

CENTRO MÉDICO NACIONAL "20 DE NOVIEMBRE"
I S. S. S. T. E.

DETERMINACION DE NIVELES DE SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS EN
DONADORES ADULTOS SANOS DEL CMN 20 DE NOVIEMBRE

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN QUE PRESENTA:

MA. GUADALUPE PÉREZ FLORES

PARA OBTENER EL DIPLOMA EN LA ESPECIALIDAD DE ALERGIA E
INMUNOLOGIA CLÍNICA

ASESOR DE TESIS

DRA. MA. ISABEL CASTREJÓN VÁZQUEZ.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

No. Registro 356.2007

Dr. Mauricio Di Silvio López
Subdirector de Enseñanza e Investigación
del CMN "20 de Noviembre" ISSSTE

Dr. Ricardo Leopoldo Guido Bayardo
Profesor Titular del Curso de Alergia e Inmunología Clínica
del CMN " 20 de Noviembre ISSSTE

Dra. Ma. Isabel Castrejón Vázquez
Médico Adscrito del servicio de Alergia e Inmunología Clínica y Asesora de Tesis

Dra. Ma. Guadalupe Pérez Flores
Médico residente del Servicio de alergia e Inmunología Clínica

AGRADECIMIENTOS

A Dios, por la vida y por darme la fortaleza para continuar mi preparación.

A mi Esposo Eduardo, por su apoyo. A mis hijos Alan, Andrea, Alejandra y Mitzi por sacrificar tiempo de juego y convivencia por trabajo.

A mis Padres, hermanos y sobrinos por el ejemplo de responsabilidad, honradez y trabajo.

A mis Maestros y compañeros residentes de Pediatría Hospital Tacuba y del CMN 20 de Noviembre por su valioso apoyo durante todos éstos años.

A los Médicos adscritos del servicio de Alergia e Inmunología clínica del CMN 20 de Noviembre actuales y predecesores, que hicieron posible el inicio y la continuidad del servicio.

A la QFB Silvia Cano del Laboratorio de Inmunología por su apoyo al servicio y su profesionalismo.

A la QFB Graciela y QFB Laura Guillermina Otero Miranda por el apoyo para la realización de éste trabajo.

Al Dr. Sergio García Méndez Jefe de Banco de sangre por su apoyo.

A los Químicos y Técnicos de Banco de sangre, de Inmunología e Histocompatibilidad por el trabajo incondicional desempeñado para la realización de mi Tesis.

A las enfermeras y Secretarias de pediatría y de Inmunología y Alergia por su apoyo, comprensión y amistad. Mi admiración y Mi respeto.

A todos los pacientes que me dieron la oportunidad de conocerlos y aprender de ellos.

INDICE

	Página
Índice.....	4
Resumen.....	5
Introducción.....	6
.....	11
Justificación.....	12
Objetivos.....	13
Hipótesis.....	14
Selección de la muestra y Metodología.....	15
Material y procedimiento.....	16
.....	23
Resultados.....	24
Discusión.....	25
Bibliografía.....	26
.....	28
Anexos.....	29
.....	38

Determinación de niveles de Subpoblaciones de Linfocitos en donadores adultos sanos del CMN 20 de noviembre ISSSTE. María Guadalupe Pérez Flores, María Isabel Castrejón Vázquez, María Eugenia Vargas Camaño, Ricardo Leopoldo Guido Bayardo.

Resumen:

En los últimos años el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas en gran medida a los avances producidos por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. De entre ellos destaca la citometría de flujo que permite la identificación de diferentes subpoblaciones de linfocitos, lo cual permite diagnosticar y evaluar una gran cantidad de enfermedades. Por otro lado para que esto sea seguro y confiable es necesario determinar la variación y los valores de referencia en individuos sanos. **Objetivo** del estudio fue analizar por medio de la citometría de flujo los valores de subpoblaciones de linfocitos en donadores adultos sanos. Se determinaron los valores de referencia para CD3, CD4, CD8 y relación CD4/CD8. **Material y Métodos:** se seleccionaron adultos voluntarios sanos del banco de sangre del CMN 20 de Noviembre de los cuales se seleccionaron 51 pacientes de edades comprendidas entre los 18 y 57 años de edad (30 hombres y 21 mujeres) La determinación de subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ y T CD8+ se realizó por medio del método de lisado No lavado (LNW) y se leyeron 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 media de 194, con intervalo de 852- 3264, con una $p (<1)$ 0.78. Para CD4 una media de 1145, un intervalo de 580-1944 y con un valor de $p (<1)$ 0.40. Para CD8 una media de 771, intervalo de 264-1533 y un valor de $p (<0.05)$ 0.10. Para la relación CD4/CD8 se obtuvo una media de 1.67, intervalo de 0.59-3.1, y un valor de $p (<1)$ de 0.063. **Discusión:** Se realizó la correlación con los valores previos utilizados en el Laboratorio de Histocompatibilidad y se observó una diferencia significativa lo cual justifica la realización de un trabajo más extenso para poder realizar estudios comparativos con trabajos de Investigación similares al nuestro.

Palabras Clave: Subpoblación de Linfocitos, valores de referencia, Citometría de flujo.

Summary:

In the last years the clinical diagnosis it has experienced deep modifications in great measure to the advances taken place by the new quantitative methods of cellular analysis. Of among them it highlights the flow cytometry that allows the identification of different lymphocytes subsets, that which allows to diagnose and to evaluate a great quantity of illnesses. On the other hand so that this is safe and reliable it is necessary to determine the variation and the reference you value among healthy subjects. **Objective:** of the study it was to analyze by means of the cytometry of flow the that s values subsets of lymphocytes in healthy mature donors. The reference values were determined for CD3, CD4, CD8 and relationship CD4/CD8. **Material and Methods:** healthy voluntary adults of the bank of blood of the CMN November 20 were selected of which 51 patients of ages were selected understood between the 18 and 57 years of age (30 man and 21 women) The determination of subsets of Lymphocytes T CD4+ and T CD8+ was carried out by means of the methods of lysed Non laundry (LNW) and they were read in the C of Flow FACSCalibur of Becton Dickinson. **Results:** The average and the reference intervals obtained for the total group were: For half CD3 194, with interval of 852-3264, with to $p (< 1)$ 0.78. For CD4 to stocking of 1145, an interval of 580-1944 and with to it valued of $p (< 1)$ 0.40. For CD8 to stocking of 771, interval of 264-1533 and to it valued of $p (< 0.05)$ 0.10. For the relationship CD4/CD8 to stocking of 1.67, was obtained interval of 0.59-3.1, and to it valued of $p (< 1)$ of 0.063. **Discussion:** One carries out the correlation with the previous values used in the Laboratory of Hystocompatibility and to significant difference that was observed which justifies the realization of to extensive work to be able to carry out comparative studies with similar works of it lives Investigation to ours.

Words Key: Subsets of Lymphocytes, reference values, Citometría of flow.

INTRODUCCIÓN

Durante muchos años la Inmunología estuvo centrada en la molécula de anticuerpo, debido a que ésta era la molécula más accesible de la inmunidad adaptativa, sin embargo hoy en día sabemos que todas las respuestas adaptativas están mediadas por linfocitos, de tal manera que para comprender la inmunobiología debe fundamentarse en el conocimiento de los linfocitos. Para ello es necesario separar e identificar las subpoblaciones de linfocitos específicamente los linfocitos T; Ya que los Linfocitos B tienen como única función efectora la producción de anticuerpos.(1,2)

La mayoría de los linfocitos son pequeños y carecen de rasgos especiales, poseen escasos organelos citoplasmáticos y con cromatina inactiva por lo que durante mucho tiempo fueron consideradas carentes de actividad. Hoy en día son piedra angular de la inmunología. Sin duda éstos no ejercen actividad funcional hasta que encuentran con el I antígeno, necesario para activar su proliferación y la diferenciación de sus capacidades funcionales especializadas. 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 ó timocitos proliferan y se diferencian, atraviesan una serie de estadios fenotípicos que pueden diferenciarse por patrones de expresión de varia proteínas en la superficie celular. Durante su desarrollo como timocitos, las células experimentan los reordenamientos génicos que producen 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 micorambiente tímico.

Tabla 1 y 2

Poseen receptores muy diversos e su superficie para reconocer antígeno, diversos en su especificidad para antígeno. El receptor de antígeno de las células T o TCR. (3)

Los Linfocitos T en reposo tienen una apariencia uniforme, son células pequeñas y redondeadas con un núcleo denso y escaso citoplasma. Sin embargo esta población general tiene varias subpoblaciones funcionales las cuales pueden diferenciarse de acuerdo a expresión de proteínas en su superficie. (3)

Estos antígenos leucocitarios se comenzaron a descubrir gracias al desarrollo de los Anticuerpos Monoclonales (MoAbs). Según se iban descubriendo nuevas proteínas con diversos anticuerpos monoclonales, un grupo de inmunólogos a nivel mundial les designó una nomenclatura sistemática y así surgió la nomenclatura CD "CD" ("cluster of differentiation") que significa grupo de diferenciación y viene seguido de un número ordinal. Este nombre deriva del hecho de que al madurar las células adquieren y elimina proteínas en su superficie: Antígenos leucocitarios. Existen más de 160 proteínas con CD asignado, además existen 3 tipos de proteínas (BCR, TCR, HLA) que marcan el

reconocimiento específicos del antígeno por el sistema inmune y que no han recibido un número CD de identificación.(4)

CD3

Se expresa durante la timopoyesis y sobre las células T maduras en la periferia. Menos del 10% de las células T periféricas expresan el complejo gamma/delta TCR, pero en el ratón la gran mayoría de las células T presentan en algunos tejidos epiteliales gamma/delta +, y tienen gran cantidad de receptores.

Esquema 1

El complejo CD3 está muy relacionado con el receptor de linfocitos T (TCR). Está compuesto de cuatro cadenas polipeptídicas sin relación covalente (alfa, delta, epsilon y zeta) y también se relaciona de forma transitoria con otro péptido llamado eta (η). Las moléculas constituyentes tienen carga negativa en su porción transmembrana. Se piensa que son importantes en la relación del complejo con el receptor de la célula T que tiene aminoácidos de carga positiva en la región correspondiente. Se piensa que el complejo CD3 participa en la traducción de la señal. Los aminoácidos presentes en el dominio citoplasmático son susceptibles de fosforilación, lo que es una señal de activación usada a menudo. (5)

CD4

El CD4 es expresado en algunos timocitos y aproximadamente en dos terceras partes de las células T de la sangre periférica, las cuales constituyen las células CD8 negativas. En humanos y ratas, pero no en ratón el CD4 es expresado en monocitos y macrófagos.

El CD4 de las células T es una molécula accesoria en el reconocimiento de antígenos extraños en asociación con los antígenos del MHC clase II. Los anticuerpos monoclonales contra CD4 inhiben la función de las células T in vivo e in vitro. El dominio citoplasmático de CD4 es fosforilado en los residuos de serina cuando las células T son activadas por el antígeno o por ésteres. El dominio citoplasmático interactúa con una tirosina cinasa linfocito específica llamada p56^{lck}. El CD4 es un receptor para el VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) y la unión de la proteína viral a esta región es el amino terminal del dominio. (1,6) **Esquema 2**

CD8

El CD8 es expresado en muchos timocitos y aproximadamente en una tercera parte de las células T de la sangre periférica, las cuales constituyen las CD4 negativas. El CD8 alfa puede ser detectado en algunas células NK en niveles bajos y se encuentra en todas las células NK de la rata.

El enlace Inmunoglobulina del dominio CD8 alfa y CD8 beta son separados por una secuencia transmembranal de una región rica en residuos de Pro, Ser y Thr.

El CD8 actúa como un correceptor con antígenos del MHC clase I restringido a TCRs. La función del correceptor CD8 es importante para la selección positiva de antígenos del MHC clase I restringido a células T CD8+. El dominio extracelular de CD8 alfa se liga al dominio alfa 3 del MHC clase I. El dominio citoplasmático de CD alfa se liga a tirosina cinasa p56 a través de la modificación hecha en dos residuos de Cys en una manera similar a CD4. (1,3, 6) **Esquema 2**

CD45

Las proteínas se encuentran en todas las células madres hematopoyéticas, excepto en la de los eritrocitos. Varias isoformas de CD45 son generadas por el entrecruzamiento alterno de los tres exones que pueden ser insertados inmediatamente después en el NH2 terminal de una secuencia de ocho aminoácidos encontrada sobre todas las isoformas. De las ocho posibles combinaciones de los exones, siete pueden ser encontradas a nivel del RNAm. Las diversas isoformas son expresadas sobre diferentes tipos de células linfoides y su expresión puede ser seguida con la utilización de un anticuerpo monoclonal que reconoce una sola isoforma ó el conjunto de las ocho isoformas. Los epítopes relevantes son llamados CD45RA, CD45RB, CD45C y CD45O respectivamente. Las isoformas expresadas del CD45 en las células CD8+, células Nk, monocitos, macrófagos, granulocitos y células dendríticas linfoides no están caracterizados aunque es sabido que éstas células expresan CD45.

La expresión del CD45 es necesaria para la señalización del receptor de células T. la actividad de la fosfatasa fosfo-tirosina es muy importante para la regulación de la actividad de la tirosina cinasa p56. No hay evidencia que los cambios en el dominio extracelular altere la actividad de la fosfatasa. (1,3, 4)

En los últimos años el diagnóstico clínico ha experimentado profundas modificaciones debidas en gran medida a los avances producidos por los nuevos métodos cuantitativos de análisis celular. De entre ellos destaca la citometría de flujo, la cual se ha extendido de forma rápida en la última década.

El Citómetro de flujo detecta y cuenta individualmente las células en una corriente de líquido iluminada por un haz de Láser. Un citómetro de flujo equipado para separar las poblaciones identificadas se denomina *FACS separador celular activado por fluorescencia*.

La conjugación de marcadores fluorescentes con anticuerpos monoclonales o policlonales ha hecho posible los estudios de la densidad y la distribución de determinantes y receptores de la superficie y del citoplasma celular permitiendo identificar poblaciones celulares, es capaz de proporcionar una información cuantitativa sobre cada célula en particular y permite identificar en una muestra subpoblaciones de células diferentes incluso cuando están escasamente representadas.

La aplicación de la citometría de flujo al análisis celular permite conocer aspectos físicos de la célula (tamaño y complejidad) y determinar presencia o ausencia de determinados antígenos (habitualmente entre 3 y 4) en los diferentes compartimentos celulares (superficie celular, citoplasma, mitocondria y núcleo) lo que contribuye a aumentar la especificidad como la sensibilidad de la prueba, como lo es en el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de las enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el lupus eritematoso sistémico y la artritis reumatoide

El progreso en los sistemas de cultivo permitió la diferenciación de los linfocitos B a células plasmáticas secretoras de inmunoglobulinas e hizo posible delinear los aspectos funcionales de las células B y T así como las bases moleculares para las clasificaciones más recientes de inmunodeficiencias primarias, la última realizada en Junio del 2005 en donde fueron reconocidas y clasificadas en 8 categorías (1,2)

El monitoreo de las subpoblaciones linfocitarias en el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) fundamentalmente la cuantificación en sangre de periférica de células CD4 y los linfocitos CD8 aportan un valor diagnóstico y pronóstico en esta. (7,8,9.)

Los estudios de fluorescencia utilizados permiten determinar fácilmente la composición de subconjuntos de linfocitos (CD54 y D8) de esta manera es posible ensayar hasta siete colores que representan siete marcadores diferentes sobre poblaciones celulares requiriéndose solo una pequeña cantidad de muestra (250,000 células en 50UI) a partir de un LBA (7,8, 9)

La relación entre los linfocitos CD4/CD8 se conoce como la relación cooperador/supresor: En personas sanas esta relación se encuentra entre 0.9 y 1.9 lo que significa que hay una o dos células CD4 por cada célula CD8. A partir de 1992 en los países desarrollados se ha establecido una serie de lineamientos para la realización correcta del conteo de células CD4/CD8. Se propone el uso de citometría de flujo y un panel de 12 anticuerpos monoclonales combinados: CD45/CD14 (para enmarcar una ventana), CD3/CD4 (para medir linfocitos T cooperadores como la); CD3/CD8 (para medir linfocitos T supresores); CD3/CD19 (para separar la población de linfocitos T y B); CD3/CD56 (para separar las células NK) y el control de anticuerpos de isotipo. Asimismo en México se han publicado trabajos donde se sugiere la conveniencia de utilizar un panel semejante para el conteo de células CD4 considerando un mínimo de seis anticuerpos. (9)

Hoy en día los estudios moleculares y de genética son los que intentan esclarecer los orígenes de las diferentes y complejas patologías. En todos ellos hay una alteración en la capacidad de reconocimiento de lo extraño,

disfuncionalidad en el reconocimiento de lo propio y por consiguiente de la tolerancia inmunológica y aumento en la propensión a desarrollar neoplasias del tejido hematoimmune (9)

Existen estudios comparativos de rangos de subpoblaciones de linfocitos periféricos en población adulta de Asia en 232 adultos donadores sanos de 16-65 años de los cuales 184 eran de origen chino, 22 de malasia, 19 de India y 9 de otras razas incluyendo caucásicos y euroasiáticos mediante análisis de citometria de flujo que mostró que las células CD8+ disminuyen con la edad y que existen diferencias con otros grupos raciales por lo que deben considerarse para futuros estudios y para el manejo de los pacientes con inmunodeficiencias edad, el sexo y el grupo racial. (10,11, 12,13)

Se realizaron también estudios en Italia para determinar valores normales en donadores sanos en diferentes instituciones en 1311 adultos entre 18 a 70 años con citómetro de Becton Dickinson con los siguientes resultados:

CD3+: 605-2460cel/ul, CD4+:493-1666cel/ul, CD8+:224-1112 c/ul, NK: 73-654 c/ul, CD19: 72-520 c/ul, DR; 86-799 c/ul. (14)

En algunos países en los cuales se ha observado la prevalencia de VIH como Uganda se ha visto la necesidad de establecer parámetros hematológicos de subpoblaciones linfocitarias debido a que los valores de referencia establecidos provienen de estudios realizados en población norteamericana ó europea los cuales posiblemente no son válidos para la población africana. Se obtuvieron los siguientes resultados en ambos sexos con el Citómetro de Becton Dickinson

CD4+: mujer 641-2370 c/ul CD4 hombres: 466-2112c/ul. CD8+ mujer 238-1460 CD8+ hombre: 245-1368c/ul (15)

En la república central de África se han adoptado parámetros de referencia de población caucásica por lo que se ha considerado dada la alta prevalecía de infección por VIH cercana a 5000 000 casos hasta el 2000, la determinación de valores de subpoblaciones de linfocitos. Aunque se considera que existen diversos factores que pueden modificarlos como genéticos, la dieta, el sexo, la edad y la altitud.

En este estudio se incluyeron 150 adultos de 17-58 años de edad, 68 hombres con edades entre los 17-58 años y 82 mujeres con edades comprendidas entre los 16 a 47 años con el Citómetro de Becton Dickinson obteniéndose los siguientes resultados:

Hombres: CD4+:380-1617 c/ul CD8+267-1545 c/ul, Relación CD4/CD8 0.34-1.88 Mujeres: CD4+:386-1454 CD8+:226-1225 Rel. CD4/CD8: 0.60-2.27 (16)

En otros estudios realizados en China por Citometria de flujo en adultos sanos se determinaron niveles con una media para CD4+: 727 y para CD8+: 540 células/ul, y relación CD4+/CD8+: de 1.49. (17)

Los valores de referencia para subpoblaciones linfocitarias en nuestro país son variables. En el Centro Médico Nacional 20 de Noviembre se cuenta con el Citómetro de flujo de Becton Dickinson FACSCalibur con los siguientes parámetros de referencia para subpoblaciones linfocitarias:

CD3:690-2540 c/ul, CD4:910-1590 c/ul, CD8:190-1140, CD56:90-590c/ul, CD19: 90-660 c/ul,

Los rangos de referencia mencionados para CD3/CD4/CD45/CD8 se determinaron de acuerdo a estudios realizados en tres centros de investigación clínica en Estados Unidos: Los sujetos fueron adultos hematológicamente normales, cuya edad variaba entre 18 y 65 años.

Existen 3 estudios Nacionales previos de rangos de referencia en la población mexicana realizados en la Universidad Autónoma Metropolitana (1991), en el Instituto Nacional de Nutrición Salvador Zubirán (1996) y en éste CMN 20 de Noviembre (2001) (7, 8,18).

JUSTIFICACIÓN

La citometría de flujo permite el análisis de los aspectos físicos de los linfocitos T y determina la presencia ó ausencia de determinados antígenos en los diferentes compartimientos celulares, lo que contribuye a aumentar la sensibilidad de la prueba para el diagnóstico y clasificación de las inmunodeficiencias primarias, en el monitoreo de las enfermedades autoinmunes como la esclerosis múltiple, el Lupus Eritematoso sistémico y la artritis reumatoide. Así pues, es imprescindible establecer los valores séricos de referencia para cada una de las subpoblaciones de Linfocitos T en voluntarios sanos con el fin de poder establecer rangos normales. En la actualidad no existe un criterio unánime conocido para establecer valores séricos de normalidad, debido a la existencia de diferencias en relación a la sensibilidad de las técnicas utilizadas para la determinación de los valores de las subpoblaciones de linfocitos, los estándares de referencia utilizados, la variabilidad interlaboratorios en relación a las modificaciones empleadas para una misma técnica; el análisis estadístico utilizado para determinar los valores de referencia, las posibles diferencias genéticas en relación a la étnia y la variabilidad de los valores séricos que las subpoblaciones linfocitarias muestran durante los primeros años de la vida hasta alcanzar los valores del adulto que es diferente para cada una de ellas.

No existen rangos de referencia nacionales que permitan el diagnóstico adecuado, que señalen alteraciones en la respuesta inmune celular CD4+ y CD8+, lo cual incide directamente en el manejo del paciente.

En la actualidad es imprescindible que para la cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias y el establecimiento de valores de referencia se utilicen técnicas lo suficientemente sensibles, anticuerpos monoclonales con alta especificidad y además un grupo control propio bien caracterizado. Como en éste estudio se utilizaron voluntarios sanos los cuales fueron protocolizados en forma estricta de acuerdo a los lineamientos establecidos en el mismo laboratorio para su selección.

OBJETIVOS

Objetivo General:

1. Determinar los niveles séricos de subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ y CD8+ en donadores adultos sanos en el CMN 20 de Noviembre ISSSTE.

Objetivos específicos:

1. Establecer rangos de referencia de subpoblaciones de Linfocitos en el CMN 20 de Noviembre.
2. Conocer los diferentes factores que pueden influir en la variabilidad de los rangos.

HIPÓTESIS DE TRABAJO

No existen estudios nacionales de rangos de referencia de subpoblaciones linfocitarias en población sana mexicana en donde se haya determinado con rigor el estado de salud clínica por lo que es importante conocer y obtener rangos de referencia más confiables que los descritos en la literatura nacional e internacional, los cuales son considerados como referencia en la población del ISSSTE.

SELECCION DE LA MUESTRA Y METODOLOGIA

Se realizó un estudio descriptivo transversal en el período comprendido del 30 de agosto al 05 de septiembre de 2007 en voluntarios sanos que acudieron al banco de sangre central del C. M. N 20 de Noviembre ISSSTE para donación voluntaria sanguínea, a los cuales se les informó acerca del estudio realizándose la selección y obteniéndose la muestra en forma abierta, aleatorizada y continua.

En relación a nuestra población de estudio, se seleccionaron 51 individuos sanos de edades comprendidas entre los 18 y 57 años de edad (30 hombres y 21 mujeres) que acudieron de forma espontánea al banco de sangre del CMN 20 de Noviembre para donación voluntaria a los cuales se les informó acerca del estudio a realizar. Se proporcionó carta de consentimiento informado (**Anexo 1**) y hoja de recolección de datos (**Anexo 2**) a aquellas personas que aceptaron participar en el estudio y cumplían con los criterios de inclusión.

Posteriormente se procedió a la extracción de 10 ml de sangre con vacutainer para medir subpoblación linfocitaria, Biometría Hemática, Serología y Polimorfismo genético. Se colocó en tubo de ensayo por separado con anticoagulante EDTA. Las muestras de sangre identificadas se llevaron al Laboratorio de Histocompatibilidad en donde se procesaron en las siguientes 4 a 6 hrs.

A cada paciente se le realizó Historia Clínica completa aplicándosele un cuestionario obligatorio como parte del protocolo obligatorio del banco central de sangre para ser seleccionado como donador sano, asimismo se les realizó estudios de Biometría hemática y serología.

Los criterios de inclusión fueron: Donantes voluntarios sanos de banco de sangre, ambos sexos, con edades comprendidas entre los 18-65 años.

Los criterios de exclusión fueron aquellas personas rechazadas en banco de sangre para la donación.

La determinación de subpoblaciones de Linfocitos T CD4+ y T CD8+ se realizó por medio del método de lisado No lavado (LNW) y se leyeron en el Citómetro de Flujo FACSCalibur de Becton Dickinson. Se vaciaron los resultados en una hoja Excel en donde se concentraron los datos para su análisis estadístico final.

MATERIAL y PROCEDIMIENTO

Tubo para cuenta absoluta TRUCOUNT (Becton Dickinson No. De catálogo

Tubos de Poliestireno de 12x75 mm Falcon

Tubos de ensayo con anticoagulante EDTA-K3

Micropipetas de 20ul, 50ul, 450ul clinipette

Frascos con capacidad de 100ml

Probeta graduada de 100ml pirex

Pipetas graduadas de 5ml

Cámara de oscuridad

Gradilla metálica

REACTIVOS

Hipoclorito de sodio

Solución de Formaldehído al 37%

Formalfehído al 10%

Agua destilada

Anticuerpo monoclonal triTEST CD3 FITC/CD4 PE/CD45 perCP(Becton Dickinson)

Anticuerpo monoclonal TriTEST CD3/ FITC/CD8 PE/CD45 perCP (becton Dickinson)

Perlas de calibración caliBRITE 3 (Becton Dickinson)

Buffer para citómetro (FACS FLOW, Bectón Dickinson)

EQUIPO

Citómetro de Flujo FACSCalibur, Becton Dickinson

Vortex termolyne, Maxi Mix II

Reloj de Cronómetro

Agitador, Ames Aliquet Mixer

PROCEDIMIENTO

REACTIVOS Y MATERIALES

1. Microesferas CaliBRITE y APC (BD No. De catalogo 340486 y 340487 respectivamente)
2. Solución Lisante FACS(10X) 100ml. (BD No. De catalogo 349202).
3. Agua grado reactivo(destilada ó desionizada)
4. Tubos Vacutainer K3 EDTA para recolección de sangre(BD No de catálogo 366457 ó equivalente)
5. Tubos de prueba desechables con tapa de poliestireno Falcon de 12X75mm (BD No. De catálogo 352058) ó equivalente(si no están usando los tubos TruCOUNT)
6. Agitador Vortex
7. Micropipeta con puntas (pipeta electrónica BD No. 343246 (EE.UU.) ó 343208(Europa) pipetman Raining Instrument Co. Inc ó equivalente.
8. Dispensador ó pipeta de 450ul para dispensar la solución lisante FACS
9. Líquido de revestimiento (FACSFlow BD No. De catálogo 340398 (EE.UU.) y Latinoamérica) ó 342003 ó equivalente
10. Controles TruCount (BD No. De catálogo 340335) Se necesitan si usan los tubos de TruCount
11. Control de sangre entera lisible (Se puede obtener comercialmente)

Tinción de células

Después de la Tinción se procede a lisar los glóbulos rojos con la solución lisante FACS diluida (1X) Se debe tener cuidado de proteger los tubos de la luz directa. El procedimiento se lleva a cabo a temperatura ambiente (20° a 25°C)

Pipeteo Inverso.

Para obtener los resultados, si se usan tubos TruCount es crítico que el volumen de sangre que se agregue sea exacto. Si no se utiliza la pipeta electrónica de BD ó una pipeta similar que dispense un volumen exacto, se debe usar el pipeteo inverso. Esta técnica aprovecha dos toques de la pipeta.

-Para el pipeteo normal, el botón se presiona hasta el primer tope. La muestra se aspira al soltar el botón y se expelle al volver a presionar hasta el primer tope.

-Para el pipeteo inverso, el botón se presiona hasta el segundo tope. Cuando se suelta el botón, el exceso de muestra asciende en la punta. Se expelle un volumen preciso de la muestra al presionar el botón hasta el primer tope, dejando el exceso de la muestra en la punta. (19)

Tinción.

1. Para cada muestra de paciente, se debe rotular un tubo de 12x75mm con el número de identificación de la muestra. Para recuentos absolutos se debe rotular un tubo TruCount en lugar del tubo de 12X75mm.

NOTA: Antes de usarlo se verifica que el sedimento de la microesfera del tubo TruCOUNT esté intacto y dentro del retenedor de metal al fondo del tubo. Si no es así, se desecha el tubo TruCOUNT y se reemplaza por otro.

2. Pipetear 20ul del reactivo TriTEST CD3/CD4/CD45 al fondo del tubo. Si se usa un tubo TruCOUNT, pipetear justo por encima del retenedor de acero inoxidable. No se debe tocar el sedimento.
3. Pipetear 50ul de sangre entera anticoagulada bien mezclada al fondo del Tubo.

NOTA: Se debe evitar que la sangre descienda por las paredes del tubo. Si se queda sangre entera en las paredes del tubo, no se teñirá con el reactivo. Si se usa un tubo TruCOUNT, la exactitud es crítica. Se debe usar la técnica de pipeteo inverso para pipetear una muestra en el lado del tubo justo por encima del retenedor

4. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle. Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C)

5. Añadir 450ul de solución lisante FACS 1 X al tubo.

6. Tapar el tubo y agitarlo suavemente en el Vortex para que se mezcle, Incubar 15 minutos en la oscuridad a temperatura ambiente (20°-25°C).La muestra está ahora lista para ser analizada en el citómetro de flujo.

CITOMETRÍA DE FLUJO.

Si las muestras no se analizan inmediatamente después de la preparación, se deben almacenar en la oscuridad a temperatura ambiente (20-25°C)

Agitar las células suavemente en el Vortex(a baja velocidad) para disminuir la agregación antes de procesarla en el citómetro de flujo.

Adquirir y analizar los datos en la modalidad de lista con el Software MultiSET. Antes de la adquisición de las muestras se debe ajustar el umbral para minimizar la presencia de restos y asegurar que las poblaciones que interesan estén incluidas (19)

PARA LA CALIBRACIÓN DEL CITÓMETRO DE FLUJO.

Se selecciona con el cursor la manzana, aparece un menú y se selecciona FACScmp.

Aparece el mensaje de bienvenida al programa. Se dan los datos de:

- a) Operador
- b) Institución.
- c) Director del Laboratorio.

Llenado esto se da un CLICK en ACCEPT

Aparece un menú en el cual nos permite escoger el tipo de calibración, así mismo nos da la opción de poder alimentar v los lotes de las diferentes perlas de calibración a utilizar para tal efecto.

- a) Para cambiar el No. De lote de las Perlas únicamente nos posesionamos en cada cuadrado de las perlas a cambiar, se borra el No. De Lote anterior y se alimenta el nuevo.
- b) Se hace la selección del ensayo de calibración para lo cual tenemos tres opciones

LYSE/WASH

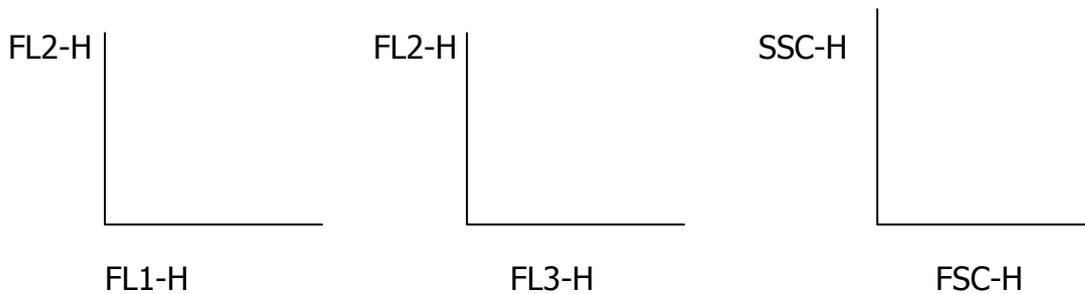
- LISE/NO WASH
- HLA-B27 CALIB.

Para nuestro caso seleccionamos

- LISE/NO WASH

Una vez hecho esto iniciamos el proceso con RUN

Aparece una pantalla con diferentes ventanas de adquisición



Visualizada ésta pantalla se cambia el tubo de agua que está en la aguja de muestra y se coloca el tubo con las perlas no teñidas.

Se selecciona iniciar el proceso en el Citómetro, se presiona el botón que tiene la palabra grabada RUN y se da la velocidad de flujo deseada que por lo regular es en Alta HI

En la pantalla de la computadora se da un Click en START, aparece un reloj que indica el inicio del proceso, en éste caso debemos ver que el EVENT RATE sea mayor a 400 eventos.

Una vez que ésta parte de la calibración ha sido aceptada aparece una nueva pantalla para realizar la COMPENSACION. Para realizar la compensación se sustituye el tubo de las perlas sin teñir por el tubo de las perlas teñidas.

De igual forma para iniciar el proceso de compensación el equipo debe estar en RUN y HI, se posesiona el cursor en START y se da un CLICK

Se observa que el EVENT RATE sea mayor a 400 eventos, a su vez se observa que la diferencia entre las fluorescencias sea el adecuado.

FL1-FL2%	FL2-FL3%
FL2-FL2%	FL3-FL2%

Una vez que las diferencias entre las fluorescencias es el correcto se inicia un proceso de ajuste de SENSIBILIDAD en forma automática con el mismo tubo de perlas teñidas por lo que no se necesita realizar ningún cambio

Terminado el ajuste de SENSIBILIDAD emite el equipo un reporte en el cual nos presenta todos los resultados de la calibración.

Para poder imprimirlo se da un click en QUIT.

RESULTADOS.

Los resultados se informan como el porcentaje de células positivas por población de linfocitos ó como el número de células positivas por microlitro de sangre (recuento absoluto) (19)

RECUESTO DE LINFOCITOS CD4 Y CD8

Se posiciona el cursor en la manzana aparece el menú

-Se selecciona MultiSET y se abre

-Aparece el mensaje de bienvenida al programa y junto con ello los siguiente datos

- a) Operador
- b) Institución
- c) Director del Laboratorio

Una vez alimentado estos datos se da un click en ACCEPT

-Aparece una pantalla en la cual nos da la opción de como queremos manejar nuestros datos y donde los queremos almacenar

Para ello en el recuadro de DATA SOURCE seleccionamos FROM CYTOMETER-ACQUISITION WITH ANALYSIS.

Para salvar en forma automática la información de la corrida del dia en los siguientes archivos

- a) Data File
- b) Laboratory report
- c) Physican report
- d) Summary report
- e) Export Document

Se realiza lo siguiente

1. Se selecciona LOCATION
2. Aparece una nueva ventana, en ella se selecciona DESKTOP
3. En un recuadro de la misma pantalla aparece FACStation se selecciona y se abre (OPEN)
4. Aparecen los archivos de la FACStation se busca y se selecciona C.M.N. 20 de Noviembre, se abre (OPEN)
5. Aparecen los archivos de la carpeta C.M.N. 20 de NOV, se busca y se selecciona HISTO y se abre (OPEN)
6. Aparecen los archivos de HISTO y se busca la carpeta de TRES COLORES y se abre (OPEN)
7. Aparecen los archivos de TRES COLORES, se selecciona 2000, se busca el mes en que se esta trabajando y se abre (OPEN)
8. Una vez seleccionado el mes en que se esta trabajando se posesiona uno en NEW se da un CLICK y aparece una ventana en la que pide el nombre de la nueva carpeta. Se escribe el nombre en el cuadrado y se presiona CREATE y ahora en un recuadro aparece SELECT+el nombre de la carpeta, se selecciona y se da CLICK (19)

De esta forma se realiza la ruta para poder salvar todos los datos en cada uno de los archivos. Teniendo únicamente una diferencia en cuanto a:

- a) Summary Report
 - b) Export Document
9. El último paso es diferente en ambos no aparece SELECT+ el nombre de la carpeta, en su lugar aparece un recuadro OK se selecciona y se da un CLICK
10. Seleccionado donde se van a salvar nuestros archivos se da un CLICK en ACCEPT
11. Aparece una pantalla que nos da ACCESO a FACScomp para calibrara el equipo, a su vez menciona el tiempo que tiene de efectuada la calibración.

En ésta ventana en la parte inferior aparecen varios mensajes como

- a) SKIP FACScomp
- b) LAUNCH FACScomp

De lo cual la primera es para saltarnos la calibración y la segunda por si requiere realizar la calibración.

Aparece una nueva ventana en la cual nos da las opciones de lo que nosotros queremos que nos imprima en el REPORTE FÍSICO, seleccionamos con una X si lo queremos impreso, si no , se deja en blanco.

En ésta misma pantalla hay la opción de poder

- a) Cambiar los rangos de referencia para las subpoblaciones
- b) Formar los paneles con los anticuerpos disponibles
- c) Alimentar los diferentes tipos de reactivos a usar.
- d) Los lotes de los reactivos.

Si nada de esto se va a modificar se posiona uno en ACCEPT y se da un CLICK.

-Aparece la pantalla para programar las muestras, estas son programadas de la siguiente forma:

- NOMBRE
- SAMPLE ID
- CASE NUMR
- PANEL NAME: CD4/CD8/CD45+TRUC

Una vez terminada la programación se inicia el procedimiento dando un CLICK en RUN (19)

-Se comienzan a pasar las muestras de acuerdo a la lista de programación en el siguiente orden

1. TUBO B+NO. DE MUESTRA (CD3/CD4/CD45)
2. TUBO C+NO. DE MUESTRA (CD3/CD8/CD45)

Para ello en el Citómetro se presiona la tecla que tiene grabada la palabra RUN, además de seleccionar la velocidad de flujo que por lo regular es alta. (HI)

Se coloca el primer tubo de la muestra y en la pantalla se da un CLICK en ACQUIERE, una vez que se termina el recuento del primer tubo se oye una alarma de que ya terminó, aparece el LAB REPORT y en esta pantalla se posiona uno en CONTINUE y se da un CLICK.

- Se cambia el tubo no. 1 por el tubo No. 2 y se da un CLICK en ACQUIERE
- terminado el recuento aparece el LAB REPORT se da un CLICK en CONTINUE
- Aparece el PHYSYCAN REPORT y se da NEXT
- De esta forma se siguen pasando las demás muestras.

Para salir aparece el sumario de la programación, en ella nos aparece la opción de poder programar más muestras (MORE TESTS) ó de Salir (QUIT)

Para salir nos posionamos en QUIT y se da un CLICK

Nos pregunta que si queremos salir se le da QUIT, le decimos que SI

Posteriormente nos aparece si queremos salvar ó no los cambios para lo cual decimos que DON ´T SAVE.

Terminado el procedimiento nos regresa al menú principal. (19)

RESULTADOS

Los pacientes estudiados se encontraban con edades comprendidas entre los 18 y 57 años para ambos grupos observando una distribución más concentrada entre los 18 y 30 años de edad (**Gráfica 1**) de los cuales 30 (60%) fueron hombres y 21(40%) mujeres, en cuanto al lugar de origen y residencia correspondieron a la Ciudad de México :40(78%), Estado de México 3(6%), Guerrero :2 (4%), Hidalgo:1 (2%), Michoacán:1 (2%), Oaxaca:1 (2%), Chiapas:1 (2%), Baja California Norte:1 (2%), y Tlaxcala:1 (2%).

Del grupo total 12(24%) fueron empleados, 10(20%) estudiantes, 16 (31%) Profesionistas, 13 (25%) Misceláneos, en cuanto a su estado civil encontramos que 22(43%) eran casados, 4(8%) divorciados, 23(45%) solteros y 2 (4%) en unión libre.

Para CD3 se obtuvo una media de 1947 y una mediana de 1908, con una desviación estándar de 495 con un valor máximo de 3264 y un valor mínimo de 852 con una $p (<1)$ 0.78. (**Grafica 2**)

Para CD4 una media de 1145 y una mediana de 1170, con un valor máximo de 1944 y un valor mínimo de 580, con una desviación estándar de 309 y un valor de $p (<1)$ 0.40. (**Gráfica 3**)

Para CD8 una media de 771 y una mediana de 714, con un valor máximo de 1533 y un valor mínimo de 264, con una desviación estándar de 304 y un valor de $p (<0.05)$ 0.10. (**Gráfica 4**)

Para la relación CD4/CD8 se obtuvo una media de 1.67 y una mediana de 1.57, con un valor mínimo de 0.59 y un valor máximo de 3.1, con una desviación estándar de 0.63 y un valor de $p (<1)$ de 0.063. (**Gráfica 5**)

Los resultados del citómetro de flujo y de la cuenta absoluta de linfocitos se concentraron en gráficas; calculándose los números absolutos y relativos de los linfocitos T CD3, CD4, CD8 así como la relación CD4/CD8. Todos los datos fueron evaluados mediante las pruebas de normalidad de Shapiro y de Kolmogorov-Smirnof y respecto a CD3, CD4, CD8 y Relación CD4/CD8 ajustándose a una distribución normal. Finalmente se procedió a realizar un análisis comparativo entre los resultados obtenidos de nuestro estudio con los valores utilizados en el laboratorio de Histocompatibilidad de éste CMN encontrándose una diferencia significativa entre los valores de CD3, CD4, CD8 y la relación CD4/CD8 como se muestra en la tabla 3. (**Gráfica6**)

DISCUSION

La fenotipificación inmunológica de las subpoblaciones linfocitarias se ha empleado para valorar el estado inmunológico en una gran cantidad de enfermedades. Sin embargo no solamente la enfermedad tiene influencia sobre el inmunofenotipo, sino que además existen una gran variedad de factores tales como la edad, el género, las infecciones virales, el estrés, medicamentos, tabaquismo, y las alteraciones endocrinas entre otros.

Nuestro estudio parte del interés por contar con parámetros de referencia Nacionales establecidos en una población sana representativa.

Se considero realizar el estudio en donadores voluntarios del banco de sangre los cuales no cuentan con historia de infección viral, antecedentes de tabaquismo importante, ni otros factores de riesgo. Para disminuir los errores tanto técnicos como humanos dentro de nuestro estudio todas las muestras fueron procesadas durante las primeras 4-6 hrs. con la mínima manipulación posible en el citómetro de Flujo de Becton Dickinson, y se protocolizo al voluntario sano de acuerdo a los lineamientos de selección del laboratorio del banco central.

Consideramos que es necesario promover la uniformidad de valores entre los diferentes laboratorios considerando la técnica utilizada, así como el establecimiento de las mismas variables, de tal forma que puedan ser analizadas entre los diferentes laboratorios.

Es importante mencionar que aunque nosotros encontramos 3 estudios enfocados en estudiar los valores de las subpoblaciones de linfocitos, éstos presentan deficiencias en cuanto a la selección de los pacientes y otras variables estudiadas, motivo por el cual no se puede establecer una correlación, comparación y validación de sus resultados con nuestro estudio. Sin embargo por las características y el método estadístico utilizado consideramos importante llevar a cabo la validación de nuestros resultados comparándolos con los actualmente utilizados en el laboratorio y con esto unificar los valores para análisis posteriores, diagnóstico, pronóstico y seguimiento de enfermedades. Asimismo consideramos importante realizar una estratificación adecuada en cuanto a género, rangos de edad, ya que en éste estudio no realizamos la búsqueda en los niños y no pudimos estratificar los resultados en los diferentes grupos de edad y así poder realizar un estudio comparativo con los trabajos ya realizados.

Por otro lado los resultados obtenidos de nuestro trabajo justifican la realización de un segundo estudio para la validación de éstos rangos comparándolos con otras enfermedades y aumentando el tamaño de la muestra.

Por lo que concluimos que los valores obtenidos de nuestro estudio pueden ser utilizados como indicadores confiables de salud y enfermedad.

Referencias bibliográficas

1. Janeway, Charles et al. *Inmunobiología*. 4ª. edición. España. Masson. 2000. 664 Págs.
2. Buckley R.H. *Immunodeficiency Diseases*. JAMA. 2002; 268(20): 2797- 06.
3. 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 200 pp 1-20
4. Goldsby A. Richard. *Inmunología*. 5a. edición. México. McGraw Hill. 2004. 665 Págs.
5. V. Pérez-Flores et al. El Complejo TCR/CD3: especificidad con flexibilidad. *Inmunología* Vol. 25 No, 1 Enero-Marzo 2006:50-56
6. George F: Gao et al. Molecular coordination of Alfa beta T-Cell receptors and coreceptor CD (and CD4 in their recognition of peptide-MHC ligands-Trends in Immunology August 2002 Vol. 23 No. 8 pp 375-42
7. Razo Morales D., García Navarro J: Cuantificación de subpoblaciones de linfocitos de sangre periférica por citometria de flujo. *Rev. Méx. Patol. Clin*, 1996,43:1,21-26
8. Ortiz, Rocío et al. Subpoblaciones de Linfocitos en sangre periférica de jóvenes mexicanos sanos: Estudio por medio de Citometria de flujo. *Bioquímica*. Vol. 24:1.1999. 18-22

9. Barrera Martínez Lourdes et al. Citometria de flujo: vínculo entre la investigación básicas la aplicación clínica Rev Inst Nal Enf Resp. Mex volumen 17. No. 1 enero- marzo 2004 Páginas: 42-55

10. Harem m: Gilburd B, Schiffenbauer Y S, 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 Sep; 187-95.

11. Szyper-Kravitz, Harel M, Gilburd B, Trubniykov E, Schiffenbauer Y S Scan in Shoenfeld Y. Application of a static fluorescence-based cytometer: the Cell Clinical immunology. Lupus 2006;15(7):436-41.

12. Justen Manasa et. al. Clin Vaccine Immunol. 2007 March; 14(3): 293–298. Published online 2007 January 31. 10.1128/CVI.00416-06. Evaluation of the Partec Flow Cytometer against the BD FACSCalibur System for Monitoring . Immune Responses of Human Immunodeficiency Virus-Infected Patients in Zimbabwe

13. Wee J. Chng, Guat B. Tan, and Ponnudurai Kupe Establishment of Adult Peripheral blood Lymphocyte Subset Reference. Range for an Asian Population by Single Platform Flow Cytometry: Influence of Age, Sex, and Race and Comparison with Other Published Studies. Clin Diagn Lab Immunol. January 11(1): 168–173.

14. Alberto Santagostino 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

15. Stefano B. Tugume et al. Hematological Reference Ranges among Healthy Ugandans Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, Mar. 1995, Vol. 2, No. 2. pp 233-235

16. Didier Menard et al. Immuno-hematological. Reference Ranges for Adults from the Central Africa Republic. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology .May 2003, Vol. 10 p. 443–445.

17. Weiming Joan et al. Normal Values for CD4 and CD8 Lymphocyte Subsets in Healthy Chinese Adults from Shanghai. Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology, July 2004, Pp.811-813, Vol. 11

18. Lozada Medina, Filemón. Tesis de Valores de Referencia de subpoblaciones linfocitarias CD4 y CD8 por citometría de flujo. 2001.

19. Referencia de inserto proporcionado por Becton Dickinson utilizado en el Laboratorio de Histocompatibilidad CMN 20 de Noviembre

ANEXOS

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 y/o CD8
Linfocito T maduro	Sangre periférica y Tejidos Linfoides	CD7,CD2,CD5,CD3,CD4 ó CD8
Linfocito T maduro	Sangre periférica y Tejidos Linfoides	HLA-DR, CD7, CD2, CD5, CD3, CD4 ó CD8.

Tabla 1. Marcadores característicos de la diferenciación de los Linfocitos T.

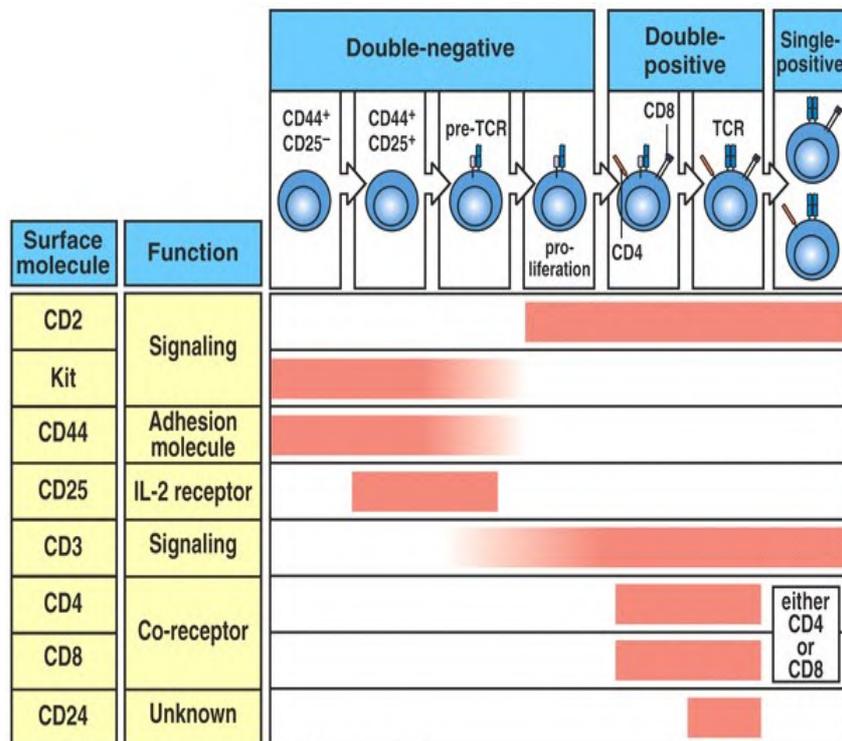


Figure 7-13 part 2 of 2 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Tabla 2. Moléculas de superficie celular en diferentes etapas de diferenciación de los Linfocitos T.

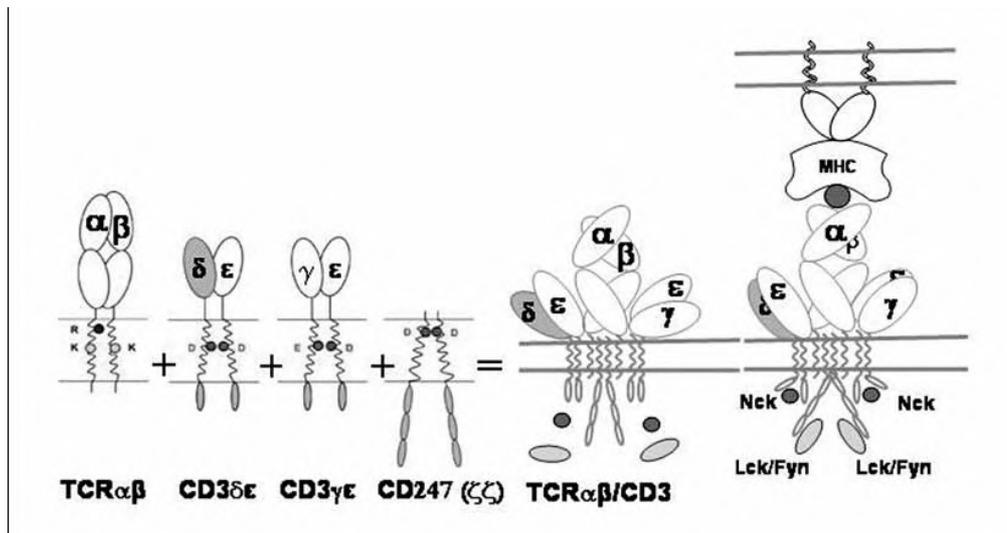


Figure 1. Complejo TCRαβ/CD3 de los linfocitos T (derecha). Las interacciones polares transmembranales son cruciales para su ensamblaje.

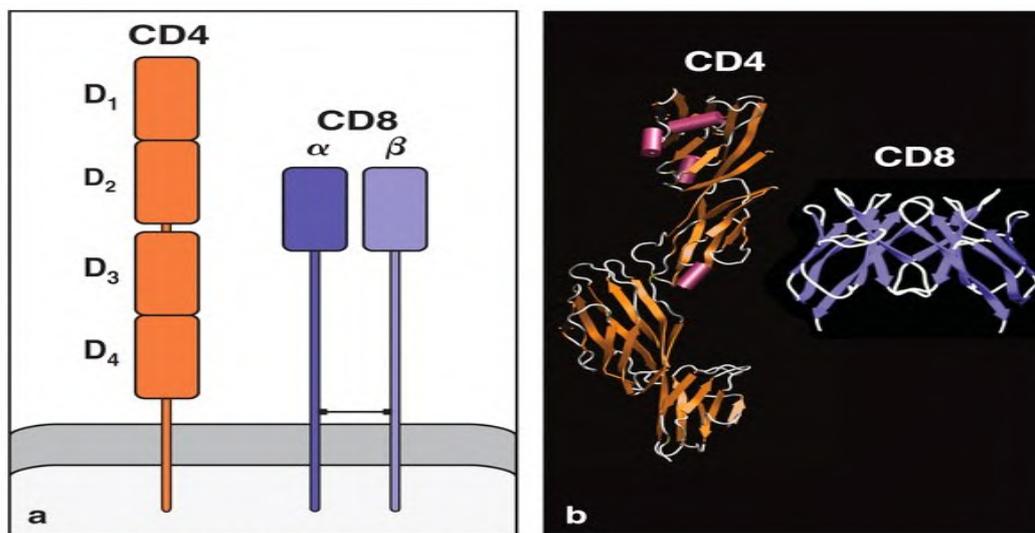


Figure 3-15 Immunobiology, 6/e. (© Garland Science 2005)

Figura 2. a. Proteínas de superficie celular CD4 y CD8. b. Microfotografía de moléculas CD4 y CD8.

Anexo 1

FORMATO DE CONSENTIMIENTO INFORMADO

México D, F; a _____ de _____ del año 2007

Yo _____ de manera libre y voluntaria **DOY MI CONSENTIMIENTO**, para ingresar al estudio titulado **Niveles de Subpoblaciones de Linfocitos en donadores adultos sanos del “CMN 20 de Noviembre”, ISSSTE**, se me ha informado que previamente el estudio fue aceptado y aprobado por el Comité de Ética y Bioseguridad del CMN “20 de Noviembre”, ISSSTE, donde se realizaran los estudios de laboratorio, se me ha explicado que tomarán 5 ml de mi sangre para la determinación de subpoblaciones de linfocitos y 5 ml más para la extracción de DNA (las muestras se almacenaran en el laboratorio de medicina genómica por un periodo de 5 años). Explicándoseme previamente la importancia que tiene para mi estado de salud, se me dio a conocer los riesgos implícitos del procedimiento y el propósito del estudio.

El investigador se ha comprometido a darme la información oportuna de los resultados obtenidos y de las dudas que de ellos surjan, me ha dado la seguridad de que la realización de este estudio no pondrá en riesgo mi integridad física ó mental, así como de que no seré identificado en las presentaciones ó publicaciones, que se deriven del mismo. Los datos de mi expediente serán manejados en forma confidencial.

Nombre del paciente:

Firma:

Dirección:

Teléfono (casa):

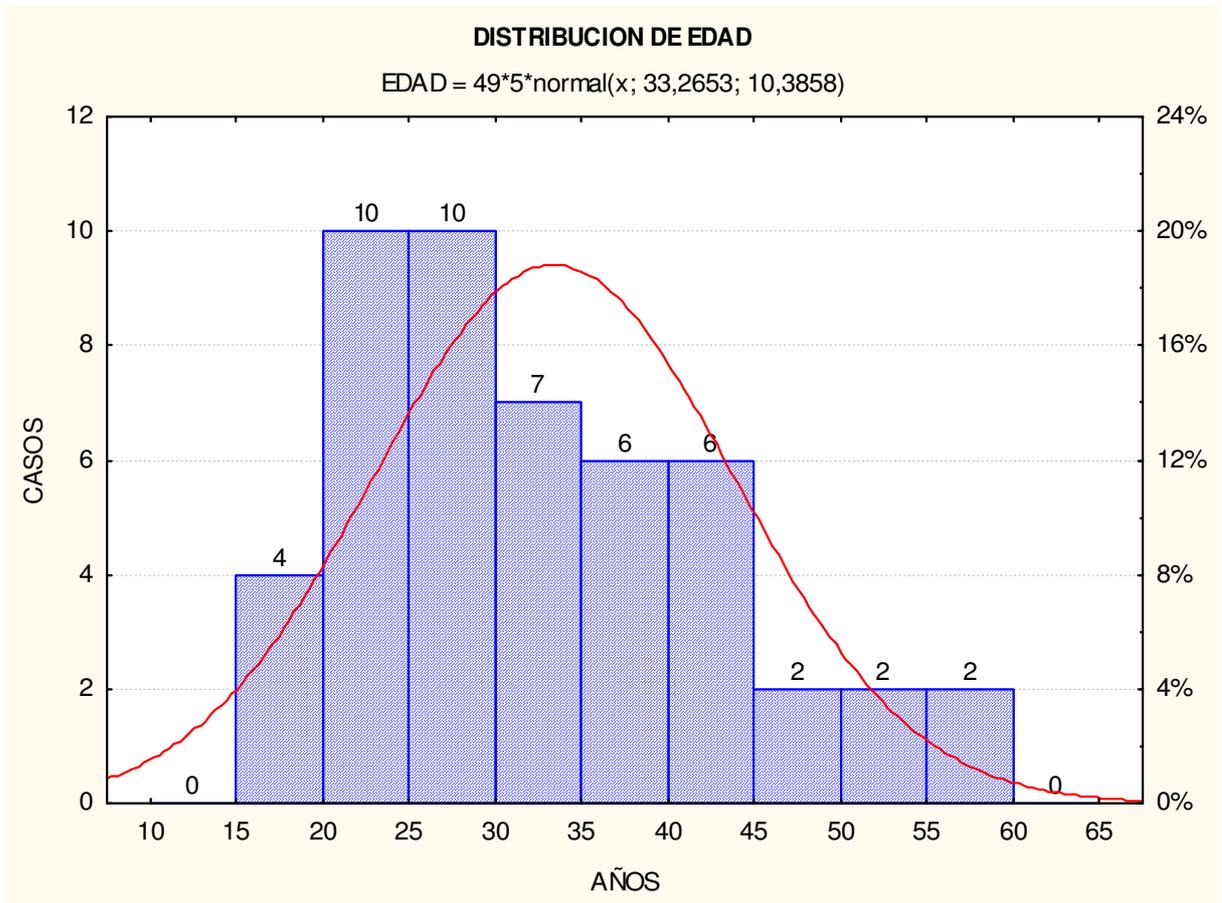
Teléfono (trabajo)

Nombre del testigo:

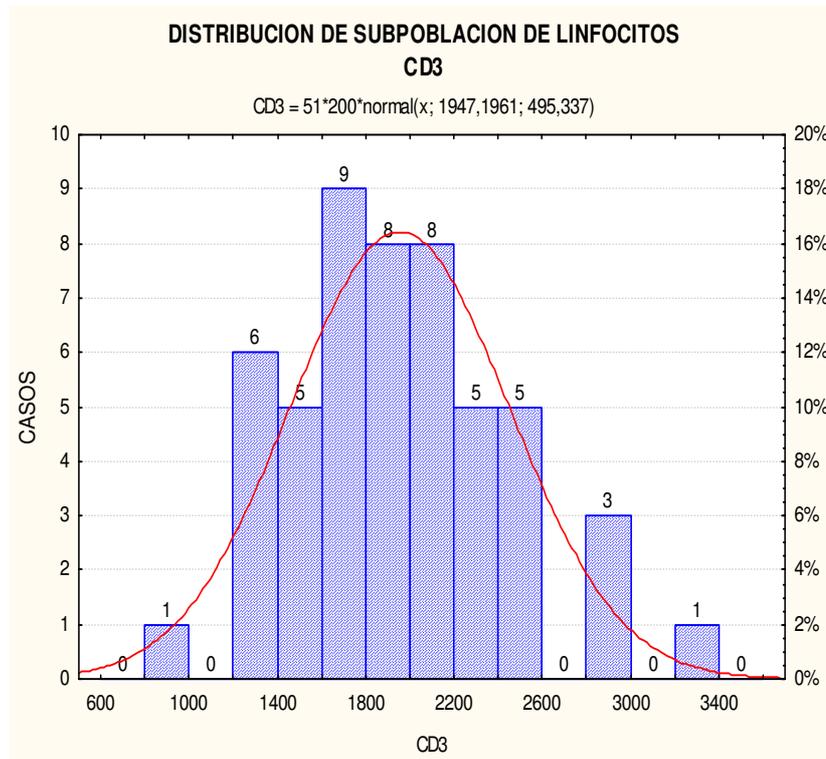
Firma:

Nombre del investigador:

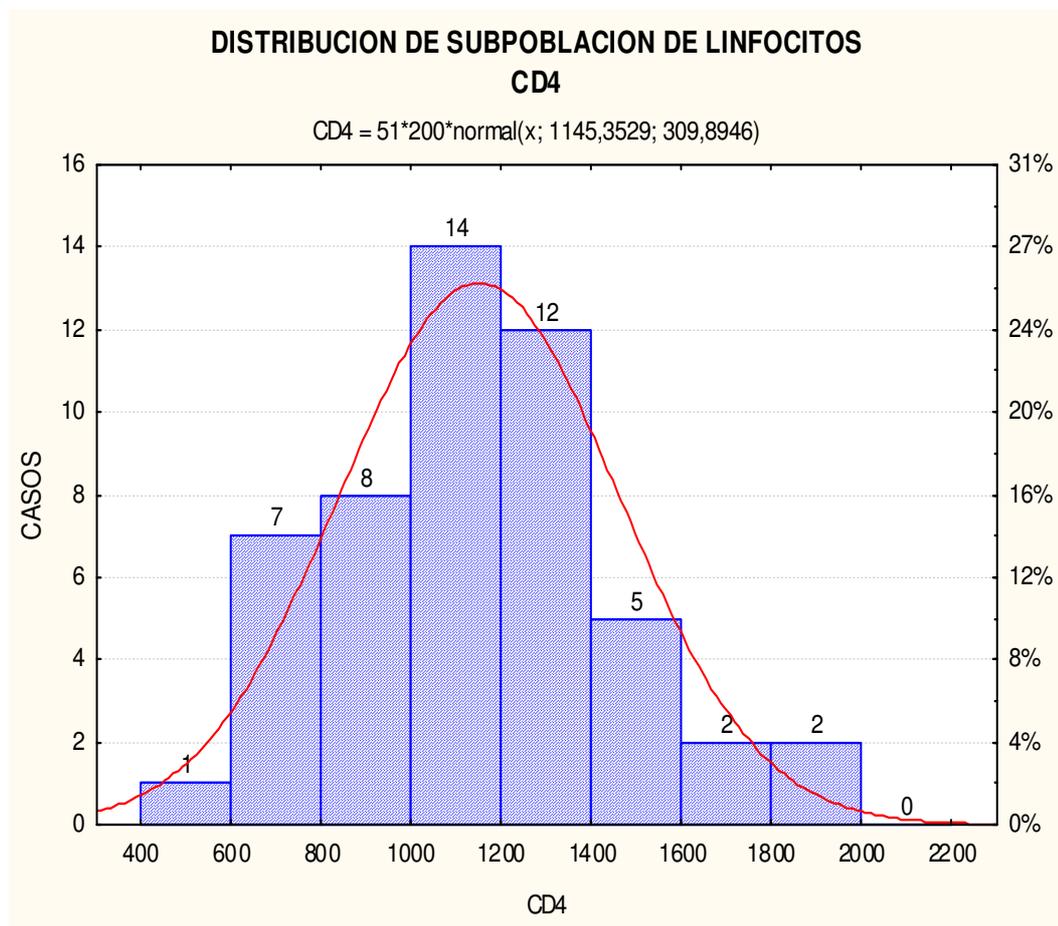
Firma:



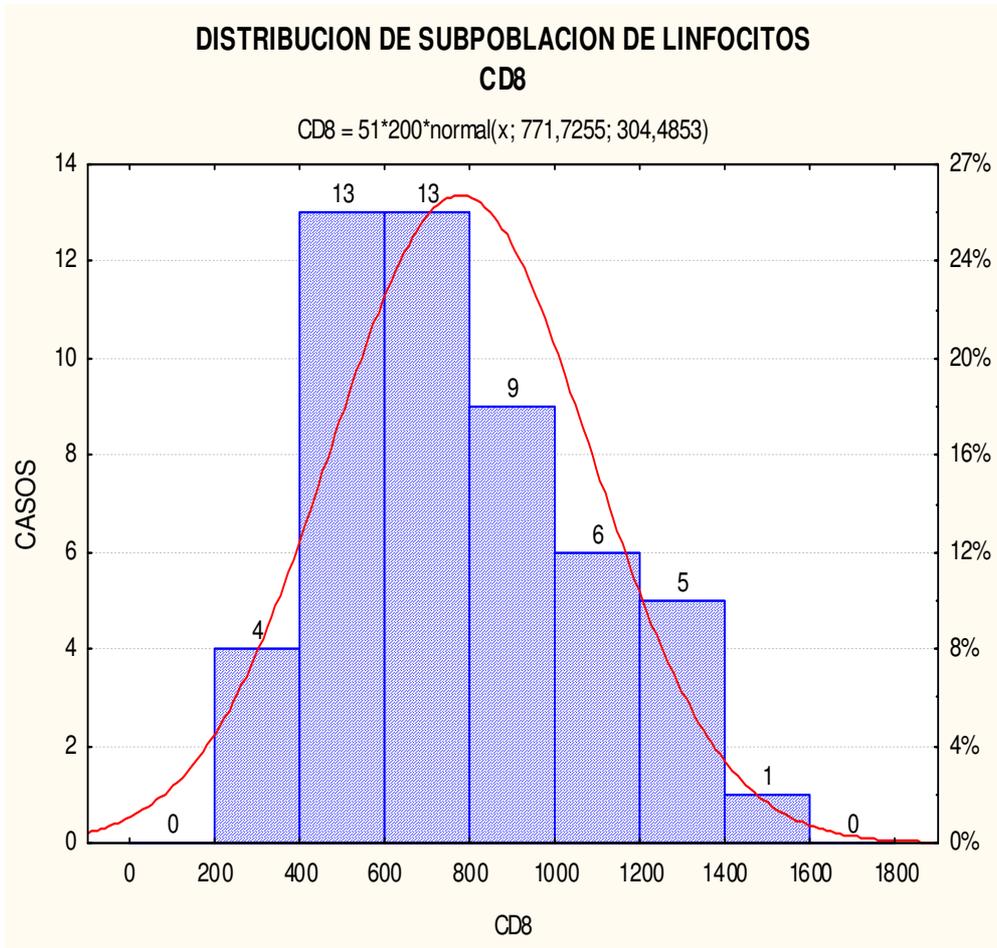
Grafica 1. Distribución por edad de la muestra de donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre.



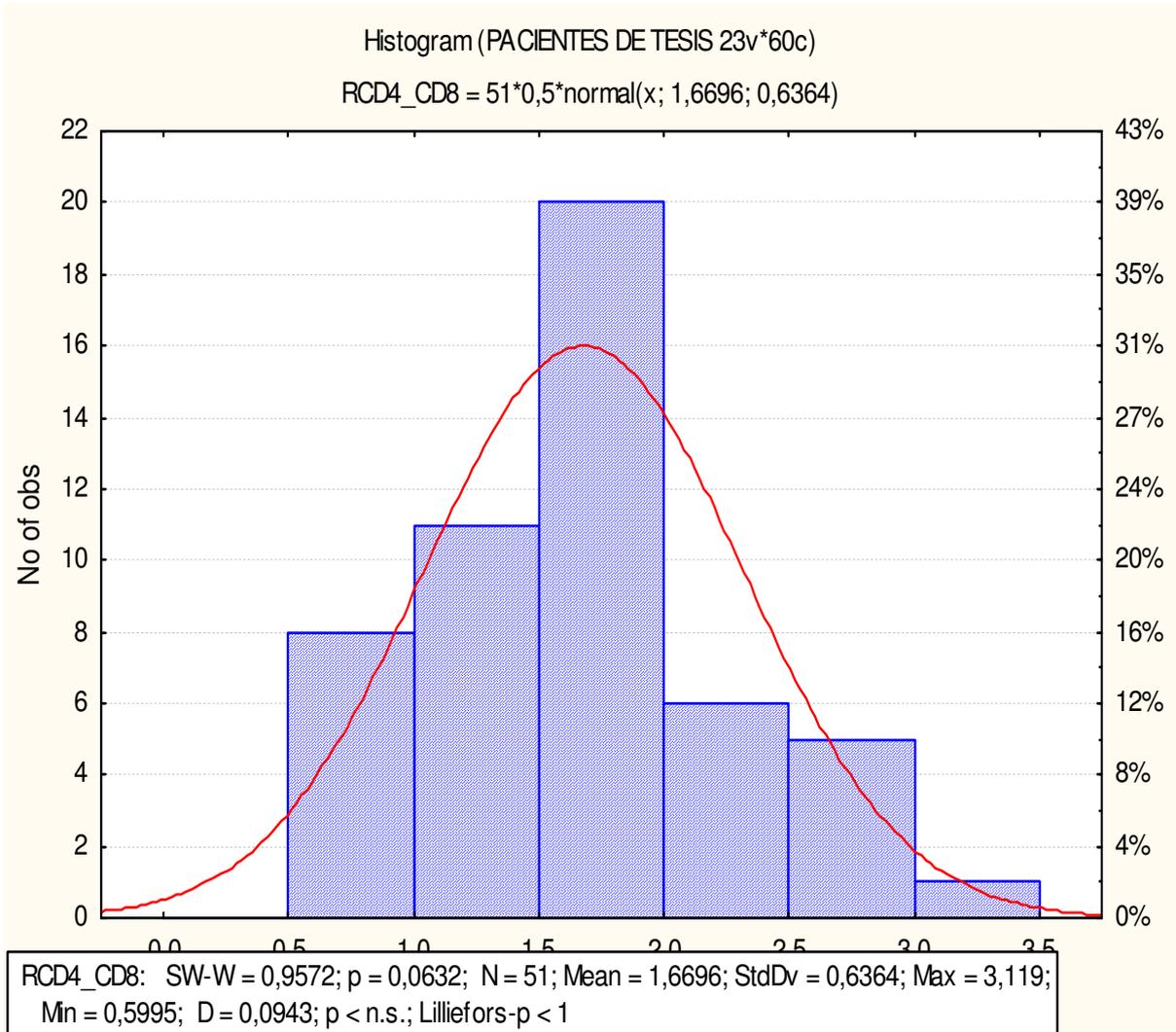
Gráfica 2. Valores de subpoblación CD3 en 51 donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



Gráfica 3. Valores de subpoblación CD4 en 51 donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



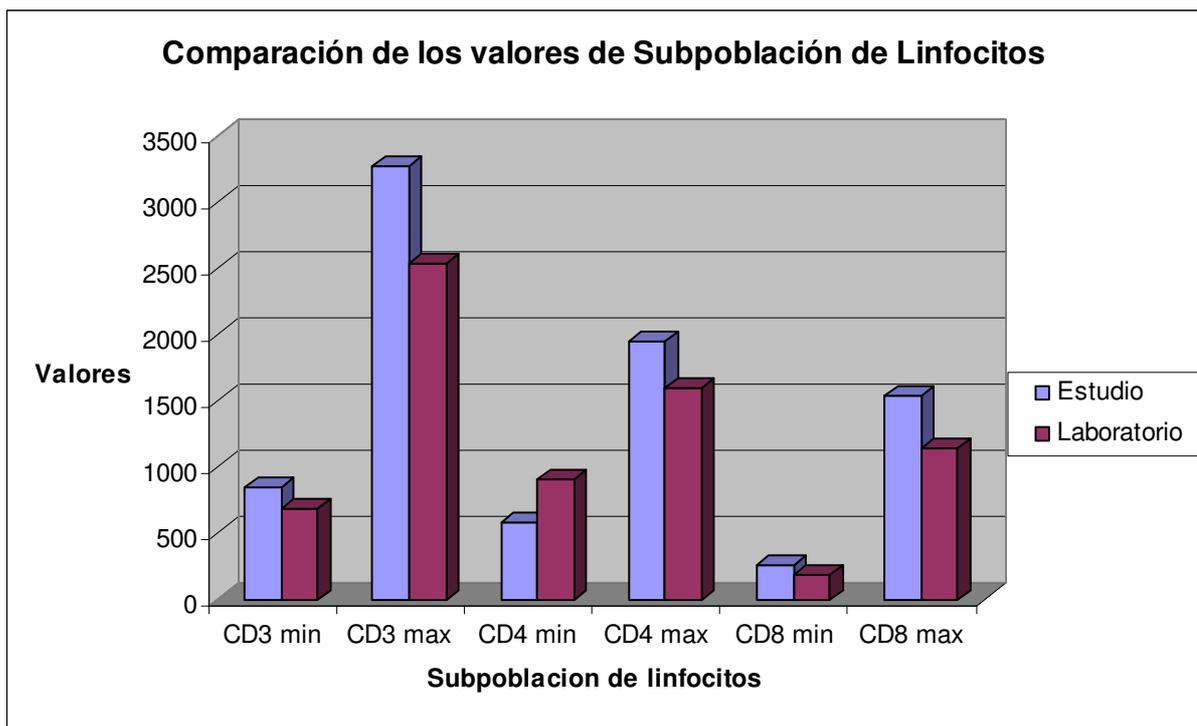
Gráfica 4. Valores de subpoblación CD8 en 51 donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre



Gráfica 5. Relación de CD4/CD8 en donadores adultos sanos del CMN 20 de Noviembre

	CD3	CD4	CD8	Relación CD4/CD8
Estudio	852-3264	580-1944	264-1533	0.59-3.1
Referencia Laboratorio Histocompatibilidad	690-2540	910-1590	190-1140	1.5-2.5

Tabla 3. Comparación de los valores de referencia del estudio y del Laboratorio de Histocompatibilidad del CMN 20 de Noviembre.



Gráfica 6. Comparación de valores de donadores adultos sanos con valores de referencia del Laboratorio de Histocompatibilidad