

**PORCENTAJE Y CIFRA ABSOLUTA
DE LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFÉRICA
POR EL MÉTODO DE ROSETAS E:
ESTUDIO DE CUARENTA ADULTOS SANOS**

Silvia Quesada, Margarita Ramírez* y Bruno Lomonte**

Key Word Index: T Lymphocytes, E-rosette assay

Resumen

Se realizó la determinación del porcentaje y cifra absoluta de linfocitos T en sangre periférica a un grupo de 40 adultos sanos costarricenses, seleccionados de un grupo inicial de 58 voluntarios. Se utilizó un método de formación de rosetas E. Los valores obtenidos fueron (promedio \pm 1 desviación estándar): $49 \pm 11\%$ células E⁺ y 1.521 ± 647 células E⁺/mm³. Al comparar estos valores con algunos otros descritos en la literatura se observa que, en general, las cifras relativas obtenidas son más bajas, mientras que las absolutas son muy similares.

Se incluye una breve revisión teórica sobre diversos aspectos básicos y clínicos relacionados con la determinación de linfocitos T, mediante la formación de rosetas E. [Rev. Cost. Cienc. Méd.1985; 6(2): 7—16].

Introducción

Al inicio de la década de 1970, investigadores de varios laboratorios informaron sobre el hallazgo de una fracción de los linfocitos sanguíneos humanos que poseía la propiedad de unirse a eritrocitos de carnero, formando agregados en forma espontánea que se denominaron rosetas (8, 24). Posteriormente se determinó que dicha fracción corresponde exclusivamente a los linfocitos T (20). Desde entonces, el método de formación de rosetas entre linfocitos T humanos y eritrocitos de carnero (rosetas E) ha sido un procedimiento ampliamente difundido en inmunología clínica, y se ha utilizado principalmente para dos propósitos: la cuantificación de los linfocitos T en diversos tipos de muestras, y el aislamiento de dichas células a partir de mezclas de linfocitos (21).

Numerosos autores han estudiado el fenómeno de unión no inmune que se da para la formación de estas rosetas y los factores que lo afectan. Desde las primeras descripciones, ya se menciona que la viabilidad del linfocito es indispensable para que ocurra la unión (8, 20). Lay *et al.* (24) determinaron que la temperatura afecta el fenómeno y que la máxima formación de rosetas se logra mediante una breve incubación de eritrocitos y linfocitos a 37°C o a temperatura ambiente, seguida de un período adicional a baja temperatura (4°C). Además encontraron que el tiempo de incubación también es importante, ya que el número de rosetas aumenta hasta los 60 minutos, punto en el cual se alcanza un máximo estable. El pH óptimo de reacción va de 7,0 a 8,0. La unión entre las células es sumamente frágil, puesto que agitaciones leves pueden disgregarlas (20). Una serie de sustancias pueden disminuir la formación de rosetas, tales como el EDTA, inhibidores metabólicos y niveles altos de AMP cíclico (21) mientras que otras incrementan la interacción, por ejemplo la timosina, el factor de transferencia (21), el dextrán (10), el tratamiento previo de los eritrocitos con neuraminidasa (12, 44, 17) o con 2-aminoetilisotiocianato (AET) (21). La presencia de una concentración alta de proteínas en el medio, tal como suero fetal bovino inactivado por calor, estabiliza las rosetas (21).

* Instituto Clodomiro Picado, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica, Costa Rica.

El receptor para eritrocitos de carnero en la membrana del linfocito T es de naturaleza glicoproteica, y es destruido por la acción de algunas enzimas, como la tripsina y la fosfolipasa A (12). Actualmente, la tecnología de hidridomas ha contribuido a dilucidar las propiedades de este receptor, al permitir la producción de varios anticuerpos monoclonales que lo reconocen e inhiben su funcionalidad: anti T-11 (41), anti-Leu-5 (19), y el anticuerpo 9.6 (22). Todos estos anticuerpos monoclonales reconocen una proteína de membrana de aproximadamente 50.000 daltons, de una cadena peptídica, expresada en la totalidad de linfocitos T humanos, e inhiben la formación de rosetas E.

Por otro lado, la estructura eritrocitaria reconocida no ha sido caracterizada. Altas concentraciones de tripsina la destruyen, y los fragmentos de membranas lisadas conservan la capacidad de bloquear o inhibir competitivamente la formación de rosetas; sin embargo al desintegrar aún más los fragmentos, esta propiedad se pierde (21).

Se ha estudiado la expresión fenotípica del receptor para E, durante el desarrollo ontogénico del sistema inmune fetal humano y también durante la diferenciación de los linfocitos T en sus diversos compartimentos. El timo es infiltrado por linfocitos alrededor de la octava semana de gestación, casi concomitantemente a la aparición de dichas células en la circulación sanguínea fetal (38). Desde la decimoprimer semana de gestación se ha demostrado que más del 95 por ciento de los linfocitos tímicos expresan el receptor para E, es decir, son E⁺ (1). Por otro lado, a nivel de diferenciación intratímica se encuentra que dicha estructura se expresa tanto en linfocitos de la corteza (más inmaduros) como en las formas intermedias y en los linfocitos medulares, manteniéndose su expresión en todos los linfocitos T circulantes sanguíneos (40).

En recién nacidos el porcentaje de células E⁺ es menor que en adultos; sin embargo la cifra absoluta de linfocitos T es significativamente mayor, debido a que el número absoluto de linfocitos totales también se encuentra muy aumentado, respecto a los niveles de adultos (15). El porcentaje de células E⁺ aumenta gradualmente en la niñez y alcanza el nivel de adultos a los 7 años aproximadamente, mientras que el número absoluto declina y se nivela también hacia los 7 años de edad (15).

La determinación de los números absolutos y relativos de linfocitos T y B sanguíneos es de ayuda en el diagnóstico de una amplia variedad de trastornos del sistema inmune, los cuales se pueden clasificar en los siguientes grupos:

- a) Inmunodeficiencias: Tal vez la aplicación clínica más importante de la cuantificación de poblaciones T y B, es el estudio del paciente con sospechas de deficiencia del sistema inmune. La evaluación de las poblaciones linfocíticas contribuye (junto con las pruebas que evalúan funciones y respuestas) a precisar la naturaleza del defecto y por ende, a predecir las complicaciones más probables que enfrentará el paciente. Además, dichas evaluaciones, en conjunto, formarán la base para intentar corregir o compensar la deficiencia (46). Foucar y Goeken (16) han descrito las alteraciones que ocurren en algunas enfermedades por inmunodeficiencia primaria, con respecto a las poblaciones linfocíticas sanguíneas.
- b) Enfermedades linfoproliferativas: En general, puede decirse que la clasificación de las diversas enfermedades linfoproliferativas humanas con base en su origen T, B u otros ("Null"), está tomando una gran importancia, ya que día a día se está acumulando evidencia que sugiere que la evolución, el pronóstico y las implicaciones terapéuticas muestran diferencias.

Por ejemplo, en las leucemias linfocíticas agudas (LLA) se ha observado que el pronóstico tiende a variar según el tipo de célula involucrada en la transformación: la LLA no-B, no-T (aproximadamente 80% de los casos) posee buen pronóstico, la

LLA-T (10-15%) es de sobre pronóstico, y la LLA-B (1-2%) es la de peor pronóstico (13). Por otro lado, está documentado que la leucemia linfocítica crónica (LLC) producida por linfocitos T (menos del 5%) tiene un comportamiento mucho más agresivo que la producida por linfocitos B (más del 90%) (5). En cuanto a linfomas no-Hodgkin, se ha encontrado que los producidos por linfocitos B tienen mejor pronóstico que las de origen T y los producidos por linfocitos "Null". Este último tipo es el de peor pronóstico (5). Bloomfield *et al.*, (6) consideran que una clasificación histoinmunológica de los linfomas provee más información diagnóstica que la obtenida únicamente por histomorfología.

c) Enfermedades autoinmunes: En esta área de los trastornos inmunológicos, la enumeración de poblaciones linfocíticas se realiza principalmente con fines de investigación, ya que a pesar de que se han descrito alteraciones cuantitativas, los resultados son muy variables y aparentemente no muestran patrones muy definidos. Por ejemplo, se ha descrito que en pacientes con sarcoidosis, las cifras de linfocitos T están reducidas, y se normalizan con frecuencia después de tratamiento (5). Sin embargo, en un informe elaborado por un grupo de especialistas en Inmunología, de la Organización Mundial de la Salud y de la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología, se señala que, hasta la fecha, no se ha comprobado que la enumeración de linfocitos T y B tenga valor clínico en casos de enfermedades autoinmunes, restringiéndose su utilidad fundamentalmente para propósitos de investigación (30). El mismo informe hace énfasis en la importancia esencial que tiene la enumeración de células T y B en la evaluación y vigilancia de inmunodeficiencias primarias, y su utilidad para la clasificación de trastornos linfoproliferativos (30).

d) Transplante y Cáncer: La determinación de poblaciones linfocíticas en pacientes organotransplantados puede ser de mucho beneficio para predecir una crisis de rechazo (11, 14). También puede ser utilizada para evaluar el estado inmune de pacientes con cáncer, sometidos a fuertes tratamientos inmunosupresivos, tales como quimioterapia e irradiación (5).

Existen varias alternativas metodológicas para la determinación de linfocitos T, entre ellas, la formación de rosetas E, la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos contra marcadores exclusivos de esta población, ya sea policlonales o monoclonales (series Leu y OKT), y -recientemente- una forma novedosa que se basa en la formación de rosetas específicas para células T, con la cepa de *Escherichia coli* ATCC 11303 (9,31). Tanto la formación de rosetas E como la inmunofluorescencia indirecta con anticuerpos monoclonales anti-T, son recomendados por la OMS como método para la rutina clínica (30). Sin embargo, debido a su simplicidad, bajo costo de reactivos y de equipo, creemos que el método de rosetas E se impone como el óptimo para las condiciones prevalecientes en nuestro país.

Para realizar estudios de investigación clínica, así como para efectuar análisis de rutina en pacientes con enfermedades como las mencionadas anteriormente, es necesario estandarizar un método de rosetas E y tratar de establecer un ámbito de referencia que nos permita comparar e interpretar los resultados obtenidos en una forma objetiva. Este ámbito debe ser establecido en cada laboratorio y no simplemente ser adoptado a partir de literatura foránea (38). El objetivo del presente trabajo fue establecer dichos valores con base en una muestra de la población adulta costarricense, bajo nuestras condiciones metodológicas definidas.

Materiales y Métodos

Donadores

Se estudió un grupo de 40 voluntarios adultos (13 mujeres y 27 hombres), en aparente buen estado de salud, a quienes se les realizó algunos exámenes hematológicos de tamizaje. Estos incluían velocidad de eritrosedimentación, recuento de leucocitos, fórmula diferencial y hematocrito. Como valores normales para estos parámetros se utilizaron los descritos por Sáenz *et al.* (34, 35). Sus edades estaban comprendidas entre los 17 y los 46 años, con un promedio de 26 años. La ocupación de los individuos fue heterogénea, incluyéndose estudiantes, misceláneos, personal de laboratorio, secretarias, dibujantes y profesionales diversos. De los 40 donadores, 33 eran habitantes de la provincia de San José, tres de Alajuela, dos de Cartago y uno de Heredia y Guanacaste respectivamente.

Preparación de los linfocitos

Se tomó muestras de sangre venosa con 50-100 U/ml de heparina (Heparin Leo, Dinamarca) y se diluyó 1:2 con solución salina amortiguada con fosfatos (SSF) pH 7,2. Los mononucleares se separaron por el método de Bøyum (7) utilizando Ficoll-Paque (Pharmacia Fine Chemicals, Suecia) y siguiendo las instrucciones del fabricante (32). Después de 20 minutos de centrifugación a 400 g y temperatura ambiente, se recogió el anillo de mononucleares (>90% linfocitos) y se lavó 2 veces con 6 ml de solución salina balanceada de Hanks (SSBH) pH 7,2. La suspensión celular se ajustó a 5×10^6 células/ml luego de hacer un recuento en cámara de Neubauer, en presencia de azul tripán al 0,2 por ciento en SSBH.

Preparación de los eritrocitos

Se obtuvo sangre de carnero y se anticoaguló con un volumen igual de solución de Alsever estéril. Esta mezcla se conservó a 4°C hasta 5 semanas como máximo. Se lavó los eritrocitos (E) 4 veces con SSF y se preparó una suspensión al 0,1 por ciento en SSBH para cada día de trabajo.

Formación de rosetas E

La mezcla de incubación consistió en 0,1 ml de la suspensión de mononucleares, 0,1 ml de E al 0,1 por ciento y 20 μ l de suero fetal bovino inactivado por el calor. Dicha mezcla se centrifugó a 50 g durante 5 minutos y luego se incubó a 4°C durante 90 minutos. Al momento de realizar la lectura se adicionó 20 μ l de azul tripán al 0,2 por ciento en SSBH, se resuspendió muy suavemente el botón de células por rotación horizontal del tubo y se transfirió por capilaridad a una cámara de recuento, utilizando una pipeta Pasteur sin bulbo. Después de 3 minutos de sedimentación, se efectuó la lectura microscópica del porcentaje de células E⁺ bajo un aumento de 400 X, considerando positivas aquellas células con 3 ó más eritrocitos, en un total de 100 células. Todas las muestras fueron leídas simultáneamente por dos de los autores (S.Q. y M.R.) a modo de control ciego, no debiendo variar la lectura en más del 5 por ciento.

El cálculo de la cifra absoluta de linfocitos T/mm³ se realizó con base en los datos del hemograma (leucocitos/mm³ y fórmula diferencial) y el porcentaje de rosetas obtenido, según Holm *et al.* (18).

Otras determinaciones

La velocidad de eritrosedimentación (VES) se determinó en tubos de Wintrobe (34). El hematocrito se determinó en capilares; el recuento de leucocitos y la fórmula dife-

rencial se realizaron por los métodos convencionales (34). Todos los análisis se iniciaron inmediatamente después de la obtención de la muestra y se completaron el mismo día.

Resultados

Los valores obtenidos (cifras relativa y absoluta) de células E⁺ en los 40 adultos sanos se muestran en la Figura 1. Con base en dichos valores se calculó el promedio y la desviación estándar para el porcentaje y el número absoluto de linfocitos T en sangre periférica (Cuadro 1).

CUADRO 1
VALOR PROMEDIO Y DESVIACION ESTANDAR
PARA EL PORCENTAJE Y CIFRA ABSOLUTA DE
LINFOCITOS T EN SANGRE PERIFERICA DE
CUARENTA ADULTOS SANOS

	% células E ⁺	Células E ⁺ /mm ³
$\bar{X} \pm 1$ D.E.	49 ± 11	1.521 ± 647
Intervalo	38 – 60	874 – 2168

Discusión

El Cuadro 2 muestra una serie de valores relativos y absolutos de linfocitos T, descritos en la literatura por diversos investigadores, utilizando la técnica de rosetas E. En él se observa considerable heterogeneidad en los resultados. Esto sugiere que ligeras modificaciones técnicas entre los diversos laboratorios pueden conducir a resultados no necesariamente idénticos. Al comparar los valores obtenidos en el presente estudio con los resumidos en el cuadro 2, puede decirse que, en general, nuestros valores relativos (porcentaje) son más bajos que la mayoría de los descritos. Por otro lado, las cifras absolutas concuerdan con la mayoría de las referencias investigadas (Cuadro 2).

Nuestros resultados demuestran la importancia de establecer valores de referencia propios, para evitar errores de interpretación causados por la aceptación indiscriminada de valores descritos en la literatura, como lo ha señalado Stites (38). Además, debe considerarse que la gran mayoría de valores de referencia para esta clase de parámetros inmunológicos se ha establecido con base en poblaciones de países desarrollados, sujetas a factores ambientales y genéticos diferentes a los que prevalecen en países como el nuestro. Al respecto, se ha demostrado claramente que los valores de inmunoglobulinas séricas en países subdesarrollados son significativamente mayores que las de países industrializados de alto nivel socio-económico (26). Dichas diferencias pueden deberse no sólo a factores genéticos sino también ambientales, es decir, una mayor estimulación antigénica (26).

CUADRO 2
RECOPIACION DE ALGUNOS VALORES RELATIVOS Y ABSOLUTOS DE
LINFOCITOS T DETERMINADOS MEDIANTE ROSETAS E

Referencia	n	% E ⁺	E ⁺ /mm ³
Jondal <i>et al.</i> (20)	11	52 – 81*	---
Bentwich <i>et al.</i> (2)	---	61 – 84	---
Mendes <i>et al.</i> (27)	---	55,4 ± 9,4**	---
Holm <i>et al.</i> (18)	28	73,2 ± 5,1	850 – 3.040
Berger <i>et al.</i> (3)	---	55 – 82	---
Winchester y Ross (46)	---	75 – 85	---
Waller y Mac Lennan (43)	---	70***	1.400
Bernego <i>et al.</i> (4)	24	64,7 ± 7,6	1.543 ± 519
Kateley <i>et al.</i> (23)	26	69,4 ± 2,9	---
Merker <i>et al.</i> (28)	49	62,0 ± 7,7	---
Scadding <i>et al.</i> (36)	14	76,6 ± 9,0	1.861 ± 758
Wells <i>et al.</i> (45)	21	54	---
Falcao (15)	51	67,3 ± 5,5	1.320 ± 460
Nagarkatti <i>et al.</i> (29)	20	20 – 65	886 ± 239
Stites (38)	---	65 – 75	---
Victorino <i>et al.</i> (42)	25	71,5	2.030
Detrick-Hooks y Bernard (13)	---	60 – 80	---
Luciani <i>et al.</i> (25)	21	72 ± 10	2.084 ± 714
Sharpin <i>et al.</i> (37)	25	56 ± 12	1.740 ± 450
Raeman <i>et al.</i> (33)	21	61,2 – 77,5	1.100 – 2.100
Ten Berge <i>et al.</i> (39)	8	---	1.460 ± 440
Presente estudio	40	49 ± 11	1.521 ± 647

* Valores mínimo y máximo (ámbito).

** Promedio ± 1 desviación estándar.

*** Promedio.

--- No descrito.

Es importante comentar que la determinación de células E⁺ se ve afectada por una serie de factores de variación intrínsecos a la técnica que se suman a la variación biológica normal. En un cuidadoso análisis de los factores técnicos que afectan esta determinación, Merker *et al.* (28) concluyeron que las dos principales fuentes de variación son la resuspensión de las rosetas y su lectura en el hemocitómetro. Debido a su fragilidad, las rosetas pueden disgregarse al momento de la resuspensión, proceso que no puede ser bien estandarizado y cuya eficiencia varía de persona a persona (28). Por otro lado, la distribución de las células en el hemocitómetro no ocurre siempre al azar, y a menudo se forman grumos o agregados, que son otra fuente importante de error (28).

Todo lo anterior debe tomarse en cuenta al momento de interpretar resultados, y asimismo debe tenerse presente que esta determinación establece cuantitativamente la presencia de células E⁺ (linfocitos T) pero no evalúa su funcionalidad. No obstante, esta prueba sigue teniendo utilidad clínica en las situaciones discutidas anteriormente, especialmente como prueba inicial en la clasificación de inmunodeficiencias y de trastornos linfoproliferativos (30).

Por último, debe enfatizarse la importancia de expresar los resultados de esta determinación en términos absolutos (células/mm³), ya que la expresión en porcentaje no indica si los niveles de un tipo celular son adecuados, sólo expresa una proporción relativa y puede prestarse a errores de interpretación (38). Se ha demostrado que durante el aislamiento de linfocitos mediante gradientes de ficoll-diatrizoato, no se selecciona ninguna subpoblación en particular (18), lo que permite convertir los porcentajes en cifras absolutas, con base en el recuento total de leucocitos y su distribución diferencial.

Agradecimientos

Agradecemos a todas las personas que nos donaron muestras para la realización de este trabajo, en especial al personal de la empresa Productos de Concreto S.A. Al director del Instituto Clodomiro Picado, Dr. Luis Cerdas y a todo el personal por su amplia colaboración. A los colegas Dr. Eduardo Brilla y Dra. Elizabeth Castro de Cerdas por habernos facilitado material indispensable para este estudio. Finalmente a la señora Hilda Herrera por el trabajo mecanográfico.

ABSTRACT

Absolute and relative numbers of T lymphocytes in peripheral blood of 40 healthy adults were determined by an E-rosette assay. The obtained values were (mean \pm 1 standard deviation): $49 \pm 11\%$ E+ cells and $1,521 \pm 647$ E+ cell/mm³. While absolute numbers were very similar to other described values, relative numbers were lower.

Basic and clinical aspects related to the E-rosette technique are reviewed.

Bibliografía

1. Asma G. E. M., Van Der Bergh R., Vossen J. M. Use of monoclonal antibodies in a study of the development of T lymphocytes in the human Fetus. *Clin. exp. Immunol.* 1983; 53:429-436.
2. Bentwich Z., Douglas S. D., Skutelsky E., Kunker H. G. Sheep red cell binding to human lymphocytes treated with neuraminidase: enhancement of T cell binding and identification of a subpopulation of B cells. *J. Exp. Med.* 1973; 137:1532-1537.
3. Berger B. M., Schuman R. M., Daniele R. P., Nowell P. C. E rosette Formation at 37°C: a property of mitogen stimulated human peripheral blood lymphocytes. *Cellular Immunology* 1976; 26:105-113.
4. Bernego M., Capella G., De Matteis A., Tovo P., Zina G. The *in vitro* effect of a calf thymus extract on the peripheral blood lymphocytes of sixty-six melanoma patients. *Clin. exp. Immunol.* 1979; 36:279-284.

5. Bio-Rad. Instruction manual: Quantigen T and B cell assay. Boletín Técnico No.4238; 1983.
6. Bloomfield C. D., Gajl-Peczalska K., Frizzera G., Kersey J. Goldman A. Clinical utility of lymphocyte surface markers combined with the Luckes-Collins histologic classification in adult lymphoma. *N. Engl. J. Med.* 1979; 301:512-518.
7. Bøyum A. Isolation of lymphocytes, granulocytes and macrophages. *Scand. J. Immunol.* 1976; 5:9-15.
8. Brain P., Gordon J., Willetts W. A. Rosette Formation by peripheral lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* 1970; 6:681- 688.
9. Bratescu A., Mayer E., Teodorescu M. The use of mutants of *Escherichia coli* for the identification of human lymphocyte subpopulations in blood smears. *J. Immunol.* 1983; 131: 1189-1194.
10. Brown C. S., Halpern H. y Wortis H. H. Enhanced rosetting of sheep erythrocytes by human peripheral blood T-cells in the presence of dextran. *Clin. exp. Immunol.* 1975; 20:505-512.
11. Cosimi A. B., Calvin R. B., Burton R. C., Rubin R. H., Goldstein G., Kung P. C., Hansen W. P., Delmonico F. L., Russel P. S. Use of monoclonal antibodies to T-Cell subsets for immunologic monitoring and treatment in recipients of renal allografts. *N. Engl. J. Med.* 1981; 305:308-314.
12. Chapel H. M. The effects of papain, tripsin and phospholipase A on the rosette formation. *Transplantation* 1973; 15:320-325.
13. Detrick-Hooks B., Bernard A. T and B lymphocytes: assays in malignant and nonmalignant disease. *Laboratory Management* 1981; (Mayo) ;41-52.
14. Ellis T. M., Berry C., Méndez G., Goldman M., Lower R., Lee H., Mohanakumar A. Immunological monitoring of renal allograft recipients using monoclonal antibodies to human T lymphocyte subpopulations *Transplantation* 1982; 33:317-319.
15. Falcao R. P. Human blood lymphocyte subpopulations from birth to eight years *Clin. exp. Immunol.* 1980; 39:203-207.
16. Foucar K. Goeken J. Clinical application of immunologic techniques to the diagnosis of lymphoproliferative and immunodeficiency disorders. *Laboratory Medicine* 1982; 13:403-413.
17. Galili V., Schlesinger M. The formation of stable E. rosettes after neuraminidase treatment of either human peripheral blood lymphocytes or of sheep red blood cells. *J. Immunol.* 1974; 112:1628-1634.
18. Holm G., Pettersson D., Mellstedt H., Hedfors E., Bolth B. Lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy persons. Characterization by surface makers and lack of selection during purification. *Clin. exp. Immunol.* 1975; 20:443-457.
19. Howard F. D., Ledbetter J. A., Wong, Bieber C. P. Stitson E. B., Hertzemberg L. A. A human T lymphocyte differentiation marker defined by monoclonal antibodies that block rosette formation. *J. Immunol.* 1981; 126:2117-2122.
20. Jondal M., Holm G., Wigzell H. Surface markers on human T and B lymphocytes. *J. Exp. Med.* 1972; 136:207-215.
21. Jondal M. SRBC rosette formation as human T lymphocyte marker. *Scand. J. Immunol.* 1976; 5:69-76.
22. Kamoun M., Martin P. J., Hanson J. A., Brown M. A., Siadak A.N., Nowinski R. C. Identification of a human T lymphocyte surface protein associated with E rosette receptor. *J. Exp. med.* 1981;153 :207-212.
23. Kateley J., Bazzell S. Immunological dysfunctions in multiple sclerosis. Diminution of "active" thymus derived lymphocytes and presence of immunodulating serum factors. *Clin. exp. Immunol.* 1979; 35:218-226.
24. Lay W. H., Mendes N. F., Bianco C., Nussenzweig V. Binding of sheep red blood cells to a large population of human lymphocytes. *Nature* 1971; 230:531-532.

25. Luciani G., Maggiano N., Citterio F., Lauriola L., Pozzetto U., Piantelli M., Musiani P. Imbalances in peripheral blood T-cell subpopulations in renal transplant patients. *Clin. exp. Immunol.* 1981; 46:615-620.
26. Maddison S. E., Reimer C. B. Normative values of serum immunoglobulins by single radial immunodiffusion: a review. *Clin. Chem.* 1976; 22:594-601.
27. Mendes N. F., Tolani M. E. A., Silveira N. P. A., Gilbertsen R. B., Metzgar R. S. Technical aspects of the rosette test used to detect human complement receptor (B) and sheep-erythrocyte-binding (T) lymphocytes. *J. Immunol.* 1973; 111:860-867.
28. Merker R., Check I., Hunter R. L. Use of cryopreserved cells in quality control of human lymphocyte assays: analysis of variation and limits of reproducibility in long-term replicate studies. *Clin. exp. Immunol.* 1979; 38:116-126.
29. Nagarkatti P., Nagarkatti M., Jain V. *In vivo* and *in vitro* action of chloroquine on surface markers of human peripheral lymphocytes. *Clin. exp. Immunol.* 1980; 41:166-172.
30. Organización Mundial de la Salud. Uso y abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1983; 94:83-102.
31. Orye E., Benoit Y., Roesbeke M., Van Yper, De Wilde M. A new, simple and rapid method for enumerating human T lymphocytes in full blood: the *E. coli* (ATCC 11303) rosette test *J. Immunol. Methods* 1983; 60:369-377.
32. Pharmacia Fine Chemicals Co. Ficoll-Paque for *in vitro* isolation of lymphocytes, Folleto comercial de Pharmacia Fine Chemicals Co. Uppsala, Suecia; 1975.
33. Raeman F., Decock W., De Beukelaar T., Decree J., Verhaegen H. Enumeration of Tlymphocyte subsets in autoimmune disease using monoclonal antibodies. *Clin. exp. Immunol.* 1981; 43:475-479.
34. Sáenz G. F., Alvarado M, Atmetlla F., Jiménez R., Arroyo G., Valenciano E., Schosinsky K. Hematología Teórico-práctica, Editorial Universidad de Costa Rica. 1980; 55.
35. Sáenz G. F., Arroyo G., Valenciano E. Valores normales de hemoglobina y hematocrito en adultos. *Rev. Méd. Hosp. Nac. Niños*, 1971; 6:53-70.
36. Scadding G., Thomas H., Harvard W. The immunological effects of thymectomy in myasthenia gravis. *Clin. exp. Immunol.* 1979; 36:205-213.
37. Sharpin R., Simmons M., Wilson J. TG Cells in peripheral blood lymphocytes from patients with rheumatoid arthritis. *Clin. exp. Immunol.* 1981; 45:538-543.
38. Stites D. P. Clinical laboratory methods of detecting cellular immune function. *Basic and Clinical Immunology*, Fudenberg H. H., Stites D. P., Caldwell J. L., Wells J. V., Eds. Lange Medical Publications, Los Altos. 1980; 382.
39. ten Berge R., van Walbeek H , Schellekens P. Evaluation of the immunosuppressive effects of cyclophosphamide in patients with multiple sclerosis. *Clin. exp. Immunol.* 1982. 50:495-502.
40. Tidman N., Janossy G., Bodger M., Granger S., Kung P., Goldstein G. Delineation of human thymocyte differentiation pathways utilizing double-staining techniques with monoclonal antibodies. *Clin. exp. Immunol.* 1981; 45:457-467.
41. Verbi W., Greaves M., Scheneider C., Koubel K., Janossy G., Stein H., Kung P., Goldstein G. Monoclonal antibodies OKT 11 and OKT 11A have pan -T reactivity and block sheep erythrocyte "receptors". *Eur. J. Immunol.* 1982; 12:81-86.
42. Victorino R., Hodgson H. Alteration in T lymphocyte subpopulations in inflammatory bowel disease. *Clin. exp. Immunol.* 1980; 41:156-165.
43. Waller C. A., Mac Lennan I. C. M . Analysis of lymphocytes in blood and tissues. *Techniques in Clinical Immunology*, Thompson R. A., Ed Blackwell Scientific Publications, Oxford. 1977; 170.

44. Weiner M. S., Bianco C., Nussenzweig V. Enhanced binding of neuraminidase-treated sheep erythrocytes to human T lymphocytes. *Blood* 1973; 42:939-946.
45. Wells R., Pavanand S., Zolyomi B., Permpnich B., Mac Dermott R. Loss of circulating T lymphocytes in Thai adults with malaria. *Clin. Exp. Immunol.* 1979; 35:202-209.
46. Winchester R. J., Ross G. Methods for enumerating lymphocyte populations. *Manual of Clinical Immunology*, Rose N. R. y Friedman H., Eds. American Society for Microbiology, Washington. 1976; 64.

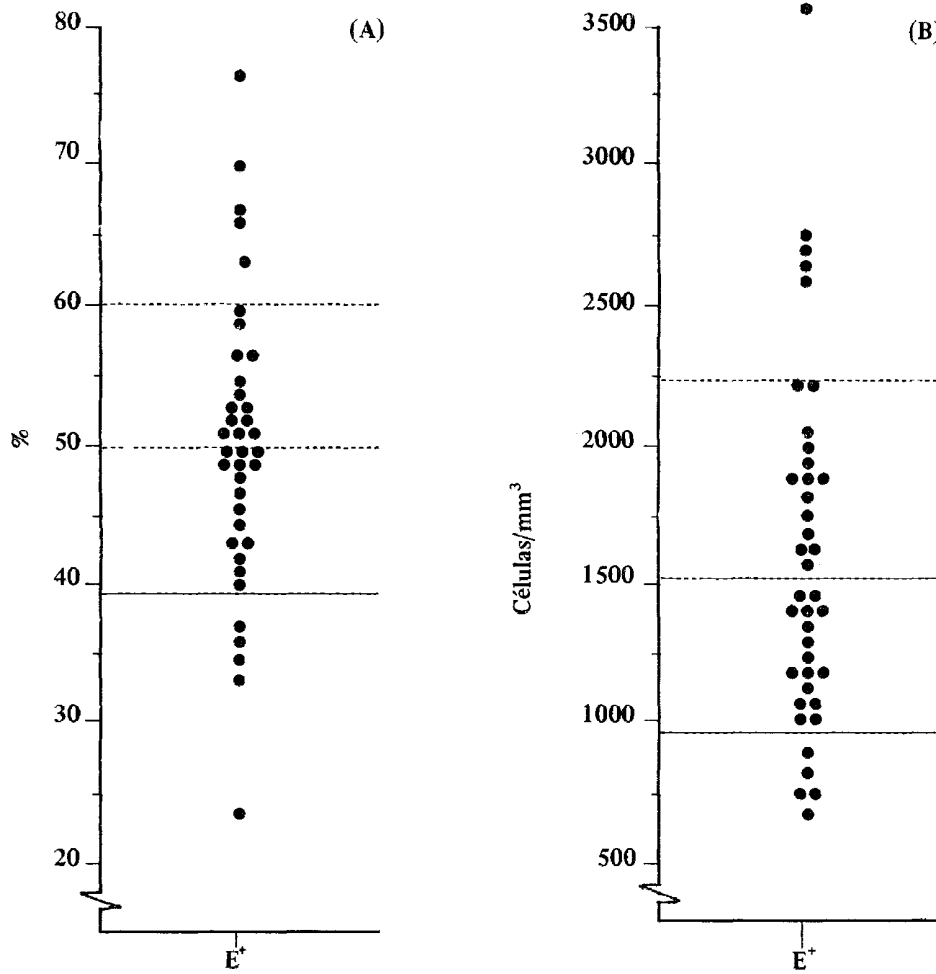


Figura 1
Distribución Según Porcentaje (A) y Cifra Absoluta (B)
de Linfocitos T en Sangre Periférica de 40 Adultos Sanos
Las líneas indican promedio \pm 1 D.E.