

Estudio de la diferenciación celular en linfocitos de pacientes con conjuntivitis alérgica y posibles implicaciones clínicas

Dra. Grisel Hernández-Martínez,¹ Dr. Jorge Morales-Martínez,¹ Dra. Concepción Santacruz-Valdés,²
Dra. Marisela Linares,¹ Dra. María C Jiménez-Martínez^{1,3}

RESUMEN

Objetivo: Determinar la expresión de CD57+ en células estimuladas con *Dermatophagoides pteronimuss* (*Der p*) y la expresión de marcadores asociados con memoria central o periférica en células de pacientes con conjuntivitis alérgica.

Material y Métodos: Se determinó por citometría de flujo la expresión de CD57, CD27, CD45RA, CD45RO, CCR7 y Ki-67 antes y después de estimulación antigénica con *Der p*. Las diferencias estadísticas fueron evaluadas con U-Mann-Whitney, las correlaciones con Pearson y se consideraron diferencias significativas con $p < 0.05$.

Resultados: Se observó en pacientes con conjuntivitis alérgica un incremento en la frecuencia de células CD57+ antes ($p = 0.0001$) y después ($p = 0.0003$) del estímulo con *Der p*. El índice de las isoformas de CD45 (CD45RA/CD45RO) fue 3.3:1 antes del estímulo ($p = 0.02$) y de 3.1:1 ($p = 0.003$) después del estímulo antigénico. Se observaron correlaciones positivas al asociar CD45RA con CCR7 y CD27 ($r = 1$; $p < 0.0001$) y correlaciones negativas al asociar CD45RO con CCR7 y CD27 ($r = -1$; $p < 0.0001$).

Conclusiones: La frecuencia de las células CD57 se incrementó después de la estimulación específica. Observamos dos subtipos celulares en los pacientes con conjuntivitis: uno de ellos fue CD27+CCR7+CD45RA+ (memoria central), el otro fue CD27-CCR7-CD45RO+ (memoria periférica). Se requerirán de estudios funcionales para dilucidar el papel de estos dos subtipos celulares en pacientes con conjuntivitis alérgica.

Palabras clave: Conjuntivitis alérgica, marcadores diferenciación, células CD57.

SUMMARY

Objective: To determine CD57+ expression on cells stimulated with *Dermatophagoides pteronimuss* (*Der p*) and to determine cell surface markers associated with central or peripheral memory on cells from conjunctivitis patients.

Material and methods: Mononuclear cells were obtained from peripheral blood to determine CD57, CD27, CD45RA, CD45RO, CCR7 and Ki-67 expression on cells before and after antigenic stimulation with *Der p*. Data were analyzed by flow cytometry. Mann-Whitney test was used to compare statistical differences. Significant correlation was performed with Pearson test. Significant differences were considered when $p < 0.05$.

Results: We observed increased frequency of CD57 cells before ($p = 0.0001$) and after ($p = 0.0003$) *Der p* stimulation in conjunctivitis patients. CD45 isoforms index (CD45RA/CD45RO) was 3.3:1 before stimulation ($p = 0.02$) and 3.1:1 ($p = 0.003$) after stimulation. Positive correlations were observed when CD45RA was associated with CCR7 and CD27 ($r = 1$; $p < 0.0001$), negative correlations were observed when CD45RO was associated with CCR7 and CD27 ($r = -1$; $p < 0.0001$).

Conclusions: Frequency of CD57 cells increase after antigenic specific stimulation. We observed two cells subsets in conjunctivitis patients: one of them was CD27+CCR7+CD45RA+ (central memory), the other one was CD27-CCR7-CD45RO+ (peripheral memory). Functional studies are needed to elucidate the real role of these two subsets in patients with allergic conjunctivitis.

Key words: Allergic conjunctivitis, differentiation markers, CD57 cells.

¹Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP".

²Departamento de Cornea y Cirugía Refractiva, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP".

³Departamento de Inmunología, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP".

Correspondencia: Dra. María C. Jiménez-Martínez. Departamento de Inmunología, Unidad de Investigación, Instituto de Oftalmología "Fundación de Asistencia Privada Conde de Valenciana, IAP". Chimalpopoca 14, Col. Obrera C.P. 06800, Del. Cuauhtémoc, México, D.F. México. Tel. + 52 55 54 42 17 00 ext. 3212, Fax + 52 55 54 42 17 00 ext. 3206, e-mail: mcjimenezm@institutodeoftalmologia.org

INTRODUCCIÓN

Las conjuntivitis son un problema de salud reconocido oficialmente en el Diagnóstico Colectivo de Salud de México en el año 2006 (1); ahí se documentó que las conjuntivitis en general se encontraban en el séptimo lugar dentro de las diez primeras causas de morbilidad (1). De todos los tipos de conjuntivitis, se sabe que las de origen alérgico son las más frecuentes, de tal manera que las conjuntivitis alérgicas se encontraban para ese mismo año como la cuarta causa de consulta oftalmológica en el Instituto de Oftalmología "Fundación Conde de Valenciana" (2).

Debido a su alta frecuencia, el estudio de la inmunopatología de las enfermedades alérgicas es una necesidad en la actualidad. El desarrollo de esta área ha permitido generar conocimiento nuevo relacionado con el desarrollo de tratamientos novedosos o proponer marcadores biológicos que orienten la toma de decisiones terapéuticas; en este sentido se han descrito una serie de marcadores de superficie celular asociados con respuestas inmunológicas crónicas, como CD57.

CD57 es un determinante antigénico oligosacárido sulfatado también conocido como HNK-1 (por sus siglas en inglés Human Natural Killer-1) (3). Aunque CD57 se describió primero en células NK y como parte de moléculas de adhesión en células del sistema nervioso central, en la actualidad se sabe que este marcador puede expresarse en algunas subpoblaciones de linfocitos T (4). La función de CD57 en linfocitos T se desconoce, se sabe que las subpoblaciones linfocitarias que lo expresan se incrementan en estados de estimulación antigénica crónica como tuberculosis (4), artritis reumatoide (5), pars planitis (6) y asma (7).

La caracterización fenotípica de los linfocitos T CD57 fue realizada en una enfermedad inflamatoria intraocular (6), en donde se llegó a la conclusión de que los linfocitos T CD57 tenían el fenotipo CCR7-CD27-CD45RO+/CD45RA+; estas características fenotípicas correspondieron con células efectoras totalmente diferenciadas (6). Aunque se ha sugerido que los linfocitos T CD57 están involucrados con el daño intraocular, no se conoce si también participan en el daño inmunológico de las conjuntivitis alérgicas. Por lo anterior, el objetivo de este estudio fue determinar si existían cambios en la frecuencia de linfocitos CD57 después del estímulo *in vitro* con el alérgeno de pacientes con conjuntivitis alérgica y si las células estimuladas con el alérgeno expresaban moléculas asociadas con diferenciación celular de memoria/efectora.

PACIENTES, MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se incluyeron en este trabajo pacientes con diagnóstico de conjuntivitis alérgica sin otras patologías oculares agregadas, que acudieron a las consulta de inmunología y/o cór-

nea del Instituto y pacientes de la misma edad y sexo clínicamente sanos.

Material

Anticuerpos monoclonales (mAbs) y reactivos

Se compraron de Santa Cruz Biotechnology, Inc (Santa Cruz, CA, USA), anticuerpos contra CD57 humano y Ki67 conjugados a Isotiocianato de fluoresceína (FITC); el anticuerpo anti CD57 conjugado a Ficoeritrina-Cy5 (PerCy5), fue obtenido de anticuerpos del laboratorio Abcam (Cambridge, MA USA); Los mAbs contra CD27 y CD45RO conjugados a FITC se obtuvieron de e-Biosciences (San Jose, CA, USA); el anticuerpo anti CD45RA conjugado a Ficoeritrina (PE) se obtuvo a partir de BD PharMingen (San Diego, CA, USA). Los mAbs IgG contra CCR7 conjugados a PE fueron comprados a RD Systems (Minneapolis, MN, USA). El Lymphoprep (Ficoll densidad 1.077) se obtuvo de Nycomed Pharma (Nyegaard, Oslo, Norway). La saponina, el medio de cultivo RPMI 1640, PMA, ionomicina, y las sales fueron compradas de Sigma Chemical Co (St. Louis, MO, USA). El suero fetal bovino fue comprado en laboratorios HyClone (Logan, TU, USA).

Métodos

Separación de células mononucleadas (CMN)

Las CMN de sangre periférica se separaron del paquete eritrocitario por centrifugación a 1750 rpm en Ficoll-hypaque (1.077 de densidad), durante 30 minutos a 18°C. Una vez obtenidas, se lavaron en dos ocasiones con PBS y su viabilidad fue valorada por exclusión del colorante eosina, cuantificándose en un hemocitómetro.

Cultivos celulares

Las CMN obtenidas fueron cultivadas en placas de 24 pozos, colocando por pozo 1×10^6 células en 1 ml de medio de cultivo RPMI-1640 suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células se mantuvieron en una incubadora a 37°C, 5% de CO₂ con una humedad del 95% durante el tiempo de estimulación con el antígeno.

Estimulación con antígeno específico

Las células obtenidas fueron estimuladas con dosis óptimas del antígeno *Dermatophagoides pteroyissinus* (*Der p*) en placas de cultivo y se mantuvieron en esas condiciones durante 7 días.

Determinación de la concentración óptima del antígeno

Para llevar a cabo los estudios de estimulación antígeno-específica fue necesario determinar la capacidad proliferante del *Der p* en un paciente alérgico rector en la prueba cutánea al antígeno a evaluar (*Der p*). Los ensayos se realizaron por triplicado y en concentraciones crecientes de proteína. Se colocaron 1×10^6 CMN en cajas de 24 pozos, durante 7 días a diferentes concentraciones de *Der p*: (2.5, 7.5, 10, 12.5 y 15 µg). Al terminar el tiempo de estimulación, las CMN fueron recuperadas y marcadas para deter-

minar el porcentaje de células mononucleadas en proliferación por el antígeno (Ki-67).

Determinación de proteínas extracelulares por citometría de flujo

Terminado el tiempo de cultivo, las CMN fueron cosechadas y marcadas con anticuerpos monoclonales dirigidos contra CD27, CD45RA, CD45RO, CD57, CCR7 conjugados a un fluorocromo. Brevemente, 2×10^5 CMN fueron incubadas en presencia de mAbs contra las especificidades descritas durante 30 min a 4°C en oscuridad. Al terminar el tiempo de incubación las células fueron lavadas con PBS y fijadas con paraformaldehído al 1%. Los resultados fueron analizados por citometría de flujo.

Determinación de proteínas intracelulares por citometría de flujo

Al concluir el tiempo de cultivo, las CMN fueron recuperadas y fijadas con paraformaldehído al 4% por 10 min a 4°C. Hecho lo anterior, las células fueron lavadas con PBS en dos ocasiones y permeabilizadas con saponina durante 15 min a temperatura ambiente. Posteriormente las células fueron incubadas en presencia de un anticuerpo anti-Ki67 conjugado a un fluorocromo durante 30 min en la oscuridad. Al concluir el tiempo de incubación las células fueron lavadas con PBS y fijadas de nuevo con paraformaldehído al 1%, para después ser analizadas por citometría de flujo.

Análisis por citometría de flujo

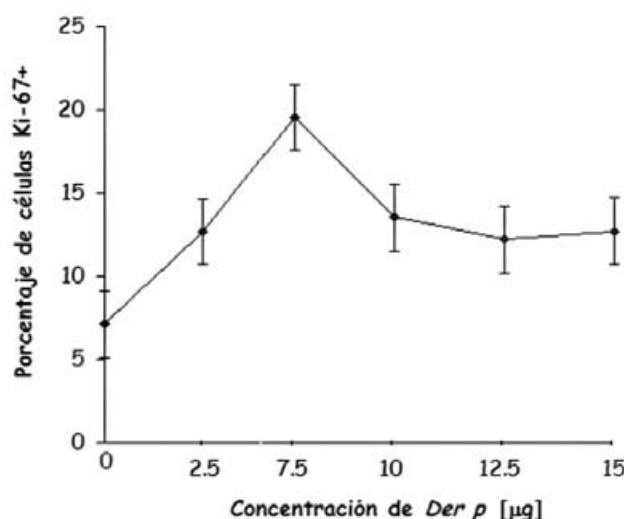
Todas las células fueron analizadas para expresión de marcadores reuniendo 5000 eventos usando un citómetro de flujo FACScan (Becton Dickinson, CA, USA) y Software CellQuest Pro. Para analizar los marcadores de superficie celular, se dibujó una ventana en la población linfocítica basándonos en las propiedades físicas (tamaño y granularidad). Se utilizaron como controles anticuerpos de isotipo de especificidad no relacionada conjugado a FITC-, ficoeritrina-Cy5- o ficoeritrina. El marcaje de fondo fue de <1% y se restó de los valores experimentales.

Pruebas cutáneas

Se realizaron pruebas cutáneas por el método de Prick contra los alérgenos más comunes encontrados en la población de nuestro país. La lectura se consideró positiva cuando la roncha formada fue mayor al control con histamina.

Análisis estadístico

Se utilizó la prueba T de Student o U-Mann Whitney para comparación entre dos grupos, dependiendo del análisis de normalidad, considerándose una $p < 0.05$ como estadísticamente significativa. El análisis estadístico se realizó con el programa SigmaStat 3.1 y las gráficas con Sigma Plot 10.0. La correlación clínica se realizó con Spearman o Pearson dependiendo de la distribución normal de las muestras.



Gráfica 1. Evaluación de la proliferación con *Dermatophagoides pteronyssinus* (Cinética de concentración). Se observan los cambios en la frecuencia de células Ki-67 a diferentes concentraciones de alérgeno en µg/ml.

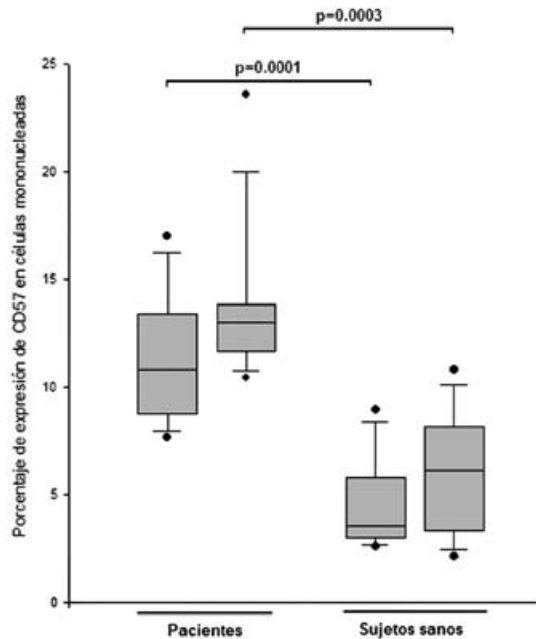
RESULTADOS

Determinación de la capacidad proliferativa del antígeno

Para determinar la concentración óptima del antígeno *Dermatophagoides pteronyssinus* (Der p) a utilizar en los ensayos *in vitro*, se realizó una cinética de concentración en CMN por triplicado. El análisis de la proliferación se realizó determinando por citometría de flujo la expresión de Ki67 en las células estimuladas encontrando que a una concentración de 2.5 µg/ml 1×10^6 céls se incrementaron 1.9 veces la frecuencia de células KI-67+ en células estimuladas que en células no estimuladas ($p=0.04$). En una concentración de 7.5 µg/ml 1×10^6 células observamos que la frecuencia de células Ki-67+ se incrementó 3 veces ($p=0.02$) en células estimuladas en comparación con las no estimuladas. Al evaluar la concentración de 10 µg/ml 1×10^6 células, encontramos que el incremento en el número de células Ki-67+ fue de 2.1 veces ($p=0.005$) en células estimuladas que en no estimuladas. Cuando se utilizaron las concentraciones de 12.5 µg/ml 1×10^6 células y 15 µg/ml 1×10^6 células encontramos un incremento de 2 veces en células estimuladas que en no estimuladas (Gráfica 1). Con los datos obtenidos se observó que la concentración óptima de antígeno que inducía una mayor proliferación fue la de 7.5 µg/ml 1×10^6 células, por lo que esa concentración fue la que se utilizó en los ensayos posteriores.

Frecuencia de células CD57+ en pacientes con conjuntivitis alérgica

La frecuencia de células CD57+ fue 2.5 veces mayor en pacientes alérgicos que en sus controles sanos ($p=0.0001$). Posterior al estímulo alérgico, la frecuencia de células CD57 se incrementó de manera similar tanto en sujetos alérgicos, como en los controles sanos. Pero al comparar la frecuencia de células CD57+ en células estimuladas de pacientes



Gráfica 2. Cambios en la expresión de células CD57+. Se observan los cambios en la frecuencia de células CD57+ antes y después del estímulo, tanto en pacientes con conjuntivitis alérgica como en individuos sanos.

versus células estimuladas de controles observamos que la frecuencia de las mismas se mantuvo 2.3 veces incrementada en pacientes ($p=0.0003$) (Gráfica 2).

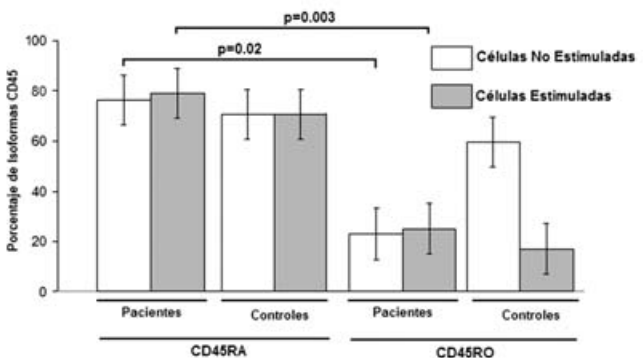
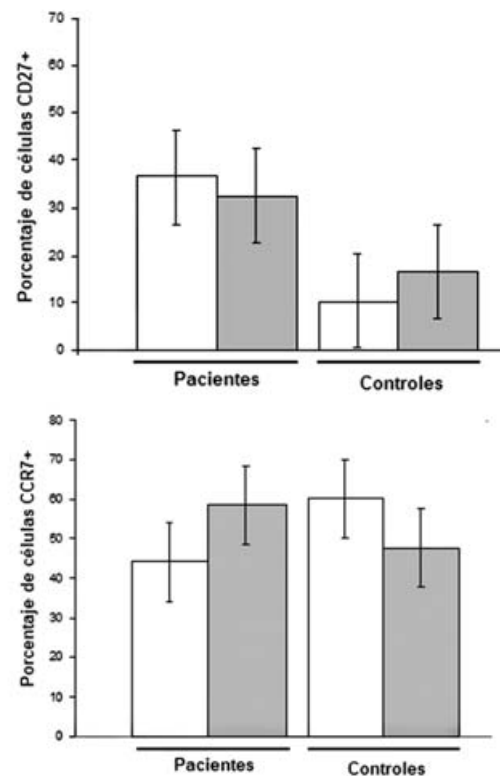
Expresión de marcadores de superficie asociados con respuestas efectoras-memoria en pacientes alérgicos y controles sanos

Al analizar la expresión de CD27 en CMN de pacientes con conjuntivitis alérgica, encontramos 3.5 veces más frecuencia de células CD27+ en pacientes que en sujetos sanos, posterior al estímulo observamos que la frecuencia de células CD27+ disminuyó 1.1 veces en pacientes, pero siguió manteniéndose 1.9 veces por encima de la frecuencia de los sujetos sanos (Gráfica 3A).

En cuanto a la expresión de las isoformas de CD45 observamos que la expresión de CD45RA en CMN no estimuladas fue 1.07 veces más en pacientes que en sujetos sanos; posterior al estímulo, la frecuencia de CMN CD27+ se mantuvo 1.1 veces por encima que los individuos control.

En el caso de la expresión de CD45RO observamos en las CMN no estimuladas de individuos con conjuntivitis una frecuencia 1.1 veces mayor que en sanos; posterior al estímulo, no se observaron cambios en la frecuencia de las células CD45RO+ en individuos alérgicos, pero sí en sanos. Al analizar la relación CD45RA/CD45RO observamos que la mayor parte de las CMN no estimuladas de pacientes con conjuntivitis alérgica fue de 3.3:1 ($p=0.02$), y posterior al estímulo la relación CD45RA/CD45RO se encontró 3.1:1 ($p=0.003$) (Gráfica 3C).

Los cambios en la frecuencia de células CCR7+ también fueron evaluados, encontrando que en CMN no estimuladas



Gráfica 3. Expresión de marcadores de superficie asociados con diferenciación celular (memoria central/periférica). Se observa la frecuencia de expresión de CCR7 en 3A, CD27 en 3B e isoformas de CD45 en 3C, tanto en pacientes como en controles, antes y después del estímulo alérgico.

de pacientes alérgicos comparadas con sus homólogas en sujetos sanos una frecuencia menor de células CCR7 de 1.1 veces en pacientes; posterior al estímulo, la frecuencia de células CCR7+ se incrementó hasta 1.2 veces por encima que lo encontrado para individuos sanos (Gráfica 3B).

Análisis de correlación entre las frecuencias de los diferentes marcadores asociados con diferenciación celular

En la Gráfica 4 se observa la correlación positiva hallada entre la frecuencia de células CD45RA+ y la frecuencia tanto de células CCR7+ (Gráfica 4A) como de células CD27+ (Gráfica 4B) en pacientes con conjuntivitis ($r=1.00$, $p<0.0001$). Consecuentemente, en el panel inferior se observa la correla-

ción negativa entre la frecuencia de células CD45RO+ y la frecuencia tanto de células CCR7+ (Gráfica 4C) como de células CD27+ (Gráfica 4D) en pacientes con conjuntivitis alérgica. ($r=-1.00$, $p<0.0001$), en ambos casos en células no estimuladas. Cabe señalar que estas mismas correlaciones se mantuvieron después del estímulo antigénico.

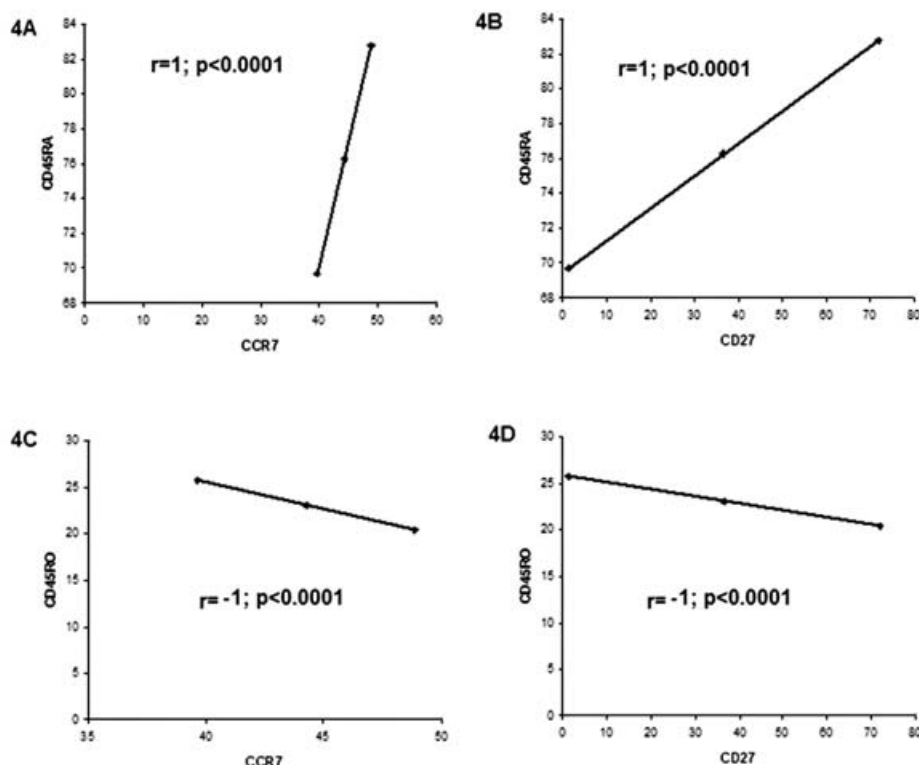
DISCUSIÓN

La participación de los linfocitos T CD57 en enfermedades oculares fue demostrada al caracterizarlos fenotípicamente en *pars planitis*. Los linfocitos T CD57 resultaron ser células de memoria periférica con capacidad efectora, CCR7-CD27-CD45RO+ en linfocitos T CD4+ y CCR7-CD27-CD45RA+ en linfocitos T CD8+ (6). En enfermedades alérgicas, se ha demostrado que los linfocitos T CD57 tienen un papel en la desregulación inmunológica observada en asma (7). En este sentido, se sabe que la cooperación de los linfocitos T CD57 favorece la diferenciación de los linfocitos B en células plasmáticas productoras de anticuerpos, favoreciendo la respuesta Th2, característica del estado alérgico (8). Es por eso que en este estudio buscamos si existían cambios en la frecuencia de células CD57+ en CMN de pacientes con conjuntivitis alérgica posterior al estímulo antigénico, además de que se determinó la frecuencia de expresión de marcadores asociados a memoria (central/periférica) en las células estimuladas.

En este trabajo encontramos que la frecuencia de expresión de CD57 en células se incrementa posterior al estímulo antigénico. Estos datos coinciden con d'Angeac y cols (9) quienes demostraron que las células CD57+ provienen de precursores CD57- en un estado de estimulación crónica *in vitro*. Es posible que los cambios en la frecuencia de estas células se asocie a la especialización de funciones celulares como producción de citocinas relacionadas con la respuesta Th2 como se ha propuesto para linfocitos CD57+ y células B (8), por lo que queda pendiente el análisis funcional para esclarecer la función de las células CD57 en conjuntivitis alérgica.

Otro objetivo de nuestro estudio fue determinar la expresión de marcadores de diferenciación celular asociados con memoria central o periférica (10) que permitieran esclarecer la función de los linfocitos en conjuntivitis alérgica, es por eso que se determinaron los marcadores de superficie CD27, CD45RA/CD45RO y CCR7 antes y después del estímulo antigénico.

Los linfocitos pueden ser definidos por la expresión o no de dos moléculas CD27 y CCR7 en células de memoria central (CD27+CCR7+) que migran a ganglio y células de memoria periférica (CD27-CCR7-) que migran al sitio de lesión (10-12). Por otra parte, las isoformas CD45 tienen que ver con memoria o virginidad al antígeno, de tal manera que la isoforma CD45RO se asocia a memoria y la isoforma CD45RA se asocia a virginidad o a un proceso de diferenciación en



Gráfica 4. Análisis de correlación de la expresión de marcadores de superficie asociados con diferenciación celular (memoria central/periférica). En 4A se observa la correlación entre CD45RA y CCR7; en 4B se observa la correlación entre CD45RA y CD27; en 4C se observa la correlación entre CD45RO y CCR7 y en 4D se observa la correlación entre CD45RO y CD27, en todos los casos en pacientes con conjuntivitis alérgica.

células efectoras, dependiendo de la asociación de CD27 y CCR7 (10-14). En este trabajo observamos que al correlacionar la expresión de CCR7 y CD27 con CD45RA y CD45RO. En pacientes alérgicos se caracterizaron claramente dos tipos de poblaciones celulares: células CD27+CCR7+CD45RA+, y células CD27-CCR7-CD45RO+. Las primeras son células con características de memoria central, su fenotipo indica migración a ganglio; las segundas tienen características de memoria periférica, lo que sugiere que podrían estar migrando al sitio de lesión. Desafortunadamente, en este trabajo no se pudieron correlacionar estos datos con la expresión de CD57, por lo que investigaciones posteriores realizando un triple marcaje citofluorométrico nos podrá decir en qué subpoblación de células CD57+/CD57- predominan.

Los resultados de esta investigación indican que en pacientes con conjuntivitis alérgica existen dos subpoblaciones celulares de memoria que podrían ser las responsables directas del estado alérgico y, consecuentemente, las reguladoras del estado efector final que se traduce en los datos clínicos del paciente en dos niveles: ganglionar y conjuntival. Para conocer el verdadero papel en la alteración inmunológica ocular de estas subpoblaciones celulares será necesario desarrollar posteriormente estudios funcionales.

En conclusión, las células CD57+ se incrementan posterior al estímulo antigénico. Hay dos tipos de subpoblaciones circulantes en los pacientes con conjuntivitis alérgica: una con fenotipo de memoria central CD27+CCR7+CD45RA+ y otra con fenotipo de memoria periférica CD27-CCR7-CD45RO+. Estudios posteriores permitirán esclarecer el verdadero papel de estas subpoblaciones celulares en la desregulación inmunológica observada en conjuntivitis alérgica.

Agradecimientos

A la Sra. Verónica Romero Martínez por el apoyo técnico recibido. Este trabajo fue financiado en parte Orte por la Fundación de Asistencia Privada "Conde de Valenciana, IAP".

REFERENCIAS

1. González-Carbajal J, Garza-Aguilar J, Diagnóstico Colectivo de Salud de México-síntesis- Facultad de Medicina UNAM 2006.
2. Pantoja-Meléndez C. Reporte de principales causas de consulta. Instituto de Oftalmología "Conde de Valenciana" 2006.
3. Mitsumoto Y, Oka S, Sakuma H, Inazawa J, Kawasaki T. Cloning and chromosomal mapping of human glucuronyltransferase involved in biosynthesis of the HNK-1 carbohydrate epitope. *Genomics* 2000; 65(2):166-173.
4. Jiménez-Martínez MC, Linares M, Báez R, Montañón LF y cols. Intracellular expression of interleukin-4 and interferon-gamma by a Mycobacterium tuberculosis antigen-stimulated CD4+ CD57+ T-cell subpopulation with memory phenotype in tuberculosis patients. *Immunology* 2004;111(1):100-106.
5. Yamada H, Kaibara N, Okano S, Maeda T, Shuto T y cols. Interleukin-15 selectively expands CD57+ CD28- CD4+ T cells, which are increased in active rheumatoid arthritis. *Clin Immunol* 2007;124(3):328-335.
6. Pedroza-Seres M, Linares M, Voorduin S, Rojas-Ramos E y cols. Pars planitis is associated with an increased frequency of effector-memory CD57+ T cells. *Br J Ophthalmol* 2001; 91(10):1393-1398.
7. Rojas-Ramos E, Garfias Y, Jiménez-Martínez MC, Martínez-Jiménez N, Zenteno E, Gorocica P, Lascrain R. Increased expression of CD30 and CD57 molecules on CD4(+) T cells from children with atopic asthma: a preliminary report. *Allergy Asthma Proc* 2007; 28(6):659-666.
8. Kim JR, Lim HW, Kang SG, Hillsamer P, Kim CH. Human CD57+ germinal center-T cells are the major helpers for GC-B cells and induce class switch recombination. *BMC Immunol.* 2005; 6(1):3.
9. d'Angeac AD, Monier S, Pilling D, Travaglio-Encinoza A, Rème T, Salmon M. CD57+ T lymphocytes are derived from CD57- precursors by differentiation occurring in late immune responses. *Eur J Immunol* 1994; 24(7):1503-1511.
10. Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004; 22:745-763.
11. Vossen MT, Matmati M, Hertoghs KM, Baars PA, Gent MR y cols. Defines Phenotypically and Functionally Different Human NK Cell Subsets. *J Immunol* 2008; 180(6):3739-3745.
12. Bromley S, Thomas SY, Luster A. Chemokine receptor CCR7 guides T cell exit from peripheral tissues and entry into afferent lymphatics. *Nat Immunol* 2005; 6:895-901.
13. Hamann D, Baars PA, Hooibrink B, van Lier RW. Heterogeneity of the human CD4+ T-cell population: two distinct CD4+ T-cell subsets characterized by coexpression of CD45RA and CD45RO isoforms. *Blood* 1996; 88(9):3513-3521.
14. Hamann D, Kostense S, Wolthers KC, Otto SA, Baars PA, Miedema F, van Lier RA. Evidence that human CD8+CD45RA+CD27- cells are induced by antigen and evolve through extensive rounds of division. *Int Immunol.* 1999; 11(7):1027-1033.