

Determinación de concentraciones de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE

María Guadalupe Pérez Flores,¹ María Isabel Castrejón Vázquez,¹ María Eugenia Vargas Camaño,¹ Ricardo Leopoldo Guido Bayardo,¹ Felipe Ortiz Contreras,³ Jorge Galicia Tapia,¹ Laura Guillermina Otero Miranda²

RESUMEN

Antecedentes: el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas, en gran medida, a los avances impulsados por nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. La citometría de flujo permite identificar diferentes subpoblaciones de linfocitos, lo que facilita el diagnóstico y la evaluación de una gran cantidad de enfermedades; y para que sea un método seguro y confiable es necesario determinar la variación y los valores de referencia en individuos sanos.

Objetivo: conocer los valores de referencia para CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8 mediante el análisis de las subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos con citometría de flujo.

Material y método: estudio descriptivo, transversal, comparativo, en el que se seleccionaron 51 adultos voluntarios sanos del Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, de 18 a 57 años de edad (30 hombres y 21 mujeres). La determinación de subpoblaciones de linfocitos T CD3, CD4+ y CD8+ se realizó por medio del método de lisado no lavado, en el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson.

Resultados: el promedio y los intervalos de referencia obtenidos para el grupo total fueron: para CD3, una media de 194 (852-3,264) con p (<1) de 0.78; para CD4, una media de 1,145 (580-1,944) con p (<1) de 0.40; para CD8, una media de 771 (264-1,533) con p (<0.05) de 0.10, y para la relación CD4/CD8 se obtuvo una media de 1.67 (0.59-3.1), p (<1) de 0.063.

Conclusiones: los datos obtenidos se correlacionaron con los valores utilizados en el laboratorio de histocompatibilidad. Se observó una diferencia significativa, lo que justifica la realización de investigaciones más extensas para comparar los resultados con estudios similares a éste.

Palabras clave: subpoblación de linfocitos, valores de referencia, citometría de flujo.

ABSTRACT

Background: Clinical diagnosis has undergone several modifications due mainly to the advances generated by the new methods of cellular analysis. Flow cytometry identifies different lymphocytes subsets for the diagnostic and evaluation of a great variety of illnesses. For that, it is necessary to determine the variation and reference values in healthy subjects.

Objective: To know reference values for CD3, CD4, CD8 and CD4/CD8 analyzing values of lymphocytes subsets in healthy donors by flow cytometry.

Material and method: A descriptive, cross-sectional and comparative study was done with 51 healthy adults (30 male and 21 female) of 18 to 57 years old from Central Blood Bank of National Medical Center 20 de Noviembre, Mexico City, were selected. The determination of subsets of lymphocytes T CD4+ and T CD8+ was carried out by lysis non laundry with flow cytometry FACSCalibur of Becton Dickinson.

Results: Results and reference intervals obtained for the total group were: for CD3 a media of 194, interval of 852-3,264, with p (<1) 0.78; for CD4, a media of 1,145, interval of 580-1,944 and p (<1) 0.40; for CD8, a media of 771, interval of 264-1,533 and p (<0.05) 0.10; for the relationship CD4/CD8, a media of 1.67, interval of 0.59-3.1 and p (<1) 0.063.

Conclusions: Data obtained were correlated with previous values used in histocompatibility laboratory, and significant differences were observed. It is necessary to perform more extensive research in order to compare results.

Key words: subsets of lymphocytes, reference values, flow cytometry.

¹ Servicio de Inmunología Clínica y Alergia.

² Laboratorio de Pruebas Especiales.

Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE.

³ Alergia e Inmunología Clínica, Hospital General Regional núm. 1, IMSS.

Correspondencia: Dra. María Isabel Castrejón Vázquez. Servicio de Inmunología Clínica y Alergia, Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE. Av. Félix Cuevas 540, colonia Del Valle, CP 03229, México, DF. Correo electrónico: isacastre@yahoo.com.mx

Recibido: mayo 2013.

Aceptado: agosto 2013.

Este artículo debe citarse como: Pérez-Flores MG, Castrejón-Vázquez MI, Vargas-Camaño ME, Guido-Bayardo RL y col. Determinación de concentraciones de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE. Rev Esp Méd Quir 2013;18:228-234.

Desde hace mucho tiempo ha habido grandes avances en el estudio de los anticuerpos en la inmunidad adaptativa. Hoy en día se sabe que todas las respuestas adaptativas están mediadas por linfocitos, de tal manera que la inmunobiología comprende, en parte, el conocimiento integral de éstos. Las células se generan de células madre de la médula ósea, pero sus progenitores migran al timo cuando maduran. En el timo, las células T inmaduras o timocitos proliferan y se diferencian, atraviesan una serie de estadios fenotípicos que pueden distinguirse por los patrones de expresión de varias proteínas en la superficie celular. Durante su desarrollo como timocitos, las células experimentan los reordenamientos génicos que produce el receptor TCR y también la selección positiva y negativa que moldea el repertorio del receptor T inmaduro. Estos procesos dependen de interacciones de las células en desarrollo con células del microambiente tímico. Poseen receptores muy diversos en su superficie para reconocer antígeno. En el Cuadro 1 y la Figura 1 se observa el receptor de antígeno de las células T o TCR.¹⁻³

Para ello es necesario separar e identificar las subpoblaciones de linfocitos, específicamente linfocitos T, ya que los B tienen como única función efectora la producción de anticuerpos.^{1,2} Dadas sus características morfológicas, durante mucho tiempo se creyeron carentes de actividad; sin embargo, en la actualidad se consideran de vital importancia para la activación, proliferación y diferenciación de la respuesta inmunitaria.³ Estos antígenos leucocitarios se descubrieron gracias al desarrollo de los anticuerpos monoclonales (MoAbs), y se les designó con la nomenclatura CD (*cluster of differentiation*) seguida de un número ordinal; al madurar las células adquieren y eliminan proteínas en su superficie. Existen más de 160 proteínas con CD asignado, entre éstas las más estudiadas son: CD3, CD4, CD8 y CD45, y tres tipos de proteínas

(BCR, TCR y HLA) que marcan el reconocimiento específico del antígeno por el sistema inmunitario, que no han recibido un número CD de identificación.⁴ Hoy en día se intenta esclarecer los orígenes de diferentes y complejas enfermedades en los estudios moleculares y de genética, ya que mediante ellos se detectan alteraciones, principalmente en el reconocimiento y disfuncionalidad de lo propio y lo extraño, con la consiguiente pérdida de tolerancia inmunológica.⁵⁻⁹

Se han hecho muchas modificaciones en el diagnóstico clínico debido, en gran medida, a los avances generados por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. Uno de ellos es la citometría de flujo, que detecta y calcula el número de células en una corriente de líquido iluminada por un haz de láser y separa las poblaciones identificadas, se le conoce como FACS (separador celular activado por fluorescencia).¹⁻⁵ La fenotipificación inmunológica de las subpoblaciones linfocitarias se ha usado para valorar el estado inmunológico en una gran cantidad de enfermedades; sin embargo, no solamente la enfermedad tiene influencia en el inmunofenotipo, sino también una gran variedad de factores, como la edad, género, infecciones virales, estrés, medicamentos, tabaquismo y alteraciones endocrinas, entre otros.⁵⁻⁸

La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible la realización de estudios de densidad y distribución de determinantes y receptores de superficie y del citoplasma celular, con lo que se identifican poblaciones celulares y se obtiene información cuantitativa de cada célula en particular a partir de una muestra de las subpoblaciones, aun cuando se encuentre en escasas cantidades. Además, permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño, complejidad) y averiguar si existen ciertos antígenos (habitualmente tres o cuatro) en los diferentes compartimientos celulares (superficie celu-

Cuadro 1. Marcadores característicos de la diferenciación de los linfocitos T

Tipo celular	Ubicación	Marcadores
Protimocito	Médula ósea	TdT, HLA-DR, CD7, CD2, CD3 citoplasmático
Timocito inmaduro	Timo	TdT, CD7, CD2, CD5, CD3 citoplasmático, CD38, CD1, CD4/CD8, TdT
Timocito común	Timo	TdT, CD7, CD2, CD5, CD3 citoplasmático, CD38, CD1, CD4/CD8
Timocito maduro	Timo	TdT, CD7, CD2, CD5, CD3, CD38, CD1, CD4 o CD8
Linfocito T maduro	Sangre periférica y tejidos linfoides	CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 o CD8
Linfocito T maduro	Sangre periférica y tejidos linfoides	HLA-DR, CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 o CD8

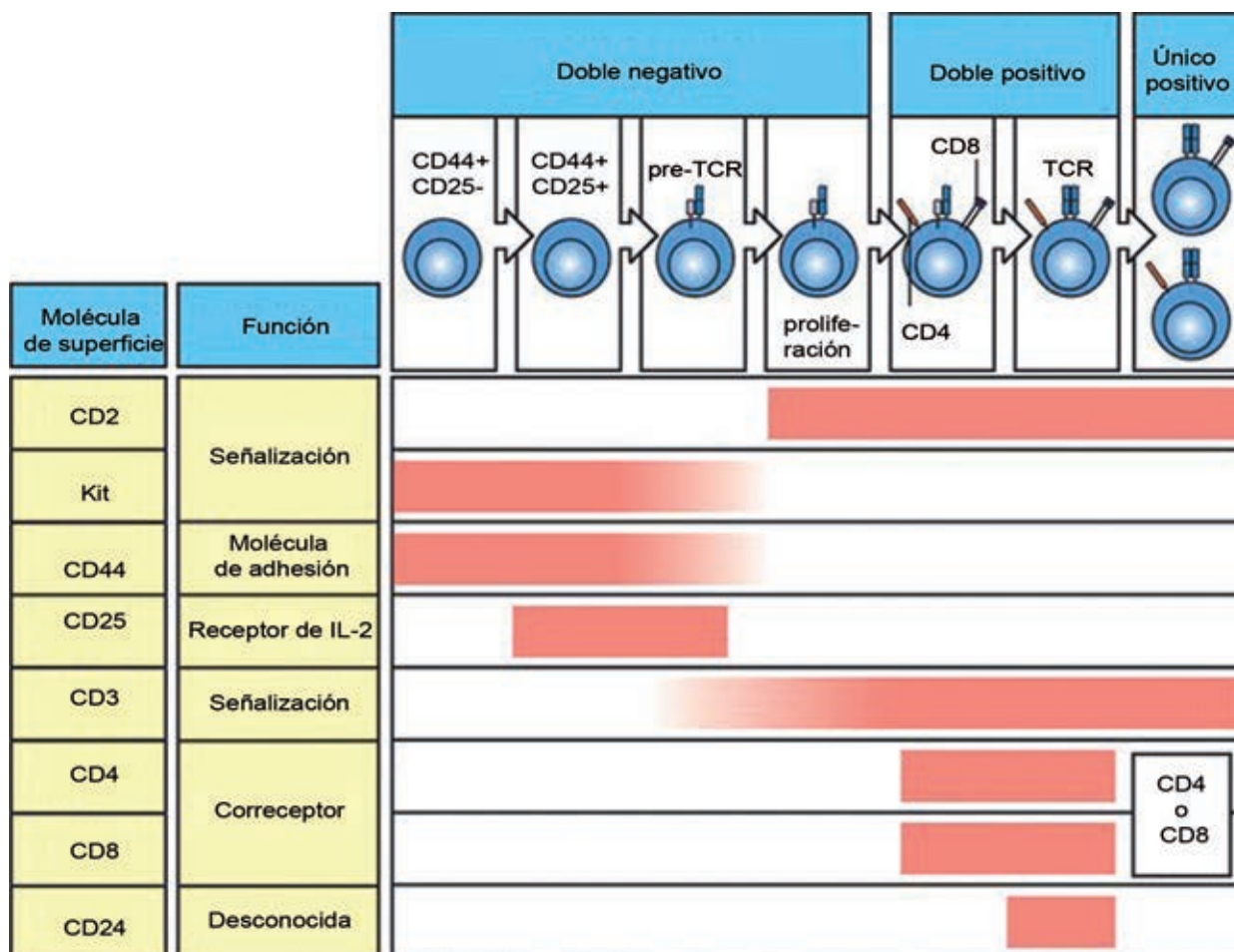


Figura 1. Moléculas de superficie celular en diferentes etapas de diferenciación de los linfocitos T.

lar, citoplasma, mitocondria y núcleo), lo que aumenta la especificidad y la sensibilidad de la prueba en el diagnóstico, clasificación, vigilancia de enfermedades alérgicas y autoinmunitarias. En la actualidad, los estudios de fluorescencia ayudan a determinar fácilmente la composición de subconjuntos de linfocitos (CD54 y D8), por lo que es posible ensayar hasta siete colores que representan siete marcadores diferentes de poblaciones celulares, y se requiere sólo una pequeña cantidad de muestra (250,000 células en 50 UI) a partir de un lavado broncoalveolar. La relación entre los linfocitos CD4 y CD8 se conoce como la relación cooperador-supresor; en personas sanas, ésta se encuentra entre 0.9 y 1.9, lo que significa que hay una o dos células CD4 por cada CD8. El

avance en los sistemas de cultivo también ha permitido observar mejor la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de las inmunoglobulinas, delinear los aspectos funcionales de las células B y T y conocer las bases moleculares para clasificar adecuadamente las inmunodeficiencias primarias y secundarias, entre otras.⁶⁻⁹

A partir de 1992, en países industrializados se estableció una serie de lineamientos para un mejor conteo de células CD4/CD8, y se propuso la citometría de flujo y un panel de 12 anticuerpos monoclonales combinados: CD45/CD14 (para enmarcar una ventana), CD3/CD19 (para separar la población de linfocitos T y B), CD3/CD56 (para separar células NK) y el control

de anticuerpos isotipo. En México se ha propuesto utilizar un panel semejante para el conteo de estas células, considerando un mínimo de seis anticuerpos.⁹ Existen múltiples estudios en los que los valores de referencia para las subpoblaciones linfocitarias muestran variabilidad de un país a otro. En México se han realizado tres estudios nacionales en los que se reportan intervalos de referencia en la población mexicana, uno se hizo en la Universidad Autónoma Metropolitana (1991), otro en el Instituto Nacional de la Nutrición Dr. Salvador Zubirán (1996) y el otro en el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, ISSSTE (2001).⁷⁻⁸ Aún no existía un criterio consensuado para establecer valores séricos de normalidad, debido a las diferencias en la sensibilidad de las técnicas, los estándares de referencia y los métodos usados en cada laboratorio y sus modificaciones, el análisis estadístico de los valores de referencia, las diferencias genéticas, el estado nutricional y la variabilidad de los valores séricos de las subpoblaciones linfocitarias observadas durante los primeros años de vida hasta alcanzar la edad adulta, que son distintos en cada una de las etapas de la vida.¹⁰⁻¹³

En el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE se cuenta con un citómetro de flujo Becton Dickinson FACSCalibur en el que se utilizan valores de referencia para la subpoblación de linfocitos determinados con base en tres estudios efectuados en Estados Unidos con población estadounidense, en los que se consideraron adultos clínica y hematológicamente sanos de diferente edad.¹³⁻¹⁷ No existen intervalos de referencia nacionales o internacionales que permitan hacer un diagnóstico adecuado, que destaquen alteraciones en la respuesta inmunitaria celular y que además incidan directamente en el tratamiento del paciente con enfermedades autoinmunitarias y otras.

En este estudio se analizaron, por medio de citometría de flujo, los valores de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos que acudieron al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre, con el objetivo de conocer valores de referencia para CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8, así como algunos factores (como género, estado civil, ocupación, entre otros) que pudieran influir en la variabilidad de estos valores.¹⁸⁻²²

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio descriptivo, transversal, comparativo, efectuado del 30 de agosto de 2005 al 5 de septiembre de 2007, en el que se incluyeron adultos sanos que acudieron al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre para donación voluntaria de sangre, a quienes se les invitó e informó acerca del estudio, autorizado por el Comité de Ética del hospital. La selección de la muestra fue abierta, aleatorizada y continua. A todos los que aceptaron y cumplieron con los criterios de inclusión se les solicitó su consentimiento informado por escrito.²³⁻²⁵ La información obtenida se capturó en una hoja de recolección de datos. Se aplicó el protocolo a los voluntarios sanos de acuerdo con los lineamientos de selección del laboratorio ya establecidos en forma rigurosa por el Banco Central de Sangre del hospital; posteriormente, se les extrajeron 10 mL de sangre con vacutainer, que se colocaron en un tubo por separado con anticoagulante EDTA. Todas las muestras se procesaron durante las primeras cuatro a seis horas de su obtención, según la técnica ya estandarizada y validada del laboratorio, con la mínima manipulación posible para disminuir los errores técnicos y humanos que pudieran ocurrir. La determinación de subpoblaciones de linfocitos T CD3, CD4+ y CD8+ se realizó por medio del método de lisado no lavado. Después de la extracción de la muestra de sangre se realizó la tinción celular para lisado de los glóbulos rojos con la solución lisante 450 µL y microesferas con FACS diluidas (1X); se agitó suavemente en el vórtex para mezclar homogéneamente y se incubó durante 15 minutos en la oscuridad, protegiendo los tubos de la luz directa a una temperatura ambiente de 20 a 25°C; se agregó por pipeteo inverso la cantidad exacta de la muestra para obtener un mejor resultado con el fin de analizarlo y leerlo en forma automatizada en el citómetro de flujo FACSCalibur de Becton Dickinson. Éste se calibró previamente a través de LISE/WASH, retirando el tubo con agua para colocar el tubo con perlas no teñidas inicialmente. Una vez calibrado y en la fase de compensación, se colocó el tubo con perlas teñidas a una velocidad de flujo alta, tomando en cuenta las diferencias en la velocidad del corrimiento durante el evento en la fluorescencia y ajustando en forma automatizada para valorar la sensibilidad y especificidad

de los resultados, que se reportaron en forma impresa como porcentaje de células positivas por población de linfocitos y como número de células positivas por μL de sangre (recuento absoluto).

RESULTADOS

Se incluyeron 51 (100%) donadores voluntarios sanos que acudieron al Banco Central de Sangre del Centro Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, de los cuales 30 (60%) eran hombres y 21 (40%) mujeres, con edades comprendidas entre 18 y 57 años, promedio de 30 (Figura 2). En la historia clínica se recabaron datos, como lugar de origen y residencia, y se encontró que 40 (78%) eran de la Ciudad de México, tres (6%) del Estado de México, dos (4%) de Guerrero, uno (2%) de Hidalgo, uno (2%) de Michoacán, uno (2%) de Oaxaca, uno (2%) de Chiapas, uno (2%) de Baja California y uno (2%) de Tlaxcala. En cuanto a su actividad, 12 (24%) eran empleados, 10 (20%) estudiantes, 16 (31%) profesionistas y 13 (25%) se dedicaban a actividades varias. Respecto al estado civil, 22 (43%) eran casados, cuatro (8%) divorciados, 23 (45%) solteros y dos (4%) vivían en unión libre.

Los valores numéricos obtenidos en la citometría de flujo y la cuenta absoluta de linfocitos se concentraron en gráficas. Se calcularon los números absolutos y relativos de los linfocitos T CD3, CD4, CD8 y CD4/CD8. Los datos se evaluaron mediante las pruebas de normalidad de Shapiro y de Kolmogorov-Smirnov, ajustados a una distribución normal. Para CD3 se obtuvo un valor pro-

medio de 1,947, mediana de 1,908 y desviación estándar (DE) de 495, con un valor máximo de 3,264 y mínimo de 852, con p (<1) de 0.78 (Figura 3); para CD4 se obtuvo un valor promedio de 1,145, mediana de 1,170 y desviación estándar de 309, con un valor máximo de 1944 y mínimo de 580, y valor p (<1) de 0.40 (Figura 4); para CD8 se obtuvo un valor promedio de 771, mediana de 714, con un valor máximo de 1,533 y mínimo de 264 y desviación estándar de 304, con p (<0.05) de 0.10 (Figura 5); para la relación CD4/CD8, se obtuvo una media de 1.67, mediana de 1.57, con un valor mínimo de 0.59 y un valor máximo de 3.1 y desviación estándar de 0.63, con p (<1) de 0.063 (Figura 6).

Finalmente, se hizo un análisis comparativo de los resultados obtenidos y los valores utilizados de forma rutinaria en el laboratorio de histocompatibilidad de este centro; se encontró una diferencia significativa entre los valores de CD3, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8 (Figura 7 y Cuadro 2).

DISCUSIÓN

No existen estudios nacionales del valor de intervalos de referencia para las subpoblaciones linfocitarias en la población mexicana sana en los que se haya determinado con rigor el estado de salud de voluntarios y enfermos, por lo que es importante conocer y obtener límites de referencia más confiables que los descritos en la bibliografía nacional e internacional, que son los que actualmente se aplican a los derechohabientes del ISSSTE.

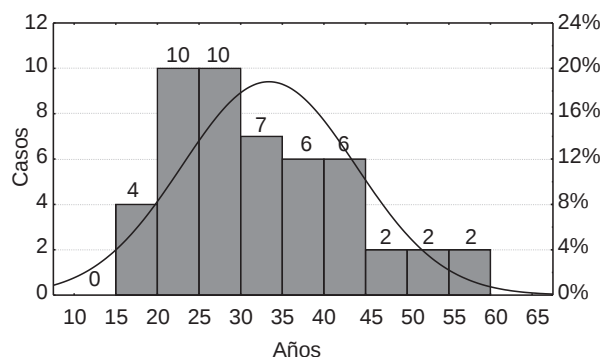


Figura 2. Distribución por edad de la muestra de donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre, ISSSTE.

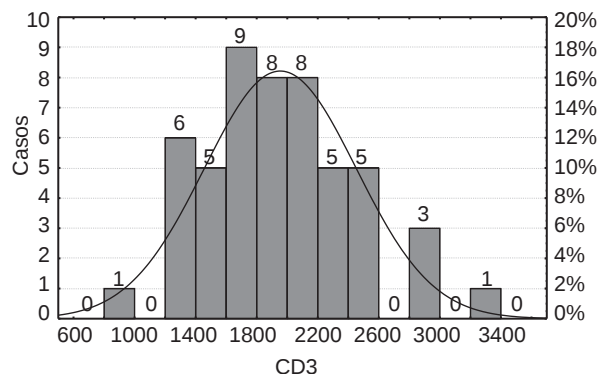


Figura 3. Distribución de linfocitos CD3 en la población estudiada.

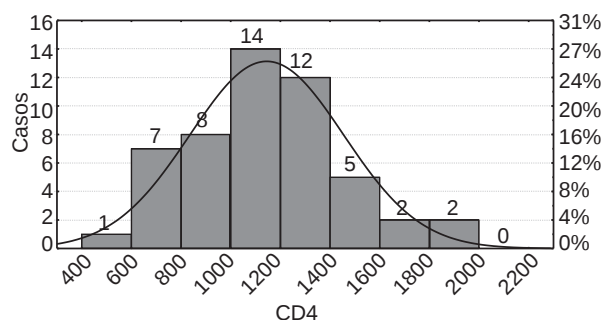


Figura 4. Distribución de linfocitos CD4 en la población estudiada.

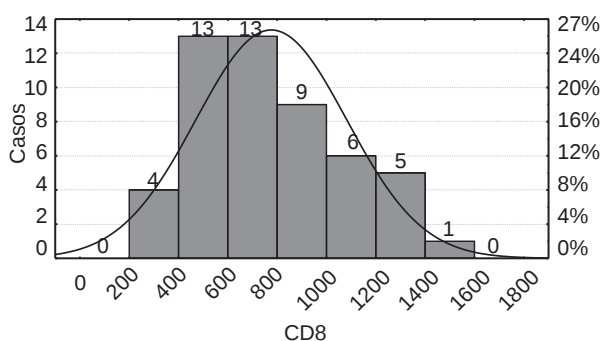


Figura 5. Distribución de linfocitos CD8 en la población estudiada.

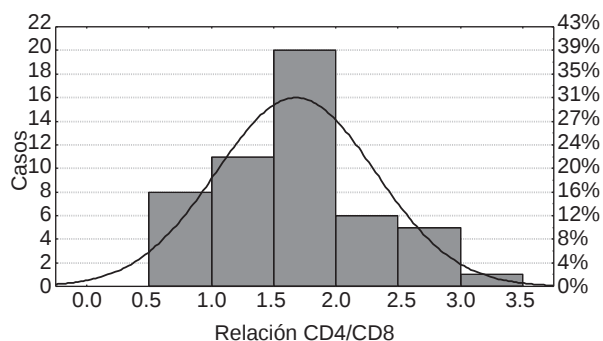


Figura 6. Distribución de la relación CD4/CD8 en la población estudiada.

Este estudio surge del interés y la necesidad de contar con parámetros confiables para la población derechohabiente sana representativa, así como para conocer valores de referencia para CD3, CD4, CD8, la relación entre CD4/CD8 y algunos factores vinculados, como: género, estado civil y ocupación, entre otros, que pudieran influir de manera directa en la variación de estos valores.

Se realizó el estudio con donadores voluntarios sanos que acudieron al Banco Central de Sangre del Centro

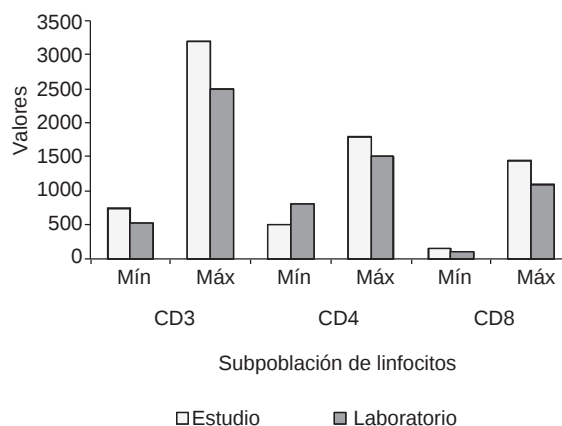


Figura 7. Comparación de valores de los donadores adultos sanos con los valores de referencia del Laboratorio de Histo-compatibilidad del CMN 20 de Noviembre.

Médico Nacional 20 de Noviembre del ISSSTE, considerado hospital de referencia, ya que gran parte de los pacientes que se atienden proceden de diferentes ciudades de la República Mexicana, lo que contribuye a la representatividad de la muestra.

Los tres estudios de los valores de las subpoblaciones de linfocitos encontrados revelan deficiencias en la selección de los pacientes, en el análisis estadístico de los datos y resultados obtenidos y en las técnicas de laboratorio utilizadas, motivo por el que no puede establecerse correlación ni comparar o validar sus resultados con los de este estudio. Es fundamental, sin embargo, validar estos resultados comparándolos con otros para uniformar criterios que permitan análisis posteriores que mejoren el diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades, así como para lograr una estratificación adecuada en cuanto a género y límites de edad.

En este estudio no se realizó la búsqueda en niños y no pudo estratificarse ni conocer los resultados en etapas más tempranas de la vida para compararlos con los distintos grupos de edad.

CONCLUSIONES

Es necesario e importante promover la uniformidad de valores entre los diferentes laboratorios tomando en cuenta la técnica utilizada y el establecimiento de las mismas variables, de tal forma que puedan compararse entre sí.

Cuadro 2. Comparación de los valores de referencia del estudio y del Laboratorio de Histocompatibilidad del CMN 20 de Noviembre

Valores de referencia	CD3	CD4	CD8	Relación CD4/CD8
Estudio	852-3,264	580-1,944	264-1,533	0.59-3.1
Laboratorio de histocompatibilidad	690-2,540	910-1,590	190-1,140	1.5-2.5

Los resultados obtenidos en este trabajo justifican la realización de un segundo estudio para la validación de estos intervalos, en el que se analice una muestra mayor de sujetos sanos y se comparen los datos con los de otras enfermedades y otros laboratorios.

En conclusión, los resultados obtenidos en este estudio pueden utilizarse como valores de referencia e indicadores confiables de salud y enfermedad.

REFERENCIAS

- Janeway C, et al. *Inmunobiología*. 4ª ed. Madrid: Masson, 2000;664.
- Buckley RH. Immunodeficiency diseases. *JAMA* 2002;268:2797-2706.
- Abbas AK, Lichtman AH. Introduction to the immune system: The nomenclature, general properties, and components of the immune system. In: *Basic immunology: Functions and disorders of the immune system*. Philadelphia: Saunders, 2001;1-20.
- Goldsby AR. *Inmunología*. 5ª ed. México: McGraw-Hill, 2004;665.
- Pérez-Flores V, et al. El complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. *Inmunología* 2006;25:50-56.
- George FG, et al. Molecular coordination of alfa beta T-Cell receptors and coreceptor CD (and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands). *Trends Immunol* 2002;23:375-342.
- Razo MD, Garcia NJ. Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. *Rev Mex Patol Clin* 1996;43:21-26.
- Ortiz R, et al. Subpoblaciones de linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: Estudio por medio de citometría de flujo. *Bioquímica* 1999;24:18-22.
- Barrera ML, et al. Citometría de flujo: vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Rev Inst Nal Enf Resp Mex* 2004;17:42-55.
- Harem M, Gilburd B, Schiffenbauer YS, Shoenfeld. Application of a static fluorescence-based cytometer (the Cell Scan) in basic cytometric studies, clinical pharmacology, oncology and clinical immunology. *Clin Dev Immunol* 2005:187-195.
- Szyper-Kravitz M, Harel M, Gilburd B, Trubniykov E, Schiffenbauer YS, Shoenfeld Y. Application of a static fluorescence-based cytometer: the cell clinical immunology. *Lupus* 2006;15:436-441.
- Anasa J, Musabaike H, Masimirembwa C, Burke E, et al. Evaluation of the Partec flow cytometer against the BD FAC-SCalibur system for monitoring immune responses of human immunodeficiency virus-infected patients in Zimbabwe. *Clin Vaccine Immunol* 2007;14:293-298.
- Wee JC, Guat BT, Ponnudurai K. Establishment of adult peripheral blood lymphocyte subset reference. Range for an Asian population by single platform flow cytometry: influence of age, sex, race and comparison with other published studies. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:168-173.
- Santagostino A, et al. An Italian national multicenter study for the definition of a reference ranges for normal values of peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults. *Haematologica* 1999;84:499-504.
- Stefano BT, et al. Hematological reference ranges among healthy Ugandans. *Clin Diagn Lab Immunol* 1995;2:233-235.
- Didier M, et al. Immunohematological. Reference ranges for adults from the Central African Republic. *Clin Diagn Lab Immunol* 2003;10:443-445.
- Weiming J, et al. Normal values for CD4 and CD8 lymphocyte subsets in healthy Chinese adults from Shanghai. *Clin Diagn Lab Immunol* 2004;11:811-813.
- Lozada MF. Valores de referencia de subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 por citometría de flujo. Tesis, 2001.
- Referencia de inserto proporcionado por Becton Dickinson utilizado en el Laboratorio de Histocompatibilidad CMN 20 de Noviembre ISSSTE.
- Nielsen PJ, Lorenz B, Muller AM, Wenger RH, et al. Altered erythrocytes and a leaky block in B-cell development in CD24/HSA-deficient mice. *Blood* 1997;89:1058-1067.
- Roncarolo MG, Levings MK. The role of different subsets of T regulatory cells controlling autoimmunity. *Curr Op Immunol* 2001;12:676-683.
- Declaración internacional sobre los datos genéticos humanos. Octubre 2003. <http://www.unesco.org>.
- Yesley MS, Alexander D, Beauchamp T, et al. Principios éticos y orientaciones para la protección de sujetos humanos en la experimentación. National Commission for the Protection of Human Subjects of Biomedical and Behavioural Research. DHEW Publication no. 78-0012, 1978.
- Recommendations Guiding Physicians in biomedical research involving human subjects. World Medical Association Declaration of Helsinki. June 1999;42:635-697.
- Códigos Internacionales de Ética. 52 Asamblea General, Edimburgo, Escocia, Octubre 2000 y nota de clarificación sobre el parágrafo 29 añadida por la Asamblea General, Washington 2002.