalmente lo había descrito, sino que también lo producía el plasma o el suero de pacientes con "el factor" de célula LE, utilizando para ello médula ósea o células sanguíneas de otros individuos sanos. Hargraves pensaba que la coagulación desempeñaba algún papel en la producción del fenómeno de la célula LE. El doctor Frederick Zimmer y Hargraves en el laboratorio de Hargraves, demostraron que la coagulación, el tiempo y el

tratamiento son factores muy importantes y Zimmer desarrolló la prueba del coágulo en dos horas que se continúa realizando en algunos laboratorios.¹⁰

Montgomery y McCreight¹¹ describieron un paciente a quien se le había diagnosticado clínicamente un mieloma múltiple; posteriormente el paciente consultó en un pueblo canadiense y le practicaron biopsia de uno de los ganglios y el patólogo informó enfermedad de Hodgkin. Después consultó a la Clínica Mayo donde se le practicó un aspirado de médula ósea y se observó el fenómeno LE, después el paciente mejoró y se recuperó; este caso lo informaron como el primer caso falso positivo de células LE y también históricamente sería el primer caso donde se demostró que el fenómeno LE no era patognomónico del lupus. Veinte años después de la publicación, la Clínica Mayo en noviembre de 1968 conmemoró el vigésimo aniversario del descubrimiento de la célula LE y también el retiro del doctor Hargraves como consultor de medicina de la Clínica Mayo, con un simposio sobre Lupus (Figura 4) horizontal. Este par de trabajos, de Hargraves fue una gran contribución a la inmunopatología, a partir de la hematología morfológica. El Dr. Hargraves se fue a vivir a Sun City, Arizona y en 1976 hizo la recapitulación del descubrimiento.^{7,7A,7} En este simposio participaron Donato Alarcón-Segovia quien describió en una forma amplia los síndromes lúpicos inducidos por drogas y Naomi F. Roth Field sobre consideraciones generales del tratamiento del lupus eritematoso sistémico.⁷

Históricamente, Louis Gross patólogo de la Clínica Sináí fue el primero en describir los cuerpos de hematoxilina-eosina (H.E) a nivel extracelular en los tejidos, especialmente en los tejidos cardíacos cuando Libman y Sacks



Figura 5. Célula LE. De la colección personal de A. Iglesias-Gamarra.

describieron la endocarditis verrugosa asociada al lupus.¹¹ A. M. Ginzler y T.T. Fox¹² plantearon posteriormente en 1940 el origen nuclear de los cuerpos de hematoxilina y eosina en los ganglios linfáticos de los pacientes con lupus. En este artículo, Gross realizó los estudios de patología y consideró que la enfermedad de Libman-Sacks era finalmente lupus, ya que los dos autores anteriores nunca reconocieron que la endocarditis verrugosa hacía parte del lupus. Este estudio de Ginzler y Fox se realizó en el Hospital for Joint Disease de New York. Posteriormente John Haserick dermatólogo de la Clínica Mayo, LA Lewis y DW Bortz¹³ describieron en 1950 que el factor sérico que estaba asociado al fenómeno LE era una gamaglobulina y la refirieron como una fracción específica del plasma. Ese mismo año Klemperer y col¹⁴ y Lee y col en 1951¹⁵ en los pacientes con lupus, ampliaron el horizonte de esta oscura enfermedad y analizaron las células LE y las alteraciones clínicas.

A partir de 1950, se iniciaron los estudios sobre la célula LE y se concluyó que los núcleos maduros de los granulocitos y linfocitos de células normales o leucémicas, como también cualquier célula de otros tejidos que tuviesen las alteraciones peculiares cuando se exponían el factor sérico LE, producirían las células LE.^{15, 16} En presencia del factor sérico o gamaglobulina de acuerdo a Haserick,^{13A} los núcleos celulares o núcleos de células susceptibles, sufren una alteración peculiar y son posteriormente fagocitados por los polimorfonucleares. Esto fue descrito por Rebeck, quien después describiera la ventana de Rebeck para el estudio de la movilidad de los neutrófilos en casos de inmunodeficiencias y junto con Berman¹⁷ al estudiar piel humana por abrasión y al agregar suero de pacientes con lupus, al colocar la

laminilla del cobre-objeto, observaron la fagocitosis del polimorfonuclear. Posteriormente, Rohn y Bond¹⁸⁻²⁰ utilizando coloraciones supravitales en 1952 y 1953 observaron con microscopio de luz que los núcleos de los polimorfonucleares primero se hinchan y posteriormente se produce la disolución de la cromatina, con una conversión del núcleo a una masa amorfa. Más adelante, Robineaux²¹⁻²³ de Francia con mejores métodos de microscopía demostró en 1956 que la alteración del núcleo afecta un solo lóbulo, con pérdida del patrón de la cromatina, pero conserva la membrana celular intacta. Rifkind y Godman²⁴ en 1957 utilizando un microscopio de contraste de fase demostró la secuencia del Fenómeno LE de la siguiente manera: 1. Cuando se agrega el suero del paciente en la primera fase se observa entre 5 a 15 segundos a nivel de los polimorfonucleares, una pérdida súbita del patrón de la cromatina (homogenización) del núcleo, seguido de un edema y de un aumento de la densidad de la cromatina; 2. la segunda fase ocurre cuando se produce la extrusión de los lóbulos de los polimorfonucleares al citoplasma; la membrana nuclear y la citoplasmática se encuentran intactas y finalmente ocurre la fusión nuclear en una masa amorfa y los linfocitos también lo hacen pero en forma más lenta; y 3. fase ocurre cuando se produce la lisis tercera el citoplasma y de la membrana citoplasmática y el homogenizado del material nuclear es fagocitado por los polimorfonucleares.^{24-27A} Robineux demostró claramente que el material nuclear alterado es sólo eso y no tiene residuos de citoplasma;^{22, 22A, 23} por ahí la observación de Hargraves de realizar el estudio dos horas después y no inmediatamente del aspirado de médula ósea ya que esta demora permite que ocurran las alteraciones intracelulares en los polimorfonucleares.^{22, 22A, 23}

El proceso de la formación de la célula LE, se inicia con la interacción de la globulina gama del suero con el núcleo celular. En presencia del complemento se pierde la estructura molecular en el núcleo y se produce edema de éste, lo que resulta en la formación de una estructura globular amorfa. Esta estructura está conformada por material nuclear, anticuerpos y complemento; además, se derivan factores quimiotácticos que atraen polimorfonucleares a nivel de la interacción gamaglobulina-núcleo celular opsonizado que facilita la fagocitosis de éste y así de esta manera se explica la inducción del fenómeno LE. En la formación de este fenómeno concluyen varios elementos como anticuerpos, material nuclear (nucleoproteínas), complemento y polimorfonucleares activados (Figura 5).

COMPOSICIÓN DE LA "CÉLULA LE" Y DE LOS CUERPOS DE HEMATOXILINA

Robert Morton con Hargraves^{6,7} utilizaron la reacción de Feulgen y demostraron que el material que se colorea con esta reacción es de origen nuclear y Klemperer en 1950¹⁴ y Lee¹⁵ en 1951 demostraron que el material que se colorea con esta reacción de Feulgen en los cuerpos de hematoxilina es de origen nuclear. En 1957 Holman y H.G. Kunkel²⁸ dos grandes de la inmunología, demostraron la afinidad del factor sérico al núcleo celular y a la nucleoproteína o DNA en su artículo de Science; este descubrimiento es trascendental para el inicio del laboratorio inmunológico, pero no se pueden olvidar los trabajos previos de Pollister y Leuchtenberger^{28,29} sobre la especificidad del verde de metilo y la cromatina en 1947 y 1949, los trabajos de Kurnick sobre la coloración básica con verde de metilo, de Kurnick y Mirky en 1950,³⁰⁻³³ Taft en 1951,³⁴ Chay en 1952,³⁵ Swift en 1955,³⁶ Singer en 1954,³⁷ Alfer en 1952,³⁸ Sandritter³⁹ en 1955, Bloch y Godman en 1955, Godman⁴¹ y Deitch⁴²⁻⁴⁴ y el clásico de Godman, Deitch y Klemperer¹⁴ sobre la composición de los cuerpos de hematoxilina y el contenido de nucleoproteína como antígeno blanco de la acción del factor sérico, que sirvió de base al estudio de Holman y Kunkel.^{28,28A}

Un año antes de la descripción de las células LE, Pollister y Ris²⁸ utilizando la reacción de Millón separó las proteínas histonas de las no histonas, ya que con esta reacción se podían medir directamente los residuos de tirosina de la proteína y se inició el estudio de las proteínas nucleares en el estudio del lupus eritematoso sistémico.

Hasta 1955, se habían realizado varios descubrimientos importantes para las futuras investigaciones inmunológicas como eran las células LE, el factor sérico o la gamaglobulina y se conocía que esta gamaglobulina reaccionaba contra las nucleoproteínas del núcleo celular. Con estos descubrimientos previos, Coons en 1956⁴⁵

utilizando antisueros marcados con fluoromo contra las gamaglobulinas, observó que éste reaccionaba contra la célula LE y el sitio donde se encontraba brillante o fluorescente se detectaba la gamaglobulina LE de todos los pacientes con lupus, prescindiendo de la célula LE tiene la capacidad de unirse a cualquier núcleo histona artificial o extraída. Godman y Deitch⁴²⁻⁴⁴ en varios estudios entre 1955 y 1957 demostraron que la gamaglobulina LE entra al núcleo y se une a los cambios que ocurren en el núcleo y que esto podría ser un anticuerpo, pero plantean la posibilidad que la gamaglobulina en este sitio podía ser inmunológicamente reactiva. Así de esta forma con los estudios de Coons,⁴⁵ Godman y Deitch,⁴²⁻⁴⁴ Holman y Kunkel²⁸ y finalmente Friou⁴⁶⁻⁴⁷ se crearon las bases del entendimiento de la inmunofluorescencia para el estudio del laboratorio de lupus y de las enfermedades autoinmunes.

Los trabajos posteriores intentaron explicar la interacción del factor sérico con las células LE. Previamente se pensaba que el DNA de las células LE y de los cuerpos de hematoxilina se encontraban despolarizados por una deoxiribonucleasa intracelular liberada por un inhibidor intracelular a través de una proteasa sérica y esto facilitaba su penetración por el factor sérico; esta teoría enzimática no se pudo demostrar. Posteriormente se comprobó que el factor sérico es una gamaglobulina y es absorbida en el núcleo y reacciona con el DNA al inducir a nivel experimental una reacción de precipitación y de fijación de complemento con el suero de pacientes lúpicos, pero no con otros sueros y el DNA purificado. Los aportes de Miesher y col,⁴⁸ Cepellini y col,⁴⁹ en Europa demostraron las técnicas de absorción, precipitación utilizando el factor sérico. Seligman y col^{50,51} demostraron que las reacciones de precipitación que se obtenían igualmente de DNA humano, animal y bacteriano con soluciones muy diluidas entre 3 y 15 gamma de DNA por ml y el suero LE de pacientes lúpicos producían una reacción específica contra el DNA, pero no con el RNA por diferentes técnicas como Ouchterlony, hemaglutinación pasiva y la inmunolectroforesis. Además Seligman,⁵² Holman y Deitch⁵³ demostraron las reacciones de precipitación y fijación de complemento con los anticuerpos o los sueros de pacientes lúpicos. Otro de los aportes importantes de Seligman y Hanan⁵⁴ y de Hisman y Schit⁵⁵ es que el factor sérico es una gamaglobulina en contraposición de Haserick y col que pensaba que era una globulina diferente.^{13,13A}

El año de 1957 es otro año histórico para el desarrollo del entendimiento del lupus, ya que al describirse el fenómeno LE y las nucleoproteínas como blanco de los auto-anticuerpos específicos, se empezó a dilucidar el papel del DNA como un componente reactivo. En 4

laboratorios en forma simultánea se informó en 1957 sobre la presencia de anticuerpos anti DNA (de doble cadena) utilizando para ello varias técnicas inmunológicas como la inmunoprecipitación, la fijación del complemento, la hemaglutinación y la doble difusión por el método de Ouchterlony descrito por el profesor Örjan Öuchterlony de la Universidad de Gothemberg en Suecia. Posteriormente Kunkel y col,^{28A} Mellons y col,^{28B} Stollan^{28c} demostraron que además del DNA, las histonas nucleares y los tejidos del riñón también sirven de blanco a los auto-anticuerpos y actualmente esto sirvió de apertura para entender 10 años después la estructura de la cromatina o nucleosoma (que es la unión del DNA de doble cadena unido al octámero de histonas o complejo DNA-histona que es el blanco de la mayoría de los auto-anticuerpos que se generan en los pacientes con lupus y sólo recientemente en 1998 se demuestra en un estudio que la histona H1 es el componente antigénico primario de este complejo.^{28D}

Gadusek en 1957 en Nature⁵⁶ publica la reacción de fijación de complemento entre antígenos de tejidos normales o "reagina" y gamaglobulinas en 9 de 11 pacientes con lupus, hepatitis lupoide en 3 de 4 pacientes, macroglobulinemia en dos de cinco pacientes y hepatitis crónica en 11 de 25 casos. En ese mismo año Mackay, Larkin y Burnet⁵⁷ no pudieron demostrar la posibilidad de que "anticuerpos autoinmune" reaccionaran con antígenos autólogos de material de biopsias, es posible que los antígenos estuviesen saturados con los anticuerpos y por ello no hubiese reacción. Así de esta forma y con estos trabajos se pensó que el lupus se considerara como una enfermedad en cuyos sueros se encontraban gamaglobulinas que tienen características inmunes y que tienen afinidad por constitu-

yentes de diversos tejidos y que pudiese variar de un individuo a otro; ese fue el comienzo del entendimiento de los mecanismos de daño inmunológico, que posteriormente Gell y Coombs plantearon como de tipo III, es decir mediados por complejos inmunes. Antes que el fenómeno LE se informara asociado a alguna enfermedad del tejido conectivo, en 1953 aparecieron varias publicaciones del fenómeno LE asociado a una reacción de hipersensibilidad a la penicilina, a la hidralazina y se pensó en una reacción por medicamentos, aun cuando en estas publicaciones existían datos clínicos que podrían sugerir la existencia del lupus eritematoso sistémico; se interpretó este cuadro clínico como si la reacción alérgica producida por los medicamentos hubiera originado el cuadro de lupus. Se describió además con la isoniazida, la procainamida y la metildopa en la que se demuestra la célula LE⁵⁸⁻⁶⁴ y la enfermedad parecida al lupus y estos cuadros clínicos se empezaron a difundir como lupus inducido por medicamentos.

Casi en forma simultánea con las publicaciones sobre la demostración de las células LE en los lupus inducidos por medicamentos, se empezó a demostrar y a estudiar la presencia de las células LE en los fluidos corporales y así de esta forma Van Doormaal y Schreuder⁶⁵ confirman la presencia de la célula LE en el líquido pleural, Seem en el líquido pericárdico⁶⁶ y Watson⁶⁷ y Hargraves a nivel experimental induce el fenómeno LE en bulas de pacientes con lupus utilizando la cantharidina, aunque en 1961 Tromovitch y Hyman⁶⁸ demuestran el fenómeno LE en bulas de pacientes con lupus. Posteriormente Finch, Ross y Ebaugh⁶⁹ inducen la producción de las células LE a nivel experimental y plantean la hipótesis que el lupus de alguna manera es una enfermedad autoinmune.



Figura 6 A. Célula LE y gránulos osmiofílicos y cuerpos de inclusión.

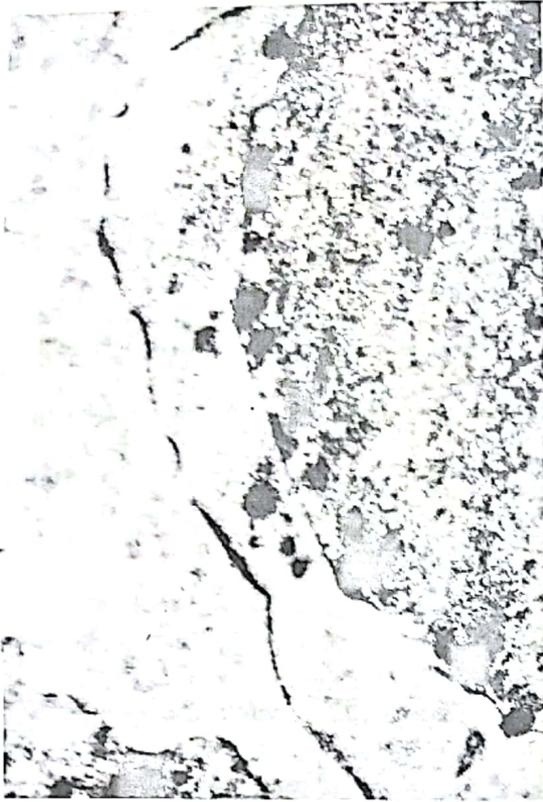


Figura 6 B. Imagen por microscopía electrónica (Cita número 70 en las referencias).

En 1963 Jorge E. Maldonado y Donato Alarcón-Segovia, fellows de medicina interna, Gertru L. Pease de la sección de patología y Arnold L. Brown⁷⁰ de la sección de anatomía y patología experimental de la Clínica Mayo en Rochester realizan el primer estudio de microscopía electrónica de la célula LE y observaron además la presencia de granulos osmiofílicos y cuerpos de inclusión superados por una membrana bien definida, pero sin aclarar su estructura (Figuras 6 A y B).

Entre 1953 y 1958 se realizaron varias publicaciones en las que se demuestra el fenómeno LE asociado a artritis reumatoidea,^{62-64, 71-75} hepatitis crónica activa en 1955,⁷⁶ en 1959 a la hepatitis crónica⁷⁷ y a la hepatitis lupoides en 1956, término que utilizaron Mackay, Taft y Cowling en su artículo de *Lancet*.⁷⁸ Estas publicaciones demostraron que el fenómeno LE no era patognomónico del lupus, sino que se encontraba asociado a muchas enfermedades autoinmunes; la célula LE de esta forma fue incorporada como uno de los criterios para el diagnóstico del lupus, era el criterio 8 para lupus de la ARA (American Rheumatism Association, hoy ACR: American College of Rheumatology).⁷⁹

Con el avance de la inmunología y siendo la técnica de la célula LE un poco dispendiosa y no muy específica

para el lupus, ya que se encontraba en otras enfermedades, perdió vigencia la prueba y con los nuevos criterios de 1982, se terminó una de las fases más interesantes de la historia del lupus. Con el descubrimiento de las células LE, se dio inicio al laboratorio inmunológico y al conocimiento de las enfermedades autoinmunes. Hay momentos de la historia en que se necesita que esté alguien y éste fue Hargraves entre los años de 1945 a 1950. Han transcurrido 50 años del descubrimiento de las células LE por Hargraves y nos abrió el camino de la caja de Pandora de los auto-anticuerpos que sólo fue reemplazada esta prueba (ya que no se utiliza como estudio de rutina) por los anticuerpos antinucleares que son más sensibles y por los anticuerpos anti-ds DNA que son más específicos. Como dato histórico el artículo de Hargraves no tiene una sola referencia, pero tiene el mérito de haber generado el campo para el estudio de los diferentes auto-anticuerpos que se ha expandido en los últimos años y actualmente los estudios que se llevan a cabo son de tipo básico y especialmente de biología molecular donde se analiza la estructura y función del núcleo y de las nucleoproteínas.

REFERENCIAS

1. Arinkin MI: Die intravitale untersuchungsmethodik des Knochenmarks. *Folia Haem* at 1929; 38: 233-240.
2. Schleicher EM: Aspirated human bone. Marrow with domestic wright stain. *Techn* 1942; 17: 161-164.
3. Schleicher EM: Method for making imprints and direct smears from gross marrow units. *Amer J Clin Path* 1945 (Tech suppl): 15: 8-9.
4. Schleicher EM: A new apparatus for isolation and preparation of aspirated bone marrow particles. *Amer J Clin Path* 1950; 20: 476-480.
5. Schleicher EM: An improved hematoxylin-eosin stain for sections of marrow units. *Stain Techn* 1953; 28: 119-123.
6. Hargraves MM, Richmond Helen and Morton R: Presentation of two bone marrow elements. The "tart" cell and the "L.E." *Proc Staff Meet. Mayo Clin* 1948; 23: 25-28.
7. Hargraves MM: Discovery of the "L.E." *Amer Lupus Society Quarterly* 1984; 5(2): 1-2.
- 7A. Hargraves MM: Discovery of the "L.E." cell. *Boswell Hosp Proc* 1976; 2: 22-5.
- 7B. Tan EM: The L.E. cell and its legacy. *Clin Exp Rheumatol* 1998; 16: 652-658.
8. Sundberg RD, Lick NB. "L.E." cell in the blood in acute disseminated lupus erythematosus. *J Invest Derm* 1949; 12: 83-84.
9. Hargraves MM: Production in vitro of the L.E. cell phenomenon: Use of normal bone marrow elements and blood plasma from patients with acute disseminated lupus erythematosus. *Proc Staff Meet Mayo Clin* 1949; 24: 243-237.
10. Zimmer E, and Hargraves MM: The effect of blood coagulation on L.E. cell formation. *Proc Staff Meet. Mayo Clinic* 1952; 27: 424-427.
11. Gross L: The heart in atypical verrucous endocarditis (Libman-Sacks), in contributions to the medical sciences in honor Dr. Emmanuel Libman by his pupils, friends and colleagues, New York, International Press, 1932 Vol. 2 p. 527.
12. Ginzler AM, and Fox TT: Disseminated lupus erythematosus: a cutaneous manifestation of a systemic disease. *Arch Int Med* 1940; 65: 26.
13. Haserick JR, Lewis LA, and Bortz DW: Blood factor in acute disseminated lupus erythematosus. I. Determination of gamma globulin as specific plasma fraction. *Am J Med Sci* 1950; 219: 660-3.
- 13A. Haserick J, Plama LE. Test in systemic lupus erythematosus. *JAMA* 1951; 46: 16.

- B. Haserick JR, Bortz DW: A new diagnostic test for acute disseminated lupus erythematosus. *Cleveland Clinic Quarterly* 1949; 16: 158-61.
4. Klemperer P, Gueff B, Lee S, Leuchtenberg C, and Pollister AW: Cytochemical changes of acute lupus erythematosus. *Arch Path* 1950; 49: 503.
5. Lee SL, Michael SR, and Vural IL: The L.E. (Lupus erythematosus) cell. Clinical and chemical studies. *Am J Med* 1951; 10: 446.
6. Moyer JB, and Fischer GS: Experimental production of L.E. cells. *Am J Clin Path* 1950; 20: 1011.
7. Rebeck JW, and Berman L: Experimental production of the L.E. Phenomenon in the skin of man. *Proc Soc Exp Biol Med* 1950; 75: 259.
8. Rohn RJ, and Bond WH: The dynamics of L.E. Cells supravivally stained. *J Lab Clin Med* 1951; 38: 944.
9. Rohn RJ, and Bond WH: Some supravital observations on the "L.E." Phenomenon. *Am J Med* 1952; 12: 422.
10. Rohn RJ, and Bond WH: Time lapse microcinematography of the L.E. Phenomenon. *J Lab Clin Med* 1953; 42: 939.
11. Robineaux R, Buffe S, and Kourilsky R: Recherches sur la formation de la cellule de Hargraves. *Annals de Institut Pasteur* 1956; 91: 109.
12. Robineaux R: Mouvements cellulaires et fonction phagocytaire des granulocytes neutrophiles. Etudes dynamique de la Phagocytose bacterienne, virale, minérale, et Cellulaire. *Rev Hémat* 1954; 9: 364.
- A. Robineaux R: Etude microcinematographique en contraste de fase du mecanisme du phenomene. LE. In: Grabar P and Miescher P (Eds): *Immunopathology Symposium* 1958; Based, Benno-Schwabe, pp 416-38.
13. Robineaux R, Research on LE: Cell formation In: *Symposium on hypersensitivity*. Boston, Little, Brown and Co., 1959.
14. Rifkind R, and Godman G: Phase contrast and interferometric microscopy of the L.E. Phenomenon. *J Exper Med* 1957; 106: 607.
15. Carrera AE, Reid MV and Kurinick NB: Difference in susceptibility of polymorphonuclear leukocytes from several species to alteration by systemic lupus erythematosus serum: Application to a more sensitive L.E. Phenomenon *Test Blood* 1954; 9: 1165.
16. Berman L, Axelrod AR, Goodman FL, and McClaughry RI: The so-called "Lupus erythematosus inclusion phenomenon" of bone marrow and blood. *Am J Clin Path* 1950; 20: 403.
17. Miescher P: Mise en Evidence du facteur L.E. par la reaction de consommation d' antiglobuline. *Vox Sang* 1955; 5: 121.
- 17A. Miescher P, Straessler R: New serological methods for the detection of the LE factor. *Vox Sang* 1957 2: 283-70.
18. Holman H, Kunkel HG: Affinity between the lupus erythematosus serum factor and cell nuclei and nucleoprotein. *Science* 1957; 126: 162.
- 18A. Kunkel HG, Holman HR, Dreicher HRG. Multiple antibodies to cell constituents in systemic lupus erythematosus. *Ciba Found Symp* 1960; 8: 429-37.
- 18B. Mellor RC, Ortega LG, Holman HR: Role of α -globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the lupus erythematosus cell reaction. *J Exp Med* 1957; 106: 191-202.
- 18C. Stollar BD: Reactions of systemic lupus erythematosus sera with histone fractions and histone-DX complexes. *Arthritis Rheum* 1971; 14: 485-92.
- 18D. Schett G, Steiner G, Smolen JS: Nuclear antigen histone His primarily involved in lupus erythematosus cell formation arthritis. *Rheum* 1998; 41: 1446-55.
19. Pollister AW, and Leuchtenberger C: The nature of the specificity of methyl green for chromatin. *Proc Natl Acad Sci* 1949; 35: 111.
20. Kurnick NB: The quantitative estimation of desoxyribose nucleic acid based on methyl green staining. *Exp Cell Res* 1950; 1: 151.
21. Kurnick NB: Methyl green-pyronine. I. Basis of selective staining of nucleic acids. *J Gen Physiol* 1950; 33: 243.
22. Kurnick NB, and Mirsky AE: Methyl green-pyronine. II. Stoichiometry of reaction with nucleic acids. *J Gen Physiol* 1950; 33: 264.
23. Kurnick NB: Histochemistry of nucleic acids. *Intl Rev Cytol* 1955; 4: 221.
24. Taft EB: The specificity of methyl green-pyronine stain for nucleic acid. *Exp Cell Res* 1951; 11: 312.
25. Chayen J: The methyl green-pyronin method. *Exp Cell Res* 1952 3: 652.
26. Swift HH: Cytochemical techniques for nucleic acid. In: *The nucleic acids* (E. Chargaff and J.N. Davison, editors). Vol. II, New York, Academic Press, 1955.
27. Singer M: The staining of basophilic components. *J Histochem and Cytochem* 1954; 2: 322.
28. Alfert M: Studies on Basophilia of Nucleic acids: the methyl green stainability of nucleic acids. *Biol Bull* 1952; 103: 145.
29. Sandritter E: Die Nachweismethoden der nucleinsäuren. *Z Wiss Mikr* 1955; 62: 283.
30. Bloch DP, and Godman GC: Evidence of differences in the desoxyribonucleoprotein complex of rapidly proliferating and non dividing cells. *J Biophysic Biochem Cytol* 1955; 6: 531.
31. Godman Gabriel C: The nature and pathogenetic significance of the L.E. Cell phenomenon of systemic lupus erythematosus. In: A. Mount Sinai Hospital Monograph on Systemic lupus erythematosus. Editors George Baehr and Paul Klemperer. Grune & Stratton New York. London 1959.
32. Godman G, and Deitch AD: A cytochemical study of the L.E. Bodies of systemic lupus erythematosus. I. Nucleic Acids. *J Exp Med* 1957; 106: 575.
33. Godman G, and Deitch AD: A cytochemical study of the L.E. Bodies of systemic lupus erythematosus. II. Proteins. *J Exp Med* 1957; 106: 593.
34. Godman G and Deitch AD: A cytochemical study of the L.E. Bodies of systemic lupus Erythematosus. *Am J Path* 1956; 32: 616.
35. Coons AH: Histochemistry with Labelled Antibody. *Intl Rev Cyto* 1956; 5: 1.
36. Friou GJ, Finch SC, Detre KD: Nuclear localization of a Factor from Disseminated lupus serum. *Fed Proc* 1957; 16: 413.
- 36A. Friou GJ: Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using florescent antibody technique. *Clin Invest* 1957; 36: 890.
37. Friou GJ: Identification of the nuclear component of the interaction of lupus erythematosus globulin and nuclei. *J Immunol* 1958; 80: 476.
38. Miescher P, and Fauconnet M: L'absorption du facteur "L.E." par des noyaux cellulaires isolés. *Experientia* 1954; 10: 252.
39. Ceppellini R, Polli E, Celada FA: DNA reacting factor in serum of a patient with lupus erythematosus diffuses. *Proc Exp Biol Med* 1957; 96: 572.
40. Seligmann M: Mise en evidence dans le serum des Malades atteints de lupus erythem ateux dissemine diune substance determinant use reaction de precipitation avec acide desoxyribonucleique C.R. Acad Sci (Paris) 1957; 245: 243-5.
41. Seligmann M, and Milgrom F: Mise en evidence par la fixation du complément de la réaction entre acide desoxyribonucleique et serum de malade atteints de lupus erythem ateux Disséminé. C.R. Acad Sci Paris 1951; 245: 1472.
42. Seligmann M: Etudes immunologiques sur le lupus ERYTHEMATEUX disséminé. *Rév. Francaised d' tudes Clin Et Biol* 1958; 3: 558.
43. Holman H, Deicher H, Robbins WC. Antinuclear "Antibodies" in lupus erythematosus. In: *Symposium on hypersensitivity*. Little, Brown and Co., Boston, 1959.
44. Seligmann M, and Hanau, C: Erude immunoélectrophorétique du sérum de Malades Atteints de lupus Erythemateux disséminé. *Rév Hématol* 1958; 13: 239.
45. Hijmans W, and Schuit HRE: Studies on the L.E. Cell Phenomenon. *Vox Sang* 1958; 3: 184.
46. Gajdusek DC: An 'auto-immune' reaction against human tissue antigens in certain chronic diseases. *Nature* 1957; 179: 666.
47. Mackay IR, Larkin L, Burnet LM: Failure of "Autoimmune antibody to react with antigen prepared from the individuals. Own tissues". *Lancet II*: 1957; 122.
48. Alarcon-Segovia D, Worthington JW, Ward LE, Warkim KG: Lupus diathesis and the hydralazine syndrome, abst. *Arthritis Rheum* 1964; 7: 285.
- 48A. *New Engl. J Med* 1965; 272: 462.
- 48B. Alarcon-Segovia D: Síndromes lúpicas inducidos por drogas. *Tribuna Médica* 1970; 9(2): 14-28.
49. Wals JR, Zimmerman HJ: The demonstration of the "LE" Phenomenon in patients with penicillin hypersensitivity. *Blood* 1953; 8: 65-71.
50. Miesher P, Delacretaz J: Demonstration d'un phénomène "LE" positif dans deux cas d'hypersensibilité médicamenteuse. *Schweiz. Med Wschr* 1953; 83: 536-538.
51. Kaufman M: Pancytopenia to lowing use of hydralazine "Apresoline". Report of a case. *JAMA* 1953; 151: 1488-1490.
52. Beelar Virginia P: Rheumatoid arthritis syndrome during apresoline therapy of a case. *Med Ann DC* 1953; 22: 651-652.
53. Dustan HP, Taylor RO, Corcoren AC, and Page IH: Rheumatic and febrile syndrome resembling rehumatoid arthritis and lupus during prolonged hydralazine (Phthalazine Derivative) treatment. *JAMA* 1954; 154: 23.

