

## Descubrimiento de la célula L.E.

Antonio Iglesias Gamarra, MD, Profesor Asociado, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia. Capítulo del libro "Historia del lupus".

### INTRODUCCIÓN

El 21 de enero de 1999, se cumplieron 51 años del descubrimiento de la célula L E y del factor reumatoideo. Estas dos técnicas de laboratorio marcaron un hito en la historia de la medicina moderna, ya que con la descripción de la célula L E, se empezó el conocimiento de la auto inmunidad, ya que habrio la caja de pandora para la descripción de los auto anticuerpos, la explicación de la formación de complejos inmunes, el inicio del conocimiento de las teorías del daño inmunológicos, las técnicas de inmunofluorescencia y con el factor Rematoideo, se empezó a plantear la patogénesis de la artritis Rematoidea. Con el desarrollo de las diferentes tecnicas para detectar auto-anticuerpos, se logro establecer que eran mas sencibles y mas especificos, por ello a partir de 1982 con los nuevos criterios del Lupus se tomo la decisión de retirar el VIII criterio de 1971 es decir la célula L E positiva.

Esta es la historia completa de cómo una serendipia que se inicio el 21 de enero de 1948, produjo un descubrimiento tan importante para la auto inmunidad y el conocimiento del Lupus Eritematoso Sistemico, y solo hasta 1998 Schett logro demostrar que la histona (H1) es el blanco del factor serico o auto-anticuerpos y que participa en forma importante en la formación de la célula L E.

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 tenía 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 hematooncológicas. En 1929 M.I. Arinkin en la revista *Folia Hematológica* (1) 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 del esternón, usando 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 donde los aspirados de médula ósea los 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 mé-

todo 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, esta forma Hargraves en compañía con la señorita Helana Richmond visitaron durante dos días al profesor Emil Schleicher del Hospital General de Minneapolis, quien desarrolló durante varios años en Detroit y Chicago algu-

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 _____	Coag. Time (Boggs) _____
Immature Lymph _____	Bleeding Time _____
<p><i>Plasma cells - increase plasma cells - peculiar pattern structure - globular bodies taking purple stain (di. fact?) - this is not diagnostic</i></p> <p>Hargraves</p>	

Figura 1. Informe de paciente de nueve años de edad que presentaba aumento de células plasmáticas y cuerpos globulares sin estructura definida.

nas técnicas para la aspiración esternal y publicó cuatro artículos en 1942 y 1945 (2-5). Posteriormente regresó a Rochester e introdujo esta metodología en la Clínica Mayo.

Así Hargraves y Richmond empezaron la ardua tarea de mejorar las técnicas de aspirado de médula ósea 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 nueve 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 aprecian cuerpos globulares sin estructura definida, muy peculiares que toman coloración morada (¿artificio? 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 trazas 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 extracelulares. De nuevo en octubre 15 de 1945 le solicitaron un estudio hematológico de médula ósea en una niña de nueve 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

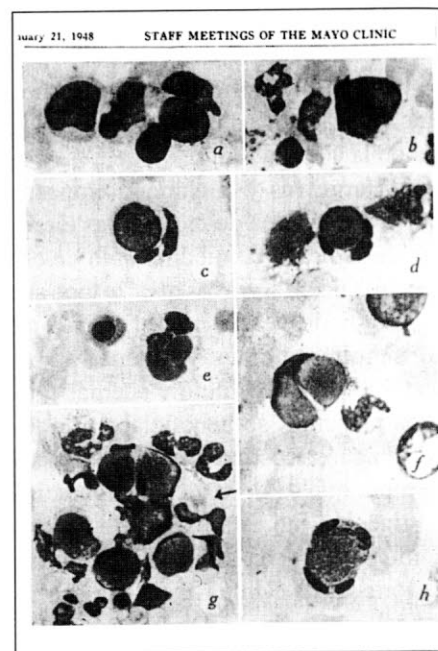
diagnóstico de leucemia y otras discrasias sanguíneas, se observaron los corpúsculos morados en una lámina adecuada y técnicamente bien realizada; de todas maneras estas láminas fueron guardadas en una caja de cartón "para ser revisados posteriormente" por el excesivo trabajo del profesor Hargraves y no se concluyó. 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 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 enviaran el siguiente caso de lupus para realizarle un aspirado; tres 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 pa-

ciente con lupus en el Hospital Santa María en el servicio del doctor JM 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 estaban llenas de esta sustancia y notó que el núcleo estaba rechazado a la periferia. Se observaban estas alteraciones en todas las preparaciones de médula ósea, pero no en los frotis periféricos. Durante los años de 1946 y 1947 Hargraves examinó varios 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 LE. 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 trabajaba el laboratorio de Hargraves por el fenómeno LE, contagió a Morton y alguien se integró el equipo 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 el director de la tesis, Morton terminó sus tres meses con Hargraves y durante otros nueve meses trabajó obteniendo muestras en otros servicios de la Clínica Mayo. Él 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 (1º 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 hallazgos, porque durante dos años mostraba las fotografías a los colegas hematólogos del famoso Hematology Club de Chicago de los años 1946 y 1947, es decir del medio oeste y a los visitantes de la Clínica Mayo y ninguno había observado estos hallazgos en sus extendidos. Esto lo desanimó en poco, pero el hecho de que Haserick y Sundberg hubieran reproducido sus experiencias lo indujo a publicarlas el 21 de enero de 1948 en la edición del Proceeding of the Staff Meeting of the Mayo Clinic, constituyéndose en uno de los artículos clásicos en la historia del lupus (Figuras 2 y 3) (6,7).

Este artículo marco 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 investigativa en USA. 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 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, el mismo Hargraves no pudo

<i>Proceedings of the</i>	
STAFF MEETINGS OF THE MAYO CLINIC	
<small>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</small>	
CONTENTS	
<i>Presentation of Two Bone Marrow Elements: the "Tart" Cell and the "L.E." Cell</i> .....	21
<small>MALCOLM M. HARGRAVES, HELEN RICHMOND and ROBERT MORTON</small>	
<i>Report on Surgery of the Stomach and Duodenum for 1946</i> .....	29
<small>WALTER WALTER, HOWARD S. GRAY and JAMES T. PRINGLE</small>	
<i>Recent Publications by Members of the Staff</i> .....	37
<i>Annual Surgical Report on the Stomach and Duodenum for 1946: Medical Aspects</i> .....	38
<small>G. B. EUSTERMAN</small>	
<i>Annual Report on Surgery of the Biliary System and Pancreas for 1946</i> .....	40
<small>WALTER WALTER, HOWARD S. GRAY and JAMES T. PRINGLE</small>	
<i>Annual Surgical Report on the Biliary System and Pancreas for 1946: Medical Aspects</i> .....	46
<small>JAMES F. WELCH</small>	
<i>An Evaluation of Thionine [N,N-Dimethyl-N'-(Alpha-Thio) Ethylbenzamide Hydrochloride]</i> .....	48
<small>ROBERT R. KIRLAND and ROBERT T. PUTTER</small>	
<i>Procedure for Distinguishing Drug Efficacy against the Tubercle Bacillus by a Combined <i>In Vivo</i> and <i>In Vitro</i> Method</i> .....	52
<small>ELISSON F. WHITE and ALBERT G. KANARIS</small>	
<i>Multiple Meningiomas: Report of Case and Surgical Considerations</i> .....	54
<small>JAMES A. FICKEL and GEORGE S. BAKER</small>	
<b>PRESENTATION OF TWO BONE MARROW ELEMENTS: THE "TART" CELL AND THE "L.E." CELL</b>	
<small>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</small>	



**Figuras 2 y 3.** Carátula de la primera página del artículo y del fenómeno LE. El artículo se denominó "Presentation of Two Bone Marrow Elements: the "Tart" cell and the "L.E. cell", lo único desafortunado del artículo fue la inclusión de las tart cell.

demostrar el fenómeno LE en estos casos (8).

En el procedimiento desarrollado por Hargraves después de practicarse el aspirado de 1 ó 2 ml de la médula esternal se 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 más tarde y con mayor tiempo de incubación que la lectura directa se encontraban mayor es muestras con resultados positivos. A partir de estas 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 se empezaron a describir las células LE en sangre periférica (7). Un año después Dorothy Sundberg y Norma Lick (9) publicaron un informe preliminar de tres pacientes con células LE, inducidas por centrifugación e incubación de sangre periférica. Esta experiencia de Sundberg y Lick le sirvió a Hargraves para revisar su primer

artículo sobre "dos elementos de la médula ósea" que era erróneo ya que las células LE se producían in vitro y la confusión fue la introducción de las células "tart" que fue observada por Helen Richmond y era la nucleofagocitosis (7). Esta célula "tart" tiene características morfológicas diferentes y el núcleo englobado no posee los cambios descritos en la célula LE, los mismos autores pensaron que esto podría ocasionar mayor confusión y error a quienes no tenían experiencias en la observación de la nucleofagocitosis, el nombre de "tart" era 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 denominó como factor de célula LE y Hargraves demostró el fenómeno LE *in vitro* realizando su segunda publicación en abril 27 de 1949 en el Proceeding Staff Meet Mayo Clinic (10). 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 discutió la presencia de la célula LE en material de médula ósea, como originalmente lo había descrito; y en el plasma o suero de pacientes que tengan "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. Frederick Zimmer y Hargraves en el laboratorio de Hargraves, demostraron que la coagulación, el tiempo y el traumatismo son factores muy importantes y Zimmer desarrolló la prueba del coágulo en dos horas que se continúa realizando en algunos laboratorios (11).

Montgomery y McCreight (12) 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 con-



**Figura 4. Dr. Malcolm H. Hargraves.**

memoró el vigésimo aniversario del descubrimiento de la célula LE y también el retiro del doctor Hargrave como consultor de medicina de la Clínica Mayo con un simposio sobre lupus (Figura 4). Estos trabajos de Hargraves fue una gran contribución a la inmunopatología, a partir de la hematología morfológica. El Dr. Hargraves se fue a vivir a Suncity, Arizona, y en 1976 hizo la recopilación de su descubrimiento (7, 13-14). En este simposio participaron el profesor Donato Alarcón-Segovia quien describió en una forma amplia los síndromes lúpicos inducidos por drogas y Naomi F. Rothfield sobre consideraciones generales del tratamiento del lupus eritematoso sistémico (7).

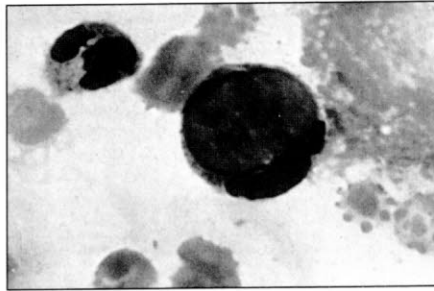
Históricamente Louis Gross patólogo del Mount Sinai fue el primero en describir los cuerpos extracelulares de hematoxilina eosina (H.E) en los tejidos, especialmente en los tejidos cardiacos cuando Libman y Sacks describieron la endocarditis verrucosa asociada al Lupus (12), Arthur Ginzler y Fox (15) plantearon 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 verrucosa 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 Bortz (16) describen que el factor sérico que estaba asociado al fenómeno LE era una gamaglobulina y la describieron como una fracción específica del plasma, esto se realizó en 1950. Ese mismo año Klemperer y col (17) y Lee y col en 1951 (18), 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 al factor sérico LE, producirían las células LE (18-19). En presencia del factor sérico o gamaglobulina de acuerdo a Haserick (20-21), 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 posteriormente describió la ventana de Rebeck para el estudio de la movilidad de los neutrófilos en casos de inmunodeficiencias) y Berman (8) al estudiar piel humana por abrasión y al agregar suero de pacientes con lupus, al colocar la laminilla del cubre-objeto observaron la fagocitosis del polimorfonuclear, posteriormente Rohn y Bond (22-24) 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. Posteriormente Robineaux (25-27) de Francia, con mejores métodos de microscopía demostró en 1956 que la alteración del núcleo afecta un solo lobulo, con pérdida del patrón de la cromatina, pero conserva la membra-

na celular intacta. Rifkind y Godman (28) 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" 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 intacta y finalmente ocurre la fusión nuclear en una masa amorfa, los linfocitos también lo hacen pero en forma más lenta; la 3) fase ocurre cuando se produce la lisis del citoplasma y de la membrana citoplasmática y el homogenizado del material nuclear es fagocitado por los polimorfonucleares (28-32). Robineaux demostró claramente que el material nuclear alterado es sólo eso y no tiene residuos de citoplasma (26-27, 33), por ello 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 de los polimorfonucleares (26-27, 33).

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.



**Figura 5. Célula LE.**

En la formación de este fenómeno confluyen varios elementos como: anticuerpos, material nuclear (núcleo-proteínas), complemento y polimorfonucleares activados (Figura 5).

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

Robert Morton y 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 1950 (17) y Lee (18) 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 Henry Kunkel (34) 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 (34-35) 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 Mirsky en 1950 (36-39), Taft en 1951 (40), Chayen en 1952 (41), Swift en 1955 (42), Singer en 1954 (43), Alfert en 1952 (44), Sandritter (45) en 1955, Bloch y Godman (46) en 1955, Godman (47) y Deich (48-50) y el clásico de Godman, Deitch y Klemperer (50) 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 (34, 51).

Un año antes de la descripción de las células LE, Pollister y Ris (34) utilizando la reacción de Millón separó las proteínas histonas de las no histonas, ya que con esta reacción se podía medir directamente los residuos de tirosina de la proteína y se inició el estudio de las proteínas nucleares en el estudio de 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 1956 (52) utilizando antisueros marcados con fluororomo 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 Deitch (48-50) 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 plantea la posibilidad que la gamaglobulina en este sitio podía ser inmunológicamente reactiva. Así de esta forma con los estudios de Coons (52), Godman y Deitch (48-50), Holman y Kunkel (33) y finalmente Friou (53-55) 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 encon-

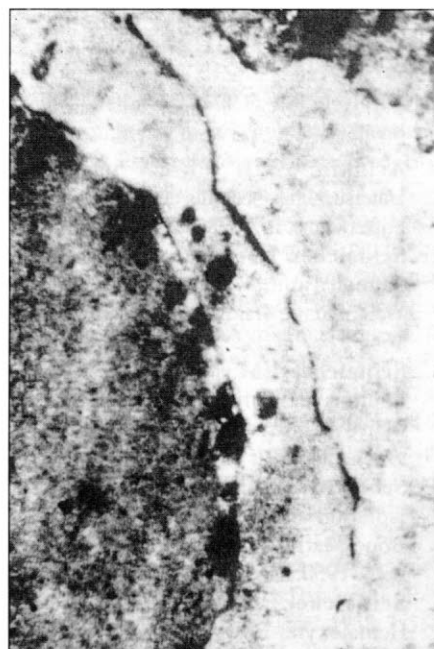
traban despolimerizadas por una deoxiribonucleasa intracelular liberada por un inhibidor intracelular a través de una proteasa sérica y esto facilitaba su penetración por el factor sérico, esta teoría enzimática no se pudo demostrar. Posteriormente se corroboró que el factor sérico es una gamaglobulina y es absorbida en el núcleo y reacciona con el DNA al inducir a nivel experimental una reacción de precipitina 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 (56), Cepellini y col (57), en Europa demostraron las técnicas de absorción, precipitación utilizando el factor sérico y Seligman y col (58-59) 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 inmunoelectroforesis. Además Seligmann (60), Holman y Deicher (61) demostraron las reacciones de precipitación y fijación de complemento con los anticuerpos o los sueros de pacientes lúpicos. Otro de los aportes importantes de Seligmann y Hanan (62), y de Hisman y Schit (63) es que el factor sérico es una gamaglobulina en contraposición de Haserick y col que pensaba era una globulina diferente (16, 20).

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 cuatro 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 Öuchterlony, descrito por el profesor Örjam Öuchterlony de la Universidad de Gothemberg en Suecia. Posteriormente Kunkel y col (51), Mellors y col (64) y Stollar (65) demostraron que además del DNA, las histonas nucleares y los tejidos (ej. riñón), también sirven de blanco a los auto-anticuerpos y actualmente esto sirvió de apertura para entender diez años después la estructura de la cromatina o nucleosoma (que es la unión del DNA de doble cadena unido al octamero 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 (66).

Gajdusek en 1957 en Nature (67) demostró la reacción de fijación de complemento entre antígenos de tejidos normales o "reagina" y gamaglobulinas en nueve de 11 pacientes con hepatitis lupoide en tres de cuatro pacientes, macroglobulinemia en dos de cinco pacientes y hepatitis crónica en 11 de 25 casos. En ese mismo año Mackay, Larkin y Burnet (68) no pudieron demostrar la posibilidad que "anticuerpos autoinmunes" reaccionaran con antígenos autologos 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 constituyentes de diversos tejidos y que pudiesen variar de un individuo a otro, ese es 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 fenóme-

no LE se informase 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 hidralizina y se pensó en una reacción por medicamentos, aún cuando en estas publicaciones existían datos clínicos que pudiesen sugerir la existencia del lupus eritematoso sistémico; se interpretó este cuadro clínico como si la reacción alérgica producida por los medicamentos había originado el cuadro de lupus, se describió además con la isoniazida, la procainamida y la metildopa (69-77) 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



Figuras 6 y 7. Microscopía electrónica de la célula LE.

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 Schreuder (78) confirman la presencia de la célula LE en el líquido pleural, Seeman en el líquido pericárdico (79) y Watson (80) y Hargraves a nivel experimental induce el fenómeno LE en bulas de pacientes con lupus utilizando la cantharidina, pero en 1961 Tromovitch y Hyman (81) demuestran el fenómeno LE en bulas de pacientes con lupus. Posteriormente Finch, Ross y Ebaugh (82) inducen la producción de las células LE a nivel experimental y plantean la hipótesis que el lupus de alguna manera es una enfermedad autoinmune.

En 1963 Jorge E. Maldonado y Donato Alarcón-Segovia fellows de medicina interna, Gertrude L. Pease de la sección de patología y Arnold L. Brown (83) de la sección de anatomía y patología experimental de la Clínica Mayo en Rochester realizaron el primer estudio de microscopía electrónica de la célula LE y observaron además la presencia de granulos osmiofílicos y cuerpos de inclusión separados por una membrana bien definida, pero no se

acclaró su estructura (Figuras 6 y 7).

Entre 1953 y 1958 se realizan varias publicaciones en la que se demuestra el fenómeno LE asociado a la artritis reumatoidea (75-77, 84-88), hepatitis crónica activa en 1955 (89), en 1959 a la hepatitis crónica (90) y a la hepatitis lupoide en 1956, término que utilizaron Mackay, Taft y Cowling en su artículo de Lancet (91). 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 No. 8 para lupus de la ARA (American Rheumatism Association), actualmente ACR (American College of Rheumatology) (92).

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 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 solo 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 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 han 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. Solo hasta 1998 Schett y col (66) demostraron que la histona de la I(H1) juega un papel importante en conformación de la célula LE y el blanco del factor serico LE o auto anti cuerpos.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. **Arinkin MI.** Die intravitale Untersuchungsmethodik des Knochenmarks. Folia Haemat 1929; 38: 233-240.
2. **Schleicher EM.** Staining Aspirated Human Bone Marrow with Domestic Wright Stain. 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. 9); 15: 8-9.
4. **Schleicher EM.** A new Apparratus 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 H, 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." cell. Amer Lupus Society Quarterly 1984; 5 (2): 1-2.
8. **Rebuck JW.** Berman L. Experimental Production of the L.E. Phenomenon in the Skin of Man. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 1950; 75: 259.
9. **Sundberg RD, Lick NB.** "L.E." Cell in the Blood in Acute disseminated Lupus Erythematosus. J. Invest. Derm. 1949; 12: 83-84.
10. **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: 234-237.
11. **Zimmer E, Hargraves MM.** The Effect of Blood Coagulation on L.E. Cell Formation. Proc. Staff Meet. Mayo Clinic 1952; 27: 424-427.
12. **Gross L.** The heart in atypical verrucous endocarditis (Libman-Sacks), in contributions to the medical sciences in honor Dr. Emanuel Libman by his pupils, friends and colleagues, New York, International Press, 1932. Vol. 2 p. 527.
13. **Hargraves MM.** Discovery of the "L.E." cell. Boswell Hosp Proc 1976; 2: 22-25.
14. **Tan EM.** The L.E. cell and its legacy. Clin Exp Rheumatol 1998; 16: 652-658.
15. **Ginzler AM, Fox TT.** Disseminated

- Lupus Erythematosus: a cutaneous manifestation of a systemic disease. Arch. Int. Med. 1940; 65: 26.
16. **Haserick JR, Lewis LA, Bortz DW.** Blood Factor in Acute Disseminated Lupus Erythematosus. I. Determination of Gamma Globulin as specific plasma fraction. Am. J. Med. Sci. 1950; 219: 660-663.
  17. **Klemperer P, Gueft B, Lee S, Leuchtenberger C, Pollister AW.** Cytochemical Changes of Acute Lupus Erythematosus. Arch. Path. 1950; 49: 503.
  18. **Lee SL, Michael SR, Vural IL.** The L.E. (Lupus Erythematosus) Cell. Clinical and Chemical Studies. Am. J. Med. 1951; 10: 446.
  19. **Moyer JB, Fischer GS.** Experimental Production of L.E. Cells. Am. J. Clin. Path. 1950; 20: 1011.
  20. **Haserick J, Plama L.E.** Test in Systemic Lupus Erythematosus. JAMA 1951; 146: 16.
  21. **Haserick JR, Bortz DW.** A new diagnostic test for acute disseminated lupus erythematosus. Cleveland Clinic Quarterly 1949; 16: 158-161.
  22. **Rohn RJ, Bond WH.** The Dynamics of L.E. Cells Supravivally Stained. J. Lab. Clin. Med. 1951; 38: 944.
  23. **Rohn RJ, Bond WH.** Some Supravital Observations on the "L.E." Phenomenon. Am. J. Med. 1952; 12: 422.
  24. **Rohn RJ, Bond WH.** Time Lapse Microcinematography of the L.E. Phenomenon. J. Lab. Clin. Med. 1953; 42: 939.
  25. **Robineaux R, Buffe S, Kourilsky R.** Recherches sur la Formation de la cellule de Hargraves. Annales del Institut Pasteur 1956; 91: 109.
  26. **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.
  27. **Robineaux R. Research on L.E.** Cell Formation In: Symposium on Hypersensitivity, Boston, Little, Brown and Co., 1959.
  28. **Rifkind R, Godman G.** Phase Contrast and Interferometric Microscopy of the L.E. Phenomenon. J. Exper. Med. 1957; 106: 607.
  29. **Carrera AE, Reid MV, 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.
  30. **Berman L, Axelrod AR, Goodman FL, McClaughry RI.** The so-called "Lupus Erythematosus Inclusion Phenomenon" of Bone Marrow and Blood. Am. J. Clin. Path. 1950; 20: 403.
  31. **Miescher P. Mise en Evidence du Facteur L.E.** par la Reaction de Consommation d'antiglobuline. Vox Sang 1955; 5: 121.
  32. **Miescher P, Straessler R.** New Serological methods for the detection of the LE factor. Vox Sang 1957; 2: 283-270.
  33. **Robineaux R.** Etude microcinematographique en contraste de fase du mecanisme du phenomene. LE. In: Grabar P, Miescher P Eds. Immunopathology Symposium 1958; Basel, Benno-Schwabe. 416-438.
  34. **Holman H, Kunkel HG.** Affinity between the Lupus Erythematosus Serum Factor and Cell Nuclei and Nucleoprotein. Science 1957; 126: 162-163.
  35. **Pollister AW, Leuchtenberger C.** The Nature of the Specificity of Methyl Green for Chromatin. Proc. Natl. Acad. Sci. 1949; 35: 111.
  36. **Kurnick NB.** The Quantitative Estimation of Desoxyribose Nucleic Acid Based on Methyl Green Staining. Exp. Cell Res. 1950; 1: 151.
  37. **Kurnick NB.** Methyl Green-Pyronine. I. Basis of Selective Staining of Nucleic Acids. J. Gen. Physiol. 1950; 33: 243.
  38. **Kurnick NB, Mirsky AE.** Methyl Green-Pyronine. II. Stoichiometry of Reaction with Nucleic Acids. J. Gen. Physiol. 1950; 33: 264.
  39. **Kurnick NB.** Histochemistry of Nucleic Acids. Intl. Rev. Cytol. 1955; 4: 221.
  40. **Taft EB.** The Specificity of Methyl Green-Pyronine Stain for Nucleic Acid. Exp. Cell Res. 1951; 11: 312.
  41. **Chayen J.** The Methyl Green-Pyronin Method. Exp. Cell Res. 1952; 3: 652.
  42. **Swift HH.** Cytochemical Techniques for Nucleic Acid. In: Chargaff E, Davison JN, Eds. The Nucleic Acids. Vol. II, New York, Academic Press, 1955.
  43. **Singer M.** The Staining of Basophilic Components. J. Histochem. and Cytochem. 1954; 2: 322.
  44. **Alfert M.** Studies on Basophilia of Nucleic acids: the methyl green stainability of Nucleic Acids. Biol. Bull 1952; 103: 145.
  45. **Sandritter E.** Die Nachweismethoden der Nucleinsäuren. Z. Wiss. Mikr. 1955; 62: 283.
  46. **Bloch DP, Godman GC.** Evidence of Differences in the Desoxyribonucleoprotein Complex of Rapidly Proliferating and Non-Dividing Cells. J. Biophysic. Biochem. Cytol. 1955; 6: 531.
  47. **Godman GC.** The nature and pathogenetic significance of the L.E. cell phenomenon of systemic lupus erythematosus. In: Baehr G, Klemperer P, Eds. A Mount Sinai Hospital Monograph on Systemic lupus erythematosus. Grune & Stratton New York. London 1959.
  48. **Godman G, Deitch AD.** A Cytochemical Study of the L.E. Bodies of Systemic Lupus Erythematosus. I. Nucleic Acids. J. Exp. Med. 1957; 106: 575.
  49. **Godman G, Deitch AD.** A Cytochemical Study of the L.E. Bodies of Systemic lupus Erythematosus. II. Proteins. J. Exp. Med. 1957; 106: 593.
  50. **Godman G, Deitch AD.** A Cytochemical Study of the L.E. Bodies of Systemic Lupus Erythematosus. Am. J. Path. 1956; 32: 616.
  51. **Kunkel HG, Holman HR, Deicher HRG.** Multiple antibodies to cell constituents in systemic lupus erythematosus. Ciba Found Symp 1960; 8: 429-437.
  52. **Coons AH.** Histochemistry with Labelled Antibody. Int. Rev. Cyto. 1956; 5: 1.
  53. **Friou GJ, Finch SC, Detre KD.** Nuclear Localization of a Factor from Disseminated Lupus Serum. Fed. Proc. 1957; 16: 413.
  54. **Friou CJ.** Clinical application of lupus serum nucleoprotein reaction using fluorescent antibody technique. J Clin Invest 1957; 36: 890-897.
  55. **Friou GJ.** Identification of the Nuclear Component of the Interaction of Lupus Erythematosus Globulin and Nuclei. J. Immunol. 1958; 80: 476.
  56. **Miescher P, Fauconnet M.** L'Absorption du Facteur "L.E.", par des Noyaux Cellulaires Isolés. Experientia 1954; 10: 252.
  57. **Cepellini R, Polli E, Celada FA.** DNA Reacting Factor in Serum of a patient with Lupus Erythematosus diffuses. Proc. Exp. Biol. & Med. 1957; 96: 572-574.
  58. **Seligmann M.** Mise en Evidence ans le serum des malades atteints de Lupus Erythemateux dissemine diune substance determinant une reaction de precipitation avec l'Acide desoxyribonucleique. C.R. Acad. Sci. (Paris) 1957; 45: 243-245.
  59. **Seligmann M, Milgrom F.** Mise en Évidence par la Fixation du Complément de la Réaction entre Acide Desoxyribonucleique et Sérum de Malade Atteints de Lupus Érythemateux Disséminé. C.R. Acad. Sci. (Paris) 1957; 245: 1472.
  60. **Seligmann M.** Études Immunologiques sur le Lupus Érythémateux Disséminé. Rév. Française d' tudes clin. Et biol. 1958; 3: 558.
  61. **Holman H, Deicher H, Robbins WC.** Antinuclear "Antibodies" in Lupus



- Erythematosus. In: Symposium on Hypersensitivity. Little, Brown and Co., Boston, 1959.
62. **Seligmann M, Hanau C.** Érude Immunoélectrophorétique du Sérum de Malades Atteints de Lupus Érythémateux Disséminé. *Rév. Hématol.* 1958; 13: 239.
  63. **Hijmans W, Schuit HRE.** Studies on the L.E. Cell Phenomenon. *Vox Sang* 1958; 3: 184.
  64. **Mellors RC, Ortega LG, Holman HR.** Role of gamma globulins in pathogenesis of renal lesions in systemic lupus erythematosus and chronic membranous glomerulonephritis, with an observation on the L.E. Cell reactions. *J Exp Med* 1957; 106: 191-202.
  65. **Stollar BD.** Reactions of systemic lupus erythematosus sera with histone fractions and histone-DNA complexes. *Arthritis Rheum* 1971; 14: 485-492.
  66. **Schett G, Steiner G, Smolen JS.** Nuclear antigen histone Hi is primarily involved in lupus erythematosus cell formation. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1445-1455.
  67. **Gajdusek DC.** An 'Auto-Immune' Reaction Against Human Tissue Antigens in Certain Chronic Diseases. *Nature* 1957; 179: 666.
  68. **Mackay IR, Larkin L, Burfnct LM.** Failure of "Autoimmune Antibody to React With Antigen Prepared from the Individuals Own Tissues". *Lancet* II 1957; 122.
  69. **Alarcon-Segovia D, Worthington JW, Ward LE, Wakim KG.** Lupus diathesis and the hydralazine syndrome. *Abst. Arthritis Rheum* 1964; 7: 285.
  70. *New Engl J Med* 1965; 272: 462.
  71. **Alarcon-Segovia D.** Síndromes lúpicos inducidos por drogas. *Tribuna Médica* 1970; 9 (2): 14-28.
  72. **Walsh JR, Zimmerman HJ.** The demonstration of the "LE" Phenomenon in patients with penicillin hypersensitivity *Blood* 1953; 8: 65-71.
  73. **Miesher P, Delacretaz J.** Demonstration d'un phénomène "LE" positif dans deux cas d'hypersensibilité médicamenteuse. *Schweiz. Med. Wschr.* 1953; 83: 536-538.
  74. **Kaufman M.** Pancytopenia to lloving use of hydrolazine "Apresoline". Report of a case *JAMA* 1953; 151: 1488-1490.
  75. **Beelar VP.** Rheumatoid arthritis syndrome during a presoline therapy of a case. *Med. Ann DC* 1953; 22: 651-652.
  76. **Dustan HP, Taylor RO, Corcoren AC, Page IH.** Rheumatic and Febrile Syndrome Resembling Rheumatoid Arthritis and Lupus durin Prolonged Hydralazine (Phthalazine Derivative) Treatment. *JAMA* 1954; 154: 23.
  77. **Perry HM, Schroeder HA.** Syndrome Simulating Collagen Disease Caused by Hydralazine (Apresoline). *JAMA* 1954; 154: 670.
  78. **Van Doormaal TAJ, Schreuder JTR.** Über die sogennante erythematodes - Zelle und deren Vorkommen inder pleura flüssigkeit bei einer an "lupus erythematodes disseminatus acutus (subacutus)" le idenden patientin. *Dermatologica* 1950; 101: 167-172.
  79. **Seeman AJ, Christerson JW.** Demonstration of lupus erythematosus cells in pericardial fluid. *JAMA* 1952; 149: 145-147.
  80. **Watson JB, O'leary PA, Hargraves MM.** Neutrophils resembling LE cells in artificial blisters. *A.M.A. Arch Dermat Syph* 1951; 63: 328-333.
  81. **Tromovitch TA, Hyman AB.** Systemic lupus erythematosus with Hemorrhagic bullae. *Arch & Dermatology* 1961; 83: 64-68.
  82. **Finch WR, Ross JF, Ebaugh FG Jr.** Immunologic mechanisms of leukocyte abnormalities. *J. Lab. Clin. Med* 1953; 42: 555.
  83. **Maldonado JE, Alarcon-Segovia D, Pease GL, Brown AL Jr.** Electron microscopy of the lupus erythematosus cell. *Proc. Staff Meet Mayo Clinic* 1963; 38: 219-224.
  84. **Kievits JA, Goslings J, Schuit HRE, Hijmans W.** Rheumatoid Arthritis and the Positive L.E. Cell Phenomenon. *Am. Rheum. Dis.* 1956; 15: 211.
  85. **Friedman IA, Sickley JF, Poske RM, Black A, Bronsky D, Hartz WH, Feldhake C, Reeder PS, Katz EM. The L.E. Phenomenon in Rheumatoid Arthritis.** *Ann. Int. Med.* 1957; 46: 1113.
  86. **Parr LT, Shipton E, Benjamin P.** The L.E. Phenomenon in Rheumatoid Arthritis. *Med. J. Australia* 1957; 1: 900.
  87. **Sigler JW, Monto RW, Ensign DL, Wilson GM, Rebuck J, Lovett J.** The Incidence of the L.E. Cell Phenomenon in Patients with Rheumatoid Arthritis. *Arthritis and Rheumatism* 1958; 1: 115.
  88. **Bateman M, Maline JM, Meynell MJ.** Rheumatoid Arthritis and Systemic Lupus Erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* 1958; 17: 114.
  89. **Joske R, King WE.** The L.E. Cell Phenomenon in Active Chronic Viral Hepatitis. *Lancet* II 1955; 447.
  90. **Marmont AM.** "L.E.-cell" Phenomenon in Chronic Hepatitis. *Lancet* I 1956; 387.
  91. **Mackay IR, Taft LI, Cowling DC.** Lupoid Hepatitis. *Lancet* II 1956; 1323.
  92. **Cohen AS, Reynolds WE, Franklin EC, et al.** *Bull. Rheum Disease.* 1971; 21: 643.