



Senescencia replicativa en células T CD8+ de pacientes con rechazo agudo en trasplante renal

R. Jiménez*, J. Carracedo*, R. Ramírez*, A. Rodríguez**, D. del Castillo**, R. Pérez***† y P. Aljama**

*Unidad de Investigación. **Servicio de Nefrología. Hospital Universitario Reina Sofía. †Fallecido. Córdoba.

RESUMEN

Durante el rechazo renal agudo las células T CD8+ son activadas de forma mantenida pudiendo desencadenar un proceso de senescencia replicativa. En este trabajo nosotros hemos evaluado varias características de senescencia replicativa como es : a) porcentaje de células T CD28-; b) acortamiento telomérico, y c) producción de citoquinas proinflamatorias. Este estudio se realizó en 14 pacientes con rechazo renal agudo, 14 pacientes sin rechazo renal agudo y 8 controles sanos. Los resultados indicaron que los pacientes con rechazo renal agudo mostraban altos porcentajes de células T CD28-CD8+ en sangre periférica y biopsia renal. Estos pacientes mostraron telómeros cortos que se asociaban con el fenotipo CD28-. Además, los pacientes con rechazo renal agudo presentaban altas concentraciones de IL-10 e IFN- γ en plasma y orina. Nuestro estudio demuestra que las células T CD8+ de pacientes con rechazo renal agudo sufren un proceso de senescencia replicativa.

Palabras clave: **Trasplante Renal. Rechazo Agudo. Senescencia Replicativa. Células T CD8+. Telómero.**

ACUTE RENAL REJECTION IS ASSOCIATED WITH INDUCTION OF REPLICATIVE SENESCENCE IN CD8+ T LYMPHOCYTES

SUMMARY

Acute renal rejection repeatedly activates immunocompromised CD8 + T cells. Maintained activation of CD8 + T cells can induce a process of replicative senescence. In the present study, we will evaluate in CD8 lymphocytes from patients undergoing acute renal rejection characteristics of replicative senescence such as: a) low expression of CD28 molecule; b) telomere shortening and c) increase production of proinflammatory cytokines. The study was carried out in CD8 + T cells from 14 patients transplanted without clinical evidences of acute renal rejection, 14 patients kidney transplanted with clinical and anatomopathological evidences of acute renal rejection, 8 healthy controls. The results shown that in peripheral blood and renal biopsy of patients with acute renal rejection there is a significant increment of the population of T cells CD28-CD8+, with short telomere length, as compared with healthy controls and patients without acute renal rejection. The presence of senescent cells was associated with high levels of IL-10 and IFN- γ in plasma and urine. In conclusion our study suggest that the CD8 + T cells of patients with acute renal rejection suffer a process of replicative senescence.

Key words: **Renal Transplantation. Acute Rejection. Replicative Senescence. CD8+ T Cells. Telomere.**

Correspondencia: Dr. R. Jiménez
Servicio de Nefrología
Hospital Universitario Reina Sofía
Avda. Menéndez Pidal, s/n
14004 Córdoba
E-mail: charitojm@yahoo.es

INTRODUCCIÓN

Durante el rechazo renal agudo se ha demostrado que se produce una infiltración de células T CD8⁺. La exposición continuada de las células T CD8⁺ a los antígenos del riñón trasplantado induce una activación repetida de estas células². Este proceso de activación mantenida va a provocar la expansión clonal de las células T CD8⁺, y la liberación de citoquinas inflamatorias.

Actualmente se conoce que las células T que se encuentran sometidas a una continua activación pueden morir por apoptosis o entrar en un estado de senescencia replicativa³. Cuando las células T alcanzan el estado de senescencia replicativa, estas células detienen su crecimiento en fase G1 del ciclo celular, dejan de proliferar, pero se mantienen metabólicamente activas⁴. En condiciones fisiológicas normales el proceso de senescencia replicativa es considerado como un mecanismo de supresión tumoral que previene la proliferación incontrolada de las células^{5,6}. Sin embargo, ha sido observado que en situaciones patológicas, como enfermedades infecciosas crónicas, las células T CD8⁺ alcanzan un estado de senescencia replicativa⁷.

Las células T que alcanzan el estado de senescencia replicativa han sido identificadas por mostrar varias características. Las características de células T senescentes son: la pérdida de expresión de marcadores celulares como aumento en el porcentaje de células T CD28⁻⁸⁻¹⁰, acortamiento de la longitud de telómero¹¹, resistencia a la apoptosis¹² y la producción de citoquinas pro-inflamatorias^{13,14}.

En este estudio nosotros postulamos que las células T CD8⁺ implicadas en el proceso de rechazo renal agudo, sufren una activación mantenida debido a la continua exposición a los antígenos del órgano injertado. De este modo nosotros estudiaremos en pacientes trasplantados de riñón con rechazo renal agudo características de senescencia replicativa como es: presencia de células T CD8⁺ con fenotipo CD28⁻, acortamiento telomérico y producción de citoquinas pro-inflamatorias.

MATERIALES Y MÉTODOS

Pacientes

En este trabajo evaluaremos 14 pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo, 14 pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo y 8 controles sanos.

Los pacientes sin rechazo renal agudo tenían edades comprendidas entre 32-66 años de edad, el 60% eran hombres y los valores de creatinina de estos pacientes era < 1,9 mg/dl. Los pacientes con rechazo renal agudo eran diagnosticados mediante biopsia renal realizada por el equipo de Anatomía Patológica del Hospital Reina Sofía. Estos pacientes tenían edades comprendidas entre los 33 y 66 años de edad, el 57,1% eran hombres y mostraron valores de creatinina > 1,9 mg/dl. Ambos grupos de pacientes eran sometidos a una triple terapia inmunosupresora de ciclosporina, micofenolato y prednisona. En la tabla I se recogen las características clínicas y epidemiológicas de los pacientes trasplantados de riñón.

Extracción de biopsia renal y sangre periférica

Diez ml de sangre venosa periférica eran obtenidas de pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo y con rechazo agudo. Inmediatamente tras su extracción se distribuyeron en tubos de 5 ml de EDTA (etilen-diamino-tetraacético). Simultáneamente a la obtención de sangre periférica de pacientes con rechazo renal agudo se procedió a la extracción de biopsia renal de pacientes con rechazo renal agudo por bipunción a través del abdomen de cada enfermo. La muestra de tejido se depositó en tubos estériles con 5 ml de suero fisiológico.

Obtención de células de la biopsia renal

Las células eran obtenidas mediante disgregación mecánica, y química con 3 ml de Trypsina-EDTA, y se dejó incubar durante 5 minutos en un incubador de CO₂. Luego se añadió 3 ml de medio de cultivo RPMI para neutralizar la reacción de la trypsin. A continuación las células fueron recogidas en tubos universales después de una centrifugación a 1.500 rpm durante 5 minutos.

Fluorescencia celular

Para la determinar la expresión de CD28 en células T CD8⁺ se realizó un doble marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD8FITC y anti-CD28TC en muestras de sangre periférica y biopsia renal de pacientes con rechazo renal agudo. 2 × 10⁵ células de sangre periférica eran incubadas durante 30 min con anticuerpos monoclonales anti-CD8FITC y anti-CD28TC a temperatura ambiente y en oscuridad. Después de la incubación, se añadió 2 ml de FACS Lysing para la lisis de los eritrocitos y posteriormente las muestras eran incubadas durante 10 min a temperatura ambiente y en oscuridad. A continuación se lavó dos veces a 1.500 rpm durante 5 min. El sobrenadante fue retirado y el pellet resuspendido en 500 µl de Cell Fix. Las muestras fueron analizadas mediante citometría de flujo con un citómetro FACS Calibur.

Determinación de la longitud de telómero

1 × 10⁶ células eran resuspendidas en 1 ml de PBS-0,1% BSA. Las células eran centrifugadas a 13.000 rpm durante 15 segundos. El sobrenadante era eliminado y las células resuspendidas en 100 µl de buffer de hidratación que contenía 70% Formamida deionizada, 20 mM Tris pH = 7,2, 1% BSA y H₂O destilada. A continuación, se adicionó a cada tubo 3 µl de sonda PNA (flow-PNAtel) telómero específica FITC-conjugada (FITC-O-CCCATAACTAAACAC-NH₂) (Applied Biosystems). Posteriormente, las células eran sometidas a desnaturalización de DNA a 80 °C durante 10 minutos en un Thermomixer 5436, seguido de una hibridación durante 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación. Tras la incubación, las células eran centrifugadas a 3.000 rpm durante 8 minutos a 16 °C. El sobrenadante era eliminado y el botón celular era resuspendido en 500 microlitros de buffer de lavado que contenía 70% de formamida deionizada, 10 mM Tris, pH = 7, 0,1% BSA y 0,1%

Tabla I. Características clínicas y epidemiológicas de los pacientes trasplantados de riñón

Datos de pacientes	Rechazo	No rechazo
Edad (media ± SD)	52,4 ± 10	52,2 ± 8,8
% hombres	57,1%	60%
Año de trasplante	1999-2002	1998-2001
Creatinina (mg/dl) (media ± SD)	5 ± 2,5	1,4 ± 0,2
Inmunosupresión	CYA+MMF+Pred	CYA+MMF+Pred

CYA: ciclosporina; MMF: micofenolato mofetilo; Pred: prednisona.

Tween-20. De nuevo, las células eran centrifugadas a 3.000 rpm durante 8 minutos a 16 °C. El sobrenadante era eliminado, y el botón celular era resuspendido en otro buffer de lavado que contenía PBS, 0,1% BSA y 0,1% Tween-20, seguido de una centrifugación a 2.000 rpm durante 6 minutos a 16 °C. El sobrenadante era eliminado. Las células eran incubadas durante 30 minutos en oscuridad, y posteriormente se añadió un buffer que contenía PBS, 0,1% BSA y RNAsa A (10 µg/ml), seguida de una incubación de 2 horas a temperatura ambiente en oscuridad y con agitación. Después de la incubación las muestras eran adquiridas en un citómetro de flujo FACSCalibur. El citómetro de flujo era alineado utilizando micropartículas esféricas fluorescentes marcadas PE (BD Pharmingen). La fluorescencia era medida en escala lineal y los resultados expresados en equivalente molecular de unidades de fluorocromo soluble (KMESF). La longitud de telómero relativo era calculado por comparación de los valores KMESF con aquellos obtenidos utilizando diferentes líneas celulares como controles de la longitud de telómero.

Inmunoensayo Cytometric Bead Array

La técnica Cytometric Bead Array (CBA) está basada en micropartículas unidas a anticuerpos. Las partículas eran teñidas con intensidades de fluorescencia diferentes. La emisión de longitud de onda máxima de emisión era aproximadamente 650 nm (FL-3). Las partículas estaban uni-

das por un enlace covalente con un anticuerpo (Pharmingen, San Diego, CA) contra una de las citoquinas (IFN-γ, IL-10). Las partículas-Ab sirven para capturar a cada citoquina y ser detectadas simultáneamente en la mezcla.

Las citoquinas son capturadas por vía directa en el inmunoensayo utilizando anticuerpos diferentes unidos a ficoeritrina (PE) que emite a 585 nm (FL-2). El anticuerpo detector PE-conjugado es utilizado para completar el sandwich, y la intensidad medida en FL-2 es proporcional a la concentración de citoquinas en la muestra, que está cuantificada por una curva de calibración. Una característica importante del sistema de ensayo es que los calibradores, reactivo Ab-bead y el segundo reactivo de anticuerpo Ab-PE están hechos de las mezclas de citoquinas. Las curvas standard (0 a 5.000 pg/ml) eran obtenidas de un grupo de calibradores y los resultados eran obtenidos de una misma muestra. Para cada muestra de orina, plasma y mezcla standard de citoquinas, 50 µl de muestra o standard de citoquinas eran adicionadas a la mezcla de 50 µl de cada reactivo Ab-bead y detector Ab-PE. La mezcla (150 µl) era incubada durante 160 min a temperatura ambiente y en oscuridad y posteriormente eran lavadas y después los datos eran adquiridos por citometría de flujo.

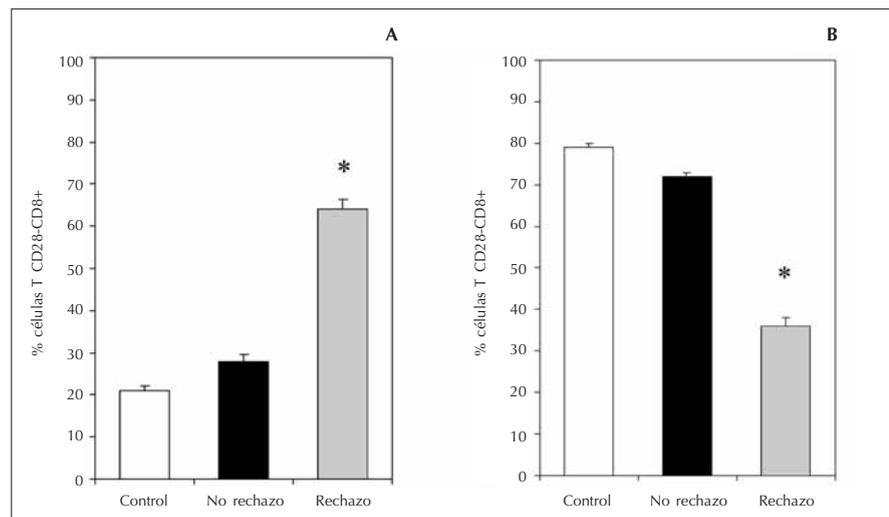
Análisis estadístico

Todos los datos se expresaron como Media ± SEM (error medio). La comparación de las medias se realizó con el test paramétrico *t*-Student. Cuando los datos eran independientes se utilizó el test de Mann-Whitney y cuando eran apareados el test de Wilcoxon. Para comparar más de dos medias se utilizó ANOVA. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas cuando *p* < 0,05.

RESULTADOS

Aumento de la población de células T CD28- CD8+ en sangre periférica de pacientes con rechazo renal agudo

La presencia de células T CD28- es considerada un marcador fenotípico de senescencia replicativa¹⁵. Para la de-



*Fig. 1.—A) Histograma representa los altos porcentajes de células T CD28-CD8+ en sangre periférica de pacientes con rechazo renal agudo, B) representa un aumento en los porcentajes de células T CD28 + CD8+ en controles sanos y pacientes sin rechazo renal agudo. **p* < 0,0001.*

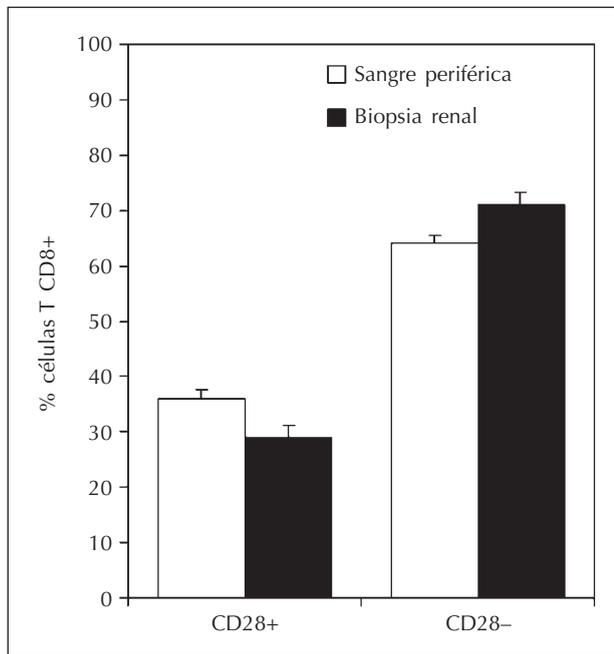


Fig. 2.—Representa los porcentajes de células T CD28-CD8+ y CD28+ CD8+ obtenidos en sangre periférica y biopsia renal de pacientes con rechazo renal agudo. No existen diferencias significativas entre biopsia renal y sangre periférica.

terminación de la expresión de CD28 en células T CD8+ nosotros realizamos un doble marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD8FITC y anti-CD28TC en muestras de sangre periférica de pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo, pacientes con rechazo agudo y en controles sanos. El estudio realizado sobre la expresión de CD28 en células T CD8+ mostró que los pacientes tras-

plantados de riñón con rechazo renal agudo presentaban altos porcentajes de células T CD28- CD8+ (fig. 1A), por el contrario los controles sanos y los pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo tenían altos porcentajes de células T CD28+ CD8+ (fig. 1B).

Aumento de la población de células T CD28-CD8+ en biopsia renal de pacientes con rechazo renal agudo

Nosotros hemos observado que en células T CD8+ de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo se produce un aumento de la población de células T CD28-CD8+ en sangre periférica. Sin embargo, nosotros nos preguntamos si este aumento de células T CD28-CD8+ observado a nivel sistémico podía verse reflejado a nivel renal. Para ello obtuvimos células T de biopsia renal (ver «Procedimientos Experimentales») de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo, y realizamos un doble marcaje con anticuerpos monoclonales anti-CD8FITC y anti-CD28TC. Los resultados obtenidos nos indicaron que en biopsia renal de pacientes con rechazo renal agudo también se observaba un aumento de células T CD28-CD8+, similar al observado en sangre periférica (fig. 2).

Acortamiento de la longitud de telómero en células T CD8+ de pacientes con rechazo renal agudo

En este trabajo nosotros determinaremos la longitud de telómero por Flow-FISH en células T CD8+ de sangre periférica en pacientes trasplantados de riñón sin rechazo renal agudo ($N = 14$) y con rechazo renal agudo ($N = 14$) y de controles sanos ($N = 8$).

Los pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo mostraron un acortamiento telomérico en células T CD8+ (fig. 3A), por el contrario en pacientes trasplantados de riñón sin rechazo renal agudo y en controles sanos no se observó acortamiento telomérico en células T CD8+ (fig. 3B).

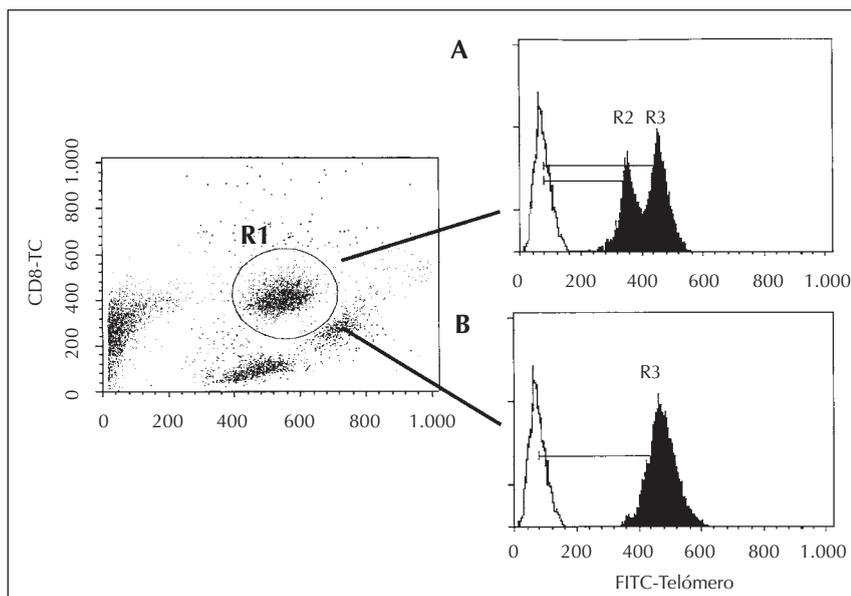


Fig. 3.—El histograma representa la longitud de telómero en células T CD8+ (R1). A) Paciente con rechazo renal agudo muestran dos poblaciones de células T CD8+ con longitud de telómero corto (R2) y telómero normal (R3); B) Controles sanos y pacientes sin rechazo renal agudo muestran una única población de células T CD8+ con telómero normal (R3).

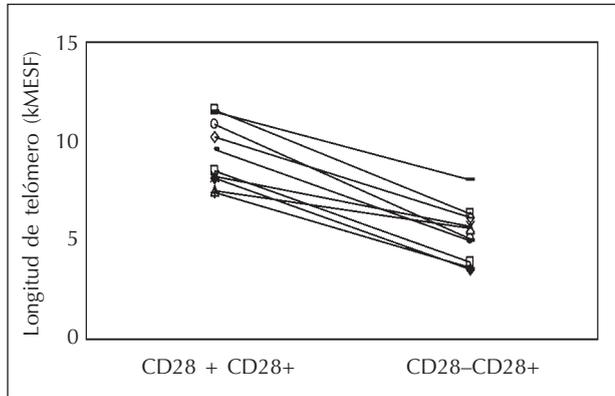


Fig. 4.—Representa la longitud de telómero (kMESF) de células T CD28 + CD8+ y CD28-CD8+ de pacientes con rechazo renal agudo.

Para determinar si el acortamiento en la longitud de telómero observado en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo estaba asociado al fenotipo CD28-/CD8+, la longitud de telómero y la expresión de CD28/CD8 eran analizadas simultáneamente. Como muestra la figura 4, las células T CD8+ con telómero acortado de pacientes con rechazo renal agudo exhiben un fenotipo CD28-/CD8+, por el contrario las células T CD8+ con telómero normal muestran un fenotipo CD28+/CD8+.

Elevada producción de IFN-g y IL-10 en plasma y orina de pacientes con rechazo renal agudo

Nosotros realizamos un estudio sobre la producción de IFN-γ y IL-10 en plasma y orina de pacientes trasplantados de riñón sin rechazo renal agudo y con rechazo renal agudo y en controles sanos. El estudio realizado en plasma de pacientes sin rechazo renal agudo, con rechazo renal agudo y en controles sanos reveló que en plasma de pacientes con rechazo renal agudo se encontraron altas concentraciones de IFN-γ y IL-10, mientras que en los otros dos grupos de pacientes las concentraciones de IFN-g y IL-10 no eran apreciables (fig. 5A). Asimismo, se determinó la producción de IFN-γ y IL-10 en orina de pacientes trasplantados de riñón

sin rechazo y con rechazo, y en controles sanos. Los resultados mostraron que los pacientes con rechazo renal agudo presentaban altas concentraciones de IFN-γ y IL-10 en orina con respecto a pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo y en controles sanos (fig. 5B).

DISCUSIÓN

La activación mantenida de las células T CD8+ durante el proceso de rechazo renal agudo puede desencadenar un proceso de senescencia replicativa debido a la continua exposición a los antígenos del riñón trasplantado.

La senescencia replicativa es un proceso por el que las células somáticas detienen su crecimiento después de un número finito de divisiones celulares. La senescencia replicativa también ha sido confirmada en células T. Como ha sido demostrado anteriormente por otros autores y demostrado en el presente estudio, la senescencia replicativa se asocia con un acortamiento telomérico, pérdida de la expresión de CD28 y producción de citoquinas pro-inflamatorias.

En el presente estudio, nosotros determinamos la longitud de telómero en células T CD8+, la expresión de CD28 en células T CD8+ y la producción de citoquinas pro-inflamatorias en plasma y orina, para observar la evidencia de senescencia replicativa en células T CD8+ de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo.

Recientemente, la pérdida de expresión de la molécula CD28 en células T ha sido utilizada como marcador fenotípico de senescencia replicativa. Además, en estudios realizados anteriormente se han demostrado que las células T CD8+ en condiciones patológicas como infección HIV¹⁶ y en Lupus Erytomatosus Sistémico¹⁷ muestran una pérdida incrementada de la expresión de CD28. En este estudio nosotros hemos observado que los pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo sufren una pérdida incrementada de la expresión de CD28 tanto a nivel sistémico como a nivel local, encontrándose altos porcentajes de células T CD28-CD8+ con respecto a pacientes trasplantados de riñón sin rechazo agudo y donantes sanos.

La determinación de la longitud de telómero por la técnica Flow-FISH nos reveló que los pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo tenían células T CD8+ con telómeros cortos que se asociaban con un fenotipo CD28-, mientras que las células T CD8+ con telómero normal presentaban un fenotipo CD28+. Este hallazgo nos lleva a pen-

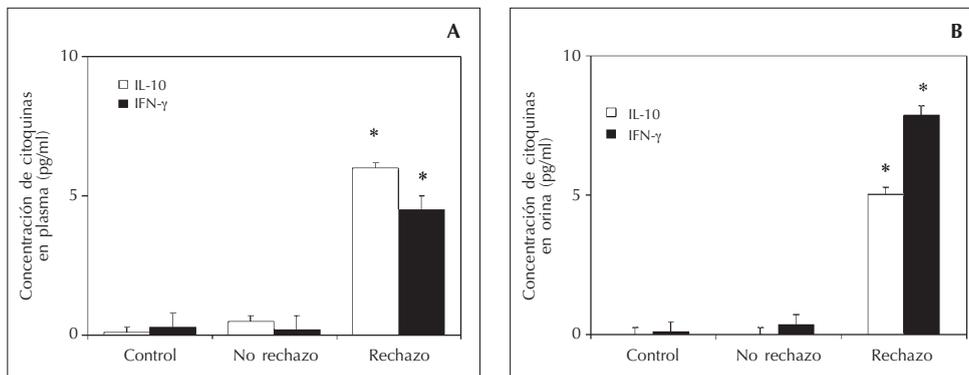


Fig. 5.—Representa las concentraciones de citoquinas IL-10 e IFN-γ, A) en plasma de pacientes con rechazo renal agudo se muestran altas concentraciones de estas citoquinas, B) en orina de pacientes con rechazo renal agudo también se observan altas concentraciones de IL-10 e IFN-γ. *p < 0,0001.

sar que las células T CD8+ sufren una expansión clonal durante el proceso de rechazo renal agudo, por el cual las células pierden la expresión de CD28 y al mismo tiempo acortan su telómero, mientras que las células T CD8+ con fenotipo CD28+ preservan su longitud de telómero. Asimismo, este hecho nos muestra que las células T CD8+ con fenotipo CD28- proceden del clon CD28+, puesto que las células T CD28-/CD8+ células muestran una historia replicativa distinta que las células T CD28+/CD8+. En relación con los datos aquí obtenidos, algunos investigadores han demostrado la presencia de células T CD8+ con telómeros cortos en situaciones clínicas, como enfermedades infecciosas crónicas como el SIDA¹⁸, enfermedades degenerativas como Artritis Reumatoide¹⁹ y en enfermedades autoinmunes como Granulomatosis de Wegener²⁰.

Otra característica de senescencia replicativa es la producción de citoquinas pro-inflamatorias. En este estudio nosotros hemos observado altas concentraciones de IFN- γ y IL-10 en plasma y orina de pacientes trasplantados de riñón que sufren rechazo agudo.

Varios autores han demostrado que las células T CD28-CD8+ producen altas concentraciones de IL-10 y IFN- γ ²¹⁻²². Considerando la predominancia de células T CD28-CD8+ encontradas en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo es razonable esperar las alteraciones significativas en la red de citoquinas durante el rechazo renal agudo. Además, la producción de citoquinas encontradas en orina de pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo muestra el daño renal producido durante el proceso de rechazo agudo.

En conclusión, los resultados obtenidos en este trabajo nos revelan que en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo se produce una activación mantenida de las células T CD8+ que origina la aparición de células T CD8+ con características de senescencia replicativa como es el aumento en el porcentaje de células T CD28-CD8+, el acortamiento telomérico y la producción de citoquinas pro-inflamatorias. La presencia de células T CD8+ senescentes en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo puede ser un marcador final como resultado de la continua replicación de las células T CD8+ y puede reflejar las consecuencias patofisiológicas de un estado de activación crónica.

En resumen, la presencia de células T CD8+ senescentes y la producción de citoquinas en orina en pacientes trasplantados de riñón con rechazo agudo puede ser utilizado como una herramienta para el diagnóstico precoz del rechazo renal agudo.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido realizado gracias a FIS 00/0788 (JC) y FIS 00/0701 (RR).

BIBLIOGRAFÍA

1. Bueno V, Pestana JOM: The role of CD8+ T cells during allograft rejection. *Braz J Med Biol Res* 35 (11): 1247-58, 2002.
2. Mannon RB, Kotzin RL, Nataraja C y cols.: Downregulation of T cell receptor expression by CD8+ lymphocytes in kidney allografts. *J Clin Invest* 101 (11): 2517-27, 1998.
3. Matsumura T, Zerrudo Z, Hayflick L: Senescent human diploid cells in culture: survival, DNA síntesis, and morphology. *J Gerontol* 34: 328-34, 1979.
4. Bérubé NG, Smith JR, Pereira-Smith OM: The Genetics of Cellular Senescence. *Am J Hum Genet* 62: 1015-9, 1998.
5. Sager R: Senescence as a mode of tumor suppression. *Environ. Health Perspect* 93: 59-62, 1991.
6. Reddel RR: The role of senescence and immortalization in carcinogenesis. *Carcinogenesis* 21: 477-84, 2000.
7. Bestilny LJ, Gill MJ, Mody CH y cols.: Accelerated replicative senescence of the peripheral immune system induced by HIV infection. *AIDS* 14: 771-80, 2000.
8. Effros RB, Boucher N, Porter y cols.: Decline in CD28+ T cells in centenarians and in long-term T cell cultures: a possible cause for both in vivo and in vitro immunosenescence. *Exp Gerontol* 29: 601-9, 1994.
9. Posnett DN, Edinger JW, Manavalan JS y cols.: Differentiation of human CD8 T cells: implications for in vivo persistence of CD8+ CD28- cytotoxic effector clones. *Int Immunol* 11: 229-41, 1999.
10. Vallejo AN, Brandes JC, Weyand CM y cols.: Modulation of CD28 expression: distinct regulatory pathways during activation and replicative senescence. *J Immunol* 162: 6572-9, 1999.
11. Monteiro J, Batliwalla F, Ostrer H y cols.: Shortened telomeres in clonally expanded CD28-CD8+ T cells imply a replicative history that is distinct from their CD28+CD8+ counterparts. *J Immunol* 156: 3587-90, 1996.
12. Raffetto JD, Leverkus M, Park HY y cols.: Synopsis on cellular senescence and apoptosis. *J Vas Surg* 34: 173-7, 2001.
13. O'Mahony L, Holland J, Jackson J y cols.: Quantitative intracellular cytokine measurement: age-related changes in proinflammatory cytokine production. *Clin Exp Immunol* 113: 213-9, 1998.
14. Shearer GM: Th1/Th2 changes in aging. *Mechanisms of ageing and development* 94: 1-5, 1997.
15. Effros RB: Loss of CD28 expression on T lymphocytes: a marker for replicative senescence. *Dev Com Immunol* 21: 471-8, 1997.
16. Vingerhoets JH, Vanham GL, Kestens LL y cols.: Increased cytolytic T lymphocyte activity and decreased B7 responsiveness are associated with CD28 down-regulation on CD8+ T cells from HIV-infected subjects. *Clin Exp Immunol* 100: 425-33, 1995.
17. Honda M, Mengesha E, Albano S y cols.: Telomere shortening and decreased replicative potential, contrasted by continued proliferation of telomerase-positive CD8 + CD28(lo) T cells in patients with systemic lupus erythematosus. *Clin Immunol* 99:211-221, 2001.
18. Effros RB, Allsopp R, Chui CP y cols.: Shortened telomeres in the expanded CD28-CD8+ cell subset in HIV disease implicate replicative senescence in HIV pathogenesis. *AIDS* 10: 17-22, 1996.
19. Fitzgerald JE, Ricalton NS, Meyer AC y cols.: Analysis of clonal CD8+ T cells expansions in normal individuals and patients with rheumatoid arthritis. *J Immunol* 154: 3538-47, 1995.
20. Vogt S, Konert CI, Hug F y cols.: Shortening of telomere: evidence for replicative senescence of T cells derived from patients with Wegener's granulomatosis. *Kidney Int* 63: 2144-51, 2003.
21. Nociari MM, Telford W, Russo C: Postthymic Development of CD28-CD8+ T cell subset: age-associated expansion and shift from memory to naive phenotype. *J Immunol* 162: 3327-35, 1999.
22. Saurweis FM, Lung TL, Marx F y cols.: Lack of antibody production following immunization in old age: association with CD8+CD28- T cell expansions and imbalance in the production of Th1 and Th2 cytokines. *J Immunology* 168: 5893-9, 2002.