

LINFÓCITOS EM HANSENÍASE: II. LINFÓCITOS T DO SANGUE PERIFÉRICO DE PORTADORES DO MAL DE HANSEN*.

Édimo Garcia de Lima e Maria Rosa Losano Borrás

RESUMO

Os autores estudaram a aplicação do teste de rosetas na determinação do número dos linfócitos do tipo T, da corrente circulatória de portadores do Mal de Hansen, com vistas ao emprego no diagnóstico da hanseníase. Determinaram os parâmetros necessários à execução do teste. Examinaram o sangue de 125 pessoas tidas como saudáveis, tomadas como controle e examinaram concomitantemente o sangue de 413 outras pessoas portadoras de hanseníase, nas formas: virchowiana, tuberculóide e indeterminada. Os resultados mostraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de doentes portadores da forma virchowiana e controles mas encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os resultados apresentados pelos controles e portadores das formas tuberculóide e indeterminada, aumentados nessas.

INTRODUÇÃO

Após a descoberta das ações dos linfócitos junto ao sistema imunológico muito se tem estudado sobre sua estrutura, variação numérica e funções.

Dickler, Adkinson & Terry (1974), estudaram os linfócitos de pessoas normais, quanto aos seus receptores para hemácias tratadas e não tratadas com neuraminidase.

BOYUM (1968) e Yu *et alii* (1973) descreveram uma metodologia semelhante de separação de linfócitos do sangue periférico, empregando substâncias de ação inerte para os leucócitos mas de densida-

des diferentes. Descreveram ainda a separação linfocitária por densidade descontínua de gradientes.

Brain, Gordon & Willetts (1970) verificaram que linfócitos do sangue periférico de pessoas, suspensos em soros e hemácias de carneiros formam rosetas. Verificaram ainda que a formação de rosetas podia ser abolida através do cianeto de sódio e do soro antilinfócito. Madsen & Johnsen (1979) estudaram a influência de hemácias tratadas com o brometo 2-aminoetilouranio no teste de rosetas e verificaram que a formação de rosetas passa ser dependente do tempo de incubação, da temperatura e da presença do soro ao meio.

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

Samarut & Revillard (1979) estudaram linfócitos do sangue periférico de pessoas com a finalidade de verificar a capacidade deles em fixar complexos antígeno-anticorpo, formados com IgG e IgM. Empregaram o teste de rosetas com hemácias de boi coaptadas com anticorpo IgG ou IgM.

Krusius *et alii* (1979) fizeram um estudo comparativo da estrutura de carboidratos em glicoproteínas de linfócitos B e T de camundongos. Os resultados mostraram que as células B e T diferem na quantidade relativa de diferentes tipos de carboidratos presentes na glicoproteína celular.

Jondal, Holm & Wigzell (1972) mostraram que há duas populações de linfócitos, com funções distintas mas cooperativas no organismo. Ambas formam rosetas, dependendo de condições experimentais.

Chiao, Pantic & Good (1974) estudaram a capacidade dos linfócitos do tipo T de formarem rosetas espontaneamente com hemácias de carneiro.

Steel, Evans & Smith (1974) estudaram a variação do número de linfócitos em pessoas submetidas a esforço físico e verificaram que apresentavam uma linfoenia que voltava ao normal após repouso de 45 minutos.

Foram estudadas várias pessoas, submetidas a tratamento, através da variação de seus leucócitos. Obbarius (1979) estudou a oxitetraciclina e verificou que as células do tipo T apresentavam pequena variação numérica. Yu & Clements (1976) estudaram o efeito da epinefrina sobre os linfócitos periféricos circulantes. Os linfócitos do tipo T foram evidenciados através do teste de rosetas. Encontraram um aumento da ordem de $2,5 \pm$

0,4%. Clements *et alii* (1974) estudaram as características dos linfócitos de pessoas tratadas com ciclofosfamida. Encontraram variação numérica acentuada dos linfócitos. Relacionaram esta queda linfocitária com a depressão humoral na imunidade mediada por células durante o tratamento por ciclofosfamida. Traubert & Mueller (1976) estudaram o efeito da levamisole sobre os linfócitos da corrente circulatória de portadores de espondilite anquilosante. Não encontraram diferenças do número relativo da população dos linfócitos T e B, das pessoas examinadas. Fauci (1975) estudou o efeito da cortisona sobre a variação linfocitária, quando pôde verificar um efeito linfocitopênico acentuado. Houve maior queda dos linfócitos do tipo T em relação aos do tipo B. Fauci & Dale (1974) já haviam estudado o efeito sobre as populações linfocitárias, da hidrocortisona. Obtiveram após o tratamento uma queda máxima dos linfócitos do tipo T após 4 horas a administração medicamentosa e volta ao número normal dos linfócitos após 24 horas, sem que se administrasse novas doses. Winkelsstein (1977) estudou as alterações numéricas sofridas pelos linfócitos. Os linfócitos do tipo T foram contados, usando-se como indicador hemácias de coelhos, papainizadas. A redução de ambos os tipos de linfócitos persistiu por oito dias. A 6-mercaptopurina e o metatrexato não alteram numericamente os linfócitos T e B. O acetato de hidrocortisona reduziu ambas as populações de linfócitos dentro de dois dias após o início da administração.

Wybran, Carr & Fudenberg (1972) determinaram o percentual dos linfócitos do tipo T, do timo de fetos de 12 a 16 semanas, e verificaram que em 65% das

pessoas da população examinada os linfócitos aumentavam conjuntamente com o envelhecimento fetal. Na medula óssea encontraram 0,8% de células T nos fetos examinados.

DeGast & Platts-Mills (1979) fizeram um estudo da função dos linfócitos T, na medula óssea humana, em seres adultos. Os linfócitos foram obtidos através do gradiente de sacarose. As medulas eram de costelas de pacientes submetidos à toracotomia de portadores de tumor pulmonar. A média dos linfócitos T aumentou de acordo com o crescer da idade. Aquelas células mostraram fraca atividade "helper" e não apresentaram atividade citotóxica quando tratadas com fitohemoglobulina. São células imaturas também em atividade imunológica.

Bobrove *et alii* (1974) produziram soro antitimo humano e com ele quantificaram os linfócitos timo derivados, do sangue periférico de pessoas portadoras de leucemia linfática. Na quantificação empregaram a imunofluorescência. Este mesmo tipo de soro foi produzido por Aiuti *et alii* (1974).

Steel, Evans & Smith (1974) quantificaram os linfócitos T e B do sangue periférico de pessoas normais e encontraram 62,0%, para os linfócitos do tipo T e 38,0%, para os linfócitos do tipo B.

Na literatura são encontradas relações existentes entre algumas entidades nosológicas e a variação numérica dos linfócitos. Na artrite reumatóide foi estudada por Williams Jr. *et alii* (1973), quando encontraram, através da imunofluorescência com soro antilinfócito T, 18,0% dos linfócitos da medula, 42,5% dos linfócitos do baço e 98,0% das células obtidas do ducto torácico. Na mesma doença Yu *et alii* (1974) encontraram um aumento dos

linfócitos do tipo T. Winchester *et alii* (1973) contaram os linfócitos do fluido da junta de portadores de artrite reumatóide e não encontraram diferenças estatisticamente significantes em relação a pessoas normais.

No lupus eritematoso sistêmico foi encontrado baixo percentual dos linfócitos do tipo T (Williams Jr. *et alii*, 1973). Na tireoidite de Hashimoto, Calder *et alii* (1976) não encontraram nenhuma alteração do número dos linfócitos porém UR-BANIAK, PENHALE & IRVINE (1973) encontraram um aumento do número dos linfócitos do tipo T, no entanto FARID *et alii* (1973) encontraram um aumento acentuado dos mesmos linfócitos nos pacientes de tireoidite que examinaram. O estudo da variação linfocitária na espondilite anquilosante foi realizado por FAN *et alii* (1977) onde o percentual linfocitário permaneceu dentro dos valores normais mas foi verificada uma queda dos linfócitos do tipo T. Aos mesmos resultados chegaram RACHID (1979). Na leucemia linfática crônica, Pampamichail *et alii* (1972) não encontraram variação dos linfócitos do tipo T. Aisenberg & Block (1972) encontraram em pacientes com a mesma doença uma diminuição dos linfócitos do tipo T. Em 1978, Ogawa, Ogoto & Naruto encontraram uma diminuição dos linfócitos em pacientes portadores de linfoma maligno, tratados química e radioterapeuticamente mas sem que o número dos linfócitos do tipo T variasse. Na doença de Hodgkin (Ramot *et alii*, 1973) foi encontrada uma queda dos linfócitos do tipo T, cujos resultados são devidos ao tratamento a que os pacientes foram submetidos.

Em relação à hanseníase os percentuais dos linfócitos do tipo T podem es-

tar modificados, como demonstraram DWYER, BULLOCK & FIELDS (1973), que encontraram uma queda daqueles linfócitos. Os mesmos resultados foram encontrados por GAJLPECZALSKA *et alii* (1973).

Em função das contravérsias encontradas na literatura nos propusemos também colaborar na determinação numérica dos linfócitos do tipo T em pacientes de hanseníase portadores da forma indeterminada e nas duas formas polares.

MATERIAL E MÉTODO

O material de estudos compreendeu o sangue de 413 hansenianos, sendo 232 portadores da forma virchowiana, 96 da forma tuberculóide e 85 da forma indeterminada. As idades dos pacientes, de ambos os sexos, variaram de 9 a 86 anos. O teste empregado foi o de rosetas.

Os sangues foram obtidos através da punção venosa dos pacientes, obtendo-se cerca de 10,0 ml de sangue, que juntados a uma solução estabilizadora de titriplex III (Garcia Lima & Mitscherlich, 1973) eram agitados e a seguir submetidos a choque hipotônico.

Os sangues após serem submetidos ao choque hipotônico, foram centrifugados e lavados os seus leucócitos por 3 vezes em solução fosfatada e tamponada, pH 7,4 (PBS). (BEHRENS & Esch, 1973; Weinhold, 1965 e Schmidt, 1970).

As hemácias foram obtidas de carneiros, desfibrinadas e conservadas a 4°C. Para uso foram lavadas em PBS e misturadas à hemolisina anticarneiro e a seguir misturadas ao complemento de camundongo (Huber *et alii*, 1971) e a seguir suspensas em PBS para conter 100.000 células por mm³.

Os parâmetros do teste de rosetas foram examinados ao que se refere ao tempo de incubação, influência da temperatura, influência das concentrações salinas das soluções empregadas no teste, o número de leucócitos por mm³ e o de hemácias por mm³.

Foram consideradas rosetas positivas as que se figuravam um leucócito com 4 ou mais hemácias aderidas à sua superfície. As rosetas negativas foram as representadas por linfócitos isolados.

O teste de rosetas para evidenciar os linfócitos do tipo T foi o descrito por Waller & MacLennan (1977).

RESULTADOS

No estabelecimento e avaliação dos parâmetros que influenciam a tipagem dos linfócitos T, considerou-se como definitivo que o tempo de incubação deverá ser de 90 minutos para a leitura final do teste. A temperatura ideal foi estabelecida em 37°C, em banho-maria. As concentrações salinas deveriam estar no padrão do PBS e da solução de cloreto de sódio a 0,85%. A concentração das hemácias foi de 100.000 células por mm³ e leucócitos 4.000 por mm³, estabelecendo a proporção de 1:25 (Leucócito-hemácia).

Foi também estabelecido o número das células mortas, apesar de que elas também podem formar rosetas positivas.

Na relação estudada entre os resultados apresentados pelos controles e de portadores da forma virchowiana não foram encontradas diferenças significantes, ao nível de 5,0%, mas houve diferenças significantes entre os controles e resultados apresentados pelos grupos de doentes portadores das formas tuberculóide e in-

determinada, ao mesmo nível de significância.

Relacionando os grupos de pacientes portadores da forma virchowiana, tuberculóide e indeterminada não apresentaram diferenças significantes entre os mesmos ao nível de 5,0%.

Os resultados também evidenciaram não haver qualquer relação com a idade, sexo e tempo de tratamento dos pacientes.

DISCUSSÃO

O teste de rosetas é de autoria de Huber *et alii* (1971) e de Jondal, Holm & Wigzell (1972) para determinar o número de linfócitos do tipo B e para se determinar a presença e número dos linfócitos do tipo T é de autoria de Waller & MacLennan (1979). Estes não formam rosetas em presença do acetato de etilenodiamino e também em solução tamponada de fosfato sem Ca⁺⁺ e sem Mg⁺⁺.

Na obtenção dos leucócitos optamos pela hemólise em vez da separação por uromiro – 380, ficoll ou por hypaque, por ser mais simples, mais rápido e mais barato.

Foi estabelecido como tempo de incubação de 90 minutos assim como foi a temperatura de 37°C, em banho-maria como fatores preponderantes na variação do teste com influências importantes nos resultados finais do trabalho. A solução escolhida para ser empregada no teste foi a PBS por nos dar condições de se obter um maior número de rosetas.

Quanto aos resultados encontrados com os dados a respeito dos linfócitos do tipo T, verificou-se não haver diferenças significantes ao nível de 5,0%, quando foram relacionados controles e portadores da forma virchowiana o que contraria re-

sultados de Dwyer, Bullock & Fields (1973) e os de Gajl – Peczalska *et alii* (1973). Estas diferenças possam estar acontecendo devido ao tratamento que nossos pacientes estão recebendo com intensidade e vigilância no Centro de Saúde de onde estão sediados.

Os resultados apresentaram ainda diferenças significantes a maior, ao nível de 5,0%, nas outras duas formas de hanseníase quando os seus resultados foram confrontados com os dos controles. O aumento dos linfócitos do tipo T, também sugere atividade proliferativa alimentada dos linfócitos do tipo T nas duas formas de hanseníase: tuberculóide e indeterminada.

Aconteceu que para os linfócitos do tipo T não houve diferenças significantes ao nível de 5,0%, quando foram relacionados os resultados apresentados pelas três formas estudadas da hanseníase.

Nossos resultados confirmam os de Nath, Curtis & Talwar (1974), quanto ao número de linfócitos do tipo T em pacientes portadores da forma virchowiana. Os autores não encontraram variações das formas polares quando relacionadas, portanto não se pode fazer inferência clínica através do número dos linfócitos T como concluíram também Kresler *et alii* (1973).

CONCLUSÕES

Os autores estudaram a aplicação do teste de rosetas na determinação do número dos linfócitos do tipo T, da corrente circulatória de portadores do Mal de Hansen, com vistas ao emprego no diagnóstico da hanseníase. Determinaram os parâmetros necessários à execução do teste. Examinaram o sangue de 125 pessoas tidas como sadias, tomadas como controle e examinaram concomitantemente o sangue de 413 outras pessoas portadoras

de hanseníase, nas formas: virchowiana, tuberculóide e indeterminada. Os resultados mostraram não haver diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de doentes portadores da forma virchowiana e controles mas encontraram diferenças estatisticamente significantes entre os resultados apresentados pelos controles e portadores das formas tuberculóide e indeterminada, aumentados nessas.

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 serviços datilográficos.

SUMMARY

Lymphocytes in hanseniasis:

II - Lymphocytes in the bloodstream of patients with Hansen's disease

The authors studied the application of the rosetts test for the determination of the number of T lymphocytes in the bloodstream of patients with Hansen's disease, as a tool to be employed in the diagnosis of hanseniasis. The parameters needed to carry out test were determined. Blood samples were taken and tested from 125 persons considered to be healthy and used as controls, and from 413 patients with the virchowian, tuberculoid and indeterminate form of hanseniasis. The results showed no statistically significant difference between the group of patients with the virchowian form of the disease and the controls, but patients with the tuberculoid and indeterminate form of the disease had significantly increased T lymphocyte numbers in relation to the controls.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 01 - AISENBERG, A.C. & BLOCK, K.J. - Immunoglobulins on the surface of neoplastic lymphocytes. *New Engl. J. Med.*, 287 (6): 272-276, 1972.
- 02 - AIUTI, F.; CEROTTINI, J.C.; COOMBS, R.B.A.; COOPER, M.; DICKLER, H.B.; FROELAND, S.S.; FUDENBERG, H.H.; GREAVES, M.F.; GREY, H.M.; RUNKEL, H.G.; NATIVIG, J.B.; PREUDHOMME, J.L.; RABELINO, E.; RITTS, R.E.; ROWE, D.S. SELIGMANN, M.; SIEGAL, F.P.; STJERNWAERD, J.; TERRY, W.D. & WYBRAN, J. - Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J. Immunol.*, 3: 521-532, 1974.
- 03 - BEHKENS, M. & ESCH, F. - Gewinnung von Leukozyten aus Rinderblut unter Verwendung von Wasser als Haemolyticum. *Experientia*, 18: 406-407, 1963.
- 04 - BOBROVE, A.M.; STROBER, S.; HERZENBERG, L.A. & De PAMPHILIS, J.D. - Identification and quantification of thymus-derived lymphocytes in human peripheral blood. *J. Immunol.*, 112 (2): 520-527, 1974.
- 05 - BOYUM, A. - Isolation of mononuclear cell and granulocytes from human blood. *J. Clin. Lab. Invest.*, 21 (Suppl. 97, 77, 1968).
- 06 - BRAIN, P.; GORDON, J. & WILLETTS, W.A. - Rosette formation by peripheral lymphocytes. *Clin. Exp. Immunol.*, 6: 681-688, 1970.
- 07 - 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.
- 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 - DeGAST, G.C. & PLATTS-MILLS, T.A.E. - Functional studies on T cells in adults human bone marrow. *Clin. Exp. Immunol.*; 38 (1): 99-105, 1979.
- 11 - DICKLER, H.B.; ADKINSON Jr. N.F. & Terry, W.D. - Evidence for individual human peripheral blood lymphocytes bearing both B and T cell markers. *Nature*, 247 (5438): 213-215, 1974.
- 12 - DWYER, J.M.; BULLOCK, W.E. & FIELDS, J.P. - Disturbance of the blood T.B lymphocytes ratio in lepromatous leprosy. *New Engl. J. Med.*, 288 (20): 1036-1039, 1973.
- 13 - FAN, P.T.; CLEMENTS, P.J.; YU, D.T.Y.; OPELZ, G. & BLUESTONE, R. - Lymphocyte abnormalities in ankylosing spondylitis. *Annals of the Rheumatic Disease*, 36: 471-473, 1977.
- 14 - 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.
- 15 - FAUCI, A.S. - Mechanisms of corticosteroid action of lymphocyte subpopulation. I. Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunology*, 28 (4): 669- 680, 1975.
- 16 - FAUCI, A.S. & DALE, D.C. - The effect of "in vivo" hydrocortisone on subpopulations of human lymphocytes. *J. Clin. Invest.*, 53: 240-246, 1974.
- 17 - GAJL - PECZALSKA, K.J.; PARK, B.H.; BIGGAR, W.D. & GOOD, R. A. - B and T lymphocytes in primary immunodeficiency disease in man. *J. Clin. Invest.*, 52: 919-928, 1973.
- 18 - GARCIA LIMA, E. & MITSCHERLICH, E. - Untersuchungen ueber die Zahl der B - und - T Lymphozyten in stroemenden blut von gesunden, leukoverdaechtigen und leukosekranken Rindern der Deutschen Schwarzbunten. *Zbl. Vet. Med.*; B, 20: 665-684, 1973.
- 19 - HUBER, H.; MICHELMAYER, G.; HUBER, C.; ASAMER, H. & DOUGLAS, S.D. - Inhomogeneity of peripheral lymphocytes - complement receptor sites on 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.
- 20 - JONDAL, M.; HOLM, G. & WIGZELL, H. - Surface markers on human T and B lymphocytes. I. A large population of lymphocytes forming non-immune rosettes with sheep red blood cells. *J. Exp. Med.* 136 (2): 207-215, 1972.
- 21 - KREISLER, M.; ARNAIZ, A.; CRUZ, E.F.; OOTELLO, A. & PEREZ, B. - B cells in leprosy *Lancet*, 1 (7801): 495-496, 1973.
- 22 - KRUSIUS, T.; FINNE, J.; ANDERSSON, L.C. & GAHMBERG, C.G. - Differences between the carbohydrate units of cell surface glycoprotein of mouse B and T lymphocytes. *Biochem. J.*, 181 (2): 451-456, 1979.
- 23 - MADSEN, M. & JOHNSON, H. E. - A metodological study of E rosette formation using AET - treated sheep red blood cells. *J. Immunol. Met.* 27 (1): 61-74, 1979.
- 24 - NATH, I.; CURTIS, J.; BHUTANI, L.K. & TALWAR, G.P. - Reduction of subpopulation of T lymphocytes in lepromatous leprosy. *Clin. Exp. Immunol.*, 18: 81-87, 1974.
- 25 - OBBARIUS, J. - T and B lymphocyte levels in the spleen and lymphnodes of guinea pigs after intramuscular of oxytetracycline. *Zh. Mikrobiol. Epidemiol. Immunobiol.*, 56 (6): 46-48, 1979.

- 26 - OGAWA, M.; OGOTO, T. & NARUTO, M. - T and B cell subpopulation in patients with malignant disease. *Jap. J. Cancer clin.*, 24 (9): 931-934, 1978.
- 27 - PAPAMICHAIL, M.; HOLBOROW, E. J.; KEITH, H.I. & CURREY, H. L. F. - Subpopulations of human peripheral blood lymphocytes distinguished by combined rosette formation and membrane immunofluorescence. *Lancet*, 2: 64-66, 1972.
- 28 - RACHID, A. - Espondilitis anguilosantes B 27 positivas e B 27 negativas. *Rev. Bras. Reumatol.*, XIX (5): 107-132, 1979.
- 29 - RAMOT, B.; MANY, A.; BINIAMINOV, M. & AGHAI, E. - Thymus - derived lymphocyte (T-cell) depletion in HODGKIN'S disease. *Israel J. Med. Sci.*; 9 (5): 657-659, 1973.
- 30 - SAMARUT, C. & REVILLARD, J.P. - Human T lymphocyte receptors for IgM: control by IgG binding lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, 9 (5): 415-420, 1979.
- 31 - SCHMIDT, F.W. - Untersuchungen ueber die Epidemiologie und Aetiologie der enzootischen Rinderleukose, *Habil. Schrift. Goettingen*, 1970.
- 32 - STELL, C.M.; EVANS, J. & SMITH, M.A. - Physiological variation in circulating B cell: T cell ratio in man. *Nature*, 247 (5440): 387-388, 1974.
- 33 - TRAUBERT, R.V. & MUELLER, W. - The effect of levamisole on peripheral blood lymphocytes subpopulations in patients with rheumatoid arthritis and ankylosing spondylitis. *Clin. Exp. Immunol.*, 25: 493-496, 1976.
- 34 - URBANIAK, S.J.; PENHALE, W.J. & IRVINE, W.J. - T lymphocytes in Hashimoto's thyroiditis. *Lancet*, 2: 452-453, 1973.
- 35 - WALLER, C.A. & MACLENNAN, I.C.M. - Analyses of lymphocytes in blood and tissues.; *Techniques in clinical immunology*. R.A. THOMPSON. Blackwell Scientific Publications, 1979.
- 36 - WEINHCLD, E. - Gewinnung Weisser Blut Koerpchen des Rinder, fuer die Zellkultur. Berlin, Muenchen, Tieraerliches Wschr., 78: 224-227, 1965.
- 37 - 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 connetive tissue diseases. *J. Clin. Invest.*, 52: 283-295, 1973.
- 38 - 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.
- 39 - WINKELSTEIN, A. - Effect of immunosuppressive drugs on T and B lymphocytes in guinea pigs. *Blood*, 50 (1): 81-91, 1977.
- 40 - WYBRAN, J.; CARR, M.C. & FUDENBERG, H.H. - The human rosette - forming cell as a marker of a population of thymus derived cell. - *J. Clin. Invest.*, 51: 2537-2543, 1972.
- 41 - YU, D.T. Y. & CLEMENTS, P.J. - Human Lymphocytes subpopulations effects of epinephrine. *Clin. Exp. Immunol.*, 25: 472-479, 1976.
- 42 - YU, D.T.Y.; CLEMENTS, P.J.; PETER, J. B.; LEVEY, J.; PAULUS, H.E. & BARNETT, E.V. - Lymphocyte characterization on rheumatic patients and the effect a azathioprine therapie. *Arthritis and Rheumatism*, 17 (1): 37-45, 1974.
- 43 - 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.