

LINFÓCITOS EM HANSENÍASE: I. LINFÓCITOS B DO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DO MAL DE HANSEN*

Édimo Garcia de Lima e Maria Rosa Losano Borrás

RESUMO

Os autores estudaram os valores numéricos dos linfócitos do tipo B em doentes portadores do mal de Hansen. Examinaram o sangue de 125 pessoas não portadoras de nenhuma doença aparente. Concomitantemente examinaram o sangue de 413 doentes, distribuídos nas formas: Virchowiana, tuberculóide e indeterminada. Os resultados mostraram não haver diferenças entre controles e portadores da forma Virchowiana, para linfócitos do tipo B, porém diminuição em relação às outras duas formas: tuberculóide e indeterminada. Os autores também não encontraram diferenças estatisticamente significantes quando foram relacionados os resultados obtidos portadores das três formas estudadas. Verificaram ainda que o tempo de tratamento não modifica o número dos linfócitos do sangue periférico.

INTRODUÇÃO

Muito se tem estudado sobre os linfócitos, visando suas estruturas, tanto de pessoas aparentemente sadias como de doentes.

BOYUM (1968) descreveu um método de separação de células mononucleares e de granulócitos do sangue humano e igualmente, YU *et alii* (1973), descreveram um método de separação de linfócitos por densidade descontínua em gradiente. O método consiste simplesmente no uso do ficoll em determinada concentração e densidade. Encontraram boa reprodutibilidade do método.

BACH, MUELLER & DARDENNE (1970) estudaram a separação das células esplênicas através do uso do gradiente de ficoll-triosil. Verificaram que as células passadas através do gradiente não mudam a sua imunocompetência quando são submetidas à formação de rosetas.

DICKLER, ADKINSON JR. & TERRY (1974), estudaram os linfócitos de pessoas normais no sentido de esclarecer suas propriedades de fixarem através de seus receptores, hemácias de carneiro tratadas e não tratadas com neuraminidase. Seus resultados contradizem a de outros autores e sugerem que suas diferenças corram por conta da metodologia empre-

* Trabalho realizado no Departamento de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP.

gada na obtenção dos linfócitos e também do método de preparação das rosetas.

SAMARUT & REVILLARD (1979) estudaram a capacidade dos linfócitos do sangue periférico de fixarem complexo antígeno anticorpo IgG ou IgM, empregando a técnica de rosetas com hemácias de boi, coaptadas com anticorpo IgG (AG) ou IgM (AM).

A formação de rosetas EAM foi ativada somente em suspensão pré-incubada por 24 horas a 37°C. A adição de complexo de EAM ou EAG, ao meio de cultura foi evidenciado que abole a formação de rosetas. A inibição é reversível. Isto não é devido à presença de traços de IgM, contaminantes da fração IgG. Não encontraram linfócitos sem hemácias quando incubados com complexo EAG. Verificaram que a inibição dos receptores dos linfócitos para IgM pode ser vista como uma consequência da modulação da superfície receptora para IgG e envolve uma interação entre as superfícies dos receptores para IgG e IgM, respectivamente. Estes experimentos não excluem a possibilidade de que poucas células cuja fixação para EAG possa perder seus receptores devido à modulação e evidenciam um receptor para IgM.

CARAUX *et alii* (1979) estudaram uma população de linfócitos que fixam eritrócitos autólogos na presença de soro também autólogo. Hemácias se tornam mais eficientes na fixação a mais 40°C, após a pré-incubação dos linfócitos em soro autólogo por 30 minutos seguidos de uma noite de incubação. A concentração celular e a razão hemácia-linfócito são também cruciais na ligação das hemácias com os linfócitos. As proteínas das membranas são envolvidas pela estrutura e são sensíveis ao tratamento com a protease.

CHIAO, PANTIC & GOOD (1974) estudaram a capacidade de linfócitos humanos fixarem complemento que é característica dos linfócitos do tipo B e a capacidade dos linfócitos do tipo T de formarem rosetas espontaneamente com hemácias de carneiro.

LAY *et alii* (1971), através da investigação da interação entre antígeno, anticorpo e complemento, como um complexo e células linfóides do sangue periférico humano para formarem rosetas puderam estudar as condições das interações. Estudaram as células linfóides de pessoas saudáveis e de portadoras de doenças hematológicas. Obtiveram linfócitos de sangue heparinizado passado através de fibras de nylon. Não encontraram rosetas formadas com monócitos ou com polimorfonucleares de pessoas saudáveis e de mongolóides e mesmo de portadoras de leucemia e de portadoras de linfossarcoma. Verificaram também que o teste de rosetas ou a interação eritrócito-linfócito e espécie específica.

STEEL, EVANS & SMITH (1974) estudaram a variação do número dos linfócitos de pessoas normais submetidas a esforço físico e verificaram que apresentavam linfocitose após o exercício e que depois de um repouso de 45 minutos o número dos linfócitos voltava ao seu nível numérico normal.

Muitos pesquisadores estudaram a variação linfocitária, levando em consideração o tratamento das pessoas e de animais com substâncias diversas como: epinefrina, ciclofosfamida, cortisona, levamisole, imunossupressoras e oxitetraciclina. OBBARIUS (1979) estudou a variação do número dos linfócitos B e T do baço e dos nódulos linfáticos de cobaias inoculadas com oxitetraciclina, intramuscular-

mente e encontrou pequenas variações de ambas as células.

YU & CLEMENTS (1976) estudaram o efeito da administração da epinefrina sobre os linfócitos da circulação. Os linfócitos do tipo T foram evidenciados, usando o teste de rosetas e os linfócitos do tipo B foram examinados através da reação de imunofluorescência. O percentual encontrado de ambas as células, após a injeção da epinefrina, foi aumentado. Aumentaram na ordem de $2,5 \pm 0,4\%$ e $10,5 \pm 1,3\%$, respectivamente. Tais variações foram encontradas em dois pacientes, previamente esplenectomizados, porém não apresentaram aumento algum do número dos linfócitos em quatro pessoas que foram inoculadas com solução de cloreto de sódio, isotônica em vez da epinefrina. Os mesmos pesquisadores estudaram o efeito da epinefrina sobre as subpopulações de linfócitos. Verificaram o efeito sobre linfócitos de pessoas normais. Os linfócitos T, contados através do teste de rosetas e B através da reação de imunofluorescência. O percentual foi de $72,2 \pm 1,4$; $13,8 \pm 1,1$ e $20,3 \pm 1,3\%$, antes da injeção e de $164,0 \pm 14,0$; $326,0 \pm 57,0$ e $272,0 \pm 45,0\%$, após, respectivamente.

CLEMENTS *et alii* (1974) estudaram a característica dos linfócitos circulantes em 16 pacientes com artrite reumatóide tratados com ciclofosfamida e foram comparados com 49 outros pacientes controles e 70 normais. Em todos os três grupos o percentual dos linfócitos T e B foi o mesmo, os linfócitos T e B, nos não tratados foi mais baixo que os das pessoas normais. Durante o tratamento com a ciclofosfamida o número dos linfócitos Te B, caíram acentuadamente. O profundo efeito da ciclofosfamida sobre os linfócitos T e B pode estar relacionado com a depres-

são humoral na imunidade mediada por células durante o tratamento por ciclofosfamida.

A levamisole também foi estudada e foram TRAUBERT & MUELLER (1976), os pesquisadores que estudaram as possíveis alterações que a levamisole pode exercer sobre o número dos linfócitos da corrente circulatória de portadores de espondilite anquilosante. Não encontraram nenhuma variação numérica dos linfócitos T e B das pessoas examinadas.

FAUCI & DALE (1974) estudaram o efeito da hidrocortisona sobre as subpopulações de linfócitos. Os linfócitos de pessoas tratadas apresentaram uma diminuição acentuada com um apogeu em 4 horas após a administração da droga ao paciente. Cessada a ação da cortisona, após 24 horas o número dos linfócitos se estabiliza em seus níveis normais.

Drogas imunossupressoras foram estudadas por WINKELSTEIN (1977), quando demonstrou a variação linfocitária (B e T) em cobaias tratadas. Observou uma redução de 6,0 a 70% do número de ambos linfócitos.

Quase houve concomitância entre os estudos celulares e os estudos dos seus valores em vários tipos de entidades nosológicas. YU *et alii* (1974) estudaram o valor numérico dos linfócitos T e B na artrite reumatóide, do sangue periférico de pacientes e o encontraram reduzido. WINCHESTER *et alii* (1973) estudaram o número das mesmas células do fluido da junta de pacientes portadores de artrite reumatóide, onde encontraram uma redução dos linfócitos do tipo B.

WILLIAMS JR. *et alii* (1973), SCHEINBERG & CATHCART (1973) e PANDOLFI *et alii* (1979) estudaram a presença dos linfócitos no lupus eritema-

toso sistêmico e seus resultados foram conflitantes.

Na tireoidite de Hashimoto os valores numéricos dos linfócitos foram estudados por PERRUDET – BADOUX & FREI (1969), por CALDER *et alii* (1976) por URBANIAK, PENHALE & IRVINE (1973) e por FARID *et alii* (1973), no entanto seus resultados foram conflitantes.

Na hanseníase há indicações de que a resistência ao microorganismo esteja relacionada à imunidade mediada por células (BULLOCK & FASAL, 1971 e TURK & BRYCESON, 1971). Os valores numéricos dos linfócitos T e B de hansenianos podem estar modificados por ação da doença. Foi estudada por DWYER, BULLOCK & FIELDS (1973).

GAJL – PECZALSKA *et alii* (1973) estudaram o número dos linfócitos do tipo B em hansenianos tratados e encontraram um número elevado dos mesmos. NATH, CURTIS & TALWAR (1974) encontraram também um aumen-

to dos linfócitos do tipo B, porém sem que houvesse dependência de tratamento dos pacientes.

Este trabalho visa estudar os valores numéricos dos linfócitos do tipo B do sangue periférico de pacientes portadores de hanseníase cuja finalidade é conhecer com maior exatidão seus valores.

MATERIAL E MÉTODO

Foram empregados 413 sangue de hansenianos, sendo 232 portadores da forma Virchowiana, 96 da forma tuberculóide e 85 da forma indeterminada, de ambos os sexos e de idades, variando de 9 a 86 anos. As idades variam de 19 a 86 anos, nos portadores da forma virchowiana, de 15 a 76 anos nos portadores da forma tuberculóide e de 9 a 78 anos nos portadores da forma indeterminada. A tabela 1, mostra a distribuição dos pacientes por forma da doença e sexo.

Tabela 1 – Distribuição por sexo e forma de doença dos hansenianos examinados.

Sexo	Formas			Total
	Virchowiana	Tuberculóide	Indeterminada	
Masc.	147	58	48	253
Fem.	85	38	37	160
Total	232	96	85	413

Foram empregados como controle sangues de 125 pessoas não hansenianas e aparentemente sadias para outras doenças, representadas por soldados recentemente incorporados ao Exército. Todos do sexo masculino e de idade de 19 anos.

DETERMINAÇÃO DOS LINFÓCITOS DO TIPO B

Foi empregado o teste de rosetas na determinação dos linfócitos do tipo B. Para a realização do teste empregou-se os

leucócitos dos pacientes e dos controles, hemácias de carneiro sensibilizadas com hemolisina anticarneiro e também complemento (C₃) de camundongo.

Os sangues foram obtidos por punção venosa e juntados a uma solução estabilizadora de titriplex III (GARCIA LIMA & MITSCHERLICH, 1973). Foram feitos esfregaços dos sangues a fresco para contagem diferencial leucocitária e feitas também contagens globais dos leucócitos. A seguir os sangues foram submetidos à hemólise por choque hipotônico. Os leucócitos foram lavados três vezes em solução tamponada de fosfato (PBS) (BEHRENS & ESCH, 1963; WEINHOLD, 1965 e SCHMIDT, 1970), pH 7,4. Foi feita uma suspensão, contendo 4000 células por mm³.

As hemácias de carneiro foram obtidas de sangue colhido sem fibrinogênio. Foram lavadas em PBS e suspensas para uma concentração de 5% em PBS e colocadas em presença de hemolisina anticarneiro. Agitadas durante 30 minutos, à temperatura de 37°C e a seguir lavadas e suspensas em PBS para conter 100.000 células por mm³. (HUBER *et alii*, 1971).

O complemento usado foi o de camundongo obtido através de uma mistura de soros de camundongos. A mistura dos soros foi absorvida com hemácias de carneiro. O complemento assim obtido foi conservado a -22°C e usado dentro do período máximo de 7 dias.

Foram estudados alguns parâmetros relativos ao teste de rosetas como: o tempo para incubação ou cinética da reação, quando foi estabelecido o tempo ótimo de incubação. Foi também estudada a influência da temperatura, número de leucócitos e de hemácias e suas relações e

ainda a influência das concentrações salinas nas soluções.

Para a leitura considerou-se como roseta positiva a que estava formada com 4 ou mais elementos, ou sejam hemácias; como rosetas negativas os leucócitos isolados.

RESULTADOS

Na avaliação dos parâmetros que podem influenciar a reação verificou-se que o tempo de incubação das reações deveria ser de 90 minutos a 37°C. Após este tempo foram lidas as reações onde se pode observar células mortas, formando roseta com hemácias. Quanto à influência do número das células que compõem o teste deveria ser de 4000 leucócitos por mm³ e de hemácias 100.000 por mm³.

A concentração obedeceu os critérios adotados classicamente na literatura. O número de leucócitos mortos influencia a relação numérica entre rosetas positivas e negativas, sendo que quanto maior o número das células mortas menor será o de rosetas, não invalidando chance de se encontrar rosetas formadas com linfócitos mortos.

A relação encontrada entre os resultados apresentados pelos controles e pacientes portadores da forma virchowiana mostraram não haver diferenças significantes ao nível de 5%. Foram significantes as diferenças entre os resultados de controles e formas tuberculóide e indeterminada, também ao nível de 5%, entre as formas não foram encontradas diferenças significantes. Em relação aos resultados apresentados pelas formas tuberculóide e indeterminada, foram menores estatisticamente significantes. As formas e tempo de tratamento não influenciam os resultados numéricos dos linfócitos.

DISCUSSÃO

HUBER *et alii* (1971) e JONDAL, HOLM & WIGZELL (1972) foram os autores do teste de rosetas para determinar o número de linfócitos do tipo B, da corrente circulatória de camundongos. Usa-se neste teste leucócitos, eritrócitos (E) sensibilizados com hemolisina anticarneiro (A) e complemento de camundongo (C³). Após um período de incubação, os receptores para Fc da IgG e C₃b dos linfócitos são ocupados pelos eritrócitos sensibilizados (YOFFEY & COURTICE, 1970 e ZUCKERFRANKLIN & St. BERNEY, 1972), formando rosetas (EAC).

Monócitos e granulócitos podem formar rosetas do tipo B, mas desde que a solução tamponada possua Mg⁺⁺. Na ausência deste íon e o de Ca⁺⁺ possam somente os linfócitos do tipo B formarem rosetas (LAY & NUSSENZWEIG, 1968; HUBER & DOUGLAS, 1970; JONDAL, HOLM & WIGZELL, 1972 e BACH *et alii* 1972).

Foi necessário estabelecer parâmetros importantes das reações como: o número dos elementos figurados do sangue, o tempo de incubação e temperatura. A relação leucócitos – hemácias foi de 1:25, apesar de terem sido encontradas rosetas formadas com mais de 25 eritrócitos.

Na obtenção dos leucócitos optamos pelo choque hipotônico, em vez da separação por gradiente de densidade devido ser mais barato e mais rápido.

Quanto aos resultados encontrados do número de linfócitos do tipo B, nos sangues de portadores de hanseníase não apresentaram resultados com diferenças significantes ao nível de 5%, os portadores da forma Virchowiana, em relação aos controles. As formas tuberculóide e inde-

terminada foram significativamente mais baixos. Quanto aos resultados dos Virchowianos está em acordo com os de GAJL – PECZALSKA *et alii*, 1973.

VERMA *et alii* (1971), encontraram um aumento dos linfócitos do tipo B, em alguns pacientes mas acreditam que esse aumento seja devido à depleção das células de origem tímica assim como da ativação da resposta imunológica humoral. Acreditam ainda que possam estes aumentos em alguns pacientes ser devido a circunstâncias estranhas à doença.

Quanto aos resultados encontrados com os linfócitos do tipo B, nas formas tuberculóide e indeterminada, apresentaram diferenças significantes a menor em relação ao controle talvez por possuírem menor atividade proliferativa em função da fase da doença.

Nas relações estudadas entre as formas de hanseníase não foram encontradas diferenças significantes. Estes resultados demonstram que os pacientes portadores das diversas formas de hanseníase não diferem nas suas reações frente ao agente etiológico da hanseníase mesmo que haja variação na forma da doença.

CONCLUSÕES

Os autores estudaram os valores numéricos dos linfócitos do tipo B em doentes portadores do Mal de Hansen. Examinaram o sangue de 125 pessoas não portadoras de nenhuma doença aparente. Concomitantemente examinaram o sangue de 413 doentes, distribuídos nas formas: Virchowiana, tuberculóide e indeterminada. Os resultados mostraram não haver diferenças entre controles e portadores da forma Virchowiana, para linfócitos do tipo B, porém diminuição em relação

às outras duas formas: tuberculóide e indeterminada. Os autores também não encontraram diferenças estatisticamente significantes quando foram relacionados os resultados obtidos portadores das três formas estudadas. Verificaram ainda que o tempo de tratamento não modifica o número dos linfócitos do sangue periférico.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Sra. Maria Aparecida Nonato Fernandes e ao Sr. Wander Cosme Ribeiro da Silva pelos serviços técnicos e à Srta. Rosângela Catarina Peral pelos trabalhos datilográficos.

SUMMARY

Lymphocytes in hanseniasis:
I – B lymphocytes in the bloodstream
of patients with Hansen's disease.

The authors counted B lymphocyte numbers in patients with Hansen Disease. Blood samples were obtained from 125 persons with no apparent disease and from 413 patients with the virchowian, tuberculoid and indeterminate form of hanseniasis. The results showed no difference between the controls and the patients with the virchowian form of the disease, but a decrease in relation to the tuberculoid and indeterminate forms. No statistically significant differences were detected among the three forms of the disease. Time of treatment did not modify the number of peripheral blood lymphocytes in patients with hanseniasis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

01 – BACH, J.F.; BIOZZI, G.; GREAVES, M.F.; McCONNEL, I.; MICKLEM, H.S.; MOELLER, E. & ZAALBERG,

O.B. – Summary of roundtable discussion on the technical aspects of the rosette test. Transplantation Proc., 4 (3): 335-337, 1972.

- 02 – BACH, J.F.; MUELLER, J.I. & DARDENNE M. – Separation of sheep RFC by a ficoll – triosil gradient after rosette formation with CRBC. Nature, 227: 1252, 1970.
- 03 – BECHRENS, M. & ESCH, F. – Gewinnung von Leukozyten zur Rinderblut unter Verwendung von Wasser als Haemolyticum. Experientia, 18: 406-407, 1963.
- 04 – BOYUM, A. – Isolation of mononuclear cell and granulocytes from human blood. J. Clin. Lab. Invest., 21 (Suppl. 97, 77), 1968.
- 05 – BULLOCK, W. E. & FASAL, P. – Studies of immune mechanisms in leprosy. III, the role of cellular and humoral factors in impairment of the "in vitro" immune response. J. Immunol., 106: 888-899, 1971.
- 06 – CALDER, E.A.; IRVINE, W. J.; DAVIDSON, N. McD. & WU, F. – T, B and K cells in autoimmune thyroid disease. Clin. Exp. Immunol., 25: 17-22, 1976.
- 07 – CARAUX, J.; THIERRY, C.; ESTEVE, C.; FLORES, G.; LODISE, R. & SERROU, B. – Human autologous rosettes. I. Mechanism of binding of autologous erythrocytes by T cells. Cell Immunol., 45 (1): 36-48, 1979.
- 08 – CHIAO, J. W.; PANTIC, V. S. & GOOD R. A. – Human peripheral lymphocytes bearing both B – cell complement receptors and T cell characteristics for sheep erythrocytes method. Clin. Exp. Immunol., 18: 483-490, 1974.
- 09 – CLEMENTS, P.J.; YU, D.T.Y.; LEVEY, J.; PAULUS, H.E. & BARNETT, E.V. – Effect of cyclophosphamide on B and T lymphocytes in rheumatoid arthritis. Arthritis and Rheumatism, 17 (4): 347-353, 1974.
- 10 – DICKLER, H.B.; ADKINSON, JR., N.F. & TERRY, W. D. – Evidence for indivi-

- dual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature*, 247 (5438): 213-215, 1974.
- 11 – DWYER, J. M.; BULLOCK, W. E. & FIELDS, J.P. – Disturbance of the blood T: B lymphocyte ratio in lepromatous leprosy. *New Engl. J. Med.*, 288 (20): 1036 – 1039, 1973.
- 12 – FARID, N.R.; MUNRO, R.E.; ROW, V.V. & VOLPE, R. – Peripheral thymus – dependent (T) lymphocytes in GRAVES' disease and Hashimoto's Thyroiditis. *New Engl. J. Med.* 288 (25): 1313-1317, 1973.
- 13 – FAUCE, A. S. & DALE, D.C. – The effect of "in vivo" hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 53: 240-246, 1974.
- 14 – GAJL - PECZALSKA, K. J.; LIM, S. D.; JACOBSON, R. & GOOD, R. A. B. – Lymphocytes in lepromatous leprosy. *New Engl. J. Med.*, 288 (20): 1033-1035, 1973.
- 15 – GARCIA LIMA, E. & MITSCHERLICH, E. – Untersuchungen über die Zahl der B – und T Lymphozyten in strömenden Blut von gesunden, leukoseverdächtigen und Leukosekranken Rindern der Deutschen Schwarzbunten. *Zbt. Vet. Med.*, B. 20: 665-684, 1973.
- 16 – HUBER, H. & DOUGLAS, S. D. – Receptor sites on human monocytes for complement: binding of red cells sensitized by cold auto antibodies. *Brit. J. Haematol.*, 19: 19-26, 1970.
- 17 – HUBER, H.; MICHELMAYER, G.; HUBER, C.; ASAMER, H. & DOUGLAS, S.D. – Inhomogeneity of peripheral lymphocytes – complement a portion of human lymphocytes. IN: DUMONDE, D.C. The role of the lymphocytes and macrophages in the immunological response. Spring Verlag, Berlin, Heidelberg. New York, 1971.
- 18 – JONDAL, M.; HOLM, G. & WIGZELL, H. – Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming nonimmune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.*, 136 (2): 207-215, 1972.
- 19 – LAY, W.A.; MENDES, N.F.; BIANCO, C. & NUSSENZWEIG, V. – Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature*, 230: 531-532, 1971.
- 20 – LAY, W. A. & NUSSENZWEIG, V. – Receptors for complement on leucocytes. *Exp. Med.*, 128: 991-1007, 1968.
- 21 – NATH, I.; CURTIS, J.; BHUTANI, L.K. & TALVAR, G.P. – Reduction of subpopulation of T lymphocytes in lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 18: 81-87, 1974.
- 22 – OBBARIUS, J. – T and B lymphocyte levels in the spleen and lymph nodes of guinea pigs after intramuscular of oxytetracycline. *Zl. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 56 (6): 46-48, 1979.
- 23 – PANDOLFI, F.; PAGANELLI, R.; SIRIANNI, M.C.; D'AMELIO, R. & AIUTTI, F. – Rosette formation with mouse erythrocytes by lymphocytes from normal donors and patients with various diseases. *Zbl. Immunitätsforschung Immunobiol.*, 155 (5) : 378-386, 1979.
- 24 – PERRUDET – BADOUX, A. & FREI, P. C. – On mechanism of "rosette" formation in human and experimental thyroiditis. *Clin. Exp. Immunol.*, 5: 117-127, 1969.
- 25 – SAMARUT, C. & REVILLARD, J. P. – Human T lymphocyte receptors for IgM: control by IgG binding lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 9 (5): 415-420, 1978.
- 26 – SCHEINBERG, M. A. & CATHCART, E. S. – B and T cell lymphopenia in SLE. *Arthritis and Rheumatism*, 16 (4): 566, 1973.
- 27 – SCHMIDT, F.W. – Untersuchungen über die Epidemiologie und Aetiologie der enzootischen Rinderleukose. *Habil. Schrift. Goettingen*, 1970.
- 28 – STEEL, C. M.; EVANS, J. & SMITH, M.A. – B and T cell lymphopenia in SLE. *Arthritis and Rheumatism*, 16 (4): 566-1973.
- 29 – TRAUBERT, R. V. & MUELLER, W. – The effect of levamisole on peripheral blood lymphocyte subpopulations in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.*; 25: 493-496, 1976.
- 30 – TURK, J.L. & BRYCESON, A.D.M. – Immunological phenomena in leprosy and related diseases. *Adv. Immunol.*, 11: 209-266, 1971.
- 31 – URBANIAK, S.J.; PENHALE, W.J. & IRVINE, W.J. – T lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *Lancet*, 2: 453, 1973.
- 32 – VERMA, R.C.; BALAKRISHNAN, K.; VASUDEVAN, D.M. & TALWAR, G. P. – Lymphocytes bearing immunoglobulin determinants in normal human lymph nodes and in patients with lepromatous leprosy. *Intern. J. Leprosy*, 39 (1): 20-24, 1971.
- 33 – WEINHOLD, E. – Gewinnung Weisser Blut Koerpchen des Rinder. fuer die Zellkultur. *Berlin, Tieraerztliches wscrh* 78: 224-227. 1965.
- 34 – WILLIAMS JR., P.C.; DeBOARD, J.R.; MELLBYR O.J.; MESSNER R.P. & LINDSTROEM, F.D. – Studies of T and B lymphocytes in patients with connective tissue diseases. *J. Clin. Invest.*, 52: 283-295, 1973.
- 35 – WINCHESTER, R.J.; SIEGAL, F.P.; BENTWICH, Z.H. & KUNKEL, H. G. – Alteration in the proportion of B and T lymphocytes in rheumatoid arthritis joint fluids with low complement and increased complexes. *Arthritis and Rheumatism*, 16 (1): 138, 1973.
- 36 – WINKELSTEIN, A. – Effect of immunosuppressive drugs on T and B lymphocytes in guinea pigs. *Blood*, 50 (1): 81-91, 1977.
- 37 – YOFFEY, J.D. & COURTICE, F.C. – Lymphatics, Lymph and the lymphomieloid complex. *New York, Acad. Press*, 1970.
- 38 – YU, D.T.Y. & CLEMENTS, P.J. – Human lymphocyte subpopulations effect of epinephrine. *Clin. Exp. Immunol.*, 25: 472-479, 1976.
- 39 – YU, D.T.Y.; CLEMENTS, P.J.; PETER, J. B.; LEVY, J.; PAULUS, H. E. & BORNETT, E. V. – Lymphocyte characterization on rheumatic patients and the effect of azathioprine therapy. *Arthritis and Rheumatism*, 17(1): 37-45, 1974.
- 40 – YU, D.T.Y.; PETER, J.B.; PAULUS, H. & MACHLEDER, H.I. – Lymphocyte populations: separation by discontinuous density gradient centrifugation. *J. Immunol.*, 110 (6): 1615-1622, 1973.
- 41 – ZUCKER – FRANKLIN, D. & BERNEY, S. – Electron microscope study of surface immunoglobulin bearing human tonsil. *J. Exp. Med.*, 135: 533-548, 1972.