

11220-

3
24

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

I. S. S. T. E.

HOSPITAL REGIONAL "LIC. ADOLFO LOPEZ MATEOS"

DETERMINACION DE SUBPOBLACION DE LINFOCITOS

EN SANGRE DE CORDON UMBILICAL DE

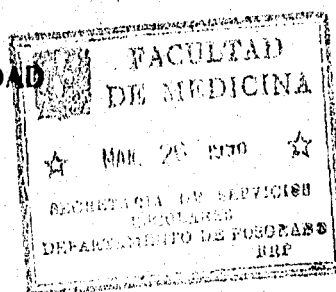
RECIENTES NACIDOS SANOS

TRABAJO DE INVESTIGACION QUE PRESENTA EL

DR. TOMAS LOPEZ HERBERT

PARA OBTENER EL DIPLOMA DE LA ESPECIALIDAD

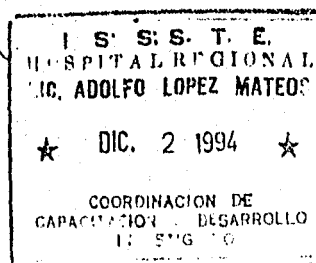
EN INMUNOLOGIA CLINICA Y ALERGIA



[Signature]
DR. JERONIMO SIERRA GUERRERO
Coordinador de Capacitación y
Desarrollo e Investigación.

[Signature]
DR. MODESTO OREA SOLANO
Profesor Titular del Curso.

[Signature]
DR. ALFREDO CHAVEZ OEST
Coordinador de Medicina Interna.



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

1996



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

11220
5
29


DETERMINACION DE SUBPOBLACION DE
LINFOCITOS EN SANGRE DE CORDON
UMBILICAL EN RECIEN
NACIDOS SANOS.

A U T O R : DR. TOMAS LOPEZ HERBERT


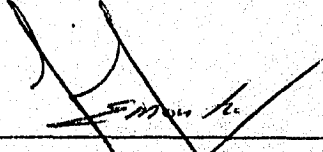
D O M I C I L I O : PATRIOTISMO 774-24 COLONIA
MIXCOAC DELEG. B. JUAREZ
MEXICO, D.F.
TEL. 6-15-07-25

C O L A B O R A D O R E S : DR. LUIS TERAN ORTIZ
Q.F.B. ANGEL CAMARENA O.
DR. JAVIER GOMEZ VERA
DR. MODESTO OREA SOLANO

A S E S O R : DRA. GRACIELA FLORES S.



DR. ENRIQUE ELGUERO PINEDA
JEFE DE INVESTIGACION

DR. ENRIQUE MONTIEL TAMAYO
JEFE DE CAPACITACION
Y DESARROLLO.

DEDICATORIA

A MIS PADRES:
Siempre han estado conmigo
q.e.p.d.

A MI ESPOSA:
SANTA te doy gracias por tu
abnegación y confianza en
estos años. TE AMO

A MIS HIJOS:
LUIS TOMAS, IVAN DAVID Y
EDGAR MOISES, que mi esfuerzo
les sirva de aliciente para un
futuro mejor, nunca desesperen.

A MIS HERMANOS:
EDUARDO, EUGENIO, ARTURO Y
JULIO, estoy orgulloso de
por sus palabras de aliento.

A MIS PROFESORES:
DRA FLORES, DR. OREA DR. GOMEZ
nunca olvidaré el que hallan
compartido sus experiencias.

A MIS COMPAÑERAS DE TRABAJO:
QUETITA Y LUCY, les agradezco
su apoyo incondicional, me
llevo un grato recuerdo de U

A MIS COMPAÑEROS DE GENERACION
ERNESTO, VICTOR Y JOSE a quienes les
pido olviden los malos momentos y que
me recuerden en los gratos instantes

INDICE

1. RESUMEN

2. INTRODUCCION

3. MATERIAL Y METODO

4. RESULTADOS

5. DISCUSION

6. CONCLUSIONES

7. GRAFICAS

8. TABLAS

9. BIBLIOGRAFIA

RESUMEN

Se realizó un estudio prospectivo, incluyéndose 30 muestras sanguíneas de cordón umbilical de recién nacidos sanos, hijos de madres sin enfermedad ni atopia, para determinar su subpoblación de linfocitos mediante la técnica de citometría de flujo y compararla con otro grupo de población -- control, siendo el resultado: CD3 45% CD4 30% CD8 20% en el porcentaje total en **población mestiza mexicana** y CD3 55% CD4 35% CD8 29% en el **grupo anglosajón** y para la cuenta -- absoluta CD3 1.7 CD4 1.1 CD8 0.5 para la **población mestiza mexicana** y CD3 3.1 CD4 1.9 CD8 1.5 en el **grupo anglosajón**. Concluyendo que los valores en nuestra población son más bajos comparados con otros grupos de población, con una p de - 0.0001, estadísticamente significativa.

Palabras claves: subpoblación de linfocitos, citometría de flujo.

S U M M A R Y

The lymphocyte subpopulation from 30 healthy newborns were determined from umbilical cord blood samples by flow cytometry in a prospective study. Their mothers had not history of atopy or other diseases and the subpopulation distribution were compared with a control group. The results --- were as follows: CD3 45% CD4 30% CD8 20% for the mexican mestizos population ; and CD3 55% CD4 35% CD8 29% for the control group. The absolute count of subpopulation were -- CD3 1.7 CD4 1.1 CD8 0.5 for the mestizos and CD3 3.1 --- CD4 1.9 CD8 1.5 for the controls. The obtained p values - were less than 0.0001 (p = 0.0001) wich demonstrate that there are differences in the lymphocyte subpopulations between. distinc populations groups.

Keywords: lymphocyte subpopulations, flow cytometry.

INTRODUCCION

El sistema inmune se descubrió por las respuestas de los animales a los procesos infecciosos. Con el transcurso del tiempo y en especial durante la última década a tomado tal importancia, que todas las alteraciones a nivel de distintos aparatos y sistemas del organismo humano, existe la participación tanto de la inmunidad celular como de la inmunidad humoral, en sus funciones de protección contra agentes nocivos externos (no propio), así también, como de lesión contra ciertos órganos blanco (lo propio).

De esta manera ha sido la evolución de la inmunología, que a pasado por distintas fases, desde la serología (Karl Landsteiner 1900), inmunología celular (Albert H. Coons 1941), inmunología molecular (Rodney R. Porter 1959) y la inmunogenética (Hugh O. McDevit 1968), que nos a permitido identificar procesos bioquímicos y biomeleculares, para mayor entendimiento de los cuadros patológicos y las futuras aplicaciones terapéuticas de estos descubrimientos (1).

Por lo anterior, la inquietud de realizar un trabajo en donde podamos contar con cifras de escala de valores, en este caso de subpoblacion de linfocitos (CD3/CD4/CD8), en población mestiza mexicana, pues no se pueden comparar como referencia, los parametros de otros grupos de población, por ejemplo la anglosajona, ya que existen diferencias principalmente de fenotipos inmunológicos, con lo cual no se pueden evaluar adecuadamente los padecimientos, cuando los utilizamos como apoyo diagnóstico de laboratorio.

Además, los valores relacionados con el nacimiento y las distintas edades de la infancia y la edad adulta, no han sido determinados sistemáticamente. Unos pocos estudios detallan los rangos referentes a los linfocitos T y B y sus subgrupos tanto en niños como en adultos, pero utilizando solamente algunos marcadores linfocíticos. Muchos trabajos se han realizado, pero ninguno con resultados estadísticamente significativos y por tanto las referencias en adultos no pueden ser utilizadas para realizar determinaciones de referencia de subpoblación de linfocitos en recién nacidos, por las discrepancias existentes entre las cifras tanto porcentuales como en su cuenta absoluta de niños y adultos hasta ahora reportados (2).

MATERIAL Y METODO

Se obtuvieron 30 muestras de sangre de cordón umbilical de recién nacidos, atendidos en las áreas de tocoquirurgica de los hospitales regionales Lic. Adolfo López Mateos e Ignacio Zaragoza del ISSSTE de la ciudad de México, D.F.

Los criterios de inclusión para el estudio, fueron recién nacidos sanos, de ambos sexos, obtenidos indistintamente por parto eutócico o cesarea, con apgar al nacer de 8 o superior. De madres sin antecedentes de enfermedad o atopía.

Los criterios de exclusión comprendieron a aquellos recién nacidos con sufrimiento fetal agudo y crónico, cuyas madres tuvieran antecedentes positivos de atopía, obtenidos por partos distócicos, valoraciones de apgar menores de 8 y silverman de 1 o mayores, hijos de madre con SIDA, citomegalovirus o con ebstein-bar.

Los criterios de eliminación se aplicaron a recién nacidos -- con antecedentes de enfermedad no identificada al momento del parto, complicaciones en el neonato inmediato, informe previo de ingesta de inmunosupresores por parte de la madre, muestras mal conservadas y las que no hallan sido procesadas.

Los especímenes sanguíneos se recolectaron durante los primeros 10 minutos de vida extrauterina, mediante venopunción, -- utilizandose 2 tubos de cristal (vacutainer) y agregandose -- 2 cc de sangre a cada uno de ellos, con y sin anticoagulante respectivamente. Para su procesamiento fueron enviadas al laboratorio de **inmunología del instituto nacional de enfermedades respiratorias (INER)**, del sector salud.

El metodo de laboratorio utilizado fué con la técnica de la **citometria de flujo de 2 colores y el uso de anticuerpos monoclonales**.

En cuanto al grupo control, se tomó como referencia el reporte de estas líneas celulares, también de sangre de cordón y -- con la misma técnica de laboratorio que apareció en la revista *immunology today* de 1992 por la Dra. Irene Hannet. El analisis estadístico fué realizado mediante la prueba de **shapiro-wilk** corroborada con prueba de **simetria para las variables**.

TECNICA

1. COLECCION DE MUESTRAS: sangre colectada por venopunción en tubos VACUTAINER EDTA (K3).

PRECAUCIONES: se utilizaron guantes de latex para la manipulación de las muestras sanguíneas.

2. A cada muestra de sangre de 2 cc; una en un tubo conteniendo anticoagulante y otra muestra en un tubo sin anticoagulante, se le agregó un conjugado de Reagentes Monoclonales.

3. Los tubos fueron incubados a Temperatura Ambiente durante 10 minutos, posteriormente centrifugadas a 300 RPM por 5 minutos.

4. El supernadante fué aspirado y se agregaron 1.0 ml de PBS al 0.1% y dicha mezcla centrifugada por 5 minutos a temperatura ambiente a 200 RPM.

5. Posteriormente se agregaron 0.5 ml de Formaldehido e inmediatamente las células son sometidas al analisis por medio de CITOMETRIA DE FLUJO.

6. NOTA: las muestras fueron almacenadas a 2 u 8 grados y el analisis de la tinción del lisado, se realizó dentro de las siguientes 24 horas

CITOMETRO DE FLUJO BECTON DICKINSON
DETECCION DE ANTIGENO POR ANTICUERPOS MONOCLONALES
HUMANOS; ANTI-LEU-3a (CD4)
 ANTI-LEU-2a (CD8)
 ANTI-LEU-4 (CD3)

RESULTADOS

De las 30 muestras de sangre obtenidas, 8 de las cuales fueron desechadas de acuerdo a los criterios de eliminación establecidos en el protocolo (2 muestras por complicaciones en el neonato inmediato, 3 por mala técnica de conservación y 3 por no haberse procesado adecuadamente), 22 especímenes, correspondiendo 12 al sexo femenino (55%) y 10 al sexo masculino (44.5%), - como lo muestra la figura No. 1.

Los resultados obtenidos en nuestra población mestiza mexicana mediante la técnica de citometría de flujo y sometidos a análisis estadístico con la prueba de shapiro-wilk y con una p de - 0.0001 para cada una de las variantes tanto en porcentajes - totales como en su cuenta absoluta, figura No. 2. Corroborando se los resultados mediante la prueba de simetría para las variables, representado en la fig. No. 3 y 4.

Comparamos los resultados obtenidos en nuestra población con - lo reportado en población anglosajona (immunology today 1992), y como lo muestra la fig. No. 5, difieren en forma importante, asimismo comparamos otros reportes con otros grupos de población (5-6), en donde se determinó que la cuenta media de linfocitos en sangre de cordón umbilical fué 2 veces más que en la - de los adultos normales a pesar de que la técnica utilizada -- fué la de **formación espontánea de rosetas**, pero en dicho estudio tanto el número de muestras de sangre de cordón, así como del grupo adulto de control fué pequeño, con una distribución - asimétrica de las variables, por lo que no se le consideró estadísticamente significativo (se tomaron 24 muestras de cordón umbilical de infantes al nacimiento) (3).

En la tabla 1 se encuentran comparados tanto los resultados e- en porcentajes totales como en su cuenta absoluta obtenidos en nuestra población mestiza mexicana y del grupo control de población anglosajona, observandose que existe una diferencia im- portante, como ya habíamos mencionado.

De esta manera comprobamos, que no podemos seguir tomando como base los parametros de otros grupos de población, ya que existen diferencias en cuanto a características antropométricas, - tipo de alimentación y por demás importante los fenotipos inmu- nológicos para cada raza (antígeno leucocitario de histocompatibilidad-HLA), siendo aún más significativos nuestros resulta- ya que se utilizó la misma técnica de **citometría de flujo y el uso de anticuerpos monoclonales**.

La importancia de saber interpretar el significado clínico con la presencia de estos marcadores de superficie y su discriminación morfológica nos permite prevenir y diagnosticar adecuadamente determinados padecimientos en donde se ven afectados los valores de estas líneas celulares, así como poder establecer un estado de actividad de la enfermedad.

Por otra parte las intervenciones coordinadas de múltiples moléculas de membrana con los receptores de células T para antígenos (TCR-CD3), son pre-requisitos para la activación de las células T y por ende la participación de la subpoblación CD4-CD8 en padecimientos no solo alérgicos, sino también autoinmunes y de malignidad, interviniendo además en forma importante el complejo principal de histocompatibilidad (CPH), de clase I y clase II para padecimientos autoinmunes como malignos y en especial de clase II para los padecimientos de tipo alérgico del tipo HLA-DR.(3).

Con respecto a los padecimientos alérgicos (atópicos), se ha podido demostrar la intervención de los subgrupos de las células TCD4 como son la línea celular Th2, como responsables de la liberación de citocinas IFN-gamma, IL-2, que junto con otras células (células plasmáticas, monocitos macrófagos, eosinófilos, etc), van a perpetuar el estado inflamatorio como respuesta al estímulo antigénico.

Por todo lo anterior, es de relevancia el que podamos contar con valores de estas subpoblaciones de linfocitos T en población nacional y su aplicación a la práctica médica y por ende poder determinar mediante la obtención de sus resultados, para metros confiables.

DISCUSION

Los resultados de este estudio a pesar de haberse realizado en un número pequeño de sujetos, son significativos no solamente en forma estadística, sino que nos permitirá dejar las bases para desarrollar estudios posteriores con grupos mayores de población, así como permitirnos tomar como referencia valores propios y poderlos aplicar en forma clínica para la prevención y diagnósticos tempranos de múltiples padecimientos que pudieran ser detectados desde el nacimiento como es el caso de **inmunodeficiencias congénitas, malignidades como leucemias** y otros padecimientos que ya hemos mencionado anteriormente.

También debemos tomar en cuenta que existen otros factores que están implicados en cuanto a los resultados de la determinación de las subpoblaciones de linfocitos. Miyawaky y cols (1984), reportaron que el porcentaje de las distintas subpoblaciones de linfocitos tienen un marcado ritmo circadiano y que los resultados obtenidos son distintos en diferentes horarios en que se toman las muestras de sangre, pero son necesarios más estudios para comprobar lo anterior (7). De acuerdo a Richte y cols también mencionan variaciones en cuanto a los valores y el ritmo circadiano.

G. Kingsley y cols (1988), observaron una marcada actividad supresora de los linfocitos T de cordón umbilical, a los determinados con los linfocitos de muestras sanguíneas en adultos de la misma población de estudio, determinada en paralelo con su aumentada producción de **lectina** y pobre producción de **inmunoglobulinas** en co-cultivos experimentales (8).

Otros estudios realizados en donde se toman como base los valores de estas subpoblaciones en procesos patológicos como por ejemplo el inducido por el **plasmodium chabaudi**, cuyo comportamiento como **superantígeno**, se puede determinar por el papel importante que juegan los linfocitos TCD4 en la fisiopatología del padecimiento y de los linfocitos TCD8 en la resolución de la infección primaria, evitando así la persistencia de la parasitemia y por ende la infección crónica (9-10).

También la participación de algunas **interleucinas** como la **IL-7** que promueve el crecimiento de los linfocitos **CD3/CD4/CD8** en su forma de células precursoras y que pueden llegar a bloquear las vías de diferenciación de los receptores de las células T alfa y beta, referido en los estudios de J. Plum (1993) y que llega a la conclusión que en algunos padecimientos, en futuro tuviera aplicaciones como terapias génicas (11).

Hans Yssel y cols (1992), encontraron que la IL-10 ha sido producida por clonas de células TCD4 de las subclonas Th2 en modelos murinos y que en modelos humanos la IL-10 es producida por las subclonas tanto Th0, Th1 y Th2, posterior tanto a la activación policlonal como a la activación antígeno-específica, siendo de importancia dichas observaciones ya que indican un papel regulatorio de la IL-10 en las fases tardías de la respuesta inmune (12)

También en investigaciones realizadas en México, se observó -- que en los eventos no solamente de tipo autoinmune, infeccioso (por superantígeno, citomegalovirus, etc), síndromes de inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, sino también en aquellos eventos pre y postnatales que propician la sensibilización alérgica, se piensa que las células Th pueden ser la célula blanco para los factores genéticos regulatorios que controlan la expresión del fenotipo respondedor de Ige, observaciones que han sido demostradas en niños de familias atópicas y alto riesgo para enfermedades alérgicas, que tienen una lentitud en la maduración de células T postnatales, con producción de IL-4 e IFN-gamma. La evidencia muestra que la respuesta inmune puede ser activada específicamente a alérgenos aún in utero, demostrada esta por la presencia de células TCD4 -- Th2 en sangre de cordón umbilical de recién nacidos (13-14).

Las células TCD4 de sangre periférica humana pueden ser divididas dentro de una población CD45RA y CD45RO positivas con diferentes capacidades funcionales. Posterior a la estimulación las células CD45RA producen IL-2 mientras que las CD45RO contienen productos de la IL-2 así como IL-4 e IFN-gamma (15-16-17). Otros investigadores han observado que durante la activación de las células T in vitro, la expresión de CD45RA declina sobre muchas células siendo inducido un fenotipo CD45RO (18-19-20). Estos hallazgos junto con las observaciones, de que las células T con especificidad para presentar antígeno, están contenidas dentro de la población CD45RO en alta frecuencia, llevando esto a la suposición de las células T CD45RA y CD45RO representan células de memoria y vírgenes respectivamente (21-22-23). En contraste las células T CD45RA y CD45RO responden con la secreción y proliferación de citocinas posterior a una mínima unión con el TCR-CD3. En resumen se ha demostrado que la predominancia de células T cooperadoras inductoras de supresión en sangre de cordón pueden determinarse por muchas de las anomalías descritas por linfocitos de cordón, pero serán necesarios más estudios en cuanto a las implicaciones en el campo de la **inmunobiología materno-fetal** y las aplicaciones de las subpoblación de linfocitos (24-25-26).

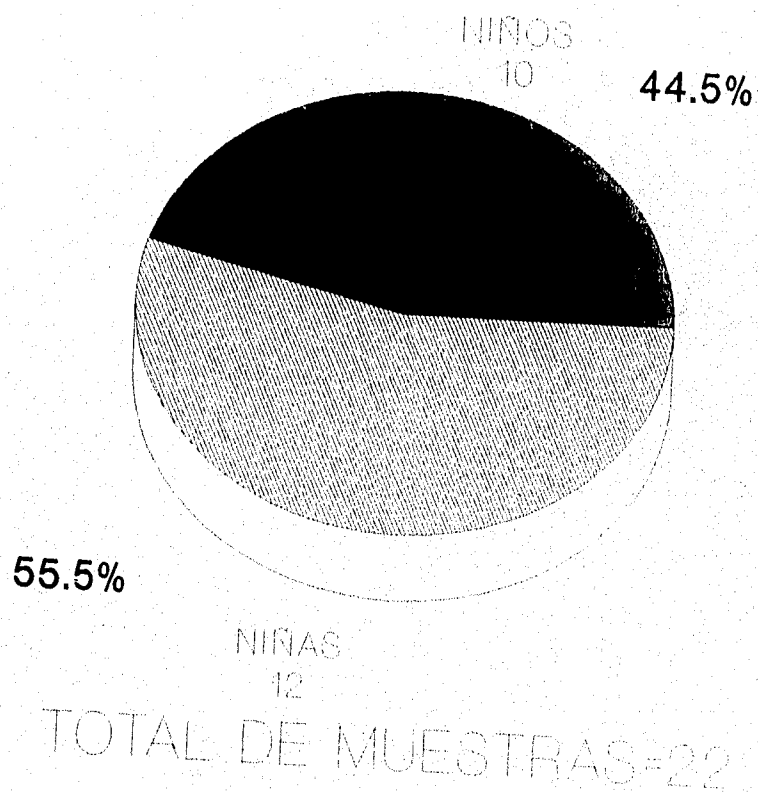
ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

CONCLUSIONES

1. A pesar de haber sido una cohorte pequeña de sujetos de estudio, los resultados fueron estadísticamente significativos, en comparación al grupo control cuyo resultado tuvo una distribución asimétrica.
2. Los resultados obtenidos servirán como base para estudios posteriores con grupos de población mayores y no solamente en recién nacidos, sino en las diferentes edades de la infancia y la edad adulta.
3. Se comprobó que existen marcadas diferencias tanto en términos porcentuales como de cuenta absoluta de estas subpoblación dentro de los linfocitos, comparadas con otros grupos de población, correspondiendo valores más bajos para nuestra población mestiza.
4. Estos parámetros podrán ser únicamente tomados como valores de referencia, ya que, por lo pequeño del tamaño de la muestra, no podrán ser extrapolados a la población en general.
5. Por último, es importante que hagamos conciencia de que podemos contar con valores propios de esta subpoblación de linfocitos, así como de otras líneas celulares y aplicarlas en la práctica clínica en nuestra población y dejar de tomar otros parámetros como apoyo diagnóstico, por las limitantes de las diferencias demostradas y que no dan confiabilidad

FIGURA 1

DISTRIBUCION POR SEXO



N

FIGURA 2

MEDIA

LA PRUEBA DE SHAPIRO-WILK DEMOSTRO QUE LEUCOCITOS
CD3,CD4,CD8 SE DISTRIBUYEN NORMALMENTE
(LA P' MAS PEQUEÑA FUE DE P=0.247 EN CD3
Y LA MAS GRANDE FUE EN LEUCO CON P=0.527)

■ P<0.0001 ▨ P<0.0001 □ P<0.0001

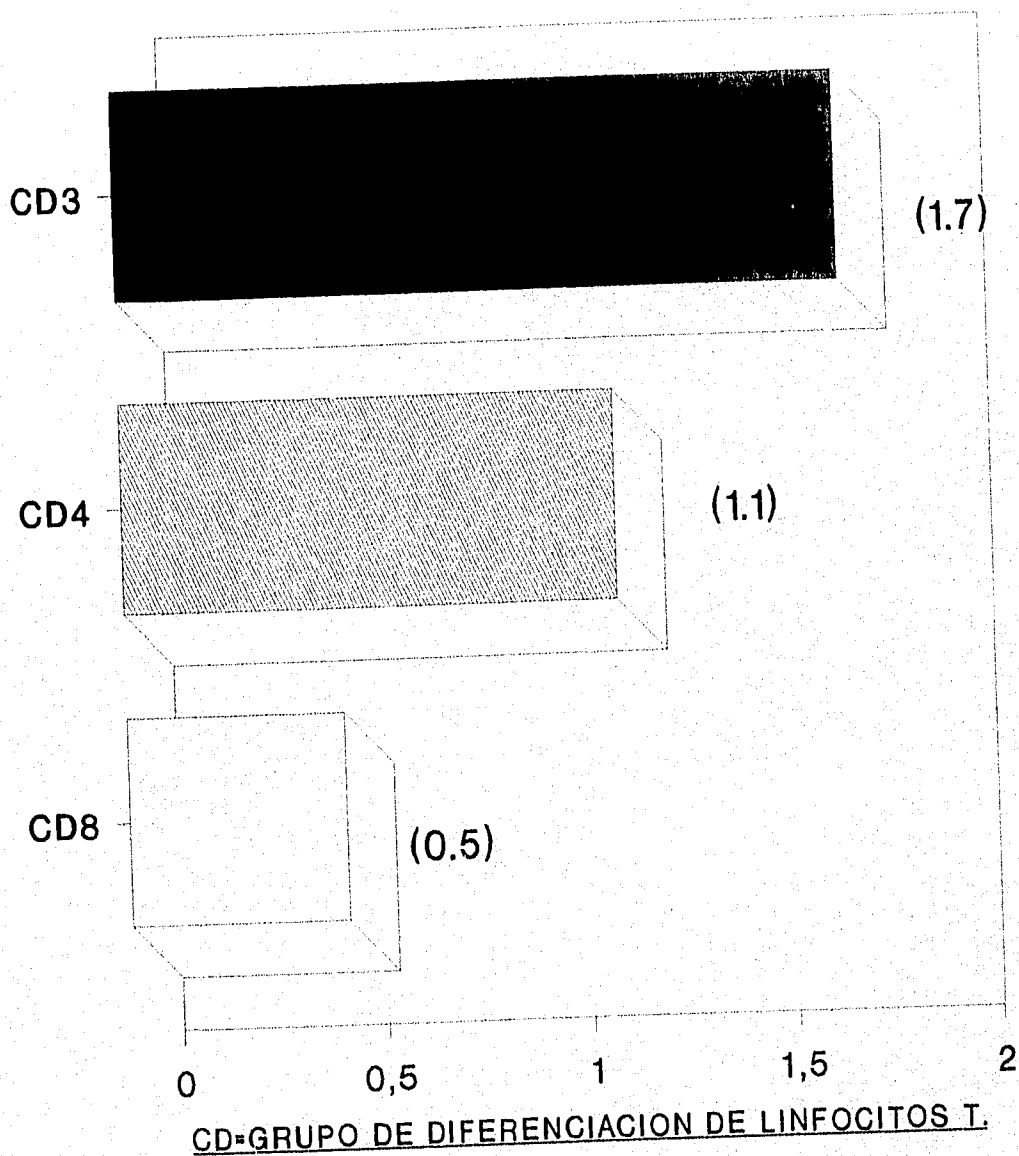


FIGURA 3.

PRUEBA SIMETRICA PARA LAS VARIABLES.

ESTO INDICA QUE LAS VARIABLES SON SIMETRICAS
CONFIRMANDO LA NORMALIDAD DE LA PRUEBA
DE SHAPIRO-WILK.

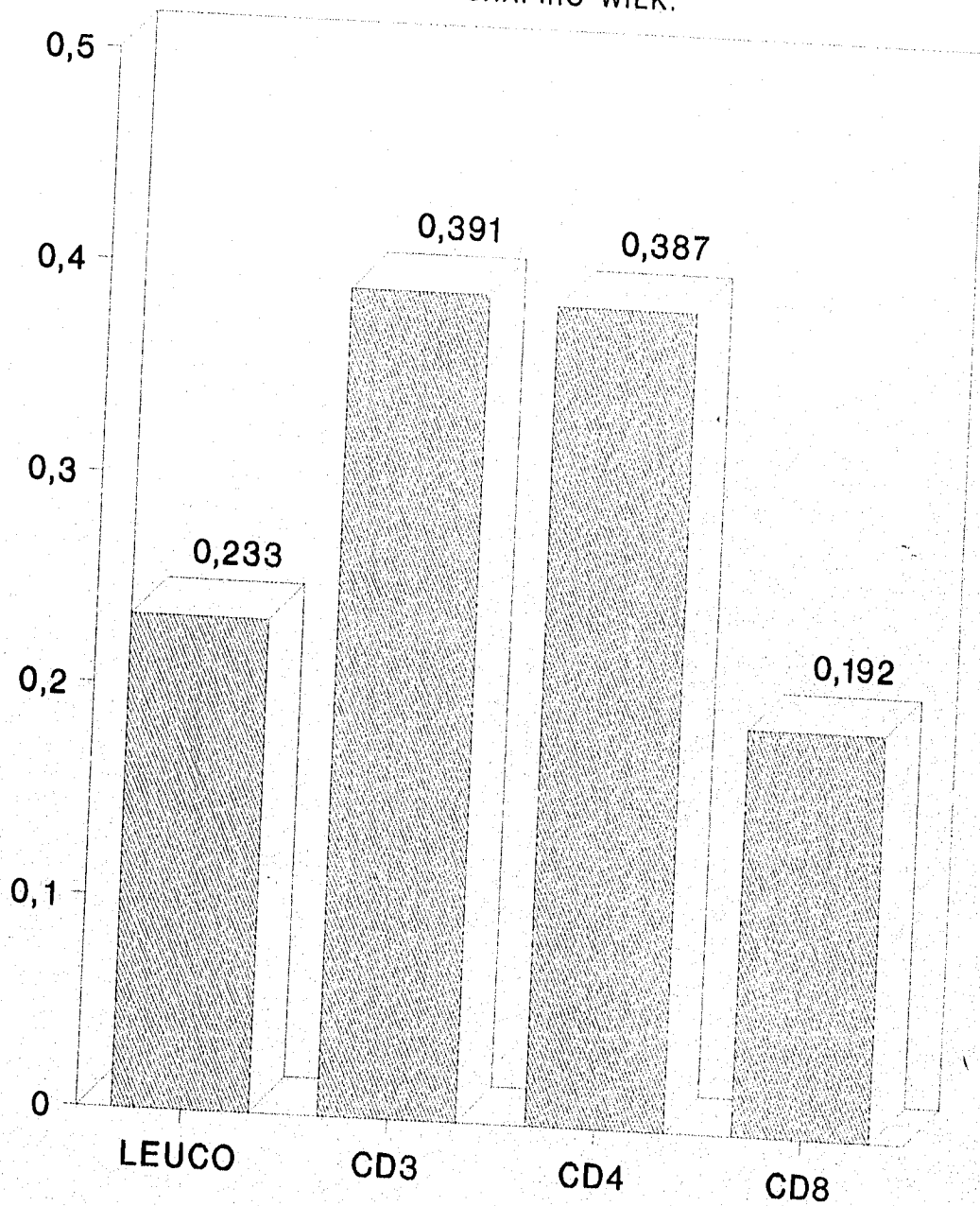


FIGURA 4

VARIABLE

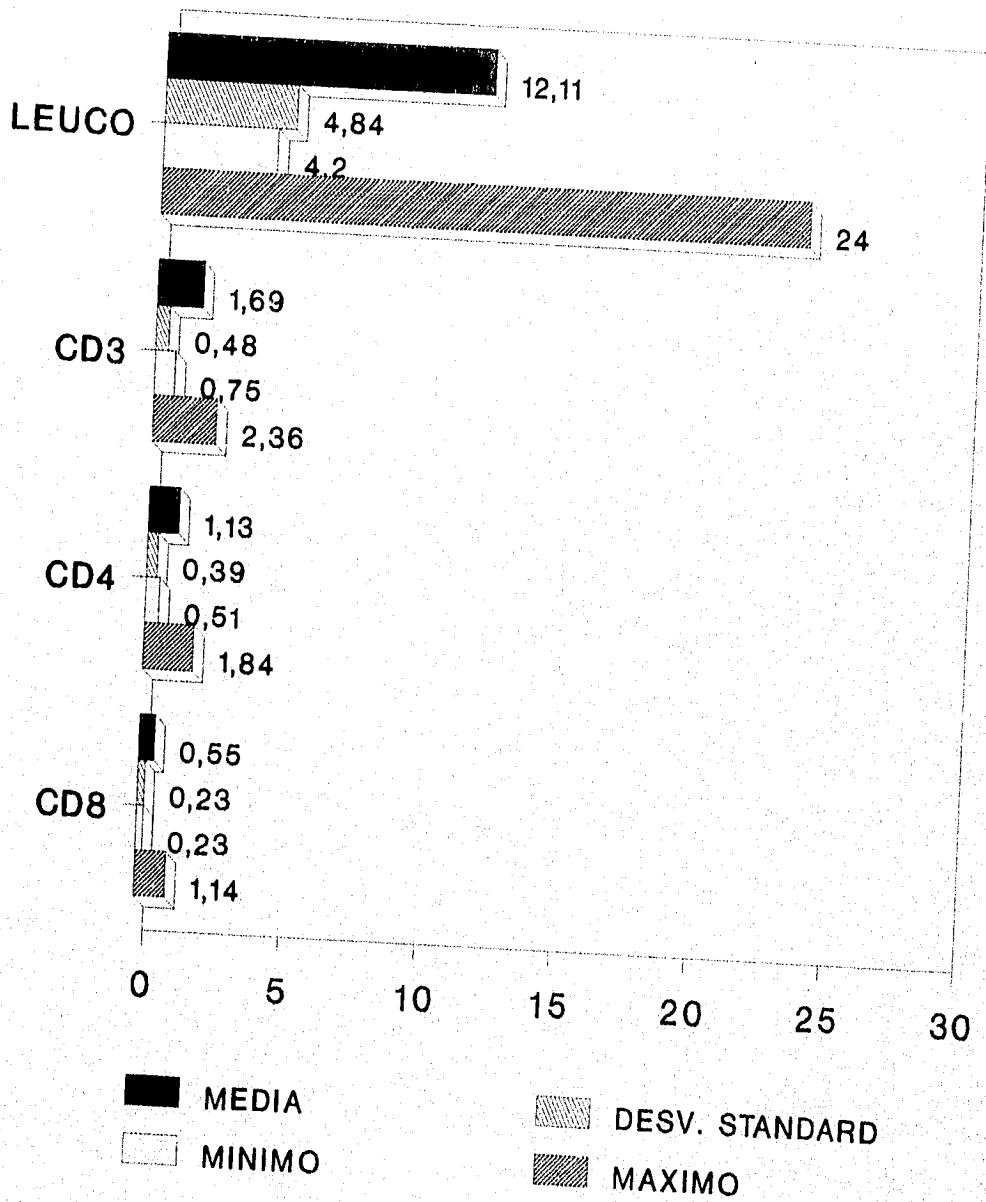


FIGURA 5

VALORES COMPARATIVOS DE SUB-POBLACION DE LINFOCITOS
EN POBLACION ANGLOSAJONA IMMUNOLOGY TODAY, 1992.

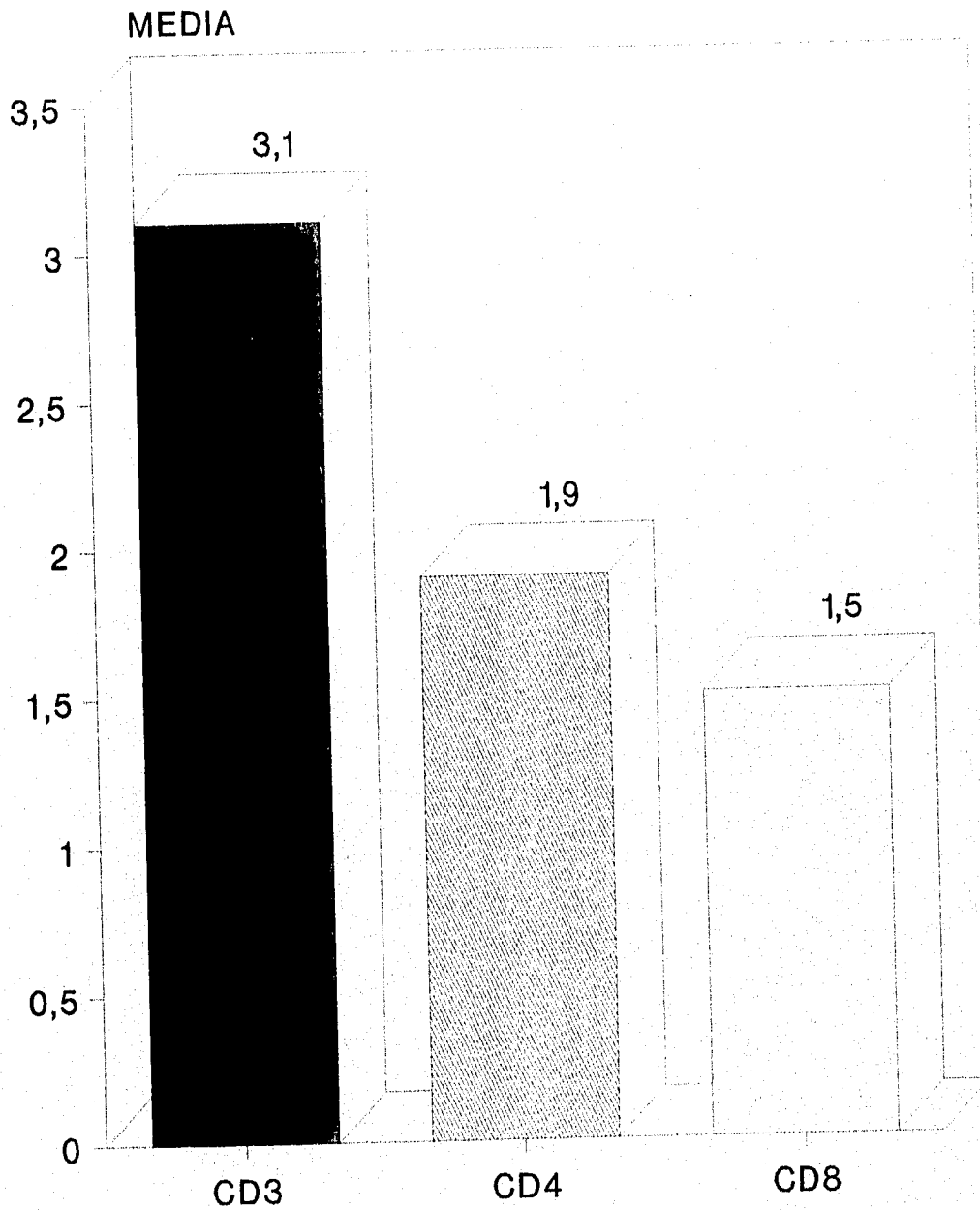


TABLA 1

	<u>PORCENTAJES TOTALES</u>		
	CD3	CD4	CD8
POBLACION NACIONAL	45%	30%	20%
POBLACION ANGLOSAJONA	55%	35%	29%

	<u>CUENTA ABSOLUTA</u>		
	CD3	CD4	CD8
POBLACION NACIONAL	1.7	1.1	0.5
POBLACION ANGLOSAJONA	3.1	1.9	1.5

BIBLIOGRAFIA

1. Daniel P. Stites Abba I. Terr Immunologia básica 1992 7a. edición p.p. 5-7.
2. J. Heldrup O Kalm and K Prellner Blod T and B lymphocyte subpopulation in healthy infants and children acta paediatric 1992 vol 81 125-32.
3. Irene Hannel Feza Erkeller-Yuksel Developmental and maturational in human blood lymphocyte subpopulation Immunology today 1992 vol 13 215-218.
4. Becton Dickinson Immunocytometry systems FACS 1991 -- 3a. edition 42-48.
5. A.C. Campbell Catherine R. Maroun Lymphocyte subpopulations in the blood of newborn infant Clin exp immunology 1974 vol 18 469-482.
6. Michael Julius Christiane R. Distinct roles for CD4 - CD8 as co-receptors in antigen receptor signalling -- Immunology today 1993 vol 14 177-182.
7. Yasuhiko Ohta Kenji Fujiwara Normal values of peripheral lymphocyte populations and T cell subsets at a fixed time of day: a flow cytometric analysis with monoclonal antibodies in 210 healthy adults Clin exp. immunology 1986 vol 64 146-149.
8. Gabrielle Kingsley C Pitzars Correlation of immunoregulatory function with cell phenotype in cordon blood lymphocytes Clin exp immunology 1988 vol 13 40-45.
9. M.M. Stevenson M.P. Tam Dieferntial induction of helper T cell subset during blood-stages plasmodium chaudi AS infection in resistant and suceptible mice Journal of immunology 1992 vol 6 77-83.
10. J. Yan Xiao-Yu Activation of T cells with material - superantigen Journal of immunology 1993 vol 15 3881-83

11. Jean Plum Magda de smedi Exogenous IL-7 promote the growth of CD3/CD4/CD8/CD44/CD25 precursors cell and blocks the differentiation pathway of TCR alfa and beta cells in fetal thymus organ culture Kournal of immunology 1993 vol 149 2706-2715.
12. Hans Yssel Rene de waal IL-10 is produced by subsets of human CD4 T cells clones and peripheral blood T cells Journal of immunology 1993 vol 149 -- 2378-84.
13. J.M. Gratama Hanneke C. Kwin F low cytometric and morphologic studies of HNK1 (leu 7) lymphocytes in relation to cytomegalovirus carrier status Clin exp. immunology 1988 vol 74 190-195.
14. D. rolien de jung Miranda Brower Maturation and differentiation-dependent responsiveness of human CD4 T helper subsets Journal of immunology 1992 vol 149 2795-2802.
15. Salma M.O.D. Kitas Production of limphokinas mRNA by CD45R positive and CD45R negative helper T cells from human peripheral blood and by human CD4 T cells clones J. immunology 1989 vol 143 907-1002.
16. Byrne J.A. Buher J.L. Differential activation requirement for activation and differentiation J. immunology 1991 vol 141 3249-56.
17. De jong P.M. Brower Human CD8 T lymphocytes can be divided into CD45RA and CD45RO cells with different requirement for activation J. immunology 1988 vol 143 2088-2094.
18. Sanders M.E. Makgoba M.W. Human memory T lymphocyte express increased levels of three cell adhesion molecules (LFA-3, CD2 and LFA-1) and three other molecules and have enhanced IFN-gamma function J. immunology 1988 vol 140 1401-1404.
19. Akbar A.N. Terry A. Tamms Loss CD45R and gain of UCHL1 reactivity is a feature of primed T cells J. immunology 1988 vol 140 2171-2178.
20. Deans J.P A.W. Boyd Transition from high to low molecule weight isoform of CD45 involve rapid activation of alternative mRNA splinling and slow turnover of surface CD45R J. immunology 1989 vol 143 1233-38.

21. Sanders M.D. C.H. Jung Enhanced responsiveness of human memory T cells to CD2 and CD3 receptor-mediated activation Eur J, immunol 1989 vol 19 803-12.
22. Merckenschlager M.L. Terry Limiting dilution analysis of proliferative responses in human lymphocyte population defined by the monoclonal antibodies --- UCHL1 implications for differential CD45 expression in T cells memory formation J. immunology 1988 vol 18 1643-58.
23. Tedder T.F. T. Clement Human lymphocyte differentiation antigen HB-10 and HB-11 if differential production of B cell growth and differentiation factor by distinct helper T cell subpopulation J. immunology - 1985 vol 134 2995-2998.
24. Van Lier R.A.W. Brower Immobilized anti-CD3 monoclonal antibodies induce accessory-cell independent lymphokine production, proliferation and helper activity in human T lymphocytes Immunology today 1989 vol 43 1238-1244.
25. Byrne J.A. J.L. Butler Virgin and memory T cells - have different requirements for activation via the CD2 molecule Immunology 1989 vol 1 24-36.
26. De jung R.M. Brower The CD27 subset of peripheral - blood memory CD4 lymphocytes contain functionally differentiated T lymphocytes that develop by persistent antigenic stimulation in vivo Eur J. immunology --- 1992 vol 22 993-1003.