

Determinación del intervalo de referencia para subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD4+ y CD8+ y el índice CD4+/CD8+ en la población chilena adulta

Determination of reference value for lymphocyte subsets CD3+, CD4+ y CD8+ and CD4+/CD8+ ratio in the healthy Chilean population

Hildegard Kranen¹, Matías Ortúzar Galaz¹, Luisa Montecinos Perret¹, Marcelo Ortega-Riveros² y William Acevedo Muñoz¹

¹Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Córdova, Santiago, Chile.

²Universidad del País Vasco / Euskal Herriko Unibertsitatea.

Los autores declaran no tener conflicto de interés respecto a la presente investigación.

Este estudio no tuvo financiamiento, la empresa Galénica aportó los reactivos, pero no tuvo ninguna influencia ni en el diseño ni en el análisis de los resultados o su publicación.

Recibido: 21 de abril de 2021 (segunda versión: 7 de julio de 2022) / Aceptado: 18 de julio de 2022

Resumen

Introducción: En varios estudios se ha documentado la influencia de factores étnicos en la distribución de las subpoblaciones linfocitarias; sin embargo, los intervalos de referencia utilizados en Chile fueron obtenidos de un estudio realizado en Países Bajos el año 1997. **Objetivo:** Determinar el intervalo de referencia para subpoblaciones linfocitarias CD3+, CD4+ y CD8+, además del índice CD4+/CD8+ en la población chilena. **Metodología:** Se analizó un total de 200 muestras de sangre total obtenida de hombres y mujeres adultos sanos, utilizando el método establecido por el CLSI estandarizado en el protocolo EP28-A3c desde la etapa pre analítica en adelante. **Resultados:** Los rangos de referencia para CD3+, CD4+ y CD8+ fueron 54,7–81,6% (789–2732 células/μL), 28,1–57,7% (447–1703 células/μL) y 15,1–38,8% (226–996 células/μL), respectivamente. El índice CD4+/CD8+ fue de 0,84–3,77. **Discusión:** Los valores de referencia de las subpoblaciones linfocitarias en la población chilena sana son diferentes de los que se usan actualmente en Chile. Estas observaciones muestran datos locales que pudieran tener implicaciones para el tratamiento de la infección por VIH, y los rangos de referencia encontrados en este estudio pudieran ser usados para entender la situación local de algunos pacientes. **Conclusiones:** Otros estudios deberán ser realizados para confirmar estas observaciones dada la falta de datos previos y debido a que este es el primer estudio en población chilena.

Palabras clave: CD3+; CD4+; CD8+; subpoblaciones; linfocitos; valor de referencia; población chilena; VIH.

Abstract

Background: Several studies have documented the influence of ethnic factors on the distribution of lymphocyte subpopulations; however, the reference intervals used in Chile were obtained from a study carried out in the Netherlands in 1997. **Aim:** To determine the reference interval for CD3+, CD4+ and CD8+ lymphocyte subpopulations, as well as the CD4+/CD8+ index in the Chilean population. **Methods:** A total of 200 whole blood samples obtained from healthy adult men and women were analyzed using the method established by CLSI standardized in protocol EP28-A3c from the pre-analytical stage onwards. **Results:** The reference ranges for CD3+, CD4+ and CD8+ were 54.7–81.6% (789–2732 cells/μL), 28.1–57.7% (447–1703 cells/μL) and 15.1–38.8% (226–996 cells/μL), respectively. The CD4+/CD8+ index was 0.84–3.77. **Discussion:** The reference values for lymphocyte subpopulations in the healthy Chilean population are different from those currently used in Chile. These observations show local data that could have implications for the treatment of HIV infection and the reference ranges found in this study could be used to understand the local situation of some patients. **Conclusions:** Others studies must be done to confirm these observations due to lack of previous data and because this is the first study in Chilean population.

Keywords: CD3+; CD4+; CD8+; subpopulations; lymphocytes; reference value; Chilean population; HIV.

Correspondencia a:

Hildegard Kranen

Hildegard.kranen@redsalud.gov.cl

Introducción

En las personas que viven con el virus de la inmunodeficiencia humana (PVVIH), el deterioro de la inmunidad se puede explicar por una disminución cuantitativa de los linfocitos T (LT) (CD4+) en proporción con las demás subpoblaciones linfocitarias (SPL). El recuento de la SPL CD4+ permite decidir el esquema de inicio de terapia antirretroviral (TARV) y tratamientos de profilaxis contra las infecciones oportunistas, mientras que la visión global que proporciona la cuantificación de LT totales (CD3+), LT citotóxicos (CD8+) y el índice CD4+/CD8+, es esencial para supervisar la eficacia del tratamiento de las patologías inmunes¹. Los avances en citometría de flujo han permitido aumentar los grados de sensibilidad y especificidad en la determinación de estos parámetros. Por otra parte, para la correcta interpretación de los resultados obtenidos en cada paciente inmunocomprometido se requiere de intervalos de referencia (InR) que provengan de estudios realizados entre individuos sanos del entorno local, ya que se han observado variaciones derivadas de aspectos genéticos poblacionales entre distintos países²⁻⁶. Los InR de las SPL no han sido estudiados en la población adulta sana de Chile, haciendo forzosa la utilización de valores extraídos de publicaciones internacionales y que fueron obtenidos con la tecnología de hace más de dos décadas². Este estancamiento, junto con el aumento en los casos de VIH+ en los últimos años, hace urgente la necesidad de establecer InR para SPL de acuerdo a parámetros obtenidos de la población chilena, mediante la tecnología vigente y utilizando criterios estandarizados por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (10). De este modo se reducirá la variabilidad analítica y se logrará un mejor monitoreo de los pacientes VIH+^{1,3,4,7}.

Materiales y Métodos

El estudio se realizó con 200 muestras obtenidas de 201 donantes voluntarios del Centro Metropolitano de Sangre de Santiago de Chile, entre octubre y noviembre del 2018. Del total de donantes, una muestra debió ser excluida del estudio tras detectarse serología positiva y no ser apta para ser transfundida. De las muestras que entraron finalmente al estudio, 96 (48%) de los donantes fueron mujeres y 104 (52%) hombres, con un rango de edades de 18 a 61 años. Todos los participantes cumplían con los requisitos de ser chilenos, de estar físicamente aptos como donantes de sangre y de superar la entrevista previa a la donación. Cada uno de ellos firmó libremente el consentimiento informado para la participación en este estudio, aprobado por el Comité Ético Científico

del SSMSO y sus muestras fueron rotuladas únicamente con un número para asegurar la confidencialidad de los datos. Al finalizar el proceso de donación de sangre, se obtuvo una muestra de tres ml desde la bolsa satélite de extracción y se agregó en tubos con ácido etilendiaminotetraacético di potásico (K2 EDTA), siguiendo las pautas para realizar determinaciones absolutas de células T (CD4+) recomendadas por los *Centers for Disease Control and Prevention*, en E.U.A.⁷. Las muestras se mantuvieron a temperatura ambiente, siendo procesadas en el Laboratorio de Microbiología y Medicina Molecular del Hospital de Enfermedades Infecciosas Dr. Lucio Córdova dentro de las 24 horas posteriores a la toma de muestra. Para el análisis de SPL se utilizó un citómetro de flujo Beckman Coulter Aquios CL (Beckman Coulter Ireland Inc, USA). Cada muestra fue marcada con anticuerpos monoclonales CD45-FITC/CD4-RD1/CD8-ECD y CD3-PC5, pertenecientes al Tetra-1 panel (Beckman Coulter Ireland Inc, USA), siguiendo las indicaciones del fabricante^{8,9}. Se midieron los valores de LT (CD3+), (CD4+) y (CD8+) en función de su porcentaje y recuento absoluto (células/ μ L), además del índice CD4+/CD8+. Todos los recuentos se realizaron en plataforma simple y los datos obtenidos de la medición fueron analizados mediante el software EP Evaluator R. Análisis estadísticos adicionales fueron realizados utilizando Minitab 18 (Minitab Inc, USA) y SPSS v19 (SPSS Statistics, USA). Desde la fase preanalítica hasta los análisis estadísticos fueron realizados siguiendo el protocolo EP28-A3c del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI)¹⁰. De acuerdo a este protocolo, los datos atípicos fueron buscados mediante la regla de Dixon-Reed y los límites de referencia establecidos en los fractiles 0,025 y fa0,975 fueron obtenidos utilizando el método propuesto por Solberg HE, con un intervalo de confianza de 90%.

Resultados

La prueba de Dixon-Reed no detectó valores aberrantes entre los datos obtenidos, de tal manera que todas las muestras fueron incluidas en el estudio. Se elaboraron histogramas de frecuencia, donde se observó que los grupos no presentaban una distribución gaussiana (Figura 1). Mediante el test de Kolmogorov-Smirnov se ratificó que solamente las curvas de los porcentajes de CD4+ y CD8+ seguían una distribución normal. Con el protocolo propuesto por Solberg¹¹ para datos que pueden seguir una distribución no paramétrica, se establecieron los valores de referencia que se muestran en la Tabla 1. Se observaron valores más dispersos en los recuentos absolutos de CD4+ que en CD8+ (amplitud IC90% de 248,4 vs 109, respectivamente).

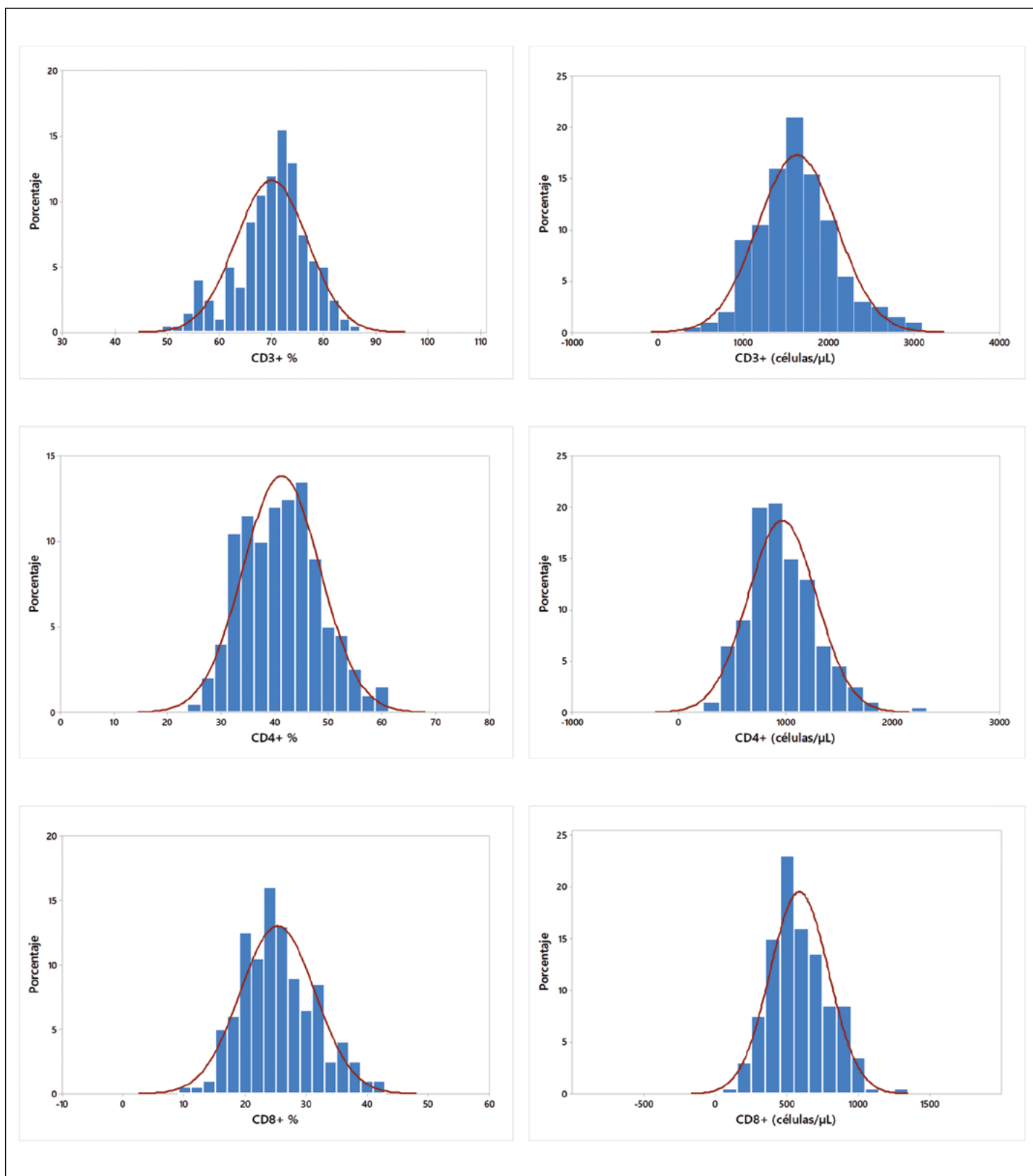


Figura 1. Histogramas de la distribución muestral en los distintos valores medidos.

Para investigar la influencia de la edad en el índice CD4+/CD8+, las muestras fueron divididas en cuartiles (Q). Se encontró que dicho índice no guarda correlación con los cuartiles de edad (Rho de Spearman = 0,258, $p < 0,05$). Comparando los valores de los distintos Q (Figura 2, derecha), la U de Mann-Whitney mostró que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el índice CD4+/CD8+ del Q1 respecto al Q2 ($p = 0,124$), pero sí respecto a Q3 y Q4. Así mismo, Q2 tampoco mostró diferencias respecto a Q3 ($p = 0,055$), pero sí respecto a Q4, mientras que Q3 no mostró diferencias respecto a Q4 ($p = 0,949$).

Discusión

Dado que muchos autores enfatizan en la influencia de factores étnicos y ambientales en los niveles de las SPL^{3,5,6,12,13} y que actualmente se utilizan valores que provienen de un estudio realizado en Países Bajos, con técnicas descontinuas², consideramos la necesidad de establecer valores de referencia propios de la población chilena para la correcta evaluación y seguimiento de los pacientes inmunocomprometidos.

La mayoría de las publicaciones han utilizado metodologías estadísticas que permiten hacer particiones por subgrupos de población; sin embargo, nosotros hemos optado por seguir las recomendaciones del protocolo EP28-A3c del CLSI, que estandarizan completamente el estudio asegurando su calidad. Uno de los objetivos era encontrar muestras de adultos sanos que fueran representativas de la población chilena. La ciudad de Santiago posee una representatividad étnica de todo el país^{14,15} y al ser muestras recolectadas de individuos aptos como donantes de sangre, tras aprobar la encuesta, el examen físico y la serología, se certifica que son personas sanas y que se encuentran libres de infecciones importantes.

El protocolo EP28-A3c recomienda la prueba de Dixon-Reed para descartar valores atípicos, haciendo énfasis en retener todos los valores, a menos que se sepa que las observaciones atípicas son aberrantes (por

Tabla 1. Intervalos de referencia obtenidos a partir de población adulta sana en Santiago de Chile

Parámetro	Unidad	Intervalos de referencia
CD3+	%	54,7 - 81,6
	células/ μ L	789 - 2732
CD4+	%	28,1 - 57,8
	células/ μ L	447 - 1703
CD8+	%	15,1 - 38,8
	células/ μ L	226 - 996
Índice CD4/CD8		0,84 - 3,77

ejemplo, debido a un error de análisis o falla en controles pre-analíticos). Esto, porque los límites de referencia estimados no paramétricamente para muestras mayores de 120 observaciones no se modifican si se elimina un valor extremo, permitiendo establecer límites de referencia con un intervalo de confianza de 90%¹⁰. Aunque este método no requiere una suposición específica sobre la forma matemática que sigue nuestro conjunto de mediciones, hemos comprobado el tipo de distribución a fin de realizar análisis por métodos estadísticos tradicionales para describir la tendencia que siguen los grupos de muestras. Así, por ejemplo, hemos observado que la dispersión en los recuentos de LT CD4+ era mayor que en CD8+, repercutiendo en el índice CD4+/CD8+. Algunos autores han informado recuentos más bajos de LT CD8+ en personas mayores (16), observando además que las fluctuaciones en las SPL CD4+ y CD8+ suelen ser más acotadas y que los cambios relacionados con la edad se evidencian más claramente en la distribución relativa de dichas subpoblaciones (el índice CD4+/CD8+)². Al analizar nuestros resultados con métodos estadísticos tradicionales, no observamos correlación con la edad, ya sea calculando sobre el total de la distribución ($R^2 = 0,06$), o dividiendo el muestreo en cuartiles clasificados por edad: Q1 (18-23 años, $n = 50$), Q2 (24-30 años, $n = 52$), Q3 (31-43 años, $n = 50$), Q4 (44-61 años, $n = 49$).

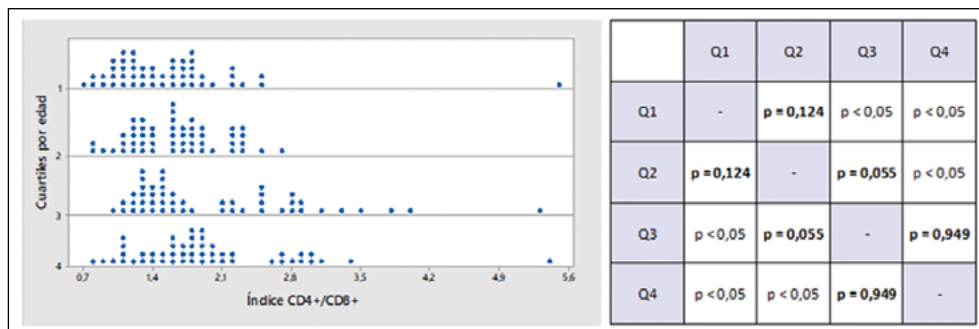


Figura 2. Izquierda: puntos del índice CD4+/CD8+ según los grupos etarios. La dispersión total de los índices es similar en todos los cuartiles, excepto Q2 que muestra valores más acotados. Los cuartiles Q3 y Q4 tienden a presentar algunos valores más altos, sin embargo, no se observa correlación entre la edad y los índices CD4+/CD8+. Derecha: significancia de las diferencias del índice CD4+/CD8+ entre los respectivos cuartiles. Q1: 18-23 años N°50; Q2: 24-30 años N°52; Q3: 31-43 años N°49; Q4: 44-61 años N° 49.

n = 49) y Q4 (44-61 años, n = 49). Como se observa en la Figura 2, en general, Q3 y Q4 tienden a presentar índices CD4+/CD8+ más altos, pero el tamaño muestral es insuficiente para hacer una aseveración concluyente, quedando esta observación abierta a futuros estudios con un mayor límite superior de edades. La influencia de la edad se ve reflejada en la involución que sufre el timo en el proceso de envejecimiento, que va acompañada de un deterioro progresivo del sistema inmunológico innato y adaptativo, disminuyendo la competencia inmune de las células T en la edad avanzada³. La distribución relativa de las subpoblaciones CD4+/CD8+ es un factor fundamental a tener en cuenta en los pacientes con infección por VIH, por lo que establecer valores de referencia por métodos validados es de vital importancia para las decisiones acerca de la TARV, evaluar la resistencia antiviral, monitorear la adherencia al tratamiento y detectar la posible evolución hacia el SIDA.

Un factor que marca las mayores diferencias en las SPL es el sexo. Diversos estudios muestran un porcentaje significativamente mayor de recuentos absolutos y de LT CD4+ en mujeres^{3-6,16,18}, dado por la influencia secundaria de las hormonas sexuales como el estrógeno, la progesterona y los andrógenos, además de algunos

glucocorticoides¹⁹. La composición nutricional y los microbiomas también determinan diferencias en el desarrollo y el funcionamiento de la respuesta inmune respecto a los hombres^{4-6,12,13,16}. El método estandarizado utilizado en este estudio no permitió fraccionar el muestreo para establecer valores de referencia por género, pero los resultados tras los análisis con estadística tradicional (datos no mostrados), concuerdan en que la media y los límites de referencia fueron mayores en mujeres.

Los resultados encontrados en este estudio, mostraron un rango más amplio y con mayores recuentos celulares, que los establecidos y usados actualmente en Chile, como límites de referencia de las SPL. Dichos valores fueron establecidos en una población de 51 adultos de Rotterdam, Países Bajos. Las diferencias étnicas, el reducido tamaño muestral y los avances tecnológicos desde que fueron obtenidos, explican las diferencias encontradas. La comparación de nuestros resultados con los obtenidos en otros estudios resulta difícil de establecer debido a la ausencia de uniformidad metodológica, de partición de muestras y de expresión de los datos. Sin embargo, en una aproximación gráfica de los rangos de referencia, las diferencias resultan evidentes (Figura 3). Las mayores similitudes de rango se observan con respecto a los países

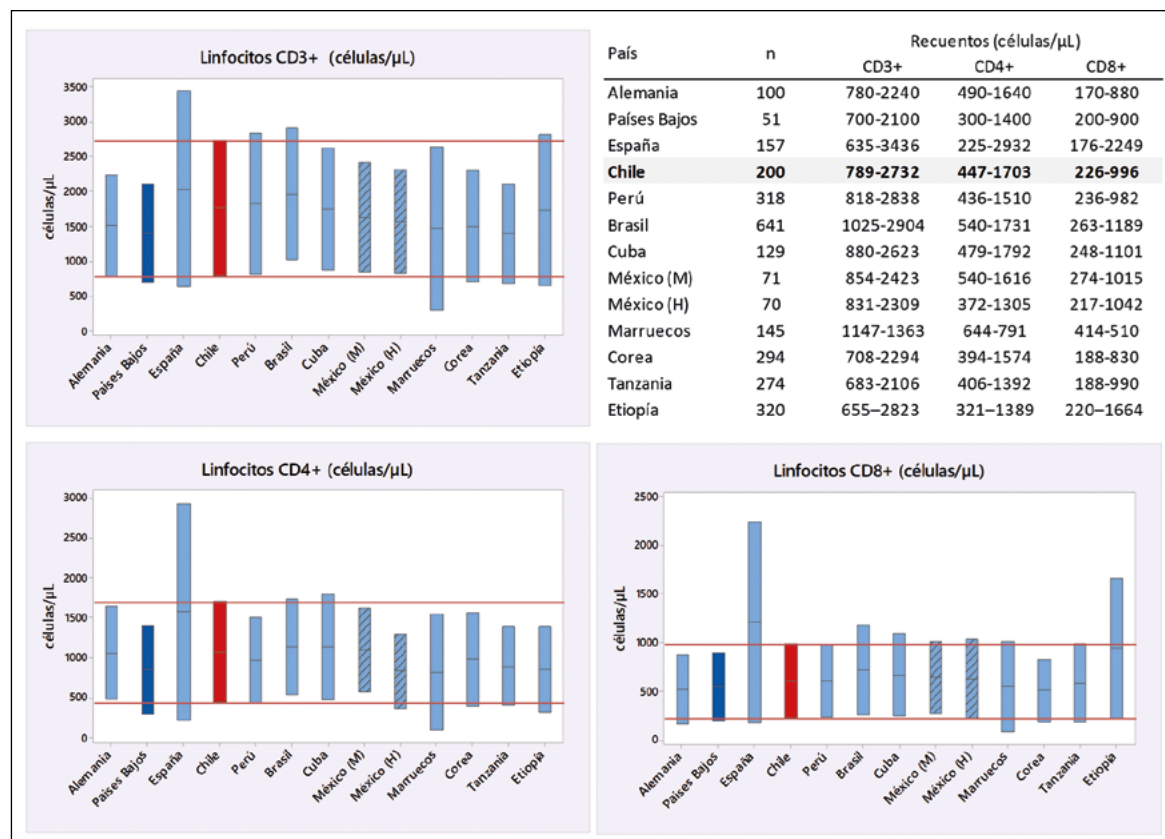


Figura 3. Comparación de los intervalos de referencia de recuentos absolutos de subpoblaciones linfocitarias obtenidos en estudios de diferentes países. Se destaca en tonos rojos los límites obtenidos en este estudio, con una proyección hacia las demás mediciones para facilitar la comparación y en oscuro los Intervalos de referencia que se han estado usando en Chile. La población mexicana está representada por sexo.

de origen latino. Los límites de referencia obtenidos en Chile para LT CD3+ son muy similares a los de Perú²¹ y en un segundo nivel a los de Cuba⁶, pero se alejan de los resultados obtenidos en otros continentes^{3,5,16,18,22,23}. Aunque nuestros recuentos de CD3+ fueron similares a los encontrados en Etiopía, la desigualdad se manifiesta en el conjunto de SPL³. En la Figura 3 también se muestra que nuestros límites de referencia en los recuentos de CD4+ y CD8+ son similares a los de Cuba; no obstante, el dato que fue graficado representa a la población total cubana, mientras que en dicho estudio encontraron diferencias significativas entre hombres y mujeres⁴. Un ejemplo de las diferencias según el sexo se puede apreciar en las barras que representan a la población de México²⁴. Nuestros resultados de la subpoblación CD4+ también son similares a los obtenidos en Brasil; sin embargo, no disponemos de datos para hacer comparaciones estadísticas. Esta aproximación visual nos permite distinguir mayores semejanzas con la población latina, pero no podemos asegurar que la proximidad étnica implique una aproximación significativa en los InR; estudios realizados entre distintas localidades de Brasil han mostrado diferencias significativas en la mayoría de los parámetros medidos²⁰. Además, en todas estas comparaciones hay que tener en cuenta las diferencias en los factores pre-analíticos y analíticos con que fueron realizadas las mediciones¹².

Los análisis fueron realizados en distintos citómetros de flujo: Alemania¹⁸, Brasil²⁰, Corea²², Marruecos⁵ y

Tanzania²³ con FAS Calibur; Países Bajos² con FACScan flow cytometer; México²⁴ con FACSCanto II y Etiopía³ con FACScout (todos los anteriores, marca Becton Dickinson). España¹³ con Cytomics FC 500, Cuba⁴ con Beckman Coulter Gallios 8 y Perú²¹ con Cytomics/single (Beckman Coulter).

Conclusiones

Estas observaciones muestran datos locales que pudieran tener implicaciones para el tratamiento de la infección por VIH, y los rangos de referencia encontrados en este estudio pudieran ser usados para entender la situación local de algunos pacientes.

Este es el primer estudio que establece de manera estandarizada, valores absolutos y porcentuales para subpoblaciones de LT en sangre periférica de adultos sanos en Chile. Dado lo imperioso que resultaba actualizar los límites de referencia y que las diferencias por sexo aún no son consideradas, los resultados de este estudio constituyen el primer paso para aplicar límites de referencia. Aunque la ciudad de Santiago es representativa de la diversidad étnica de todo Chile, se deben tener presente las variables sociodemográficas de las distintas zonas del país. Por esto, planteamos como una segunda etapa realizar un estudio multicéntrico a nivel nacional que además permita la partición de muestras por sexo, edad u otros factores que puedan ser motivo de revisión.

Referencias bibliográficas

- Noda A, Vidal L, Pérez J, Cañete R. Interpretación clínica del conteo de linfocitos T CD4 positivos en la infección por VIH. *Revista Cubana de Medicina*. 2013; 52(2): 118-27. <http://scielo.sld.cu/pdf/med/v52n2/med05213.pdf>
- Comans-Bitter W M, de Groot R, van den Beemd R, Neijens H J, Hop W C J, Groeneveld K, et al. Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. reference values for lymphocyte subpopulations. *J Pediatr*. 1997; 130(3): 388-93. [https://doi.org/S0022-3476\(97\)70200-2](https://doi.org/S0022-3476(97)70200-2).
- Gize A, Mathewos B, Moges B, Workneh M, Gedefaw L. Establishment of normal reference intervals for CD3(+), CD4(+), CD8(+), and CD4(+) to CD8(+) ratio of T lymphocytes in HIV negative adults from University of Gondar Hospital, North West Ethiopia. *AIDS Res Treat*. 2014; 2014: 267450. <https://doi.org/10.1155/2014/267450>.
- Kokuina E, Breff-Fonseca M C, Villegas-Valverde C A, Mora-Díaz I. Normal values of T, B and NK lymphocyte subpopulations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Rev*. 2019; 21(2-3): 16-21. <https://doi.org/10.37757/MR2019.V21.N2-3.5>.
- Sahmoudi K, El Allam A, El Fakih S, Tahoune H, Sadak A, El Hafidi N, et al. Moroccan lymphocyte subsets reference ranges: Age, gender, ethnicity, and socio-economic factors dependent. *J Immunoassay Immunochem*. 2020; May 3 1-16; 41(3):281-96. <https://doi.org/10.1080/15321819.2020.1728543> [doi].
- Villegas-Valverde C A, Kokuina E, Breff-Fonseca M C. Estimating normal values of rare T-lymphocyte populations in peripheral blood of healthy Cuban adults. *MEDICC Rev*. 2018; 20(4): 20-6. <https://www.medigraphic.com/pdfs/medicreview/mrw-2018/mrw184f.pdf>
- Mandy F F, Nicholson J K A, McDougal J S. Guidelines for performing single-platform absolute CD4+ T-cell determinations with CD45 gating for persons infected with human immunodeficiency virus. <https://www.cdc.gov/mmwr/preview/mmwrhtml/rr5202a1.htm>. Updated 2003.
- Beckman Coulter I. AQUIOS CL flow cytometer instruction for use. 2015. <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/techdocs?docname=B21896AB.pdf>
- Grossi V, Infantino M, Meacci F, Bellio E, Bellio V, Ciotta G, et al. Comparison of methods and TAT assessment: Volumetric AQUIOS CL and bead-based FACS CANTO II cytometers. *Cytometry B Clin Cytom*. 2018; 94(4): 674-8. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21513>.
- CLSI. Defining, establishing, and verifying reference intervals in the clinical laboratory; approved guideline - third edition. CLSI document EP28-A3c. . 2016. https://clsi.org/media/2458/ep28a3ce_sample.pdf
- Solberg H E. The theory of reference values part 5. Statistical treatment of collected reference values. determination of reference limits. *J Clin Chem Clin Biochem*. 1983; 21(11): 749-60. PMID: 6655449
- Parra-Ortega I, Salceda-Rangel KS, Najera-Martínez N, López-Martínez B, Ortiz-Navarrete V, Olvera-Gómez I. Determinación y cuantificación de subpoblaciones de linfocitos T y células

- natural killer* en sangre periférica de individuos sanos por citometría de flujo. Bol Med Hosp Infant Mex. 2019; 76(2): 66-78. <https://doi.org/10.24875/BMHIM.18000083>.
- 13.- Andreu-Ballester J C, Garcia-Ballesteros C, Benet-Campos C, Amigó V A, Mayans J, et al. Values for alphabeta and gammadelta T-lymphocytes and CD4+, CD8+, and CD56+ subsets in healthy adult subjects: Assessment by age and gender. Cytometry B Clin Cytom. 2012; 82(4): 238-44. <https://doi.org/10.1002/cyto.b.21020> [doi].
 - 14.- Instituto Nacional de Estadísticas (INE). Síntesis de resultados censo 2017, Chile. <http://www.censo2017.cl/descargas/home/sintesis-de-resultados-censo2017.pdf>.
 - 15.- NU. CEPAL. CELADE. Atlas sociodemográfico de la población y pueblos indígenas, Región Metropolitana e Isla de Pascua, Chile. 2010. <https://repositorio.cepal.org/handle/11362/1261>.
 - 16.- Shahal-Zimra Y, Rotem Z, Chezar J, Shochat T, Ross L, Pickholtz I, et al. Lymphocyte subset reference ranges in healthy Israeli adults. Isr Med Assoc J. 2016; 18(12): 739-43. PMID: 28457077.
 - 17.- González-Mancera M S, Bolanos N I, Salamanca M, Orjuela G A, Rodríguez A N, González J M. Percentages of CD4+CD8+ double-positive T lymphocytes in the peripheral blood of adults from a blood bank in Bogota, Colombia. Turk J Haematol. 2020; 37(1): 36-41. <https://doi.org/10.4274/tjh.galenos.2019.2019.0256>.
 - 18.- Jentsch-Ullrich K, Koenigsmann M, Mohren M, Franke A. Lymphocyte subsets' reference ranges in an age- and gender-balanced population of 100 healthy adults--a monocentric german study. Clin Immunol. 2005; 116(2): 192-7. [https://doi.org/S1521-6616\(05\)00117-8](https://doi.org/S1521-6616(05)00117-8).
 - 19.- Klein S L, Flanagan K L. Sex differences in immune responses. Nat Rev Immunol. 2016; 16(10): 626-38. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.90>.
 - 20.- Torres A J, Angelo A L, Silva M O, de Carvalho Bastos M, Ferreira de Souza D, Amaral Inocência L, et al. Establishing the reference range for T lymphocytes subpopulations in adults and children from Brazil. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 2013; 55(5): 323-8. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652013000500005>.
 - 21.- Condor J M, Alvarez M, Cano L, Matos E, Leiva C, Paredes J A. Reference intervals for peripheral blood lymphocyte subsets in healthy adults in Lima, Peru. Rev Peru Med Exp Salud Pública. 2013; 30(2): 235-240. <https://doi.org/S1726-46342013000200012>.
 - 22.- Choi J, Lee S J, Lee Y A, Maeng H G, Lee J K, Kang Y W. Reference values for peripheral blood lymphocyte subsets in a healthy Korean population. Immune Netw. 2014; 14(6): 289-95. <https://doi.org/10.4110/in.2014.14.6.289>.
 - 23.- Saathoff E, Schneider P, Kleinfeldt V, Geis S, Haule D, Maboko L, et al. Laboratory reference values for healthy adults from southern Tanzania. Trop Med Int Health. 2008; 13(5): 612-25. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2008.02047.x>.
 - 24.- Angulo G B, Escorza C A, González A A, Jiménez M Á, Bruno A I. Determinación de intervalos de referencia de linfocitos CD3, CD4, CD8 y razón CD4/CD8 por citometría de flujo en población adulta sana mexicana. Rev Latinoam Patol Clin Med Lab. 2016; 63(1): 34-42.