

SESIÓN 1: AUTOINMUNIDAD

Moderadores: Carmen Gelpi (Barcelona)
Ricardo Pujol-Borrel (Barcelona)

O-001

UTILIDAD DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE ACETILCOLINA (ACHRAB) Y ANTI-MÚSCULO ESTRIADO (SMAb) EN EL DIAGNÓSTICO DE MIASTENIA GRAVIS. D.M. Valero Hervás, M. Sevilla Sánchez, J.L. Peña, A. Alonso Ortiz, V. Pérez Aradas, M. Talise Astier, P. Morales Pérez, E. Paz Artal, A. Serrano Hernandez. Hospital Universitario 12 De Octubre, Madrid.

Objetivos. La Miastenia Gravis es una enfermedad autoinmune de etiología desconocida, caracterizada por la presencia de autoanticuerpos frente a los receptores de Acetylcolina situados en la placa motora, bloqueando la función de la musculatura esquelética causando debilidad muscular generalizada. El diagnóstico temprano permite la atenuación de la sintomatología y mejora la calidad de vida, así como la adecuación al tratamiento farmacológico. La técnica de referencia actual es la determinación de anticuerpos frente a músculo estriado (SMAb) vía Inmunofluorescencia-Indirecta (IFI), pero han aparecido nuevos métodos por ELISA para la detección de anticuerpos anti-receptor de Acetylcolina (AchRAb) en suero.

El objetivo del presente estudio fue comparar ambas técnicas para su adecuación diagnóstica, así como la búsqueda de posibles ventajas que pueda aportar la técnica de ELISA en pacientes tanto no diagnosticados como diagnosticados.

Materiales y Métodos. Se incluyeron 99 pacientes bajo sospecha clínica de diversas formas de Miastenia Gravis entre Febrero de 2009 y Febrero de 2010. A cada uno de ellos se le realizó la determinación cuantitativa de Anticuerpos anti-Receptor de Acetylcolina en suero, siguiendo las instrucciones del fabricante (RSR Limited). Además se realizó la titulación de anticuerpos anti-músculo estriado en suero mediante Inmunofluorescencia Indirecta sobre portas de músculo estriado (EUROIMMUN). Los resultados fueron analizados por el software informático SPSS v.12.

Resultados. Se diagnosticaron 19 pacientes de Miastenia Gravis de los 99. De estos, 4 (21%) presentaron ambos parámetros negativos, 3 (15.7%) sólo positivos para AchRAb, 1 (5.2%) positivo para SMAb, y 11 (58.1%) ambos parámetros positivos. La comparación entre técnicas mostró que la determinación de AchRAb presenta una sensibilidad del 40%, especificidad 37%, VPP de 5% y VPN de 86% comparado con estos valores para SMAb de 12%, 77%, 66% y 85%. Sin embargo el empleo de ambas técnicas conjuntamente, AchRAb como cribaje y SMAb como confirmación mostró unos parámetros significativamente óptimos para el diagnóstico ($p=0.038$): E: 92%, S: 73%, VPP: 61% y VPN: 95% comparado con el uso independiente de ambas.

En 6 (30%) de los pacientes el tratamiento con Piridostigmina redujo los niveles de AchRAb, en predominando la disminución en el inicio del tratamiento y volviendo a aumentar con el tiempo de tratamiento debido a la acomodación de la misma placa motora, sugiriendo la necesidad de ajuste de dosis. Nuestro estudio mostró que esta disminución en los niveles de AchRAb debida al tratamiento es estadísticamente significativa ($p=0.006$).

Se observó que en pacientes sanos bajo sospecha, máximos niveles de AchRAb en los momentos en los que se desencadenó la sintomatología grave y el diagnóstico de Miastenia que fue estadísticamente significativa ($p=0.005$).

Conclusiones. El uso conjunto de ambas técnicas es la estadísticamente más adecuada para el diagnóstico empleando AchRAb como screening seguido de confirmación por SMAb.

El empleo como control de pacientes de Miastenia de niveles de AchRAb parece ser un buen indicador de efectividad del tratamiento y de necesidad de ajuste de dosificación farmacológica así como la determinación de rutina de AchRAb podría actuar como marcador del momento de aparición de la sintomatología clínica de Miastenia y de su diagnóstico en pacientes bajo sospecha.

O-002

ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS ENTRE DISTINTOS GRUPOS DE ENFERMOS DE ESCLEROERMIA. J.M. López Cacho¹, B. Cárdaba Olombrada¹, A.M. Rabasco Álvarez², M.L. Fernández Rodríguez², T. Mayayo³, M. Aguerri Moreno¹, C. Lahoz Navarro¹, M. Posada De La Paz⁴, S. Gallardo Posada¹. ¹IIS Fundación Jiménez Díaz, Madrid, ²Universidad De Sevilla. Facultad De Farmacia, Sevilla, ³Sanired, ⁴Instituto De Salud Carlos III, Madrid.

Objetivos. Detectar diferencias en subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, así como su estado de activación y/o apoptosis entre distintos grupos de pacientes de esclerodermia distribuidos según el tipo (localizada, sistémica), años desde el diagnóstico, agravaciones (cardiopatías, fibrosis e hipertensión pulmonar), tipo y tiempo de tratamiento.

Materiales y métodos. Se analizaron 49 casos y 49 controles. Se determinó el porcentaje de Linfocitos T (CD4, CD8), B (CD19), NK (CD56), Monocitos (CD4/SSC), Apoptosis (Anexina V) y Activación (CD25) por citometría de flujo utilizando un citómetro de 5 colores. El análisis estadístico se realizó mediante un test de Wilcoxon no pareado.

Resultados. Hemos encontrado diferencias significativas en algunas poblaciones celulares entre los distintos grupos de pacientes y con respecto a sus controles, tanto en activación como en apoptosis.

En general, hay una disminución de la apoptosis en todas las subpoblaciones y en todos los grupos de enfermos comparados con los controles, aunque este efecto tiende a normalizarse con la agravación evolutiva de la enfermedad (fibrosis o hipertensión pulmonar, afección cardiaca o en aquellos con más de diez años de evolución). En

los linfocitos B y monocitos esta disminución se produce de manera significativa en todos los grupos estudiados. También se produce una disminución en la esclerodermia sistémica con respecto a la localizada.

Los monocitos aumentan en todas las agravaciones evaluadas y en mayor medida en la sistémica, pero únicamente hemos encontrado una disminución de su activación en enfermos tratados durante más de cuatro años con corticoides.

Los linfocitos NK son los únicos que tienen aumentada su activación en los pacientes con más de cuatro años de evolución de la enfermedad.

Con respecto a los linfocitos B, hay una disminución en aquellos pacientes con fibrosis e hipertensión pulmonar y en la esclerodermia sistémica difusa con respecto a controles. La apoptosis disminuye significativamente en la sistémica con respecto a la localizada.

Conclusiones. Estos resultados pueden ser importantes para el diagnóstico diferencial de la evolución de la enfermedad y pueden ser útiles, no sólo para un mejor diagnóstico sino también para enfocar futuros tratamientos más específicos.

O-003

LA SEÑALIZACIÓN EPH/EFRINA B REGULA LA MADURACIÓN DEL EPITELIO TÍMICO. *J. García-Ceca Hernández, D. Alfaro Sánchez, A. Zapata González. Universidad Complutense/Facultad de Biología, Madrid.*

Objetivos. Previamente hemos demostrado que la falta de Eph/efrinas B generan profundas alteraciones histológicas y fenotípicas en la red epitelial tímica (TEC). En el presente trabajo profundizamos en algunas de estas alteraciones a fin de comprender el papel de estas moléculas en la maduración del epitelio tímico.

Material y Métodos. Se han analizado mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia la diferenciación y supervivencia de las TEC durante las primeras etapas del desarrollo embrionario (13.5 y 15.5F) en ratones WT y deficientes en EphB2. Además, la supervivencia y diferenciación de las células epiteliales fueron estudiadas *in vitro* mediante reagregados (RTOC), cultivos organotípicos (FTOC) o cultivos en monocapa de epitelio de lóbulos tímicos WT fetales (13,5F), mantenidos en presencia (o no) de proteínas de fusión (efrinaB1-Fc y EphB2-Fc).

Resultados. Nuestros resultados demuestran que la falta de EphB2 provoca un incremento de muerte en la fracción CD45-total y, fundamentalmente, en las TEC corticales CD45-Ly51⁺ a 13.5 y 15.5F. Además, la proporción de células CD45-apoptóticas incrementaba significativamente en RTOC tratados con proteínas de fusión, que bloqueaban las interacciones TEC-timocitos. Por el contrario, la estimulación de las señales trasmítidas por Eph/efrinas B rescataba significativamente de la muerte las TEC. De nuevo, el porcentaje de TEC apoptóticas aumentaba en RTOC establecidos con TEC y/o timocitos deficientes en EphB2.

Por otro lado, nuestros resultados previos demostraban un retraso en la maduración de TEC en ratones EphB2^{-/-} junto con una desorganización de la red epitelial que resultaba en la aparición de grandes áreas carentes de queratinas. Un análisis fenotípico exhaustivo del contenido de estas áreas sugiere que en ellas está aconteciendo una transformación epitelio-mesénquima como consecuencia de la falta de EphB2. Además, análisis a citometría de flujo de lóbulos tímicos 13,5-15,5F deficientes en EphB2 demuestran un aumento de la proporción

de células progenitoras CD45-EpCAM⁺MTS20⁺ y una reducción de las TEC medulares maduras CD45-EpCAM⁺UEA-1⁺. Este retraso en la maduración del epitelio tímico se puso también de manifiesto con FTOCs 13,5F WT cultivados en presencia de EphB2-Fc o efrinaB1-Fc durante 5 días. De nuevo, se observó un incremento significativo en la proporción de células CD45-EpCAM⁺MTS20⁺ y una reducción de las células CD45-EpCAM⁺UEA-1⁺.

Conclusiones. Estos resultados demuestran la relevancia de EphB2 y sus ligandos las efrinas B en la maduración del epitelio tímico.

O-004

RELACIÓN ENTRE CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES Y CELULAS ENDOMETRIALES ESTROMALES HUMANAS: FENOTIPO ANTIGÉNICO Y SUSCEPTIBILIDAD A LA APOPTOSIS. *E. Leno Durán, R. Muñoz Fernández, A. Prados Martín, E. García Olivares, M.D.C. Ruiz Ruiz. Universidad de Granada/CIBM, Armilla.*

Objetivos. Las células más abundantes del endometrio son las células endometriales estromales (ESC). Durante la fase secretoria del ciclo menstrual y, sobre todo si el embarazo se produce, las ESC o sus equivalentes en la decidua, las células deciduales estromales (DSC) se diferencian (decidualizan) por el efecto de la progesterona. Aunque las ESC proceden de las DSC, y ambas, de las células madre mesenquimales (MSC), al encontrarse estas células en un entorno citoquímico y hormonal diferente, es probable que estos dos tipos de células presenten diferencias fenotípicas y funcionales que podrían influir en las actividades inmunorreguladoras de estas células. El objetivo de este trabajo es comparar fenotipo antigénico, diferenciación por progesterona, susceptibilidad a la apoptosis y efecto sobre la apoptosis espontánea de los linfocitos.

Materiales y métodos. DSC proceden de abortos inducidos del primer trimestre de mujeres sanas (20-30 años). ESC fueron recogidas de sangre menstrual de mujeres sanas entre 20-30 años.

Las células fueron cultivadas en OPTI-MEM y decidualizadas con progesterona 300 nM y AMPc 500 μM durante 30 días. El medio fue cambiado cada 3-4 días. Las células apoptóticas fueron detectadas por citometría de flujo cuantificando las células en la fase sub-G1 del ciclo celular. El fenotipo antigénico de las células fue medido por citometría de flujo.

Proteínas implicadas en la apoptosis fueron detectadas mediante western-blot.

Resultados. ESC y DSC presentan un fenotipo similar, prácticamente todas las células expresan CD10, CD73 y CD29, presentando diferencias en el marcador CD21 y CD54. Las DSC decidualizadas producen altos niveles de prolactina (marcador de decidualización), mientras que las ESC producen unos niveles significativamente menores. Al decidualizar, una proporción de DSC y ESC se encuentra en apoptosis, aunque la proporción de células apoptóticas de las primeras fue superior. Se observa que la apoptosis asociada a la decidualización induce una disminución de proteínas antiapoptóticas como FLIP, BCL-x_L y XIAP. Además, ESC y DSC protegen de la apoptosis espontánea a los linfocitos periféricos.

Conclusiones. Aunque las DSC y ESC presentan un fenotipo antigénico semejante y protegen a los linfocitos de la apoptosis espontánea, su susceptibilidad a la decidualización, medida por la secreción de prolactina y por la tendencia a la apoptosis fue significativamente superior en las DSC que en las ESC.

O-005

TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS AS A POTENTIAL TOOL FOR TOLERANCE INDUCTION IN MULTIPLE SCLEROSIS. *D. Raïch Regué¹, L. Grau López², M. Naranjo Gómez², C. Ramo Tello², R. Pujol Borrell¹, E. Martínez Cáceres¹, F.E. Borràs Serres¹. ¹Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Barcelona. ²Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Barcelona.*

Multiple sclerosis (MS) is a chronic demyelinating autoimmune disease of the Central Nervous System. Current MS therapies decrease the frequency of relapses and modestly the accumulation of disability, but do not prevent MS progression. Tolerance induction to myelin antigens is a promising therapeutic strategy in MS. Dendritic cells (DC) is the main antigen presenting cells. DC therapy in tumour and infection immunology has been longly investigated as a potential tool to induce the immunoresponse in those situations.

Objective. Our aim is the generation of tolerogenic dendritic cells from autologous peripheral blood monocytes (MDDC) of MS patients, as a tool for cellular therapy and tolerance induction.

Methods. Peripheral blood cells were obtained from donors (n=8) and patients with relapsing-remitting MS (n=8). GM-CSF and IL-4 were used to differentiate MDDCs; maturation was induced with a proinflammatory cytokine cocktail, in the absence (mature DC [matDC]) or presence of 1α,25-dihydroxyvitamin D₃ [tolDC]. The morphology, viability, phenotype, cytokine production and the ability of MDDC to induce T cell proliferation were evaluated.

Results. MDDC differentiation yield, viability and functionality were similar in both healthy subjects and MS patients. tolDC exhibited a reduced expression of CD83, CD86 and HLA-DR, produced low levels of IL-12/IL-23, and showed a lower capacity to induce proliferation of allogeneic T cells when compared to matDC. Supernatants from tolDC allostimulated T cells revealed an impaired secretion of proinflammatory cytokines (IL-6, TNF-α, IFN-γ). In addition, tolDC were resistant to a subsequent maturation stimulus induced by LPS. Specific binding of myelin peptides to MDDC was shown by competition binding assay. Myelin peptide-loaded matDC induced proliferation of autologous T cells obtained from MS patients, thus confirming the specificity of the assay.

Conclusions. Tolerogenic MDDC may be generated from monocytes of MS patients, and loaded with myelin peptides might be an effective tool to restore antigen-specific tolerance in MS. The generation of specific T cell responding population (i.e. regulatory T cells) merits further investigation.

O-006

EL ANÁLISIS MEDIANTE UNA APROXIMACIÓN DE PROTEÓMICA CUANTITATIVA COMBINADA REVELA UN INCREMENTO DE APOPTOSIS TRAS LA EXPRESIÓN DEL REGULADOR AUTOINMUNE (AIRE) EN CÉLULAS EPITELIALES. *N. Colomé¹, J. Collado², J.J. Bech-Serra¹, I. Liiv³, L.C. Antón⁴, P. Peterson³, F. Canals¹, D. Jaraquemada², I. Álvarez². ¹Institut d'Oncologia. Vall d'Hebron, Bellaterra. ²Unitat d'Immunología. Institut de Biotecnología i Biomedicina. ³Biomedicum, Tartu, Estonia. ⁴Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid.*

Objetivos. APECED es una enfermedad autoinmune recesiva multiorgánica que se asocia a la pérdida de función de un único gen llamado AutoImmune REgulator (AIRE). Ratones deficientes en este gen desarrollan diversos procesos autoinmunes. AIRE se expresa principalmente en células epiteliales medulares tímicas (mTECs) y su ausencia

resulta en la pérdida de tolerancia a antígenos específicos de tejido (TRAs). Experimentos con microarrays han demostrado que AIRE induce la transcripción de TRAs en mTECs. Otra función que se ha descrito es su papel de inductor de apoptosis en mTECs, que podría generar mayor cross-presentation por parte de las células dendríticas medulares. Hasta el momento no se ha estudiado el efecto de AIRE sobre la célula a nivel proteico. El objetivo de este trabajo ha sido analizar el impacto sobre el proteoma de la expresión de AIRE en células epiteliales humanas.

Material y Métodos. Se transfeció la línea epitelial humana HT93 con el gen de AIRE. Diversos extractos proteicos celulares se analizaron mediante una aproximación que combinó dos técnicas de proteómica cuantitativa (2D-DIGE e ICPL). Los datos se confirmaron por western blot y por citometría de flujo. Finalmente se realizaron ensayos de apoptosis con anexina V y etopósido.

Resultados. Los resultados mostraron que algunas chaperonas (HSC70, HSP27 y tubulin-specific chaperone A) se encontraban en mayor abundancia en las células AIRE⁺, mientras que varias proteínas relacionadas con el citoesqueleto (transgelin, caldesmon, tropomyosin alpha-1 chain, myosin regulatory light polypeptide 9 y myosin-9) estaban en menor cantidad. Además se observaron cambios cuantitativos en diversas proteínas relacionadas con apoptosis. La diferencia de abundancia de algunas proteínas se confirmó por Western blot y citometría de flujo. Estos datos sugerían que las células transfectadas con AIRE presentan un perfil proteico compatible con un incremento de apoptosis. Mediante experimentos con anexina V y etopósido se confirmó que las células que expresan AIRE sufren más apoptosis espontánea y son más sensibles a la inducción de apoptosis.

Conclusiones. El uso de técnicas de proteómica cuantitativa ha permitido demostrar que las células AIRE⁺ sufren más apoptosis que las células AIRE⁻, lo que revela que AIRE puede jugar papeles diferentes de la regulación transcripcional en el control de la autoinmunidad.

O-007

ESTUDIO DE LA SÍNTESIS INTRATECAL DE ANTICUERPOS EN LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL. *N. Marin¹, M.J. Mansilla², J.C. Alvarez-Cermeño¹, X. Montalban², C. Guaza³, L. Villar⁴, C. Espejo². ¹Unidad De Esclerosis Múltiple, Hospital Ramón Y Cajal, Madrid. ²Unidad De Neuroinmunología Clínica, Hospital Universitario Vall D'Hebron, Barcelona. ³Instituto Cajal, Consejo Superior De Investigaciones Científicas, Madrid. ⁴Unidad De Esclerosis Múltiple, Hospital Ramón Y Cajal, Madrid.*

Objetivos. La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) es una enfermedad desmielinizante que se induce en ratones mediante inmunización con distintos antígenos de la mielina. Se utiliza como modelo experimental para el estudio de la esclerosis múltiple. Nuestro objetivo fue estudiar la evolución de la síntesis intratecal de anticuerpos a lo largo del tiempo en la EAE inducida mediante inmunización de ratones SJL con la proteína proteolipídica (PLP).

Métodos. Se obtuvieron muestras de líquido cefalorraquídeo y suero a día 0, 7, 14, 31 y 38 tras inmunización. Así mismo, se valoró diariamente la puntuación clínica de los signos neurológicos. Se determinó el título de anticuerpos anti-PLP y frente a otras proteínas mayoritarias de la mielina [proteína básica de mielina (MBP) y glicoproteína de la mielina del oligodendrocito (MOG)] mediante ELISA. Se estudió la síntesis intratecal de IgG e IgM mediante isoelectrofoque e inmunodetección.

Resultados. Síntesis intratecal de IgG: Aparece un patrón en especial a partir del día 7 postinmunización, que se mantiene a lo largo del seguimiento.

Síntesis intratecal de IgM: Se detecta en las muestras de día 7 y 31 post inmunización coincidiendo con el primer y segundo brote de la enfermedad. No se detectó en los períodos de remisión.

Anticuerpos anti-PLP, IgM: Alcanzan un máximo a los 14 días, a partir de ese punto, los títulos decrecen. **IgG:** Aumentan hasta los 14 días. A partir de este punto se mantienen estables durante el seguimiento.

Anticuerpos anti-MBP: Se detecta un aumento a partir del día 31 que se mantiene durante el seguimiento.

Anticuerpos anti-MOG: Se detectan títulos muy bajos a partir del día 31.

Conclusiones. Los ratones hacen una respuesta temprana a la PLP que induce una diseminación de epítopos, detectándose anticuerpos frente a otros antígenos de la mielina a partir del segundo brote de la enfermedad. También se detecta la presencia de un patrón oligoclonal de IgG en suero, con la aparición de nuevas bandas a lo largo de la evolución. La síntesis intratecal de IgM coincide con los períodos de actividad de la enfermedad. Estos hallazgos pueden contribuir a dilucidar el papel de la síntesis de anticuerpos en la EAE.

O-008

EVIDENCIA DE ALTERACIONES EN LOS COMPARTIMENTOS DE LINFOCITOS B Y DE LA ACTIVACION DE CÉLULA T EN EL SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO TROMBÓTICO. *J. Carbone Campaner, A. Gallego López, N. Lanio Amador, C. Chean Pacheco, J. Navarro Caspistegui, J. Dale, E. Sarmiento Marchese. Hospital Gregorio Marañón, Madrid.*

Introducción. Existe evidencia de que el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) no sólo es una patología pro-trombótica sino que también asocia un componente inflamatorio. Nosotros hemos descrito que en el SAAF obstétrico existe una mayor activación de linfocitos T CD4⁺ (*J Rheumatol 2009; 36:1217*).

Objetivos. Caracterizar alteraciones inmunofenotípicas de sangre periférica en pacientes con SAAF trombótico.

Métodos. Pacientes: 13 pacientes con SAAF trombótico (diagnosticados según criterios de clasificación de Sidney) y 52 controles sanos de edad similar. Las subpoblaciones linfocitarias T, B y NK se estudiaron en fresco, en sangre periférica, mediante citometría de flujo de tres colores (sangre total), incluyendo distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales anti: CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CCR7, CD38, HLA-DR, CD19, CD27, IgD, CD5, CD40, CD16 y CD56. Estadística: prueba T de Student con dos colas.

Resultados. En relación con los controles sanos, los pacientes con SAAF trombótico tenían: mayor porcentaje de linfocitos B naïve (CD19⁺CD27-IgD⁺: 67 vs 58%, p=0,04) y menor de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (CD19⁺CD27⁺IgD⁻: 14 vs 22%, p=0,009); aumento de la expresión de marcadores de activación tanto en células T CD4⁺ (CD4⁺CD25⁺DR⁺: 5 vs 3,7%, p=0,01) como CD8⁺ (CD8⁺DR⁺: 27 vs 21%, p=0,03). En los pacientes con SAAF trombótico no observamos alteraciones en el porcentaje de células T CD4 o CD8 reguladoras (CD4⁺CD25^{high}, CD8⁺CD28⁻), ni en el porcentaje de células NK (CD3-CD16⁺CD56⁺).

Conclusiones. En pacientes con SAAF trombótico se observan distintas alteraciones inmunofenotípicas en linfocitos de sangre periférica, algunas de ellas potencialmente implicadas en la patogenia del síndrome, lo que aporta más evidencia al concepto de que este síndrome se extiende más allá de la producción de autoanticuerpos. A la vista de los resultados, un aumento de células B naïve evidenciaría la posibilidad de que esta subpoblación no sólo puede participar en procesos

de presentación antigenica sino en la misma producción de anticuerpos. El aumento de marcadores de activación sobre células T CD4⁺ se podría enmarcar en la posible presencia de células T autoreactivas.

O-009

RECLUTAMIENTO DE SUBPOBLACIONES ESPECÍFICAS DE LINFOCITOS T CD8⁺ REGULADORES EN LIQUIDO CEFALORRÁQUIDEO DE PACIENTES DE PACIENTES EN PRIMER BROTE DE ESCLEROSIS MULTIPLE. *M. Tejera Alhambra, R. Teijeiro, B. Alonso, C. De Andrés, E. Fernández-Cruz, S. Sánchez-Ramón. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.*

La esclerosis múltiple (EM) es una grave enfermedad inflamatoria desmielinizante y progresiva del sistema nervioso central (CNS), en la que diferentes subpoblaciones de linfocitos T CD4⁺ y CD8⁺ juegan un importante papel en el daño tisular y en la supresión de la respuesta efectora. Se desconoce la presencia y función de los linfocitos T CD8⁺ reguladores (Ts) en la fisiopatología de la EM.

Objetivo. Estudiar la presencia de subpoblaciones de linfocitos Ts (CD8⁺CD25⁺, CD8⁺CD28⁻, CD8⁺CD25⁺CD28⁻, CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ y CD8⁺CD25⁺CD127lo) y efectores (CD8⁺CD45RA⁺CCR7⁻) en el líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre periférica (SP) de pacientes con primer brote de EM.

Materiales y Métodos. Se analizaron en paralelo mediante citometría de flujo multiparamétrica muestras de LCR y SP de pacientes con EM (n=13).

Resultados. Los porcentajes de linfocitos Ts CD8⁺CD28⁻, CD8⁺CD25⁺CD28⁻, CD8⁺CD25⁺CD127⁻ y CD8⁺CD25⁺FoxP3⁺ fueron superiores en LCR que en SP (p=0,05; p=0,06; p=0,004 y NS, respectivamente), indicando un reclutamiento específico de estas células en el LCR en brote. Por el contrario, los linfocitos T CD8⁺CD25⁺ totales fueron más abundantes en SP (p=0,03). Los porcentajes de células T CD4 y CD8 naïve fueron menores en LCR (p<0,0001 y p=0,004, respectivamente) respecto a SP, mientras que las células T CD4 pre-efectoras (p=0,004), memoria (p=0,002) y efectoras (p=0,07) fueron mayores en LCR. Las células CD8 pre-efectoras fueron mayores en LCR (p=0,004), mientras que las células CD8⁺ memoria (p=0,04) en SP.

Conclusiones. En nuestra cohorte de pacientes en primer brote de EM observamos un Enriquecimiento específico de subpoblaciones de Ts y de células T CD4⁺ y CD8⁺ pre-efectoras y CD4⁺ efectoras en el LCR. Estos datos podrían sugerir el reclutamiento específico de Ts que modulan a la baja la molécula CD28 y expresan el factor de transcripción FoxP3 para inhibir la respuesta efectora T CD4 y CD8 antígeno específica en un intento de controlar la enfermedad.

O-010

A ROLE FOR AIM, A MACROPHAGE SOLUBLE MEMBER OF THE SRCR SUPERFAMILY, AS A PATTERN RECOGNITION RECEPTOR. *V.G. Martínez¹, C. Escoda I Ferran¹, C. Miró¹, A. Castrillo², F. Lozano³.*

¹Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Barcelona. ²Departamento de Bioquímica-Biología Molecular, Universidad de Las Palmas. ³Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias, Universidad de Barcelona.

*Authors contributed equally to this work (Oral). No beca Inmunidad Innata.

Mouse AIM (Apoptosis Inhibitor expressed in Macrophages), a homologue of human Spa, is a soluble member of the scavenger receptor

cysteine-rich (SRCR) superfamily, a group of proteins involved in both the innate and adaptive immune response. Pleiotropic functions have been ascribed to AIM, from survival support of lymphocytes during thymic selection to anti-inflammatory effects in autoimmune pathologies. To further explore its functional capabilities we successfully expressed a recombinant form of AIM (rAIM) using an episomal system in HEK293-EBNA cells. We used rAIM to generate AIM-specific rat mAbs and to identify conserved epitopes cross-reactive with anti-Spa mouse mAbs previously generated by our group. Additionally, the pathogen-binding properties of rAIM were also explored. The results obtained show that rAIM binds to a number of Gram-positive as well as Gram-negative bacterial strains. Furthermore, rAIM induced aggregation of both Gram-positive and Gram-negative bacteria, which could imply the existence of multiple bacterial binding domains. Bacterial binding and aggregation was insensitive to EDTA, suggesting that divalent ions do not influence binding of rAIM to bacteria. Interestingly, some of the rat anti-AIM and mouse anti-Spa mAbs used in this study competed the binding of both rAIM and rSpa to bacteria. Altogether, these data suggest a role for AIM in innate immune defence against bacteria.

SESIÓN 2: CÉLULAS B Y ALERGIA

Moderadores: Jose Antonio Brieva Romero (Cádiz)
Julia Sequí Navarro (Madrid)

O-011

MODULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS B NAIVE POR LIGANDOS DE INTEGRINAS. J. Saez De Guinoa Corral, L. Barrio Cano, M. Mellado, Y. R. Carrasco. FCSIC/Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.

Las células B *naive* migran activamente dentro de los órganos linfoides secundarios (OLS) en busca de antígeno específico. Este movimiento está regulado principalmente por la quimioquina CXCL13 y, en menor medida, la quimioquina CXCL12, ambas producidas por células foliculares dendríticas (FDC) y otras células estromales presentes en los OLS. Datos obtenidos mediante técnicas de microscopía confocal y multifotón indican que las células B se desplazan siguiendo la red de "caminos" formada por la superficie de las FDC. Poco se sabe a cerca del posible efecto modulador del contexto molecular sobre el cual la célula B migra. En este trabajo, hemos puesto a punto un modelo bidimensional de membranas artificiales donde podemos estudiar la dinámica en tiempo real de células B *naive* en respuesta a CXCL13 y CXCL12 mediante técnicas de microscopía confocal. Con este sistema hemos analizado cómo las moléculas de adhesión ICAM-1 y VCAM-1, ligandos de las integrinas LFA-1 y VLA-4, respectivamente, modifican la migración de las células B *naive*. Los resultados obtenidos indican que las quimioquinas CXCL13 y CXCL12 inducen la polarización de las células B *naive* en igual proporción, y de manera independiente a la presencia de ambos ligandos de integrinas. Por otra parte, la migración sí requiere de la presencia de ICAM-1 y/o VCAM-1; además, su densidad juega un papel crítico en la modulación de los parámetros dinámicos de la célula B *naive*. Es necesaria una densidad mínima de estos ligandos para promover la migración de la célula B; a densidades óptimas, los parámetros dinámicos alcanzan valores muy similares a los descritos *in vivo* por microscopía multifotón en ganglios linfáticos; altas densidades de ICAM-1 y/o VCAM-1 retardan, sin embar-

go, el movimiento de la célula B. Por último, también hemos observado que, a iguales densidades, ICAM-1 promueve una mayor velocidad de migración y, por tanto, una dinámica más activa, que VCAM-1. En conjunto, estos datos ponen de manifiesto el importante papel modulador de ambas moléculas de adhesión en la dinámica de las células B y, por tanto, en los procesos de búsqueda y reconocimiento del antígeno específico en los OLS.

O-012

UTILIDAD DEL TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÓFILOS EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ANAFILAXIA A FÁRMACOS. A. Marin Sánchez, P. García Ortega, I. Salvador Corres, A. Teniente Serra, E. Ruiz-Ortiz De Arrizabaleta, R. Pujol-Borrell, E. Martínez-Cáceres. Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

Objetivo. Evaluar la utilidad de la test de activación de basófilos (TAB) en el diagnóstico de la alergia a fármacos en pacientes con anafilaxia grave en los que las pruebas *in vivo* se consideran de alto riesgo.

Materiales y Métodos. Se seleccionaron pacientes que consultaron después de una anafilaxia potencialmente mortal que se había producido en menos de una hora tras la administración de un sólo fármaco. Despues de la anamnesis detallada, los pacientes con otras etiologías posibles fueron descartados por la historia clínica y/o pruebas cutáneas. Entre 2 a 6 meses después de la reacción se realizaron tanto el TAB (Basotest, Orpegen, Alemania) como la determinación de IgE específica (ImmunoCAP, Phadia, Suecia). Las pruebas cutáneas se efectuaron sólo a pacientes con reacciones menos graves que aceptaron el riesgo y que firmaron un consentimiento informado.

Resultados. Se recogieron 24 pacientes que cumplían las condiciones del estudio. La clínica fue de paro respiratorio (3 casos), shock (10 casos), edema lárígeo (2 casos), pérdida de conciencia (4 casos), disnea (4 casos) y obnubilación (1 caso). Los fármacos implicados fueron la amoxicilina en 14 pacientes, metamizol en 5, el ibuprofeno en 2 y cloxacilina, ácido pipemídico y diclofenaco en el resto. El TAB fue positivo en 10 pacientes (42%), negativo en 12 (50%) y no evaluable en 2 (8%), estos últimos correspondientes a un paciente no respondedor frente al control con anti-IgE y otro con menos del 5% basófilos activados frente al fármaco. La IgE específica fue positiva en sólo 3 / 17 pacientes (18%) con TAB negativo (n=1) o dudoso (n=2).

Conclusiones. A pesar de que las pruebas cutáneas siguen siendo la herramienta más fiable para determinar alergia a fármacos grave, cuando estas pruebas no se pueden realizar por razones éticas o porque son rechazadas por los pacientes, la combinación del TAB y la IgE específica puede identificar el fármaco responsable en más del 50% de los pacientes con anafilaxia potencialmente mortal.

O-013

MECANISMOS REGULADORES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA ALÉRGICA: MODELO DE RESPUESTA AL POLEN DE OLIVO. M. Aguerri Moreno¹, F. Florido², J. Quiralte³, J. Delgado⁴, A. Miranda⁵, J.M. López-Cacho¹, S. Gallardo¹, P. Palomino¹, L. Carlos¹, B. Cárdaba Olombrada¹. ¹IIS-Fundación Jiménez Díaz-CIBERES, Madrid. ²Hospital Universitario San Cecilio, Granada. ³Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. ⁴Policlínico, Sevilla. ⁵Hospital Civil, Málaga

Objetivo. La sensibilización y la tolerancia (natural o inducida) a los alérgenos puede ser debida a diferentes mecanismos molecula-

res. El objetivo del trabajo es analizar alguno de estos mecanismos, usando como modelo la respuesta al polen de olivo.

Material y Métodos. Se seleccionaron 84 sujetos distribuidos en 5 grupos: Grupo 1 (no alérgicos, N=17), Grupo 2 (asintomáticos con anticuerpos IgE frente a olivo, N=10), Grupo 3 (alérgicos no relacionados, N=20), Grupo 4 (alérgicos al olivo, no tratados, N=22) y Grupo 5 (alérgicos al olivo con inmunoterapia específica, N=15). Se obtuvo suero, plasma, PBMCs, ARN y ADN durante y fuera del periodo de polinización.

En el suero se determinaron los niveles de anticuerpos IgE total, IgE, IgA e IgG4 específicos al polen de olivo mediante CAP, así como citoquinas Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-4, IL-5, IL-9, IL-13), reguladoras (IL-10, TGF- β) e IL-17 y TNF- α mediante ensayos inmunoenzimáticos (ELISA).

El RNA se extrajo de las PBMCs por el método de Trizol y se analizó la expresión del mRNA del gen FOXP3 mediante RT-PCR.

Resultados. Los niveles más altos de anticuerpos IgE específicos se observaron en los sujetos alérgicos al olivo (tratados y no tratados) aunque los tratados mostraron los niveles más altos de anticuerpos IgG4 específicos. El grupo de asintomáticos mostró los mayores niveles de IgE total.

El resultado más relevante del análisis de citoquinas fue el descenso significativo de los niveles de TGF- β en el grupo de alérgicos no tratados durante la polinización. En este mismo grupo encontramos un descenso significativo en la expresión de FOXP3.

Conclusiones. Los resultados de la respuesta humoral junto al descenso de TGF- β en suero y de FOXP3 en el grupo de sujetos alérgicos al olivo en el periodo de mayor exposición polínica, sugieren un descenso de los mecanismos reguladores en los pacientes alérgicos, y cómo la respuesta puede ser normalizada mediante la inmunoterapia.

O-014

DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES ÚTILES EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ DE LEUCEMIAS LINFOIDES B. M. Fuentes García¹, R. Bartolome Casado¹, M. Gonzalez-Gonzalez¹, R. Góngora², J.M. Sayagües², F. Lund-Johansen³, A. Orfao¹. ¹Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca. ²Universidad de Salamanca, Salamanca. ³University of Oslo, Oslo, Norway.

En este proyecto se ha desarrollado una estrategia metodológica que permite relacionar el inmunofenotipo de células B neoplásicas individuales con sus niveles de expresión para un amplio abanico de proteínas. Para ello, se han combinado técnicas de purificación celular por citometría de flujo y que permiten además una caracterización inmunofenotípica básica de las células B aberrantes, junto con la utilización de arrays de proteínas (basados en esferas) para establecer patrones de expresión proteica a nivel de las poblaciones celulares purificadas subyacentes a los diferentes inmunofenotipos celulares encontrados.

Objetivos. 1. Diseño y desarrollo de un array de partículas magnéticas para la purificación mediante citometría de flujo de poblaciones de células B aberrantes de pacientes con leucemia linfoides B, de subpoblaciones B neoplásicas muy minoritarias (pequeños clones de significado incierto detectados en individuos aparentemente sanos) y su contrapartida normal. 2. Rastreo dirigido hacia la detección de anticuerpos frente a proteínas potencialmente antigenicas de las líneas de células B neoplásicas. 3. Análisis de arrays basados en anticuerpos para la determinación de patrones proteicos de expresión, incluyendo la cuantificación de proteínas individuales intracelulares, la evaluación

de niveles de fosforilación, ... en células aberrantes B comparado con células normales.

Metodología. Se incluirán un total de 100 individuos; n=50 LLC-B u otros SLPC-B leucemizados (n=50). Inicialmente se les proporcionará a todos los individuos un cuestionario de salud y sobre sus muestras de sangre periférica obtenidas en ese momento, se realizará el rastreo diagnóstico de la presencia de células B clonales mediante citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales en combinaciones cuádruples/séxtuples. En los casos en los que se detecte la presencia de células B aberrantes se realizará una amplia caracterización de la/s población/es B aberrante/s purificada/s: a) Caracterización inmunofenotípica completa y exhaustiva de dichas poblaciones de células B por citometría de flujo. b) Rastreo de muestras de plasma de la presencia de Ac frente a una amplia gama de bacterias, virus y otros microorganismos mediante técnicas inmunoenzimáticas; c) Estudios de expresión proteica diferencial mediante técnica de microarrays de proteínas. Finalmente, se hará la integración y análisis de los datos obtenidos y correlación con los hallazgos clínicos y biológicos.

Resultados y Conclusión. Se han obtenido resultados relevantes y útiles mediante la comparación de los perfiles proteicos de expresión diferencial de poblaciones de células B aberrante de pacientes con leucemia linfoides B, de subpoblaciones B neoplásicas muy minoritarias (pequeños clones de significado incierto detectados en individuos aparentemente sanos) y su contrapartida normal, como por ejemplo diferencias claras en la expresión de proteínas como AKT1, JAK-STAT, etc. así como diferentes factores de transcripción incluyendo mutaciones puntuales en p53 y Mdm2.

O-015

EXPRESIÓN DE HLA-G POR LAS CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS HUMANAS. A. Prados Martín, E. Leno Durán, R. Muñoz Fernandez, E. García Olivares. Universidad de Granada/CIBM, Armilla.

Objetivos. Las Células Foliculares Dendríticas (FDC, Follicular Dendritic Cells) constituyen la fracción estromal de los centros germinales, los cuales se forman tras la activación de los linfocitos B en los folículos linfoides. La función de las FDC consiste en capturar y retener antígenos nativos en su superficie, los cuales son presentados a las células B para su selección positiva, durante la maduración de la afinidad. Además, durante la presentación del antígeno, las FDC les aportan señales de supervivencia y proliferación a estos linfocitos. El HLA-G es una molécula perteneciente al MHC-I no clásica, implicada en procesos de tolerancia inmunológica y capaz de formar dímeros a través de una cisteína en posición 42, característica inusual dentro del MHC. Dichos dímeros presentan una elevada afinidad por el receptor ILT-2, expresado en células B vírgenes y memoria, entre otras. El objetivo de este trabajo es determinar la expresión de HLA-G en líneas de Células Foliculares Dendríticas humanas.

Material y Métodos. Se aislaron FDC humanas de amígdalas, obtenidas de pacientes de entre 3 y 10 años con amigdalitis crónica, en completa remisión antes de la intervención. Se realizó un análisis fenotípico y funcional mediante citometría de flujo de las líneas y la expresión de HLA-G fue determinada mediante Western-Blot.

Resultados. Nosotros aislamos líneas de FDC y las mantuvimos en cultivo durante varios meses. Estas líneas expresaron CD10, CD21, CD23, CD29, CD73, ICAM-1, BAFF, α -SM Actina y STRO-1, un fenotipo característico de FDC. Además, las líneas de FDC fueron capaces de rescatar de la apoptosis a linfocitos B de amígdalas, al ser co-

cultivadas durante 72h. Finalmente, mostramos la expresión de dímeros de HLA-G1 mediante Western-Blot.

Conclusiones. En este trabajo, demostramos la expresión de dímeros de HLA-G en FDC. La expresión de esta molécula inhibidora brinda una nueva perspectiva sobre la función de las FDC, caracterizadas por transmitir señales activadoras. Los dímeros de HLA-G podrían impedir la proliferación de linfocitos B vírgenes o memoria, pues estas células expresan el receptor ILT-2 hasta el momento de ser activadas vía BCR. Así, el HLA-G regularía el efecto que las citocinas producidas por las FDC pudieran tener sobre linfocitos no activados.

O-016

RELACIÓN ENTRE CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES Y CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS. *R. Muñoz Fernández, A. Prados Martín, E. Leno Durán, E. García Olivares. Universidad de Granada / CIBM, Armilla.*

Objetivos. Las células deciduales estromales (decidual stromal cells, DSC) se localizan en la decidua, tejido transitorio, que procede del endometrio gestante por efecto de la progesterona, y en íntimo contacto con el trofoblasto (origen fetal). Estas células inhiben la apoptosis de linfocitos deciduales, ejerciendo un papel inmunorregulador en la interfase materno-fetal. Las células foliculares dendríticas (follicular dendritic cells, FDC) se encuentran en los folículos linfoides, donde captan y retienen antígenos nativos durante largos períodos de tiempo y cuya función principal es rescatar de la apoptosis a las células B foliculares. En la diferenciación a FDC interviene el TNF α , mientras que las DSC se diferencian por la progesterona. A pesar de que DSC y FDC son dos tipos celulares aparentemente distintos, ambos han sido relacionados con las células madre mesenquimales (mesenchymal stem cells, MSC). El objetivo de este trabajo es determinar la posible relación entre DSC y FDC en cuanto a su fenotipo antigénico y funcionalidad.

Material y Métodos. Muestras: Las FDC se obtuvieron de amígdalas de pacientes con amigdalitis (3-10 años) y las DSC de decidua de abortos inducidos del primer trimestre (6-11) de mujeres sanas (20-30 años). Las DSC y FDC fueron cultivadas en Opti-MEM y en su fase de crecimiento se procedió al estudio del fenotipo antigénico y a la producción de la quimiocina CXCL-13, por citometría de flujo y E.L.I.S.A respectivamente. Para el papel funcional, se realizaron co-cultivos de DSC o FDC con células B y se determinó la apoptosis en células B cuantificando la fase sub-G1 por citometría de flujo. DSC fueron tratadas con TNF y se estudió su efecto sobre el fenotipo antigénico de estas células. Por otra parte, las FDC fueron tratadas con progesterona y AMPc, y se determinó la secreción de prolactina mediante E.L.I.S.A.

Resultados. DSC y FDC presentaron morfología fibroblástica *in vitro* y fenotipo similar. Fueron positivas para CD10, CD29, CD54 (ICAM-1) y CD73, marcadores relacionados con MSC, y para CD21, CD23, BAFF y secretaron CXCL-13 (quimiocina), marcadores propios de FDC. Funcionalmente, las DSC al igual que FDC, inhibieron la apoptosis de células B, requiriendo contacto celular. El TNF α , aumentó la expresión ICAM-1 (CD54) tanto en DSC como en FDC. Cuando las FDC fueron tratadas con progesterona y AMPc, se detectaron niveles de prolactina en el sobrenadante, aunque en niveles significativamente inferiores a los presentados por las DSC.

Conclusiones. Aunque las DSC y FDC son células aparentemente distintas y realmente distantes, y se encuentran en entornos funcionales muy diferentes, comparten unas características fenotípicas y funcionales semejantes.

O-017

EFECHO DE LA ADICIÓN DE CITOQUINAS SOBRE LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS PLASMÁTICAS CIRCULANTES HUMANAS. *B. Rodríguez-Bayona, A. Ramos-Amaya, J.A. Brieva. Hospital Universitario Puerta de, Cádiz.*

Objetivos. Las células plasmáticas (CP) constituyen la fase final de diferenciación del linfocito B, siendo las responsables de la respuesta inmune humoral. Las CP conforman un compartimento heterogéneo que engloba células con características fenotípicas y funcionales distintivas dependiendo de su localización anatómica, mostrando un gradiente de maduración en el sentido amígdala (A) - sangre periférica (SP) - médula ósea (MO). El objetivo del presente estudio consistió en la identificación de los factores implicados en la transición de CP circulantes a CP de larga vida.

Materiales y métodos. Se obtuvieron muestras de SP de voluntarios sanos 6 días después de inmunización convencional con toxoide tetánico (tet). Esta vacunación induce una rápida respuesta frente a tet, desencadenado la aparición de una oleada de CP circulantes que secretan IgG-tet, que es máxima a los 6 días de la inmunización. Sobre la fracción mononuclear deplecionada de linfocitos T se analizaron la incorporación de BrdU, la frecuencia de CP caspasa-3 activada positivas y la recuperación celular mediante citometría de flujo (CF), y la producción de IgG-tet mediante ELISA en cultivos control y con la mezcla de citoquinas.

Resultados. La adición de una mezcla de seis citocinas (SDF-1 α , IGF-I, IL-21, BAFF, VEGF121 y APRIL) provocaba un claro aumento de la producción de IgG-tet. Este efecto se debía a un incremento de la proliferación inicial de las CP circulantes. Además se observó una mayor recuperación celular y un aumento notable en la producción de Ac cuando se añadían estos factores, sin que se afectara la tasa basal de apoptosis de las CP. Estos efectos potenciadores, sin embargo, no se mantenían en el tiempo, como revelaban los estudios cinéticos de recuperación celular y de acumulación de la IgG-tet secretada.

Conclusiones. La adición de la mezcla de factores descrita a cultivos de CP de SP da lugar a un aumento de su proliferación y, por tanto, del número de precursores que justifican la mayor recuperación celular y producción de IgG-tet. No obstante, estos factores no producen mayor supervivencia de las CP.

O-018

UNA FASE DE PROLIFERACIÓN INICIAL Y SEÑALES MEDIADAS POR INTERLEUQUINA-6/STAT3 SON DOS REQUISITOS PARA LA SUPERVIVENCIA DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS CIRCULANTES HUMANAS. *A. Ramos-Amaya, B. Rodríguez-Bayona, J.A. Brieva. Hospital Universitario Puerta Del Mar, Ubrique.*

Objetivos. El compartimento de células plasmáticas (CP) circulantes humanas contiene una fracción de células proliferantes no observado en CP de médula ósea (MO). Por otro lado, IL-6 es una citoquina implicada en los procesos de diferenciación y supervivencia de CP. El objetivo de este estudio consistió en la caracterización de la cinética de formación, capacidad proliferativa, de desarrollar apoptosis, producción de Ac y respuesta a IL-6 de las CP circulantes.

Materiales y métodos. Se obtuvieron muestras de SP de voluntarios sanos 6 días después de inmunización convencional con toxoide tetánico (tet). Esta vacunación induce una rápida respuesta fren-

te a tet, desencadenando la aparición de una oleada de CP circulantes que secretan IgG-tet, que es máxima a los 6 días de la inmunización. Sobre la fracción mononuclear deplecionada de linfocitos T se analizaron la incorporación de BrdU, la frecuencia de CP caspasa-3 activada positivas y la recuperación celular mediante citometría de flujo (CF), y la producción de IgG-tet mediante ELISA en cultivos control y en presencia de anti-IL6 y de hidroxiurea, como inhibidor de la proliferación.

Resultados. Los datos obtenidos en el trabajo indican que *in vitro* existe una fase de proliferación temprana (primeras 24 horas de cultivo) de las CP circulantes tet-inducidas; esta fase parece importante en la biología de estas CP ya que, si es bloqueada, disminuye la supervivencia de las células en cultivo, y disminuye aún en mayor proporción la producción de IgG-tet por parte de las CP. También se ha visto que existe una baja, pero continua, tasa de apoptosis en los cultivos de CP circulantes lo que hace que la recuperación celular disminuya con el tiempo. La actividad apoptótica se ve fuertemente potenciada si se bloquea la IL-6 endógena con Ac anti-IL-6, por lo que esta citoquina estaría implicada en procesos de supervivencia de las CP.

Conclusiones. Las CP circulantes inducidas tras una inmunización presentan una actividad proliferativa inicial y una baja pero continua tasa de apoptosis. La IL-6 es un factor de supervivencia para las CP, ya que su bloqueo induce un aumento de apoptosis.

O-019

CARACTERIZACION FENOTIPICA Y FUNCIONAL DE LA POBLACION DE LINFOCITOS B CD19⁺CD45R⁻, SECRETORA DE INMUNOGLOBULINAS IGG E IGA PRESENTE EN EL BAZO DE RATONES ADULTOS. B. De Andres¹, B. Palacios¹, A.R. Sánchez-Archipiona¹, N. Serrano², I. Cortegano¹, C. Ruiz¹, F. Martínez¹, M. Alia¹, M.A. R. Marcos², M.L. Gaspar¹. ¹Instituto De Salud Carlos III, Aranjuez. ²Centro De Biología Molecular Severo Ochoa.

La población murina de linfocitos B, con fenotipo CD19⁺CD45R⁻ presente en bazo de individuos adultos, fue identificada por nosotros como secretora de forma espontánea de altos niveles de IgG e IgA. Esta subpoblación se encuentra ya en edades tempranas de la vida, y sus progenitores tienen un origen embrionario. En el estudio actual caracterizamos de forma extensa su fenotipo por citometría de flujo, identificándola como diferente de otras subpoblaciones de células B presentes en el bazo, tales como: las transicionales (T, CD93⁺), las células B foliculares (Fo, IgD⁺CD23⁺CD21⁺), las de zona marginal (MZ, CD21⁺⁺) y las células B1 peritoneales (B1, CD5⁺CD11b⁺). Además, mediante estudios de incorporación de BrdU *in vivo* y por transferencias adoptivas de la población purificada CD19⁺CD45R⁻, en animales inmunodeficientes RAG2. γ chain^{-/-}, hemos caracterizado su recambio celular y sus tasas de supervivencia en condiciones homeostáticas. Hemos también analizado su participación en respuestas T-dependientes y T independientes mediante activación *in vivo* e *in vitro* con diversos estímulos. Finalmente, estamos caracterizando el repertorio de las inmunoglobulinas que secretan estas células CD19⁺CD45R⁻, mediante la amplificación por RT-PCR de las regiones VDJ de las inmunoglobulinas que se expresan y su secuenciación.

Finalmente, podemos concluir que la población CD19⁺CD45R⁻ representa un nuevo subset del tipo innato, adscrito dentro del sistema inmune adaptativo.

O-020

B CELL COMMITMENT PROGRAM IS DRIVEN BY THE PROTO-ONCOGENE C-MYC. I. Moreno De Alborán, M. Vallespinós , D. Fernández, L. Rodríguez, J. Alvaro-Blanco, E. Baena, M. Ortiz, D. Dukovska, A. Rojas, M.R. Campanero. National Center for Biotechnology, Madrid.

c-Myc, a member of the Myc family of transcription factors, is involved in numerous biological functions including the regulation of cell proliferation, differentiation and apoptosis in various cell types. Of all its functions, the role of c-Myc in cell differentiation is one of the least understood. We addressed the role of c-Myc in B lymphocyte differentiation. We found that c-Myc is essential from early stages of B lymphocyte differentiation *in vivo*, and regulates this process by providing B cell identity via direct transcriptional regulation of the ebf-1 gene. Our data show that c-Myc influences early B lymphocyte differentiation by promoting activation of B cell identity genes, thus linking this transcription factor to the EBF-1-Pax-5 pathway.

SESIÓN 3: CÉLULAS T

Moderadores: Ana Clara Carrera (Madrid)
Enrique Aguado (Murcia)

O-021

VIRAL LIGANDS, CONSERVED AMONG ORTHOPOXVIRUSES, NATURALLY PRESENTED IN TAP-DEFICIENT VACCINIA VIRUS-INFECTED CELLS. D. López¹, E. Lorente¹, S. Infantes¹, E. Barneva², I. Beer², R. García¹, F. Lasala¹, M. Jiménez¹, C. Vilches³, A. Admon². ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. ²Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology. ³Laboratorio de Inmunogenética-HLA, Hospital Universitario Puerto de Hierro, Madrid.

The transporters associated with antigen processing (TAP) deliver the products generated by the proteolytic activity of proteasomes in the cytosol to the rough endoplasmic reticulum lumen. This classical endogenous antigen processing pathway is the main source of pathogen HLA ligands that are later specifically recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTL) on the surface of infected cells. Several viral epitopes in individuals with non functional TAP complexes and both TAP-deficient cell lines and mice models have been identified. Except for Epstein-Barr virus, no systematic studies of pathogen derived TAP-independent ligands have been reported. Using mass spectrometry analysis of complex HLA-bound peptide pools isolated from large amounts of TAP-deficient vaccinia virus-infected cells, we identified six naturally processed either HLA-A*0201 or B*2705 class I molecules in the same infected cells. All sequences are conserved in several vaccinia virus strains, variola virus and other orthopoxviruses. In addition to two high-affinity ligands, one low-affinity peptide restricted by each HLA class I molecule studied was identified. Both high- and low-affinity ligands generate CTL long-term memory response against vaccinia virus in an HLA-A*0201 transgenic mouse model. These data have implications for the analysis of the CTL response, for the vaccine development, and for the study of effectiveness of early empirical vaccination with cowpoxvirus against smallpox disease.

O-022

ALTERACIONES EN LA DISTRIBUCIÓN DE LAS POBLACIONES DE LINFOCITOS T Y EN SU PATRÓN DE SECRECIÓN DE CITOQUINAS SEGÚN LA EXPRESIÓN DE ZAP-70 EN PACIENTES CON LLC-B. M.Á. Sánchez Luengo¹, L. Ortega Moreno¹, G. Parada Hermoza¹, Z. Moreno Villegas¹, D. Díaz Martín¹, H. Barcenilla Rodríguez¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, E. Reyes Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto². ¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Introducción. Los nuevos criterios para definir el grado de activación de linfocitos T están basados en la expresión combinada de la isoforma del antígeno CD45RA y del marcador CD27. En el caso de la LLC-B se ha observado que existía un incremento de las células T memoria y descenso de células novatas en pacientes categorizados en morfología atípica o elevado número de linfocitos circulantes. ZAP-70 se muestra como un factor pronóstico de gran importancia para predecir la evolución de los pacientes con LLC-B.

Objetivos. Estudiar la distribución de los linfocitos T según su grado de activación y el patrón de producción de citoquinas en pacientes con LLC-B según el valor pronóstico ZAP-70.

Materiales y métodos. Se utilizaron células mononucleares de sangre periférica de 34 pacientes con LLC-B que se categorizaron por citometría de flujo en dos grupos según la expresión de ZAP-70 (ZAP-70+ y ZAP-70-) y de 18 controles sanos de edad y sexo pareado. Las células fueron cultivadas durante 6 horas en presencia de PMA, ionomicina y nomensina. El estudio inmunofenotípico y de producción de citoquinas se realizó por citometría de flujo de 8 colores utilizando anticuerpos frente a los antígenos de superficie CD3, CD8, CD27, CD28, CD45RA, CD62L y anticuerpos para el marcaje intracelular de las citoquinas INF γ , TNF α , IL-2, IL-4 e IL-10.

Resultados. Los pacientes con LLC-B y de forma significativamente mayor en los ZAP-70+ que en los ZAP-70- presentaron una profunda redistribución del compartimento linfocitario T, tanto CD4+ como CD8+, con incremento de los linfocitos T CD4+ efectores y T CD8+ memoria central así como descensos significativos de linfocitos T CD4+ y CD8+ novatos. Por otra parte se observó diferencias en la producción de citoquinas entre los diferentes grupos de pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 además de mostrar diferencias significativas con los controles sanos.

Conclusiones. Existe una profunda alteración en los pacientes con LLC-B y en concreto en los ZAP-70+ en el compartimento de células T tanto en su distribución como en su capacidad de producción y secreción de citoquinas que puede estar relacionado con el peor pronóstico y evolución de estos pacientes.

O-023

AUMENTO DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T Y CÉLULAS REGULADORAS FOXP-3+ EN PACIENTES CON LLC-B ZAP-70+. M.Á. Sánchez Luengo¹, Z. Moreno Villegas¹, G. Parada Hermoza¹, L. Ortega Moreno¹, D. Díaz Martín¹, H. Barcenilla Rodríguez¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, E. Reyes Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto². ¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Introducción. La patogenia de la LLC-B no sólo está ocasionada por las alteraciones existentes en los linfocitos B. Existen alteraciones en otros compartimentos del sistema inmune incluidos los linfocitos

T, siendo estas alteraciones tanto a nivel de distribución poblacional como también fenotípica y funcionalmente.

Objetivos. Estudiar la distribución de diferentes subpoblaciones de linfocitos T y su estado de activación en pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 por parte de las células B tumorales.

Materiales y métodos. Se realizó estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de 4 colores, para lo cual se obtuvieron PBMCs de sangre periférica de 34 pacientes con LLC-B que se categorizaron en ZAP-70+ (n=16) y ZAP-70- (n=18), y de 18 controles sanos. Para el estudio de las distribución y activación de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T se utilizaron anticuerpos frente a los antígenos de superficie CD3, CD4, CD8, CD25, CD28, CD40L, CD62L, CD45RA, CD45RO, CD95. También se estudió la distribución de células reguladoras mediante el marcaje con anticuerpos frente a los antígenos CD4, CD25 y FOXP-3.

Resultados. Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ mostraron incrementos significativos con respecto de los pacientes ZAP-70- y los controles sanos del número absoluto de linfocitos T. Sin embargo si bien los pacientes con LLC-B muestran incrementos importantes y significativos tanto de linfocitos T CD4+ como CD8+ respecto de los controles sanos, no hay diferencias significativas entre pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70. Los pacientes con LLC-B ZAP-70+ además se caracterizan por un incremento significativo de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ que expresan CD45RO, CD62L, CD95 y sin embargo por una disminución significativa de los números absolutos y porcentajes de los linfocitos T CD4+ y T CD8+ que expresan CD28. Por otra parte los pacientes ZAP-70+ mostraron un incremento significativo de células CD4+FOXP-3+ con respecto de los otros dos grupos estudiados.

Conclusión. Existe una importante alteración en la distribución así como en la activación de los linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+ en los pacientes con LLC-B ZAP-70+, mostrando estos pacientes un mayor grado de activación celular y una mayor proporción de células reguladoras FOXP-3+.

O-024

INCREMENTO DE LA APOPTOSIS DE LOS LINFOCITOS T EN PACIENTES CON LLC-B ZAP-70+. M.Á. Sánchez Luengo¹, G. Parada Hermoza¹, Z. Moreno Villegas¹, L. Ortega Moreno¹, D. Díaz Martín¹, H. Barcenilla Rodríguez¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, E. Reyes Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto². ¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Introducción. La LLC-B se caracteriza por una acumulación lenta y progresiva de células B debido a un aumento anormal de su resistencia a la apoptosis. Sin embargo la apoptosis ha sido un fenómeno poco estudiado en las células T en aquellos pacientes con LLC-B no tratados, si bien hay algunos estudios atendiendo a la expresión de moléculas relacionadas con los procesos de apoptosis.

Objetivos. Estudiar el grado de apoptosis de diferentes subpoblaciones de linfocitos T en pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 y en comparación con controles sanos.

Materiales y métodos. Se obtuvieron células mononucleares de sangre periférica por separación por gradiente de densidad con Ficoll de sangre periférica de 34 pacientes con LLC-B que se categorizaron en ZAP-70+ (n=16) y ZAP-70- (n=18), y de 18 controles sanos de edad y sexo pareados. El estudio de la apoptosis se realizó mediante el marcaje con Anexina-V en FITC y uso de citometría de flujo de

8 colores. Los marcadores escogidos para la determinación de las diferentes poblaciones celulares fueron: CD3, CD4, CD8, CD27, CD28, CD62L y CD45RA. Se calculó el AI (Apoptotic index o porcentaje de células apoptóticas) a tiempo basal y tras cultivo de 24 horas.

Resultados. Observamos como el AI tanto en los linfocitos T CD4⁺ como CD8⁺ a tiempo basal son significativamente más bajos en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ respecto a los pacientes ZAP-70⁻ y los controles sanos, sin embargo tras 24 horas de cultivo la situación se revierte siendo en los pacientes ZAP-70⁺ donde estas células presentan porcentajes significativamente superiores respecto a las células de los otros dos grupos estudiados llegando a alcanzar valores superiores al 50%. Por otra parte existe en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ una correlación significativa entre la coexpresión de CD45RO y CD95 y el porcentaje de apoptosis que presentan los linfocitos T CD4⁺ ($r = 0,72$, $p < 0,01$) y CD8⁺ ($r = 0,80$, $p < 0,01$) tras cultivo de 24 h.

Conclusiones. En los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ los linfocitos T muestran una alteración en su apoptosis que puede estar relacionada con el defecto de este compartimento en el control de la enfermedad.

O-025

CARACTERIZACIÓN ESPACIO-TEMPORAL DE LA SEÑALIZACIÓN POR NOTCH1 IN VIVO EN EL TIMO HUMANO. M.J. García Leon¹, G. Del Monte Nieto², J.L. de la Pompa², M.L. Toribio García³.

¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid. ²Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares. ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa

El desarrollo T es un proceso mediado por gran variedad de tipos celulares dispuestos en diferentes localizaciones en el timo. Estas células forman una organizada red estromal que proporciona una combinación precisa de interacciones celulares, citoquinas y quimioquinas que inducen la migración, proliferación y diferenciación de los progenitores hematopoyéticos intratímicos (HPCs). El entendimiento y la caracterización de estas señales complejas es imprescindible para aportar claves de cómo se regulan los procesos asociados al desarrollo de los distintos linajes intratímicos. Los diferentes ligandos del receptor Notch1 expresados en el timo son esenciales para la proliferación y diferenciación de los HPCs, lo que sugiere la participación selectiva de diferentes ligandos en eventos concretos de la timopoyesis. Para validar esta hipótesis, hemos analizado, mediante inmunohistoquímica y microscopía confocal, la identificación *in vivo* en el timo humano de los nichos intratímicos definidos por la activación del receptor Notch1 y por la expresión de sus ligandos. Hemos mostrado la primera evidencia *in vivo* de que Notch1 se activa específicamente en HPCs CD34^{hi/+}, en timocitos subcapsulares y, lo que es más novedoso, en células epiteliales medulares (mTECs) y corticales (cTECs) subcapsulares, sugiriendo la implicación de Notch1 en la diferenciación y homeostasis de las células epiteliales tímicas. Asimismo, mostramos la existencia de microambientes especializados en la presentación de ligandos específicos de Notch1. Además, observamos niveles variables de los ligandos de Notch en distintas regiones histológicas y tipos celulares, lo que sugiere un nivel de regulación funcional dependiente de la intensidad de la señal ligando-específica. En concreto, el ligando Delta-like-4, imprescindible para el desarrollo T, muestra una amplia y heterogénea distribución, con elevados niveles en endotelio y células mieloides y niveles más bajos en timocitos y cTECs. Además, la expresión de los ligandos parece regu-

larse con la edad, lo que podría contribuir a la degeneración funcional del timo asociada a la edad. Por tanto, la señalización por Notch1 en el timo humano comprende una compleja regulación de interacciones ligando-específicas entre timocitos y células estromales restringidas en el espacio y en el tiempo, con posibles implicaciones funcionales en la generación de linfocitos T y células no-T intratímicas.

O-026

ANÁLISIS DE LA FUNCIÓN DE DIVERSOS MOTIVOS NO BASADOS EN TIROSINA DEL ADAPTADOR LAT. A. García-Blesa¹, M. Martínez-Florensa², J. Yélamos³, F. García-Cózar¹, P. Aparicio⁴, A. Alonso⁵, E. Aguado⁵. ¹Universidad de Cádiz, Puerto Real. ²Hospital Clinic, Barcelona. ³IMIM-Hospital del Mar, Barcelona. ⁴Universidad de Murcia, Murcia. ⁵Hospital Carlos Haya - Universidad de Málaga, Málaga.

La proteína adaptadora LAT ("Linker for Activation of T cells") tiene una función prominente en la transducción de señales intracelulares generadas a partir del complejo TCR/CD3. Tras la estimulación de linfocitos T a través de su TCR se produce la fosforilación de varios residuos de tirosina del adaptador LAT. Esto permite el reclutamiento hasta la membrana plasmática de varias proteínas citosólicas, implicadas en etapas más tardías de la transducción de señales intracelulares que conducen a la activación de las células T. Sin embargo, se sabe muy poco acerca del papel de otras secuencias consenso no basadas en tirosina presentes en el adaptador LAT. En este trabajo presentamos evidencia de la función de varios motivos consenso basados en serinas presentes en la secuencia de aminoácidos de LAT. Estos motivos son esenciales para la correcta transducción de señales de activación dependientes del complejo TCR/CD3, ya que su mutación impide en células Jurkat la correcta generación de flujos de calcio, la activación de la ruta de las MAP-kinasas y la producción de IL-2. Además, estos motivos basados en serina parecen tener un papel de protección frente a la apoptosis, ya que las células Jurkat que expresan una forma mutante de LAT para esos motivos son más propensas a la muerte celular inducida tras estimulación del complejo TCR/CD3. La función de estos motivos no se reduce a señales intracelulares tardías, sino que parece afectar a eventos tempranos como la activación de la kinasa ZAP-70. En consecuencia, nuestro trabajo demuestra que secuencias consenso del adaptador LAT, no basadas en tirosina, son esenciales para el desempeño de sus funciones.

O-027

EFFECTO DIFERENCIAL DE CEPAS PROBIÓTICAS DE BIFIDOBACTERIUM EN LA POLARIZACIÓN DE CÉLULAS T CD4⁺. P. López Suárez¹, M. Gueimonde Fernández², I. González Rodríguez², A. Margolles Barros², A. Suárez Díaz³. ¹Universidad de Oviedo/Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Oviedo. ²Instituto de Productos Lácteos de Asturias – Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC). ³Universidad de Oviedo.

Objetivo. Estudiar el efecto de distintas cepas de *Bifidobacterium* sobre la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) y su papel en la polarización de linfocitos CD4⁺ hacia células efectoras o reguladoras.

Material y métodos. El efecto de las bifidobacterias sobre los niveles de citocinas en cultivos de Mo-DCs, células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y co-cultivos de Mo-DCs con linfocitos T vírgenes se cuantificó mediante ensayos citométricos multianálisis. La expresión de marcadores de maduración en Mo-DCs (HLA-DR/CD80/CD86/CD1a) y de células Treg (CD25/Foxp3/CD127) se estudió mediante citometría de flujo.

Resultados. Todas las cepas de bifidobacterias estudiadas (n=20) indujeron la maduración de Mo-DCs, pero mostraron importantes diferencias en la producción de citocinas (IL-12p70, IL-10, TNF α , IL-6, IL-8 e IL-1b). Así, *B. bifidum* LMG13195 y DSM20239 presentaron una relación IL-1/IL-12 elevada y niveles bajos de TNF α /IL-10 e IL-10/IL-12, lo que sugería su capacidad para inducir células Th17, mientras que *B. breve* BM12/11 y BM13/14 presentaron una relación TNF α /IL-10 alta e IL-10/IL-12 baja, indicativo de perfil Th1. De acuerdo con estos resultados, el cultivo de PBMCs con las mismas cepas mostró diferencias importantes en la capacidad de inducir citocinas. En particular, *B. bifidum* IF10/10, A8, DSM20239 y LMG13195 indujeron los mayores niveles de IL-17, así como una baja producción de IFN γ y TNF α , lo que sugería un perfil Th17. Por el contrario, *B. animalis* Bb12, *B. breve* BM12/11 y *B. bifidum* KCTC5082 mostraron mayor inducción de TNF α e IFN γ , indicativa de una polarización Th1. Estos resultados se confirmaron analizando la producción de citocinas por linfocitos CD4 $^+$ CD45RA $^+$ co-cultivados con Mo-DCs madurados con 5 cepas seleccionadas de bifidobacterias. Sin embargo, el análisis de la población de células Treg inducidas tras los co-cultivos, mostró que las cepas de *B. bifidum* que habían inducido menor producción de TNF α e IFN γ , y mayor de IL-17, generaban un elevado porcentaje de células CD25 high /CD127 low /Foxp3 $^+$, sugiriendo una respuesta reguladora.

Conclusiones. Bifidobacterium sp. es capaz de madurar Mo-DCs, induciendo un perfil de citocinas específico de cepa que conduciría a la polarización de linfocitos T hacia células efectoras o reguladoras, potencialmente útiles en la selección de cepas probióticas con aplicación clínica o biotecnológica.

O-028

PAPEL DE LAS SUBUNIDADES CATALÍTICAS DE PI-3 CINASA P11ALFA Y P110DELTA EN LA COESTIMULACIÓN POR ICOS (INDUCIBLE COSTIMULATOR, CD278). Y.Y. Acosta¹, M.P. Zafra¹, G. Ojeda², P. Portolés¹, J.M. Rojo¹. ¹Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid. ²Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.

Objetivo. ICOS por linfocitos T activados. El motivo Y₁₉₁MFM de su región citoplasmática une subunidades reguladoras de PI3-cinasa de clase IA (p85 α , p50-55 α , p85 β). Aunque las células T expresan p110 α y p110 δ , y se sabe que p110 δ es importante en la activación de linfocitos T por TCR/CD3, ICOS coprecipita preferentemente la subunidad catalítica p110 α . Aquí se analiza en distintas células la asociación de p110 α a ICOS, y el papel de p110 α y p110 δ en la activación por TCR/CD3, en la coestimulación por ICOS, y en señales exclusivas de ICOS.

Material y métodos. Se ha analizado la co-precipitación de p110 α y p110 δ con subunidades reguladoras de PI3-cinasa de clase IA en distintos tipos de linfocitos T CD4 $^+$, incluyendo linfocitos de bazo de ratón. Además se ha estudiado mediante siRNA e inhibidores selectivos el papel de p110 α y p110 δ en la coestimulación por ICOS de la activación

por TCR/CD3 y en los cambios morfológicos y en el citoesqueleto de actina inducido por ICOS.

Resultados. La asociación selectiva de p110 α a ICOS se debe a la co-precipitación preferente de esta subunidad catalítica con las subunidades reguladoras en líneas de células T CD4 $^+$ o en linfocitos T CD4 $^+$ de bazo. El silenciamiento tanto de p110 α como de p110 δ inhibe parcialmente la activación (fosforilación) temprana de Akt/PKB inducida por anti-CD3, particularmente cuando se coestimula con anti-ICOS. Curiosamente, el silenciamiento de p110 α aumentó, y el de p110 δ inhibió la activación de Erk. Los inhibidores de p110 α o de p110 δ bloquearon la activación por TCR, con o sin ICOS, de la fosforilación de Akt y Erk o la secreción de IL-4. En cambio, sólo los inhibidores de p110 α inhibieron los cambios morfológicos (alargamiento) inducido por ligandos de ICOS en linfocitos T.

Conclusiones. Estos resultados confirman datos previos sobre el papel de p110 δ en la activación de linfocitos T, pero también muestran que p110 α es esencial para la activación óptima de linfocitos T. Además, la abundancia y actividad de las subunidades catalíticas de PI3-cinasa regulan de modo diferente distintas vías de la señalización por ICOS: es una molécula coestimuladora de la familia de CD28 expresada típicamente.

O-029

T REGULADORAS NATURALES COESTIMULADAS A TRAVÉS DEL REGULADOR DE COMPLEMENTO CRRY/P65 MANTIENEN SUS PROPIEDADES IN VITRO Y ATENUAN LA ARTRITIS INDUCIDA POR PROTEOGLICANO. P. Portolés¹, G. Ojeda¹, E. Pini¹, C. Eguiluz¹, M. Montes-Casado¹, F. Broere², W. Van Eden², J.M. Rojo³. ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. ²Utrecht University, Utrecht, Netherlands. ³Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

Las células T reguladoras (Treg) CD4 $^+$ CD25 $^+$ contribuyen de forma importante a la tolerancia y a la homeostasis inmune; sin embargo, su potencial terapéutico está dificultado por sus propias características. Las señales emitidas por el regulador de complemento murino Crry/p65, homólogo funcional de CD46 humano, aumentan la proliferación de células CD4 $^+$ *in vitro*.

Objetivos. En este estudio, hemos investigado el efecto del coestímulo mediado por Crry/p65 sobre la expansión y función de células Treg naturales, y su capacidad para mejorar la artritis inducida por proteoglicano (PGIA) en ratones Balb/c, un modelo de enfermedad inflamatoria en el que el papel de las Treg naturales no está bien establecido.

Métodos. Treg naturales obtenidas de ratones Balb/c fueron activadas *in vitro* y coestimuladas a través de Crry/p65. Las células expandidas fueron caracterizadas por citometría de flujo y se ensayó su efecto supresor sobre la proliferación *in vitro* de células T. Se estudió el efecto terapéutico potencial de esta población comparada con la población Treg natural en el modelo de PGIA en ratones Balb/c. Hemos analizado el grado de enfermedad, la histología y el isotpso de anticuerpos Ag-específicos, la respuesta *in vitro* de células T y la presencia de Treg en las extremidades de los animales.

Resultados. El coestímulo de Crry facilitó la expansión *in vitro* de Treg naturales manteniendo su fenotipo y propiedades supresoras. Las células Treg naturales CD4 $^+$ CD25 $^+$ coestimuladas *in vitro* a través de Crry mantuvieron sus propiedades supresoras *in vivo*, produciendo un efecto de mejoría de la inflamación en el modelo

de PGIA que es más duradero que el efecto de Treg naturales. La transferencia de Treg expandidas a través de coestímulo de Crry suprimió las respuestas T y B-dependientes en animales en los que se había inducido artritis por proteoglicano, cambiando el patrón de isótipo patogénico y disminuyendo la secreción Ag-dependiente de IFN- γ , IL-12, IL-17 y otras citoquinas implicadas en inflamación.

Se detectó un incremento de células Foxp3 $^{+}$ en las extremidades de animales tratados con Treg coestimuladas a través de Crry.

Conclusión. El coestímulo mediado por Crry facilita la expansión *in vitro* de células Treg naturales purificadas, mientras mantiene sus propiedades supresoras *in vitro* e *in vivo* en el modelo de artritis inducida por proteoglicano. Estos resultados resaltan el potencial de la molécula reguladora de complemento Crry/p65 para coestimular y expandir Treg naturales con la capacidad de suprimir enfermedad en condiciones de inflamación articular crónica.

O-030

ESTUDIO DE ALTERACIONES FUNCIONALES EN LAS CELULAS iNKT ASOCIADO AL ENVEJECIMIENTO. M.D.C. Campos¹, I. Gayoso¹, E. Peralbo¹, A. Pera¹, N. Rojas-Colonelli¹, R. Tarazona², R. Solana¹. ¹Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba. ²Universidad de Extremadura.

La respuesta inmune se encuentra afectada con la edad, proceso denominado immunosenescencia. Existen estudios previos que incluyen a las células "invariantes NKT" (iNKT) dentro de las poblaciones afectadas por la immunosenescencia. Las células iNKT en humanos se caracterizan por la expresión del receptor NK CD161 y de un receptor T (TCR) formado por una cadena V α 24JaQ y una cadena V β 11 que reconoce antígenos glucolipídicos presentados por un MHC-I no clásico denominado CD1d. Existen 3 subpoblaciones de células NKTi en función de la expresión de los receptores CD4 y CD8: NKT-CD8 $^{+}$, iNKT-CD4 $^{+}$ e iNKT-Dobles Negativas. Tras la activación las células iNKT proliferan liberando citoquinas tipo Th1 y Th2. Las células iNKT actúan durante la respuesta innata del sistema inmune y está implicadas en la eliminación de tumores y en enfermedades autoinmunes.

Nuestro trabajo pretende estudiar ex vivo el fenotipo y función, secreción de citoquinas y proliferación, de células iNKT procedentes de donantes jóvenes y ancianos sanos.

Para ello se obtuvieron las PBMCs de donantes jóvenes (18-35 años) y ancianos (70-95 años) sanos. La identificación de las iNKT se analizó mediante citometría de flujo. Se utilizaron AcMo anti-V α 24, anti-V β 11, CD8, CD4, y otros marcadores para identificar las células NKTi. Para analizar la secreción de citoquinas las PBMCs se incubaron con PMA, Ionomicina y Brefeldina durante 6 horas. La capacidad proliferativa se determinó mediante el marcaje con CFSE, sembradas en medio de cultivo durante 5 días con IL-2 y KRN (estímulo específico de NKTi *in vitro* semejante al α -Galactosil Ceramida que está identificado como un potente inductor de la activación de las células iNKT vía TCR).

Cuando analizamos la secreción de citoquinas tras la estimulación con KRN vemos una disminución de la secreción de IFN- γ en células NKTi de ancianos. Este descenso es significativo en las subpoblaciones NKTi-CD8 y NKTi-CD4.

En cuanto al estudio de proliferación con CFSE, transcurridos 5 días de cultivo *in vitro*, observamos una mayor proliferación de las

células iNKT de donantes jóvenes que en ancianos. Con respecto a las diferentes subpoblaciones de iNKT, vimos como las células CD4-NKT son las que principalmente proliferan en jóvenes y las únicas que proliferan en ancianos.

El descenso de la capacidad proliferativa de las células iNKT de ancianos y el descenso de producción de IFN- γ indican que las células iNKT se encuentran entre las poblaciones linfocitarias afectadas por la immunosenescencia. Y además dichos cambios podrían alterar la función y respuesta de las células NKTi en ancianos.

O-031

EL IFN α FOMENTA EL DESARROLLO DE CÉLULAS T CD8 MEMORIAS ALTAMENTE RESPONDEDORAS. S. Hervás-Stubbs, M.D.C. Ochoa, J. Dubrot, A. Palazón, I. Martínez-Forero, U. Mancheno, I. Gabari, I. González, J.I. Riezu-Boj, E. Larrea, I. Melero. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Pamplona.

Objetivos. Estudios previos realizados en el modelo del ratón han demostrado que las citoquinas pro-inflamatorias, tales como la IL-12 y el IFN- α/β , actúan directamente sobre los linfocitos T CD8 que han reconocido específicamente a sus antígenos, afectando aspectos cruciales de su diferenciación hacia células efectoras y/o memorias. Recientemente hemos mostrado que el IFN- α proporciona también señales directas a linfocitos T CD8 humanos naïve favoreciendo su diferenciación a células efectoras. Nuestro siguiente objetivo fue investigar si el IFN- α podría estar implicado en la diferenciación de los linfocitos T CD8 humanos a células memorias.

Material y métodos. Se aislaron mediante autoMACS (selección negativa) linfocitos T CD8 humanos totales a partir de PBLs y, tras tinción con anticuerpos frente a CD27 y CD45RA, se separaron linfocitos T CD8 naïves (CD27 hi CD45RA $^{+}$) mediante FACS. Los linfocitos purificados fueron teñidos con CFSE y estimulados con bolitas de látex que llevaban unidos anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28, en presencia o ausencia de IFN- α . Tras 6 días de estimulación, las células que habían proliferado (CFSE low) se aislaron mediante FACS y se mantuvieron en cultivo (20 días) en presencia de IL-15. Tras este periodo, los linfocitos fueron estimulados por segunda vez con antígeno (mimetizado por las bolitas anti-CD3/CD28)

Resultados. Los linfocitos T CD8 humanos naïve estimulados en presencia del IFN- α adquieren muchos de los marcadores fenotípicos típicos de los linfocitos T centrales memorias (CD45RA low CXCR3 hi CD62L hi CCR7 hi IL-7Ra hi CD27 hi CD28 hi). El IFN- α regula positivamente la expresión de IL-15Ra, Eomesodermin y T-bet. Como consecuencia del incremento de la expresión de IL-15Ra, y de IL-7Ra, los linfocitos estimulados en presencia de IFN- α muestran una mayor capacidad proliferativa cuando se estimulan con IL-15 o IL-7. Tras la segunda exposición con el antígeno, los linfocitos T CD8 inicialmente estimulados en presencia de IFN- α proliferan más y muestran una mayor capacidad efectora (alta producción de IFN- γ , Granzima B y TRAIL) tras una segunda estimulación antigenica que aquellos linfocitos que habían sido estimulados en ausencia de IFN- α .

Conclusiones. Nuestros resultados solidamente sugieren que las señales derivadas del reconocimiento del IFN- α durante el primer encuentro de los linfocitos T CD8 humanos con el antígeno son críticas para el desarrollo y la calidad de la respuesta T CD8 memoria subsecuente.

SESIÓN 4: CÉLULAS NK

Moderadores: Raquel Tarazona (Cáceres)
Rafael Solana (Córdoba)

O-032

CÉLULAS NK DE TIMO HUMANO: ¿UNA SUBPOBLACIÓN DE CÉLULAS NK DIFERENTES? L. Hidalgo¹, A. Entrena¹, V.G. Martínez¹, J. Valencia¹, M.N. Vázquez¹, A. Zapata², R. Sacedón¹, C. Hernández-López¹, A. Varas¹, Á. Vicente¹. ¹Facultad De Medicina Universidad Complutense, Madrid. ²Facultad De Biología Universidad Complutense, Madrid.

Objetivos. Las células NK son las principales células efectoras de la inmunidad innata y desempeñan un papel fundamental en las respuestas antivirales y antitumorales. Si bien tanto en humanos como en ratón, se asume que la médula ósea es el principal sitio de maduración de las células NK, diferentes órganos como timo, ganglio linfático, intestino, o útero soportan su diferenciación, indicando que la producción de las células NK humanas tiene lugar en múltiples localizaciones anatómicas. En relación con el timo humano, son muy escasos los datos existentes en la literatura. En el presente estudio se ahonda en las características fenotípicas y funcionales de las células NK de timo humano en comparación con las subpopulaciones de células NK CD56^{Low}CD16⁺ y CD56^{Bright}CD16⁻ de sangre periférica.

Material y Métodos. Los análisis fueron realizados en muestras de timo humano, procedentes de niños sometidos a cirugía cardíaca correctora, y en muestras de sangre periférica de donantes sanos. Las células NK aisladas mediante separación electrónica por sorting o aislamiento inmunomagnético, fueron utilizadas para la determinación del repertorio de receptores, perfiles genéticos, capacidad citolítica y perfiles de producción de citocinas utilizando para ello técnicas de citometría de flujo, PCR cuantitativa, técnicas de citotoxicidad y ELISA.

Resultados. Las células NK tímicas activadas con IL-12 e IL-15 exhibieron una escasa capacidad citotóxica similar a la exhibida por las células CD56^{Bright} periféricas siendo a su vez, en ambos casos inferiores a los resultados obtenidos para la subpoblación CD56^{Low}. En correlación, el perfil de expresión de distintos marcadores de activación de las células NK fue similar a la de la subpoblación CD56^{Bright} de sangre periférica. Por el contrario, en el caso de la producción de IFNγ, el comportamiento de las células NK de timo se asemejaba a aquél que exhibían las células CD56^{Low} de sangre. En correlación los niveles de tránscritos para T-BET, fueron 3 veces inferiores a los de las células CD56^{Bright} de sangre.

Conclusión. A tenor de los resultados obtenidos, las células NK de timo humano presentan características diferenciales respecto a las dos subpopulaciones de células NK descritas en periferia, pudiendo representar, una población con características funcionales distintas.

O-033

REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN DE CÉLULAS NK POR LA ACTIVACIÓN DE NKG2D. E. Serrano Pertierra, E. Cernuda Morillo, C. López Larrea. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos. NKG2D es un receptor transmembrana expresado fundamentalmente en células Natural Killer (NK) y T CD8⁺. La liberación de sus ligandos solubles resulta en un descenso en la expresión de NKG2D, uno de los mecanismos propuestos de evasión de la respon-

ta inmune por células tumorales, aunque la existencia de mecanismos alternativos no ha sido explorada. En el presente estudio analizamos la regulación de la migración de las células NK por activación de NKG2D, y exploramos el papel de las Rho-GTPasas en este efecto.

Métodos. Células NK se preincubaron con anticuerpos anti-NKG2D o ligandos o IgG como control. Los ensayos de migración fueron realizados en transwell recubiertos con ICAM-1 o fibronectina, en presencia o ausencia de CXCL12 como quimioatractante. La actividad de miembros de la familia de proteínas de las Rho-GTPasas como Rac1, RhoA y Cdc42 fue analizada mediante ensayos de pull down y posterior western blot. La implicación de la activación de Rac fue analizada mediante la inhibición farmacológica de la proteína.

Resultados. La activación de NKG2D inhibe la migración de las células NK tanto en los ensayos de migración randomizada como de quimiotaxis. Rac1 y Cdc42 se activan downstream NKG2D, mientras que RhoA se inhibe. La estatmina, una proteína implicada en la regulación de la dinámica de microtúbulos, y MLC (Myosin Light Chain) se fosforilan tras la activación de NKG2D. Se observa también una disminución en la fosforilación de ERM (Ezrin-Radixin-Moesin). Se ha descrito que estas proteínas están implicadas en la regulación de la polarización de linfocitos. La inhibición de la activación de Rac disminuye la fosforilación de estatmina pero no es capaz de rescatar la migración celular en las diferentes dosis estudiadas, aunque se observa un incremento en la migración basal.

Conclusiones. La activación de NKG2D por anticuerpos específicos o ligandos inhibe la migración de las células NK. El entrecruzamiento con anti-NKG2D regula la actividad de miembros de las Rho-GTPasas e inicia cascadas de señalización que pueden estar implicadas no sólo en la formación de la sinapsis inmunológica sino también en la migración y polarización celular.

O-034

MÚLTIPLES INTERACCIONES LIGANDO-RECEPTOR CONTROLAN EL RECONOCIMIENTO Y ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA. S. Morgado¹, J.G. Casado¹, B. Sánchez-Correa¹, I. Gayoso², R. Solana², G. Pawelec³. ¹Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura, Cáceres. ²Facultad de Medicina Universidad de Córdoba(3) Center for Medical Research, University of Tübingen.

Objetivos. Las células Natural Killer (NK) son un componente del sistema inmune innato que contribuyen a la respuesta inmune frente a tumores, puesto que son capaces de matar células tumorales sin una inmunización previa. El papel de las células NK en el reconocimiento y eliminación de células de melanoma es un importante punto de estudio en la actualidad, dado que el melanoma es considerado la forma más letal de cáncer de piel. Por tanto, el conocimiento de las interacciones entre los ligandos presentes en células tumorales y los receptores activadores de las células NK, como NKG2D, NCRs y DNAM-1, es esencial para introducir en la práctica clínica protocolos de inmunoterapia basados en células NK.

Material y métodos. Hemos analizado mediante citometría de flujo, la expresión superficial de ligandos para los receptores activadores de las células NK en un amplio panel de líneas celulares (n=124) procedentes de "European Searchable Tumour Cell Line and Data Bank" (ESTDAB, <http://www.ebi.ac.uk/ipd/estdab/>). Con objeto de analizar la activación de las células NK se realizaron ensayos de desgranulación, analizando la expresión de CD107a/b en la superficie de las células NK después de la activación frente a células de melanoma. Los

experimentos de bloqueo se realizaron incubando las células con anticuerpos monoclonales contra MICA/B o NKG2D. Por último, la detección de MICA soluble en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares de melanoma se realizó utilizando el kit DuoSet ELISA Development kit (R&D Systems) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Resultados. El análisis de los ligandos para NKG2D en nuestro panel de líneas celulares de melanoma muestra que más del 80% de las líneas expresa MICA/B, y en menor porcentaje, ULBPs. Hemos estudiado la contribución de NKG2D a la lisis de las células de melanoma utilizando la línea celular humana de NK, NKL, y células NK policlonales. La lisis mediada por células NK de la mayoría de las líneas de melanoma fue dependiente de NKG2D, aunque la lisis de algunas de las líneas de melanoma, sin expresión o con baja expresión de ligandos para NKG2D, fue independiente de NKG2D.

El uso de proteínas químéricas de los receptores NCR para analizar la expresión de los ligandos para NCR en células de melanoma mostró que las células de melanoma expresan bajos niveles de estos ligandos, principalmente para el receptor NKp44, mientras que el análisis de los ligandos para otros receptores activadores y coestimuladores puso de manifiesto que el 95% expresa ligandos para DNAM-1, la mayoría CD155, mientras que la expresión de CD112 fue menos frecuente. Esto concuerda con recientes hallazgos en el papel de los NCR y DNAM-1 en el reconocimiento de las células de melanoma por parte de las NK.

Nuestros resultados utilizando la línea de melanoma ESTDAB-067, negativa para ligandos de NKG2D, muestra que la línea de células NK, NKL se activa principalmente a través de NCR y DNAM-1, manteniendo que NCRs y NKG2D son los principales receptores que contribuyen a la lisis de melanoma mediada por NK. También encontramos que en ausencia de señales inhibidoras de MHC clase I, varios melanomas DNAM-1L⁺/NKG2DL⁺ son resistentes a la lisis mediada por células NK sugiriendo la existencia de mecanismos de inmunoescape como la liberación de ligandos para los receptores activadores, lo que contribuiría a la activación deficiente de las células NK.

Conclusiones. La expresión de ligandos para los receptores activadores de células NK es variable en diferentes líneas de melanoma y la activación simultánea de varios receptores activadores contribuye a la lisis eficiente de las células de melanoma. Además, la conexión entre DNAM-1 y NKG2D podría contribuir a la activación de las células T. Por tanto, la caracterización fenotípica de las células de melanoma y el desarrollo de estrategias de inmunoterapia para incrementar la expresión de ligandos para receptores activadores de NK contribuiría a la creación de terapias más efectivas para pacientes individuales.

O-035

REGULACIÓN EPIGENÉTICA DEL RECEPTOR ACTIVADOR DE NKS, NKG2D/DAP10. A. Fernández-Sánchez, B. Suárez-Álvarez, C. López-Larrea. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos. NKG2D es un receptor activador expresado en células NK, linfocitos T CD8αβ y γδ en humanos pero no en linfocitos T CD4. Sin embargo, una población de linfocitos T CD4 NKG2D⁺ aparece en determinadas situaciones patológicas tales como infecciones, enfermedades autoinmunes y en cáncer. La señalización intracelular mediada por NKG2D así como su expresión en la membrana celular requiere

exclusivamente de la molécula adaptadora DAP10 en humanos. La caracterización de los factores que regulan la expresión de NKG2D /DAP10 podría tener un gran interés por sus importantes aplicaciones terapéuticas. En este trabajo se han estudiado las modificaciones epigenéticas de los promotores de NKG2D y DAP10 en líneas celulares (Jurkat, HUT78 y NKL) y en linfocitos de sangre periférica (CD4, CD8 y NK).

Material y métodos. La metilación en los promotores de NKG2D y DAP10 se ha estudiado mediante técnicas de modificación de ADN genómico con bisulfito mientras que modificaciones de histonas activadoras (AcH4, AcH3, AcH3K9 y H3K4 3me) e inhibidoras (H3K27 3 me, H3K9 2me/3me) se han determinado mediante ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Se han analizado las variaciones en los niveles de expresión de NKG2D / DAP10 mediante tratamiento con inhibidores de histonas deacetilasas (sirtinol, SB, VPA y TSA) y con inhibidores de DNA metiltransferasas (5azaC y DAC).

Resultados. Se han visto diferencias en el nivel de metilación de la región proximal del promotor de NKG2D entre las posiciones -400 y -100, encontrándose metilado en linfocitos T CD4 pero no en CD8 y células NK. Adicionalmente, hemos determinado que modificaciones en las histonas H3 y H4 participan en la regulación de estos genes. Las modificaciones asociadas a eucromatina transcripcionalmente activa como son la AcH3K9 y la H3K4 3me parecen tener un papel destacado en la regulación de NKG2D puesto que tienen una presencia notable en linfocitos T CD8, mientras que en linfocitos T CD4 no están presentes. Confirmando los resultados previos, el tratamiento con inhibidores epigenéticos lleva a un aumento en los niveles de expresión de NKG2D y DAP10.

Conclusiones. En conclusión, determinamos que la expresión de NKG2D/DAP10 puede estar regulada mediante mecanismos epigenéticos y esto puede emplearse como diana farmacológica.

O-036

LA EXPRESIÓN DE NKG2D EN LINFOCITOS T CD4⁺ ES UN MARCADOR DE LA SENESCENCIA DEL SISTEMA INMUNE. R. Alonso Arias¹, M.A. Moro García¹, I. Cuevas Pérez¹, F.M. Suárez García², J.J. Solano Jaurrieta³, C. López Larrea¹. ¹Hospital Central de Asturias, Oviedo.

²Consejería de Salud y Servicios Sanitarios del Principado de Asturias. ³Hospital Monte Naranco.

Objetivos. El proceso de envejecimiento se caracteriza por una serie de cambios en el sistema inmune. En los linfocitos T los cambios se producen fundamentalmente en el compartimento CD8⁺, mientras que no se dispone de marcadores de senescencia bien definidos para los CD4⁺. La expresión “aberrante” de NKG2D en células CD4⁺ se ha descrito en determinadas patologías autoinmunes e infecciosas caracterizadas por alto grado de inmunosenescencia. El objetivo de este estudio fue analizar si la expresión de la molécula NKG2D se encuentra incrementada en las células CD4⁺ de los individuos de edad avanzada y puede considerarse un marcador de envejecimiento del sistema inmune.

Material y métodos. Se analizó por citometría de flujo la expresión de NKG2D en un grupo de 100 ancianos y 50 individuos jóvenes. Se realizó caracterización fenotípica (marcadores activación y diferenciación), funcional (respuesta a antígenos, producción de citocinas) y ontogénica (cuantificación de TRECs por PCR “real-time”) de la subpoblación CD4⁺NKG2D⁺.

Resultados. La mediana del porcentaje de CD4⁺NKG2D⁺ en ancianos fue significativamente mayor que en individuos jóvenes (5,3% [IR: 8,74%] vs 1,4% [IR: 1,7%], p=0,3x10⁻¹⁰). La expresión de CD28 distinguió dos subpoblaciones de células CD4⁺NKG2D⁺ claramente diferenciadas. Las CD28⁺ fueron células muy inmaduras, con alto porcentaje de expresión de CD45RA y CD31. Las CD28^{null}, mayoritarias en los individuos de edad avanzada, presentaron características fenotípicas de células CD4⁺ muy diferenciadas, con bajos niveles de CD25 y altos de HLA-DR, perforina y granzima B. La respuesta específica de estas células CD28^{null}NKG2D⁺ frente a CMV no presentó diferencias con respecto al resto de las células CD4⁺, sin embargo fueron significativamente menores frente a un antígeno de reciente contacto como la vacuna de la gripe estacional. Dentro de las células CD4⁺CD28^{null} la expresión de NKG2D se asoció con estadio de diferenciación más avanzado, presentando estas células mayor producción de IFN-γ en respuesta a la activación con anti-CD3 (40,56%±13,7% versus 24%±8,8%, p=0,015), un menor umbral de activación y un menor contenido en TRECs.

Conclusiones. La expresión de NKG2D en linfocitos T CD4⁺CD28^{null} define una subpoblación de células CD4⁺ con un alto grado de diferenciación que caracteriza la senescencia del sistema inmunológico.

O-037

ALTERACIÓN DE RECEPTORES ACTIVADORES E INHIBIDORES EN CÉLULAS NK DE ANCIANOS. I.C. Gayoso Cabada, B. Sánchez-Correa, N. Rojas, A. Pera, C. Campos, S. Morgado, J. Casado, R. Tarazona, R. Solana Lara. Instituto Maimónides de Investigación Biomédica, Córdoba.

Las células NK son una población heterogénea de linfocitos definidas por un fenotipo de membrana CD3-CD56⁺ que se caracterizan por su capacidad para lisar gran variedad de tipos celulares transformados o infectados por virus. Las células NK son un componente muy importante de la respuesta innata, tanto por su función efectora como por su función reguladora de la iniciación de la respuesta inmune adaptativa. Se sabe que el envejecimiento afecta al número y función de células NK. Se han definido diferentes cambios en las células NK asociados a la edad como son, el incremento en ancianos del porcentaje de células NK, el descenso de la respuesta a IL-2 o el descenso en la producción de citoquinas. Las células NK poseen receptores de membrana encargados de la activación o inhibición de su función citotóxica. La activación de las células NK está determinada por el balance entre señales inhibidoras y activadoras procedentes de dichos receptores. De esta forma el balance entre señales activadoras e inhibitorias determina la activación de las células NK.

Nuestro trabajo estudia la expresión de receptores activadores e inhibidores de la citotoxicidad NK en jóvenes y ancianos y la influencia sobre los cambios en la capacidad funcional de las células NK en ancianos.

Para la realización de este estudio se tomaron las PBMCs de donantes voluntarios jóvenes (18-35 años) y ancianos (70-95 años) sanos. Se identificaron las células NK por citometría de flujo y se analizó la expresión de los receptores NK activadores e inhibidores en las subpoblaciones de células NK de voluntarios jóvenes y ancianos sanos.

Los resultados muestran un descenso en la expresión del receptor NKp30 y del receptor DNAM1 en células NK de ancianos. Tam-

bien encontramos un incremento del receptor KIR2DL1 en células NK de ancianos. La alteración del patrón de expresión de receptores activadores e inhibidores podría provocar un descenso en la capacidad citotóxica en células NK de ancianos. Además, el descenso de la expresión de NKp30 y DNAM1 puede contribuir no solo al descenso en la capacidad citotóxica natural de estas células, sino que, dado el importante papel de este receptor en la interacción de células NK con células dendríticas, puede influir en las alteraciones en la iniciación de la respuesta inmune adaptativa observadas en ancianos.

O-038

EFFECTS OF DACLIZUMAB, BASILIXIMAB, THYMOGLOBULIN AND CAMPATH-1H ON HUMAN NATURAL KILLER CELLS. E. Sarmiento Marchese¹, D. Stauch¹, J. Carbone², K. Kotsch¹. ¹Institute of Medical Immunology, Charité Universitätsmedizin Berlin, Germany. ²Gregorio Marañón University Hospital, Madrid.

Introduction. MoAb against the anti-IL2Ralpha-chain (anti-CD25) have been efficiently implemented in transplantation induction protocols including the humanized antibody daclizumab (DAC) as well as the chimeric antibody basiliximab (BAS). Alternatively, rabbit anti-thymocyte globulin (rATG) or the humanized anti-CD52 MoAb (Campath-1H) are used.

Aim and methods. As natural killer (NK) cells are functionally relevant for an effective clearance of opportunistic viral infections and anti-tumor activity post transplantation, we analyzed the effects *in vitro* of these agents at a concentration of 10µg/ml on NK cell phenotype, viability, cytokine release (IFN γ , TNF α), apoptosis (FasL) and activation (CD25) by flow cytometry and real-time RT-PCR.

Results. Within the first hour of co-incubation with rATG and Campath-1H, NK cells (CD3-CD56⁺) revealed a significant mRNA expression of IFNg (40 fold) and TNFa (30 fold) in contrast to DAC and BAS. Gene expression data were confirmed by illustrating that rATG and Campath-1H resulted in an early (1h) and significant secretion of IFNg (133pg/ml for rATG; 68 pg/ml for Campath-1H) and TNFa (313 pg/ml for rATG; 223 pg/ml for Campath-1H) detectable in the supernatant. Whereas induction of TNFa reached the highest level after 6h (404 and 582 pg/ml, respectively) and declined rapidly, IFNg secretion was still significantly elevated after 24h (731 and 828 pg/ml). In contrast, DAC and BAS did not induce significant cytokine release. Both, rATG and Campath-1H induced necrosis (70,7% and 69,5%) and apoptosis (14,6% and 14,2%) compared with DAC and BAS (<2% respectively). Specially, Fc γ RIII (CD16) present in CD56^{dim}CD16⁺NK, is targeted with rATG and Campath-1H showing a complete depletion. FasL (7 fold) and CD25 mRNA expression was also significantly enhanced. Whereas FasL expression declined rapidly, CD25-mRNA illustrated constant enhancement after 24 hours corresponding with the increase of CD3-CD56⁺CD25⁺NK cells after 24 hours: from 0,5% in the control to 17% with rATG and 23% with Campath-1H.

Conclusion. Therapeutic anti-CD25 antibodies do not have deleterious effects on NK cells whereas rATG and Campath-1H induces cell apoptosis, necrosis and pro-inflammatory activity of NK cells. The latter observation needs to be considered for the risk of cytokine release syndrome after antibody application and for the selection of the optimal therapeutic strategy in clinical settings.

Funds. European Molecular Biology Organization (ERA-EDTA), Spanish National Health Ministry (FIS PI 081430) and the Medical Immunology Institut Charité, Berlin, Germany.

O-039

INHIBITION OF NKG2D EXPRESSION IN NK CELLS BY CYTOKINES SECRETED IN RESPONSE TO HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTION. A. Muntasell¹, G. Magri¹, D. Pende², A. Angulo³, M. López-Botet¹. ¹Universidad Pompeu Fabra, Barcelona. ²Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro. ³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer.

The NKG2D receptor activates NK cell cytotoxicity and cytokine production upon recognition of self-molecules induced by cellular stress under different conditions such as viral infections. The importance of NKG2D in the immune response to Human Cytomegalovirus (HCMV) is supported by the identification of several viral molecules that prevent the expression of NKG2D ligands by infected cells. In this study we report that, paradoxically, a significant, selective and transient reduction of NKG2D expression on NK cells is detected during HCMV infection of peripheral blood mononuclear cells (PBMC). Antagonizing type I IFN, IL-12 and IFN- α prevented HCMV-induced down-regulation of surface NKG2D. Moreover, treatment of purified NK cells with recombinant IFN- γ and IL-12 mimicked the effect, supporting a direct role of these cytokines in regulating NKG2D surface expression in NK cells. The loss of NKG2D expression selectively impaired NK cell cytotoxicity against cells expressing NKG2D-ligands, but preserved the response triggered through other activating receptors. These results support that down-regulation of NKG2D expression on NK cells by cytokines with a key role in anti-viral immune response may constitute a physiological mechanism to control NK cell reactivity against normal cells expressing NKG2D ligands in the context of inflammatory responses to viral infections.

O-040

ANÁLISIS DE RECEPTORES NK Y FUNCIONALIDAD EN UN PACIENTE CON LINFOCITOSIS NK DE FENOTIPO CD16⁺/CD56⁻. L. Arriarán, A. Muntasell, M. Sáenz, A. López De Arcuate , M. López-Botet , P. Echaniz, E. Cuadrado. Laboratorio de Inmunología del Hospital Donostia.

Caso clínico. Varón de 42 años clínicamente asintomático, sin adenopatías ni visceromegalias con serología POSITIVA para AcHbc, VHC, VHA, Epstein-Barr, Toxoplasma, Citomegalovirus, Herpes simple y Varicela Zoster. VIH: NEGATIVO.

El paciente presenta una linfocitosis de 13.000 cel/ μ l con una población expandida (67%) de linfocitos NK de fenotipo CD16⁺/CD56⁻ / CD57⁺/CD2⁺/CD3⁻. El análisis de receptores NK (NKG2D, NKG2C, NKG2A, NKp30, NKp46, NKp44, ILT2, KIR, DNAM) en dicha población mostró un marcaje alto y uniforme para NKG2A, ILT2, KIR y DNAM así como la ausencia o baja expresión de los receptores NCR: NKp30 y NKp46. Las células expandidas presentaban marcadores de activación temprana (CD69), eran positivas para HLA-DR. La expresión de mediadores de citotoxicidad (perforina y granzima) se comprobó mediante tinción intracitoplásrica. Para analizar la actividad citotóxica de la población NK expandida se empleó un ensayo de degranulación por citometría

de flujo (expresión de CD107a). Los PBMC del paciente se incubaron con 50UI/ml de rIL-2 y al día siguiente se cultivaron con diferentes células dianas, no observándose defectos en la función. Tras el cultivo de las células del paciente con IL-2+ IL-15 se constató de la expresión de los receptores NKp30 y NKp46 en las células del paciente.

Conclusiones. Los estudios realizados indican un origen monoclonal de la expansión de células NK con un fenotipo heterogéneo para algunos KIRs. La falta de expresión de receptores NCR en la población expandida, no excluye su actividad citotóxica ya que estas células son capaces de expresarlos en respuesta a citocinas.

SESIÓN 5: INMUNIDAD E INFECCIÓN

Moderadores: Miguel López Botet (Barcelona)
Maria Montoya (Barcelona)

O-041

LAS CÉLULAS T REGULADORAS BLOQUEAN LA ACTIVIDAD INMUNOESTIMULADORA DE LA IL-12 Y LA RESPUESTA INMUNE FRENTES A ANTÍGENOS VIRALES EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS DE LA MARMOTA (WHV): REVERSIÓN PORINHIBIDORES DE TGF- β . I. Otano Andrés¹, J.D. Dotor¹, A. Benito¹, J. Crettaz¹, C. Olagüe¹, S. Menne², J. Prieto¹, G. González-Aseguinolaza¹. ¹Universidad de Navarra, Pamplona. ²Cornell University, United States.

Introducción. El tratamiento con análogos de nucleósidos/nucleótidos de la infección crónica por virus de la hepatitis B (VHB) ha de mantenerse durante largo tiempo ya que estos fármacos son poco eficaces en la inducción de una respuesta inmune antiviral. Esto comporta costos elevados y limita la eficacia del tratamiento. En un estudio reciente hemos comprobado que la expresión intrahepática de IL-12 durante 40 días induce una respuesta inmune antiviral capaz de eliminar la infección vírica en marmotas con hepatitis crónica por WHV. Sin embargo, en animales con carga viral igual o por encima de 10¹⁰ pg/ml el tratamiento con IL-12 no logra inducir una inmunidad protectora. Se hace necesario el desarrollo de estrategias capaces de vencer la anergia inmune que también está presente en aquellos pacientes con hepatitis crónica B que presentan una alta carga viral. En este trabajo hemos analizado la actividad de las Treg en el modelo de la hepatitis de la marmota y los cambios en la función de las Treg tras la administración de un bloqueante de TGF- β .

Métodos. Se cuantificaron mediante citometría de flujo (FACS) las células Treg de sangre periférica de marmotas crónicamente infectadas con WHV. Las Treg fueron purificadas utilizando bolitas inmuno-magnéticas y se estimularon con anticuerpos anti CD3 analizándose la proliferación celular con CFSE y la producción de citoquinas mediante PCR cuantitativa. Se evaluó *in vitro* e *in vivo* el efecto del TGF- β sobre la función de Treg utilizando un péptido bloqueante de esta citoquina (P17).

Resultados. Se observó que las Treg purificadas de sangre periférica de marmota ejercen un potente efecto inhibidor sobre la actividad de los linfocitos T efectores. El P17 fue capaz de bloquear *in vitro* esta actividad inhibidora. Mientras que los linfocitos de sangre periférica de marmotas con viremias superiores a 10¹⁰ vg/ml no responden con

producción de IFN γ a la estimulación con IL-12, la administración a estos animales del péptido P17 por vía intraperitoneal restauró la capacidad de los linfocitos T de producir IFN γ tras adición de IL-12.

Conclusión. Los animales con infección crónica por hepadna-virus con una viremia mayor de 10^{10} pfu/ml presentan un aumento de la actividad Treg causante de la inhibición de las respuestas efectoras antivirales. El TGF- β juega un papel relevante en esta anergia inmunológica. El bloqueo de TGF- β puede contribuir a facilitar la respuesta al tratamiento inmunomodulador de la hepatitis crónica B.

O-042

ASOCIACIÓN DEL PORCENTAJE DE LINFOCITOS T CD8 $^{+}$ CMV-ESPECÍFICOS CON FENOTIPO "EMRA" CON LA DURACIÓN DE LA VIREMIA POR CITOMEGALOVIRUS EN TRASPLANTADOS DE ÓRGANO SÓLIDO. S. Cantísán Bohórquez¹, J. Torre-Cisneros¹, R. Lara Contreras¹, I. Gayoso Cabada¹, A. Rodríguez-Benot¹, F. Santos Luna¹, M. Casal Román¹, M. Montejo Baranda², R. Solana Lara¹. ¹Instituto Maimónides para la Investigación Biomédica de Córdoba (IMIBIC)-Universidad de Córdoba-Hospital Reina Sofía, Córdoba. ²Hospital de Cruces, Bilbao.

Introducción. Las células T CD8 $^{+}$ effector-memory (EM) (CD45RA-CCR7-) intervienen durante la infección aguda por citomegalovirus (CMV), mientras que, una vez resuelta la viremia, un porcentaje de estas células re-expresan CD45RA, denominándolas como "EMRA" (CD45RA $^{+}$ CCR7-). Las células "EMRA" han sido descritas recientemente como linfocitos memoria de larga vida, y parecen representar a las verdaderas células memoria en la infección por CMV.

Objetivo. Estudiar si existe relación entre el porcentaje de células EMRA (CD45RA $^{+}$ CCR7-, CD45RA $^{+}$ CD28- y CD45RA $^{+}$ CD27-) y la duración de la viremia por CMV.

Material y método. Estudio transversal de 42 pacientes HLA-A*02 trasplantados de órgano sólido. Para estudiar los linfocitos T CD8 $^{+}$ CMV-específicos se extrajo una muestra de sangre periférica de cada paciente, entre 1-3 años tras el trasplante. Los PBMCs se incubaron con pentámeros CMVpp65 HLA-A*0201(APC) en combinación con anticuerpos monoclonales frente a CD8, CD28, CD27, CCR7 y CD45RA. Se analizó por citometría de flujo de cuatro colores.

Se utilizó el test de Spearman para determinar la existencia de correlación y la regresión lineal múltiple para determinar los factores asociados con el porcentaje de células T EMRA.

Resultados. Se observó correlación estadísticamente significativa entre la duración de la viremia por CMV tras el trasplante y el porcentaje de células T CD8 $^{+}$ CMV-específicas CD45RA $^{+}$ CD27- ($r = 0.609$; $p = 0.004$), CD45RA $^{+}$ CD280- ($r = 0.579$; $p = 0.008$) y CD45RA $^{+}$ CCR7- ($r = 0.488$; $p = 0.029$). En el análisis multivariante, por cada incremento de 10 días en la duración de la viremia de CMV los porcentajes de CD45RA $^{+}$ CD27-, CD45RA $^{+}$ CD28- y CD45RA $^{+}$ CCR7- incrementaban un 5.58% ($p = 0.001$), 5.35% ($p = 0.001$) y 4.49% ($p = 0.012$), respectivamente, cuando se ajustaba por el seroestatus para CMV, tipo de órgano y edad. Luego, mientras más tiempo está replicando el virus mayor es el porcentaje de linfocitos T CD8 $^{+}$ CMV-específicos con fenotipo "EMRA".

Conclusiones. Los resultados demuestran que, en nuestros pacientes trasplantados de órgano sólido, existe una asociación

clara entre el porcentaje de células T CD8 $^{+}$ CMV-específicas con fenotipo "EMRA" y la duración de la viremia de CMV tras el trasplante. Sin embargo, será necesario llevar a cabo estudios prospectivos para establecer la relación de causalidad entre estos dos hechos.

O-043

DIVERSIDAD DE LOS GENES HLA, KIR Y FCGR Y SU RELACIÓN CON LA VARIABILIDAD CLÍNICA DE LA INFECCIÓN POR VIRUS HERPES SIMPLEX TIPO 1. M. Moraru, E. Cisneros, N. Gómez-Lozano, R. De Pablo, F. Portero, M. Vaquero, G. Roustán, C. Vilches. Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid.

El virus Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) establece infecciones latentes de por vida que pueden mantenerse asintomáticas o cursar con reactivaciones ocasionales o recurrentes. Aunque la mayoría de los individuos adultos han estado expuestos al virus, la clínica de la infección es altamente variable, lo que apunta hacia un componente genético implicado en esta diversidad de respuesta. Se conocen varias estrategias desarrolladas por el virus para evadir la respuesta inmunitaria del huésped. Sin embargo, los mecanismos de defensa frente al patógeno no están bien esclarecidos. La gran variabilidad del sistema HLA y de los receptores KIR (killer-cell immunoglobulin-like receptors) y su implicación en la respuesta inmunitaria frente a infecciones virales, así como la capacidad del virus para subvertir la presentación antigenica, hace que sean buenos candidatos para explicar la diversidad interindividual de la respuesta protectora frente a HSV-1. Las diferencias de afinidad de los receptores para la fracción cristalizable de las inmunoglobulinas (Fc γ R), conferidas por polimorfismos en los genes que los codifican, podrían influir también en la eficacia de la respuesta inmunitaria frente al virus, y en su capacidad para competir con señuelos virales (glicoproteínas gE y gI).

En este trabajo hemos analizado la contribución de la diversidad genética del sistema HLA, de los KIR, y de los receptores para la IgG Fc γ RIIa (CD32A) y Fc γ RIIIa (CD16A) a la variabilidad clínica de la infección por HSV-1. Para ello, se ha recogido información clínica de la infección por HSV-1 y muestras de sangre de 301 individuos, en las que se han determinado los genotipos HLA, KIR, FCGR2A y FCGR3A y la presencia de anticuerpos tipo IgG frente a HSV.

Hemos observado una desviación coincidente, pero no significativa, con los resultados publicados previamente en una población italiana, en la que se demostró una asociación negativa con el alelo B*35. Además, encontramos asociaciones no descritas hasta ahora con los alelos HLA-B*18 ($p=0.003$) y HLA-C*15 ($p=0.01$). No hemos observado ninguna asociación significativa entre la distribución de los genes KIR y sus ligandos y la clínica de la infección; en particular, la relación previamente descrita entre la infección sintomática y la presencia de los genes KIR2DL2 y KIR2DS2 no tiene significación estadística en la nueva muestra. Por último, nuestros resultados apuntan hacia una relación directa entre la presencia del alelo CD16A de alta afinidad en homozigosis y la menor frecuencia de sintomatología herpética ($p=0.037$).

El elevado número de comparaciones realizado en este estudio ([71 alelos HLA, 16 genes KIR, 4 ligandos, 6 genotipos FCGR] x cuatro grupos de estratificación clínica) aumenta la probabilidad de encontrar asociaciones significativas espurias. No obstante, nuestros datos apuntan, en conjunto, hacia una contribución modesta de los polimor-

fismos relacionados con la inmunidad adaptativa y con la vigilancia de su sabotaje, a la predisposición genética a sufrir reactivaciones de la infección por HSV-1.

*Este estudio ha sido financiado con el proyecto BFU2005-04622 (Mº Educación y Ciencia).

O-044

RESPUESTA INMUNITARIA EN PULMÓN DURANTE UNA INFECCIÓN EXPERIMENTAL MIXTA CON EL vDVB Y HVB-1.1. M.Á. Risalde Moya, V. Molina Hernández, M. Pedrera Mazarro, P.J. Sánchez Cordón, F. Romero Palomo, J.C. Gómez Villamandos. Universidad de Córdoba, Córdoba.

El virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) se considera el principal factor predisponente para la aparición de infecciones respiratorias secundarias en bovino, desconociéndose con exactitud las estrategias utilizadas por este virus para evadir la respuesta inmune en pulmón y facilitar la instauración de agentes concomitantes. Así, el objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios cuantitativos y secretores que experimentan las diferentes poblaciones y subpoblaciones de linfocitos en el pulmón de animales coinfecados experimentalmente con el vDVB y el herpesvirus bovino tipo 1.1 (HVB-1.1), con el fin de determinar el papel de estas células inmunocompetentes en la patogenia de la enfermedad y el tipo de respuesta inmune establecida (Th1 o Th2).

Para ello, 8 terneros fueron inoculados intranasalmente con la cepa no citopática 7443 del vDVB y coinfecados a los 12 días post-inoculación (dpi) con la cepa Iowa del HVB-1.1. Los animales fueron sacrificados en grupos de dos a los 2, 4, 7 y 14 dpi del HVB-1.1. Además, 2 animales control se inocularon con medio estéril y fueron sacrificados al final de la experiencia. Se tomaron muestras de sangre en días previos y posteriores a ambas inoculaciones, analizándose las distintas poblaciones de linfocitos periféricos (CD4, CD8, $\gamma\delta$ y B) por inmunofluorescencia indirecta mediante citometría de flujo. Las muestras de pulmón fueron procesadas de forma rutinaria para su posterior estudio histopatológico e inmunohistoquímico (CD79, CD3, CD4, CD8, WC1, INF γ e IL-4).

Los animales inoculados con vDVB mostraron, tras la infección con HVB-1.1, un descenso en sangre periférica de linfocitos CD4 $^+$ y CD8 $^+$ (2 y 4 dpi), así como de los linfocitos $\gamma\delta^+$ y B $^+$ que se prolongó durante todo el proceso. Coincidiendo con el mayor declive de las diferentes poblaciones linfocitarias en sangre, observamos en pulmón la aparición de un infiltrado mononuclear, constituido principalmente por linfocitos T y macrófagos. Unido a los cambios cuantitativos, el estudio de la expresión de mediadores químicos indicativos de activación de los linfocitos e instauración de la respuesta inmune reveló que, tras la inoculación con HVB-1.1, se produce un incremento en el número de linfocitos reactivos frente a la IL-4.

Estos resultados sugieren una migración de las células inmunocompetentes sanguíneas al pulmón como respuesta a la infección con HVB-1.1. Sin embargo, pese a producirse un incremento en el número de estas poblaciones, no se instaura una respuesta celular correcta (Th1) frente a la coinfección, sino que se mantiene la respuesta Th2 previamente instaurada, lo que impide una respuesta de defensa adecuada frente a agentes secundarios.

*Este trabajo ha sido financiado por la Junta de Andalucía a través del proyecto de Excelencia PO9-AGR-4671.

O-045

IMPORTANCIA DE LOS DIFERENTES RECEPTORES NK EN EL DETERIORO DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA OBSERVADA EN PACIENTES HIV+ VIRÉMICOS. M. Fries Casas, L. Castro Orgaz, R. González Fernández, M. Cobo Medina, L. Montes Torres, J. Peña Martínez. Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba.

Objetivo. Ciertos defectos funcionales de las células NK en la infección por HIV tienen un efecto directo en la expresión anormal tanto en los receptores inhibidores como en los activadores. Debido a que la interacción de estos receptores interviene en la función innata del sistema inmune del individuo, el objetivo de este estudio es analizar la expresión de estas moléculas, como son NKG2A, NKG2C, NKp30, NKp44, NKp46 y en particular CD85j, con su ligando HLA-G, en individuos HIV+ que poseen un buen control de la viremia a pesar de haberse retirado el tratamiento comparándolo a su vez con pacientes avirémicos.

Material y métodos. Para la realización de este estudio se utilizaron PBMCs previamente congeladas de pacientes HIV+ a los que se les retiró el HAART durante al menos dos años (n=21), PBMCs congeladas de donantes sanos (n=24) y PBMCs congeladas de pacientes HIV+ con HAART (n=22). El análisis de las poblaciones celulares se realizó mediante citometría de flujo de cuatro colores. El paquete estadístico usado para el análisis de los datos fue el SPSS (V.17)

Resultados. En el caso de las moléculas CD85j y HLA-G los resultados obtenidos muestran un incremento significativo en todas las subpoblaciones NK conocidas, CD56 $^{\text{dim}}$, CD56 $^{\text{bright}}$ y CD56 $^{\text{neg}}$ en pacientes a los que se les ha retirado el HAART. En el caso de pacientes sanos y HIV+ tratados encontramos los niveles de CD85j y HLA-G normales. Este incremento significativo de la molécula CD85j y su ligando HLA-G está correlacionado positivamente con la carga viral de los pacientes ($P<0,05$). Por el contrario respecto a los receptores lectina tipo C (NKG2A y NKG2C) y receptores de citotoxicidad no encontramos ningún cambio significativo en su expresión entre pacientes virémicos y avirémicos.

Conclusión. Estos resultados sugieren que un nivel alto de carga viral HIV induce el aumento de la expresión de receptores inhibidores, en este caso, CD85j así como su ligando HLA-G, mientras que en los demás grupos este incremento fue restringido como resultado de una replicación de HIV significativamente menor.

O-046

THE VIRAL PROTEIN A238L INHIBITS CICOXYGENASE-2 AND METALLOPROTEINASE-9 EXPRESSION IN HUMAN COLORECTAL CARCINOMA CELLS. E. G. Sánchez¹, A. G. Granja², P. Sabina³, I. Bañón-Rodríguez⁴, I. Antón⁵, M. Fresno¹, Y. Revilla¹. ¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), MADRID. ²Cancer Research UK London, , United Kingdom. ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. ⁴Centro Nacional de Biotecnología (CNB). ⁵Centro Nacional de Biotecnología (CNB).

Introduction. Cyclooxygenase-2 (COX-2), an inducible prostaglandin synthase, is overexpressed in several human cancers and affects many processes that have implicated in different stages of carcinogenesis. Multiple lines of evidence indicate that COX-2 is a "bona fide" pharmacological target for anti-cancer therapy. Both tumor formation and growth are reduced in animals that are either engineered to be COX-2 deficient or treated with selective COX-2 inhibitors. The mechanisms of the pro-tumorigenic activity of COX-

2 are: production of angiogenic factors, increasing of cells proliferation, inhibition of immune surveillance, prevention of apoptosis and increased metastatic potential. Previously, we have demonstrated that the viral protein A238L, of African Swine Fever Virus, is able to inhibit COX-2 expression through the NFAT transactivation pathway in Jurkat T cells.

Objetivos. To study if the viral protein A238L has an antitumor or antimetastatic function in human colorectal carcinoma cells, Caco-2.

Materials and methods. We generated Caco-2 cells that stably express the A238L gene by transfection with an expression plasmid. We analysed COX-2 promoter expression and transcriptional activity of NFAT, NFkB and the activity of the p300 coactivator by luciferase assays. COX-2, metalloproteinase-9 (MMP-9) and ICAM-1 mRNA expression were measured by PCR assays, and MMP-9 secretion and activity through a gelatin zymography. Finally, we performed chamber assays to analyze migration ability of Caco-A238L cells and ELISA assays to measure prostaglandin E2 levels.

Results and conclusions. The viral protein A238L inhibits COX-2 promoter activity, mRNA expression and PGE2 synthesis in Caco-2 cells, and this inhibition is mediated by blocking NFAT, NFkB and p300 transcriptional activity. Moreover, we have observed that the presence of this viral protein diminished the migration ability of Caco-2 cells probably due to inhibit the expression and secretion of MMP-9, and A238L is able to modulate the expression of other molecules involved in cellular adhesion as ICAM-1.

Taken together, this date indicate that A238L could be a potential tool for anti-tumor therapy.

O-047

NKP46 AND DNAM-1 NK CELL RECEPTORS DRIVE THE RESPONSE TO HUMAN CYTOMEGALOVIRUS INFECTED MYELOID DENDRITIC CELLS OVERCOMING VIRAL IMMUNE EVASION STRATEGIES. G. Magri¹, A. Muntasell¹, N. Romo¹, A. Sáez-Borderías¹, D. Pendo², A. Angulo³, A. Moretta⁴, M. López-Botet¹. ¹Universitat Pompeu Fabra , Barcelona. ²Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro. ³Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer. ⁴Università di Genova.

Myeloid dendritic cells play a central role in the biology of human cytomegalovirus (HCMV) infection as they differentiate from myeloid progenitors, which constitute a main site for viral latency, and are themselves susceptible to direct infection. NK cells are involved in immune defence against HCMV though information on the nature of NK cell receptors involved is limited. In the present study we analysed the response of NK cell populations against autologous monocyte-derived dendritic cells (moDC) infected by the TB40/E HCMV strain, assessing the antagonistic effect of monoclonal antibodies (mAbs) specific for different activating NK cell receptors.

Interaction with autologous HCMV-infected moDC, which down-regulated the expression of HLA class I and II molecules, specifically activated NK cells, triggering IFN- α production and cytotoxicity. NKP46 and DNAM-1-specific mAbs inhibited NK cell activation in response to HCMV-infected moDC, despite that DNAM ligands (PVR and Nectin-2) were down-regulated. Differences in the efficiency of CD94/NKG2A⁺ and CD94/NKG2C⁺ NK cell subsets from HCMV seropositive donors to respond against infected moDC were noticed.

Our results indicate that NK cells efficiently respond against HCMV-infected immature moDC, overcoming putative viral immune evasion

strategies, and support that the NKP46 and DNAM-1 receptors play a central role in this process.

SESIÓN 6: INMUNIDAD INNATA E INFLAMACIÓN

Moderadores: J.L. Rodríguez Fernández (Madrid)
Francisco Sánchez Madrid (Madrid)

O-048

PAPEL DE COT/TPL2 EN HIPERNOCICEPCIÓN INFLAMATORIA INDUCIDA POR TLR. I. Soria Castro, A. Krzyzanowska, M. López Peláez, M. Fernández, S. Alemany. IIB, Alberto Sols, CSIC, Madrid.

Objetivos

- Determinar el papel de Cot/tpl2 en la inflamación inducida por zimósano.
- Identificación de los distintos mecanismos empleados por Cot/tpl2 en procesos de inflamación *in vivo*.
- Estudio del papel de Cot/tpl2 en hipernocicepción asociada a inflamación.

Materiales y Métodos

- Modelos de inflamación *in vivo* en ratones Cot/tpl2^{+/+} y Cot/tpl2^{-/-}: inyección i.p. con zimósano (2 mg/ml, 0,5 ml) e inyección intraplanicular i.p. con zimósano (30 µg/µl).
- Luminiscencia *in vivo*: actividad MPO en pata y peritoneo, IVIS LUMINA (Gross et al, 2009).
- Cuantificación de células del peritoneo y marcaje de neutrófilos (Ly6G⁺/F4/80⁺) y macrófagos (F4/80⁺/Ly6G⁺) por citometría de flujo.
- Medida de citoquinas y quimioquinas por Citometría, por el método de CBA.
- Medida de PGE2 y LTB4 por inmunoensayo encimático, Cayman Chemical.
- Test de nocicepción: método validado por Cunha (Cunha et al, 2004) con anestesiómetro eléctrico, tras la i.p. con zimósano y con LPS.

Resultados. La ausencia de Cot/tpl2 redujo significativamente la hipernocicepción asociada a inflamación inducida por lipopolisacárido y por zimósano. Los ratones deficientes en Cot/tpl2 mostraron una reducción del 40% de la actividad MPO *in vivo* a las 6 horas tras la inyección intraplanicular con zimósano. Consecuentemente, en el modelo de peritonitis inducida con zimósano, los ratones deficientes en Cot/tpl2 mostraron una reducción de un 30% de la actividad MPO así como un 25 menos de neutrófilos y un 65% de macrófagos en el lavados peritoneal. La ausencia de Cot/tpl2 también determinó la reducción de los niveles de ciertas citoquinas y quimioquinas detectadas durante la inflamación con zimósano. Así mismo, mientras que en ensayos *in vitro* realizados en macrófagos estimulados con zimósano Cot/tpl2 es necesario para generar TNF- α y PGE2, en modelos *in vivo*, los ratones deficientes en Cot/tpl2 tan solo mostraron una pequeña reducción de los niveles de TNF- α así como una inducción de los niveles de PGE₂.

Conclusiones. Nuestros datos muestran como Cot/tpl2 es una buena diana terapéutica para reducir la inflamación aguda así como la hipernocicepción asociada a inflamación, debido a su capacidad para controlar el reclutamiento de células inflamatorias. También hemos demostrado como el papel de Cot/tpl2 descrito para ensa-

tos in vitro no es extrapolable en estudios de animal entero, lo que debería ser considerado a la hora de desarrollar fármacos contra Cot/tpl2.

O-049

EFEITO POTENCIADOR DE LA DEFICIENCIA EN APOE SOBRE EL DESARROLLO DE ARTRITIS EN ROEDORES. *J. Postigo¹, F. Genro¹, M. Iglesias¹, L. Buelta², M. Fernandez-Rey¹, J. Merino¹, R. Merino¹.*

¹Universidad de Cantabria, Santander. ²Universidad de Cantabria.

Diversos estudios epidemiológicos han mostrado un incremento en la frecuencia de arteriosclerosis en los pacientes con artritis reumatoide (AR) que no se explica únicamente en base a factores de riesgo vascular tradicionales. Todo ello sugiere que mecanismos inmuno-inflamatorios implicados en la patogenia de la AR también influyen en la aceleración de la arteriosclerosis en estos pacientes. Un aspecto que aun no se ha evaluado en este contexto es hasta qué punto la aparición de arteriosclerosis y/o las anomalías metabólicas asociadas, influyen en el propio desarrollo de AR.

En el presente trabajo se evalúa como la deficiencia en ApoE y la hipercolesterolemia asociada influyen en la inducción y evolución de la artritis autoinmune experimental (CIA), la cual inducimos inmunizando con colágeno de tipo II bovino (C-II) a ratones B10RIII, deficientes o no en ApoE, lo cual les hace susceptibles al padecimiento de arteriosclerosis.

El seguimiento clínico complementado con técnicas radiológicas y anatómopatológicas muestra que los ratones B10RIII-ApoE^{-/-} inmunizados con C-II padecen una CIA mucho más severa que los ratones B10RIII control. En correlación con estos hallazgos, mediante Q-PCR, hemos observado que los ratones B10RIII-ApoE^{-/-} inmunizados con C-II, tienen incrementada la expresión articular de citocinas pro-inflamatorias artritogénicas (TNFα e IL-1β) y las citocinas y factores de transcripción asociados a la diferenciación de linfocitos T CD4⁺ hacia los subtipos Th1 y Th17 (IFNγ, TGFβ, IL-6, IL-21, T-bet y RORγt), en comparación con los ratones silvestres inmunizados. Así mismo, en los ratones B10RIII-ApoE^{-/-} se observa un incremento importante de linfocitos Th17 (CD4⁺ IL-17⁺) y en menor grado de Th1 (CD4⁺ IFNγ⁺) en los ganglios linfáticos 3 semanas tras la inmunización con C-II en comparación con los ratones silvestres inmunizados.

En conjunto, nuestros resultados demuestran que la deficiencia en ApoE y/o la hipercolesterolemia asociada a dicha deficiencia, agravan el curso clínico de la CIA en ratones susceptibles promoviendo respuestas Th1 y Th17.

O-050

LA SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-2 INCREMENTA LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE LOS LINFOCOTOS CD4⁺CD25⁺ REGULADORES POR UN MECANISMO DEPENDIENTE DE TGFB. *M. Iglesias¹, I. Santiuste¹, L. Buelta¹, J. Postigo², J. Merino², R. Merino³.*

¹Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria-CSIC, SANTANDER. ²Universidad de Cantabria. ³Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria (IBBTEC)-CSIC.

Recientemente nuestro grupo ha demostrado la protección contra el desarrollo de patologías autoinmunes en un modelo de ratón transgénico (Tg) que sobre-expresaba Bcl-2 humano (hBcl-2) en lin-

citos B y en una subpoblación de linfocitos T. Este efecto protector estaba mediado por linfocitos T CD4⁺CD25⁺ reguladores (Treg) que se encontraban expandidos en los animales Tg. Con la finalidad de profundizar en los mecanismos responsables de dicha protección, hemos estudiado el número y actividad funcional de los linfocitos Treg así como el desarrollo de artritis autoinmune tras inmunización con colágeno de tipo II bovino (CIA) en ratones (DBA/1x C57BL/6)F1 Tg para hBcl-2 en linfocitos T (F1-hBcl-2-TgT). A diferencia de lo descrito en los ratones hBcl-2 Tg en linfocitos B y T, el porcentaje de células Tregs en los ratones F1-hBcl-2-TgT es similar al observado en ratones F1 no-Tg controles. Sin embargo, experimentos funcionales in vitro muestran que la sobre-expresión de hBcl-2 en los linfocitos Tregs potencia en más de 10 veces su actividad supresora. De acuerdo con estos hallazgos, los ratones F1-hBcl-2-TgT no desarrollan CIA tras inmunización con colágeno de tipo II. En correlación con la ausencia de CIA, los ratones F1-hBcl-2-TgT expresan niveles normales de las citocinas pro-inflamatorias TNFα, IL-1β e IL-6 a nivel articular, cuantificadas por Q-PCR, mientras que la expresión de la citocina anti-inflamatoria TGFβ se encuentra incrementada. La eliminación *in vivo* de las células Tregs en los ratones F1-hBcl-2-TgT, mediante un Ac monoclonal anti-CD25, induce el desarrollo de CIA similar a la observada en los controles no-Tg que no fueron tratados con este AcM y promueve un incremento en la expresión articular de TNFα, IL-1β e IL-6, indicando que la ausencia de patología autoinmune en esta línea de ratones Tg también es dependiente de los linfocitos Tregs. Por último, el tratamiento local con un anticuerpo anti-TGFβ incrementa la severidad de la artritis en los ratones F1 no-Tg y sobre todo, promueve la aparición de CIA en los ratones F1-hBcl-2-TgT. Estos resultados ponen en evidencia que la sobre-expresión de hBcl-2 en linfocitos Tregs potencia su actividad supresora y que dicho incremento está mediado por TGFβ.

O-051

CRITICAL ROLE OF PI3K IN THE UPREGULATION OF KC AND MIP-2 BY HISPANOLONE DERIVATIVE IN TLR4-ACTIVATED MACROPHAGES. *S. Hortelano¹, P.G. Traves², R. López-Fontal³, G. Bergazyn³, L. Boscá², B. Rodríguez⁴, B. De Las Heras⁵.*

¹Unidad de Inflamación y Cáncer, Área de Biología Celular y del Desarrollo, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM), Madrid. ³CNIC, Madrid. ⁴Instituto de Química Orgánica (CSIC), Madrid. ⁵Departamento de Farmacología Facultad de Farmacia, Universidad Complutense, Madrid.

Background. The search for new anti-inflammatory natural products has enormously increased in last years. We have recently described that hispanolone derivative 8,9-Dehydrohispanolone-15,16-lactol (T11) inhibits LPS-dependent NO release through a mechanism that involves inhibition of NF-κB activation.

Objective. In this study, we want to extend our results to other TLR ligands and demonstrated the differential regulation of inflammatory chemokines in the presence of T11 in mouse peritoneal macrophages.

Material and methods. Mouse peritoneal macrophages were maintained in culture and activated with pro-inflammatory stimuli in the absence or presence of T11. Expression of inflammatory cytokines, mediators and chemokines was determined.

Results. We show that T11 exerts potent inhibitory effects on the expression of NF-κB responsive genes such as NOS-2 and COX-2 after stimulation with TLR2, TLR3 and TLR4 ligands. In addition, using

microarray and quantitative RT-PCR analysis, we observed a clear inhibition of the expression of proinflammatory cytokines such as IL-1 α , IL-1, and IL-6 and chemokines including CCL2, CCL4, CCL5, CCL7, CCL12, CCL17, and CXCL10 in T11-treated cells after LPS stimulation. In contrast, the chemoattractants CXCL1/KC and CXCL2/MIP-2 chemokines were highly upregulated. This synergistic effect was only observed after LPS stimulation and was dependent on PI3K inhibition as demonstrated the upregulation of KC and MIP-2 in LPS-stimulated macrophages after treatment with the specific inhibitor of PI3K LY294002. Consisting with this, treatment of LPS-stimulated macrophages with T11 resulted in a decreased activity of PI3K and Akt phosphorylation.

Conclusions. Taken together, these results demonstrate that T11 differentially affects the ability of TLR4 signaling pathway to induce pro-inflammatory cytokines and describe a novel negative role of PI3K for the regulation of TLR signaling.

*This work was supported by grants from the FIS PI05.0050, PI08/0070 and the Fundación Mutua Madrileña to S.H, and by a Santander-Complutense grant to S.H. and B.de las H.

O-052

EFFECTS OF ULTRAVIOLET RADIATION IN DIFFERENT SUB-POPULATIONS OF PERIPHERAL BLOOD MONOCYTES. Z. Moreno Villegas¹, D. Diaz Martin¹, G. Parada Hermoza¹, L. Ortega Moreno¹, H. Barcenilla Rodríguez¹, M.Á. Sánchez Luengo¹, L. Chara Velarde¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto². ¹Universidad Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Background. Ultraviolet (UV) irradiation has cytotoxic effects on the skin and the immune system as a consequence of oxidative stress. Several effects have been described in different immune cellular types. However, there are no studies about its effects in recently described monocyte subpopulations.

Objetive. To determine the UV irradiation effects on the different subsets of peripheral blood monocytes.

Material and methods. Peripheral blood mononuclear cells were isolated from healthy donors by standard Ficoll-Paque density gradient centrifugation. Monocytes were irradiated with an UV-emitting lamp ($I=1319W/m^2$) over different times (7, 14 and 28 minutes). Later, cells were cultured for 3, 6, 24 and 48 hours and were acquired in a FACSCalibur flow cytometer using fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. Monocytes were selected in a FSC-SSC dot plot, and defined as CD3 negative and CD14 positive. Monocyte subpopulations were identified as classic monocytes (CD14 $^+$ CD16 $^-$), inflammatory monocytes (CD14 high CD16 $^+$) and resident monocytes (CD14 dim CD16 $^-$). The absolute number of viable (7-AAD-) monocytes were calculated using microbeads as an internal reference.

Results. We observed that in both CD16 $^+$ monocyte subsets UV exposure caused a rapid and dramatical decrease in the absolute number of viable cells. However, the absolute number of viable classic monocytes (CD14 $^+$ CD16 $^-$) increased progressively after 7 minutes of UV exposition. Meanwhile, 14 minutes of irradiation caused at 3 hours a slow increase of viable cell number, but after 6 h decreased strongly. For all subpopulations studied, 28 minutes of UV induced a massive cell death. We also observed a very slight and progressive increase in viable classic monocytes absolute number from 6 and 24 yours for 28 and 14 minutes of irradiation respectively.

Conclusion. Classic monocytes are much more resistant to ultraviolet emissions than inflammatory and residents subsets, which disappear at 3 hours of cultured.

O-053

SVT003407 Y SVT008294: NUEVOS COMPUESTOS CON ACTIVIDAD DUAL ANTI-PROLIFERATIVA Y ANTI-INFLAMATORIA COMO POTENCIALES FÁRMACOS ANTIPSORIÁTICOS. S. Marchán, C. Herrero, J. Cabellos, C. Lagunas. Laboratorios Salvat, Esplugues de Llobregat.

Objetivos. La psoriasis es una enfermedad inflamatoria crónica de la piel caracterizada por una hiperproliferación y diferenciación anormal de queratinocitos y un aumento en la producción de citoquinas proinflamatorias. Las terapias actuales abordan ambos aspectos de la patología. El objetivo de este estudio es evaluar el potencial terapéutico para el tratamiento de la psoriasis de dos agonistas del receptor PPAR γ , SVT003407 y SVT008294.

Materiales y métodos. Actividad PPAR γ : la actividad fue determinada por estudios de afinidad con un radioligando competitivo así como ensayos celulares de transactivación.

Actividad antiproliferativa y citotoxicidad: se determinó mediante métodos colorímetros en las líneas celulares HEKn (queratinocitos epidermicos humanos) y HDFa (fibroblastos dérmicos humanos).

Actividad anti-inflamatoria: La inhibición de la producción de citoquinas inflamatorias in vitro se determinó en PBMC humanos estimulados con LPS mediante qRT-PCR. La capacidad anti-inflamatoria *in vivo* se determinó en un modelo de inflamación tópico inducido por TPA en oreja de ratón.

Resultados. Los agonistas del receptor PPAR γ SVT003407 y SVT008294 son dos nuevos compuestos en desarrollo preclínico para el tratamiento tópico de la psoriasis que muestran una actividad dual anti-proliferativa y anti-inflamatoria. Ambos productos presentan una marcada inhibición de la proliferación de queratinocitos sin efectos citotóxicos asociados. Dado que estos compuestos no muestran actividad anti-proliferativa sobre fibroblastos, su administración tópica no debería conllevar atrofia dérmica, tal como sucede con otros fármacos. Por otro lado, en un modelo celular basado en la estimulación de PBMC's con LPS, estos productos son capaces de inhibir la producción de las citoquinas inflamatorias validadas clínicamente para el tratamiento de psoriasis como TNF α , IL-1 α , IL-12p40 (subunidad presente en las citoquinas IL-12 e IL-23). Finalmente, estos compuestos son eficaces en un modelo *in vivo* de inflamación tópica, siendo la respuesta anti-inflamatoria de éstos superior al estándar terapéutico tazaroteno.

Conclusiones. SVT003407 y SVT008294 presentan un potencial terapéutico elevado para el tratamiento de la psoriasis dado que actúan en las dos principales causas responsables del desarrollo de la patología: proliferación de queratinocitos y producción de mediadores inflamatorios.

O-054

RIAM (RAP1-INTERACTING ADAPTOR MOLECULE) ES ESENCIAL PARA LA FAGOCITOSIS MEDIADA POR COMPLEMENTO EN CÉLULAS PROMIELOCÍTICAS. I. Medraño Fernández¹, I.M. Olazabal Olearreaga², J. Merino Gracia¹, F. Sánchez Madrid², V.A. Boussois³, C. Cabañas Gutiérrez⁴, E.M. Lafuente Duarte¹. ¹Facultad de Medicina, UCM, Madrid. ²Hospital de La Princesa. ³BIDMC, Harvard, United States. ⁴CBM-SO, CSIC.

Introducción. Los receptores del complemento CR3 y CR4 ($\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$, respectivamente), son miembros de la familia de integrinas $\beta 2$.

Estímulos pro-inflamatorios inician cascadas de señalización *inside-out* que incrementan la afinidad de estas integrinas, induciendo una activación de la fagocitosis. Algunos componentes de esta vía de señalización *inside-out* a $\alpha M\beta 2$ han sido definidos, como Rap1, cuya activación incrementa la fagocitosis de partículas opsonizadas por complemento, y Talina cuya unión a la región citoplasmática de la integrina $\beta 2$ es esencial para la activación de $\alpha M\beta 2$. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el que Rap1 induce la unión de talina a $\alpha M\beta 2$. Recientemente hemos identificado a RIAM, un efector de Rap1 que funciona como una proteína adaptadora interaccionando directamente con Rap1-GTP y con Talina. Se ha descrito que la asociación Rap1-RIAM contribuye al reclutamiento de Talina a la subunidad β , en otras integrinas.

Objetivos. Estudiar la implicación de RIAM en fagocitosis mediada por complemento y adhesión a través de integrinas $\beta 2$ ($\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$), en células promielocíticas.

Materiales y métodos. Hemos estudiado las siguientes actividades en la línea HL-60 interferida establemente para RIAM (shRNA) y diferenciada a neutrófilo con ATRA: 1) Adhesión a Fibrinógeno/iC3b, soluble y en placa. 2) Fagocitosis mediada por complemento (FACS). 3) Detección de Rap1-GTP (Pull-Down). 4) Reclutamiento de Talina a la copa fagocítica (confocal).

Resultados. La línea celular promielocítica HL-60 interferida establemente para la expresión de RIAM y diferenciada a neutrófilo muestra un defecto en adhesión a fibrinógeno e iC3b, ligandos de $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$, y un defecto en fagocitosis mediada por complemento. Este defecto es específico de CR3 y CR4 ya que no se observa en la fagocitosis mediada por FcR. La activación de Rap1 mediada por 8-CPT-2Me-cAMP, un activador de EPAC (GEF específica de Rap1) induce un incremento en fagocitosis que es inhibido por la interferencia de la expresión de RIAM. Además la interferencia de expresión de RIAM resulta en un menor reclutamiento de Talina a la copa fagocítica, lo que produciría un defecto en la activación de las integrinas $\alpha M\beta 2$ y $\alpha X\beta 2$.

Conclusión. Nuestros datos sugieren que RIAM funciona como el nexo de unión entre la forma activa de Rap1 y el reclutamiento de Talina a la región citoplasmática de la subunidad beta de las integrinas $\alpha M\beta 2$ y/o $\alpha X\beta 2$. RIAM, por tanto actuaría como el efector de Rap1 que regula la activación de los receptores fagocíticos del complemento CR3 y CR4.

O-055

LOS LIGANDOS DE RECEPTORES TOLL-LIKE REGULAN EL PATRÓN MIGRATORIO DE LOS LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA. J.C. Nieto Sáchica, E. Cantó, M.A. Ortiz, C. Zamora, S. Vidal. Institut De Recerca Hospital De Santa Creu I Sant Pau, Barcelona.

Los leucocitos juegan un papel central en la regulación de la respuesta inmune, conocer las vías que regulan la migración y la dinámica del tránsito celular, nos permitirán entender la progresión del proceso inflamatorio.

Nosotros hemos investigado como ligandos de TLR2 (Pam3CSK4, FSL-1), TLR4 (LPS) o algunos mediadores inflamatorios (IFN- γ , IL-10, TNF- α) producidos tras el estímulo con ligandos de TLRs pueden regular la expresión de los receptores de quimiocinas (CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR3) en las diferentes poblaciones leucocitarias.

Resultados. Primero por citometría de flujo se analizó la expresión de los receptores de quimiocinas en monocitos, linfocitos y neutrófilos en sangre total. Los monocitos expresaban CCR2, CCR4, CCR5, mientras que los linfocitos expresaban CXCR3, CCR6 y CCR4. Tras esti-

mular cultivos de sangre total con ligandos de TLR2 y TLR4 durante 20 horas observamos que disminuía la expresión de CCR2, aumentaba la expresión de CCR4, CCR5, CXCR3 en monocitos y aumentaba la expresión de CXCR3 en linfocitos. Los principales mediadores inflamatorios detectados en estos cultivos fueron IL-10, IL-6, TNF α . En consecuencia determinamos la influencia de estos mediadores inflamatorios sobre la expresión de los receptores de quimiocinas. Al estimular sangre total con IL-10 y TNF- α disminuía la expresión de CCR2 y aumentaba la expresión del CCR4 y el CXCR3 en monocitos. Para validar el efecto de la IL-10, bloqueamos con anti IL-10 neutralizante los cultivos de sangre total estimulada con el ligando de TLR4.

Conclusión. El reconocimiento de patógenos por las diferentes poblaciones leucocitarias en especial por los monocitos, altera su repertorio de receptores quimiocinas, lo que condicionaría su tránsito a través de los tejidos.

O-056

LA ACTIVACION CONSTITUTIVA DE NOTCH1 DESEQUILIBRA EL BALANCE PROLIFERACIÓN/DIFERENCIACION EN LAS CELULAS HEMATOPOIETICAS EN EL EMBRIÓN DE RATÓN POSTGASTRULACIÓN. I. Cortegano, L. Luna, P. Melgar, M. Alia, B. Palacios, N. Serrano, A. Sánchez-Archidona, B. De Andrés, J. De La Pompa, M. Marcos, M. Gaspar. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Objetivo. Estudiar el efecto de la activación constituida de Notch1 a lo largo del desarrollo embrionario en el embrión postgastrulación de ratón.

Material y Métodos. Modelo murino Cre-lox en el cual la región intracitoplasmática del receptor Notch1 (N1ICD) se encuentra constitutivamente activa y es expresada en todas las células que en algún momento del desarrollo son Tie-2+, además esta construcción está unida a la proteína fluorescente GFP para la identificación de las células mutantes. Se ha realizado la caracterización fenotípica de las poblaciones a día 9 de gestación en saco vitelino mediante citometría de flujo multi-paramétrica. Se han aislado las poblaciones GFP+ para estudiar su potencial hematopoiético (ensayos de methocult), su expresión génica (PCR a tiempor real).

Resultados. Nuestros resultados muestran que, al igual que ocurre en el caso de la delección de Notch1, su hiperactivación de células Tie2+ da lugar a la desaparición de los islotes sanguíneos de la aorta-dorsal y al bloqueo de la hematopoyesis definitiva en los embriones de día 9.5 de gestación. El potencial hematopoiético de los progenitores aislados de los ratones transgénicos se reduce en 10-20 veces en comparación con el ratón control. Los estadios inmaduros e intermedios en el proceso de diferenciación eritroide y mieloide en los ratones mutantes se ven incrementados y presentan mayor capacidad de proliferación; sin embargo, tanto el proceso de hemoglobinización como la diferenciación a estadios más maduros de estos linajes están bloqueados. El análisis de la expresión génica de muestras purificadas por citometría de flujo de las poblaciones progenitoras GFP+ muestra un aumento en la expresión tanto de los ligandos de Notch como de sus dianas directas (Dll4, Jagged 1 y 2, Hes1 y HRT2), así como de los genes implicados en la vía no canónica de Wnt (Dkk1 y Wnt5a). En cuanto al análisis de los genes esenciales para la hematopoyesis, la hiperactivación de Notch1 en estos estadios celulares reduce en gran medida la expresión de SCL, Fli1 y GATA2 y no altera la expresión de LMO2 y LDB1. El análisis de los genes de ciclo celular muestra alteraciones en

la expresión de ciclinas importantes en la regulación de este proceso como la ciclina E1 y la ciclina B2.

Conclusión. La hiperactivación de Notch1 en células embrionarias Tie2+ produce un bloqueo en la diferenciación final hematopoética mieleroítroide con acúmulo de precursores intermedios de los linajes eritroide y mieloide.

SESIÓN 7: CÉLULAS DENTRÍTICAS

Moderadores: Alberto Varas (Madrid)

David Sancho (Madrid)

O-057

LANGERHANS CELLS CONTROL ANTIGEN-SPECIFIC SKIN INFLAMMATION. M. Gomez De Agüero Tamargo¹, M. Vocanson¹, A. Kissensefning², B. Malissen², K. Dominique¹, B. Dubois¹. ¹INSERM U 851, Lyon, France. ²Centre d'Immunologie Inserm-CNRS de Marseille-Luminy, France.

We previously reported that induction of CD8⁺ cytotoxic T cell responses by skin immunization does not involve skin resident Langerhans cells (LC) (Kissenpfennig et al. Immunity 2005) and requires recruitment of inflammatory DC from blood (Le Borgne et al. Immunity 2006). In particular, we showed using Langerin-DTR transgenic mice that LC were dispensable for induction of contact hypersensitivity (CHS) responses to the strong contact sensitizer DNFB. We now show using the cross-reactive and tolerogenic hapten DNTB, and Langerin-GFP and -DTR knock-in mice, that LC mediate hapten-specific skin CD8⁺ T cell tolerance and prevent CHS to this hapten. A single skin painting with DNTB induces LC activation and emigration to skin draining lymph nodes (dLN). Skin-derived LC constitute the major DC subset that is present in dLN as soon as 24 hours after skin DNTB painting and able to present the tolerogenic hapten to specific CD8⁺ T cells. Remarkably, while skin immunization with DNTB is unable to prime specific CD8⁺ effector T cells and results in lack of CHS, *in vivo* ablation of LC induced by injection of Diphtheria toxin into Langerin-DTR mice allowed for priming of hapten-specific CD8⁺ CTL, indicating a tolerogenic role for LC. Alternatively, repeated skin delivery of DNTB results in the priming of CHS effector cells and correlates with mobilization of both LC and non LC Ag-presenting DC into dLN. Thus, LC induce Ag-specific tolerance via the skin and this can be overcome by the mobilization of other subsets of myeloid DC.

O-058

ACTIVATION OF CDCS INDUCES SPECIFIC PDC COOPERATION TO PROMOTE A COORDINATED IMMUNE RESPONSE. B. Pérez-Cabezas¹, P. Bastos-Amador¹, M. Naranjo-Gómez¹, M. Bofill², F. Carmona³, F. Nuñez⁴, R. Pujol-Borrell¹, F.E. Borras¹. ¹Fundació Ins Inv Germans Trias i Pujol, Badalona. ²Fundació Irsicaixa. ³Dpto Estadística UB. ⁴UCTS, Ins Inv Vall d'Hebron, Barcelona.

Two well-characterized blood dendritic cell populations, conventional (cDC) and plasmacytoid (pDC) have been described. Both populations exhibit multiple differences including phenotype, TLR-expression and cytokine and chemokine secretion. cDCs are highly efficient at exogenous antigen presentation and they traffic from tissues to local lymph nodes

for antigen presentation via afferent lymphatic vessels. In contrast, pDCs are less competent in antigen uptake, they are present in the thymus and secondary lymph nodes and are rarely found in non-inflamed tissues and afferent lymphatics. These marked differences and some evidences reported by our and other laboratories suggest specialized and may be complementary and coordinated functions between DC subsets to induce a potent immune response.

AIMS. To verify the coordination between pDC and cDC in the generation of immune responses, determining the mechanisms of pDCs-conditioning by activated cDCs and looking for specific differences depending on the cDC activation stimulus.

Methods. cDCs and pDCs were sorted from buffy coats obtained from healthy blood donors. Sorted cDCs were stimulated with LPS or R848 during 16h. Meanwhile, pDCs from the same donor were CFSE-labeled and maintained in IL3. Then, CFSE-pDCs and stimulated-cDCs were mixed (2:1) and co-cultured for additional 5h. CFSE-pDCs were sorted again and the RNA was extracted for microarray analyses and real time-PCR. Functional features of the conditioned-pDC included phenotype changes, induction of alloproliferation and production of IFN α .

Results. Phenotypically, activated cDC induced the up-regulation of several maturation markers in pDCs, including CD25, CD83 and CD86. Also, conditioning of pDC by activated-cDC promoted the expression of several genes such as chemokines and proinflammatory cytokines such as IL6. Qualitatively, the gene expression profile of pDCs conditioned by LPS-cDCs or by R848-cDCs was very similar and both were able to induce alloresponses. However, as expected, the higher number of changes in gene expression was found when pDCs were conditioned by R848-cDC.

Conclusions. Our results demonstrate that different types of cDC activating factors promote specialized gene and functional activation profiles in pDC that may in turn contribute to establish an appropriate immune-regulatory environment.

Acknowledgments. This work is being supported by a grant from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" FIS 06/0453 to FEB.

O-059

REDISTRIBUCIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MONOCITOS EN PACIENTES CON LLC-B ZAP-70⁺. M.Á. Sánchez Luengo, G. Parada Hermoza, Z. Moreno Villegas, L. Ortega Moreno, D. Díaz Martín, H. Barcenilla Rodríguez, A. Prieto Martín, J. Monserrat Sanz, E. Reyes Martín, M. Álvarez De Mon-Soto. Dpto. Medicina, Unidad I+D asociada UAH/CSIC/IMMPA, Alcalá de Henares.

Introducción. Las células dendríticas (DCs) son muy importantes en la protección frente a agentes infecciosos y en la defensa antitumoral, alteraciones en estas poblaciones celulares repercuten de manera muy significativa en estas respuestas. Una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en los pacientes con LLC-B son las infecciones producidas por agentes infecciosos.

Objetivos. Estudiar mediante la citometría de flujo las posibles alteraciones en DCs y monocitos relacionadas con la expresión de ZAP-70 en pacientes con LLC-B.

Materiales y métodos. Se realizó estudio inmunofenotípico por citometría de flujo de 4 colores en 34 pacientes con LLC-B que se categorizaron en ZAP-70⁺ (n=16) y ZAP-70- (n=18), los resultados se compararon con 18 controles sanos. Para la determinación inmunofenotípica de células dendríticas se utilizó un kit de enumeración de DCs,

que permite discriminar entre DCs mieloides tipo I, tipo II y DCs plasmacitoides. En el caso de la determinación de monocitos se utilizó marcaje mediante CD14 y CD16 para discernir entre las distintas poblaciones de monocitos, y se evaluó la expresión en las diferentes poblaciones monocitarias de los marcadores de coestimulación CD80 y CD86, y los marcadores de migración CX3CR1 y CD62L.

Resultados. En los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ se observó respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos una disminución de las DCs mieloides tipo I (mDC 1) y una disminución de las DCs plasmacitoides (pDC) contrarrestada por un incremento en las DCs mieloides tipo II (mDC 2). A su vez estos pacientes ZAP-70⁺ presentaron también una importante redistribución de las poblaciones monocitarias con un descenso importante de los monocitos clásicos CD14^{+hi}CD16⁻, y de los monocitos CD14^{+high}CD16^{+high} y CD14^{+high}CD16^{+low} presentando estas últimas poblaciones descensos importantes en la expresión de moléculas implicadas en la migración y coestimulación celular. El descenso observado en estas poblaciones monocitarias se debe al fuerte incremento en los pacientes con LLC-B ZAP-70⁺ de los monocitos CD14^{+low}CD16^{+high} y CD14⁻CD16^{+high}.

Conclusiones. Los pacientes con LLC-B y concretamente los ZAP-70+ se caracterizan por presentar una fuerte alteración en el compartimento de DCs y monocitos que podría estar asociado al peor pronóstico de estos pacientes y una mayor susceptibilidad de sufrir infecciones.

O-060

LA VÍA CANÓNICA DE SEÑALIZACIÓN BMP PARTICIPA EN LA MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS.
V.G. Martínez, C. Hernández-López, L. Hidalgo, A. Entrena, J. Valencia, A. Zapata, A. Vicente, R. Sacedón, A. Varas. Facultad Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivos. Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) son factores de crecimiento secretados bien conocidos por sus funciones durante el desarrollo embrionario, aunque cada vez son más las evidencias que las implican también en procesos de diferenciación y proliferación celular en tejidos adultos, incluyendo el sistema inmunitario. Parte esencial de este sistema son las células dendríticas (DCs) por su elevado potencial immunogénico. En este estudio, se pretende demostrar la expresión y funcionalidad de la vía de señalización BMP en las células dendríticas humanas.

Material y Métodos. A partir de monocitos de sangre periférica se obtuvieron células dendríticas inmaduras (iDCs) tras cultivo en AIM-V suplementado con IL-4 y GM-CSF. La adición posterior de diferentes estímulos madurativos permitió obtener células dendríticas maduras (mDCs). La expresión y funcionalidad de los componentes de la vía de señalización BMP se realizó por PCR cuantitativa. Los efectos de la activación de la vía BMP en la supervivencia de iDCs y mDCs fueron analizados por citometría de flujo tras cultivo con BMP-4. Asimismo, las iDCs se trataron con BMP-4 para analizar, por citometría de flujo, ELISA y PCR cuantitativa, los cambios en expresión de marcadores de maduración, niveles de producción de citoquinas, y capacidad aloestimuladora.

Resultados. Tanto iDCs como mDCs expresaban los componentes de la vía de señalización BMP. El incremento en la expresión de proteínas Id tras la estimulación con BMP-4 demostró que la vía de señalización era funcional, y el pre-tratamiento con dorsomorfina

indicó que ocurría mayoritariamente a través de la ruta canónica de las proteínas Smad. El tratamiento con BMP4 disminuyó la tasa de apoptosis fundamentalmente en iDCs, mediante un incremento en la expresión de Bcl-2. La activación de la vía BMP en iDCs condujo a la adquisición paulatina de un fenotipo maduro por aumento en la expresión de CD40, CD80, CD86, CD83, PD-L1 y PD-L2, acompañado de un incremento en la secreción de determinadas citoquinas y de la capacidad aloestimuladora. Finalmente, se demostró en iDCs la inducción mediada por BMP-4 de los factores de transcripción de la familia Runx, cuyos niveles están incrementados en mDCs vs iDCs.

Conclusiones. El presente estudio demuestra que la vía canónica de señalización BMP está implicada en la maduración y supervivencia de las DCs humanas.

O-061

EFFECTO IN VITRO DE LA LENALIDOMIDA (REVLIMID®) SOBRE CÉLULAS HUMANAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO CD1D POSITIVAS. J. López Relaño, M. Gómez Del Moral, B. Abós Gracia, E. Martínez-Naves. Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid.

Introducción. La Lenalidomida es un análogo de la Talidomida con una reconocida función inmunomoduladora y antitumoral. Es usada en el tratamiento de diferentes cánceres hematológicos, síndromes mielodisplásicos y tumores sólidos. Se ha descrito su capacidad de activar a las células NKT (Natural Killer T cells), un tipo de linfocito T con funciones inmunomoduladoras que reconoce抗ígenos lípidicos presentados por la molécula CD1d, expresada en células presentadoras de antígeno, principalmente células dendríticas y monocitos.

Objetivos. Estudiar el efecto de la Lenalidomida en el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs) y a macrófagos.

Material y métodos. Se generaron iDCs y macrófagos a partir de monocitos extraídos de Buffy coats de donantes sanos utilizando GM-CSF e IL-4, en presencia o ausencia de Lenalidomida. Por citometría de flujo se analizó la expresión en superficie de las moléculas de HLA no clásicas CD1d y CD1a; la molécula de HLA clásica HLA-DR; y la molécula coestimuladora de la presentación antigenica CD86 durante el proceso de diferenciación de los monocitos a iDCs y macrófagos. Se estudió la expresión génica de las moléculas de CD1d y CD1a durante el proceso de diferenciación, mediante la valoración de RNA por la técnica de q-RT-PCR.

Resultados. Las iDCs generadas a partir de monocitos en presencia de Lenalidomida presentaron un aumento de la expresión en superficie de las moléculas CD86 y HLA-DR, utilizadas como marcadores de maduración, con respecto a las células control. También se observó un aumento de la expresión en superficie de la molécula presentadora de抗ígenos lípidicos CD1d. Existió un aumento del transcrito del gen de CD1d observado mediante q-RT-PCR bajo estas condiciones.

Conclusiones. La Lenalidomida modifica el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a macrófagos, generándose iDCs con una mayor expresión en superficie de las moléculas CD86 y HLA-DR, lo que sugiere un efecto positivo de la droga sobre la maduración de las DC y su capacidad presentadora. Así mismo, el efecto de la Lenalidomida sobre el aumento de la expresión, tanto a nivel de RNA como en superficie, de la molécula CD1d de las DC gene-

radas a partir de monocitos, afectará a su reconocimiento por células NKT, como ya ha sido descrito en estudios de citotoxicidad anteriores.

O-062

CÉLULAS NKT HUMANAS RESPONDEN A CÉLULAS DENDRÍTICAS TRATADAS CON LÍPIDOS DEL POLEN DE OLIVO (*Olea europeae*) A TRAVÉS DE CD1D. B. Abós Gracia¹, M. Gómez del Moral¹, J. López Relaño¹, L. Castro de las Cuevas², M.T. Villalba Díaz², E. Martínez Naves¹. ¹Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. ²Facultad de Química, Universidad Complutense de Madrid.

Introducción. CD1d es una molécula de tipo MHC no polimórfica que restringe a células NKT (Natural Killer T). CD1d presenta antígenos de naturaleza lipídica, tanto endógenos como exógenos, a células NKT.

El polen es uno de los principales agentes ambientales que puede actuar como antígeno estimulando respuestas alérgicas. En este trabajo se muestra como las células NKT pueden responder a células dendríticas tratadas con lípidos del polen de olivo (*Olea europeae*) a través de CD1d.

Objetivo. Estudiar si las células dendríticas (DCs) son capaces de presentar antígenos lipídicos procedentes del polen de olivo a las células NKT.

Material y métodos. DCs inmaduras fueron generadas *in vitro* a partir de monocitos de sangre periférica de donantes sanos mediante su cultivo con GM-CSF e IL-4. iDCs se trataron durante 48 h con lípidos totales del polen de olivo, con la fracción polar (fosfolípidos -PLs-) y la fracción apolar (triglicéridos -TGs-), separadas por cromatografía en capa fina (TLC). Las células NKT se expandieron a partir de células mononucleares de sangre periférica (PBMCs), por cultivo con IL-2 y α-Galactosilceramida. Se analizó la expresión en iDCs de las moléculas CD1a, CD1d, CD86 y HLA-DR, por citometría de flujo. Los niveles de ARNm de CD1D, CD1A, CD1B y CD1C fueron cuantificados por PCR cuantitativa. Por último, se analizaron la producción de IL-4 e IFN-γ (ELISA) y la citotoxicidad (detección con Lactato Deshidrogenasa -LDH-) de NKTs frente a iDCs tratadas con lípidos.

Resultados. Las iDCs tratadas con lípidos de polen de olivo incrementaron la expresión de CD1d y de CD86 respecto a las células control. El aumento de CD1d fue aún mayor con la fracción de fosfolípidos. La expresión de CD1a y HLA-DR no varió significativamente entre las células tratadas con lípidos totales y las células sin tratar. Tampoco hubo variación con la fracción fosfolipídica y de triglicéridos. A nivel transcripcional, la expresión génica de CD1D en iDCs tratadas con lípidos totales de polen fue mayor respecto a las células control. Por el contrario, los niveles de transcriptos de CD1A, CD1B y CD1C disminuyeron. Las células NKT lisaron de forma eficiente las iDCs tratadas con lípidos totales de polen, pero no las iDCs tratadas con PLs y TGs. En cuanto a la producción de IFN-γ e IL-4 por las NKTs, se detectó un aumento de ambas citoquinas en las iDCs tratadas con lípidos totales.

Conclusiones. Las iDCs tratadas con extractos lipídicos del polen de olivo aumentaron la expresión de CD1d, siendo este aumento mayor al tratar con la fracción de PLs. Esto apunta a los lípidos polares como responsables de dicho aumento. Por otro lado, las NKTs fueron capaces de responder frente a los lípidos del polen, lisando las iDCs tratadas y produciendo además IFN-γ e IL-4. Todos estos datos sugieren que las células NKT pueden jugar un papel importante en la respuesta inmune frente a alergenos como el polen de olivo.

O-063

DIVERSIDAD FUNCIONAL DE LOS LIGANDOS DE NOTCH EN LA GENERACIÓN DE LOS DISTINTOS SUBTIPOS DE CELULAS DENDRITICAS EN EL TIMO HUMANO. E. Martín Gayo¹, M.J. García Leon¹, B. De Andrés², M.L. Gaspar², M.L. Toribio García¹. ¹Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa", Madrid. ²Centro Nacional de Microbiología. Instituto de salud Carlos III, Madrid.

Previos estudios han identificado dos subtipos de células dendríticas (DCs) en el timo humano, plasmacitoïdes (pDCs) y convencionales (cDCs), cuya relación ontogénica sigue en debate. Nuestros trabajos previos indicaron que las cDCs derivan de los progenitores multipotenciales (MHPs) que colonizan el timo humano a través de una ruta alternativa a la ruta linfoides T, que implica la generación de progenitores intermedios con características mieloides. Estos progenitores han perdido el potencial pro-T (progenitores no-T) y mantienen potencial NK y granulo-monocítico, pero su capacidad de generar pDCs se desconoce. La generación de progenitores no-T se inhibe por la señalización a través de receptores Notch, en favor de la generación pro-T. Sin embargo, se desconoce el impacto de Notch en los progenitores no-T una vez generados, así como la función de Notch en la generación de los subtipos de células intratímicas no-T a partir de ellos. Con el fin de analizar estas cuestiones, hemos derivado sistemas experimentales de diferenciación *in vitro* de MHPs intratímicos humanos CD34⁺ sobre células estromales de médula ósea (OP9) que carecen de ligandos de Notch o expresan selectivamente el ligando Delta-like 1 (DLL1) o Jagged-1 (JAG1). Además, hemos realizado estudios de genómica comparativa por macroarrays para definir las relaciones ontogénicas de diferentes linajes intratímicos T y no-T. Nuestros resultados indican que, en ausencia de ligandos de Notch, los MHPs se diferencian *in vitro* en progenitores no-T CD5^{lo}CD123⁺ que expresan genes asociados con el linaje DC y con la vía de Notch y son capaces de generar células NK, cDCs y pDCs. Por el contrario, la señalización mediada por DLL1 inhibe la generación de progenitores no-T, aunque JAG1 la permite, y ambos ligandos promueven la supervivencia y expansión de los progenitores CD5^{lo}CD123⁺ una vez generados. Finalmente, DLL1 y JAG1 regulan diferencialmente la generación de células NK, cDC y pDC a partir de estos progenitores. En conclusión, nuestros datos demuestran una función estadio-específica de los diferentes ligandos de Notch y sugieren que su expresión diferencial en el timo humano podría regular de forma nicho-específica la generación de diferentes tipos de DCs y células NK a partir de un progenitor intratímico común.

O-064

CALICIVIRUS-LIKE PARTICLES MODULATE PORCINE DENDRITIC CELLS IN VITRO. E. Crisci¹, C. Lorena¹, L. Fraile¹, T. Mus-sá¹, J. Domínguez², I. Mena³, J. Bárcena³, M. Montoya¹. ¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. ²Dpto Biotecnología Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), Madrid. ³Centro de Investigación en Sanidad Animal (CISA-INIA), Madrid.

Objective. We have analyzed the immunogenic potential of virus-like particles (VLPs) from rabbit hemorrhagic disease virus (RHDV) in porcine bone marrow-derived dendritic cells (poBMDCs), as we have previously described in mice⁽¹⁾.

Materials and Methods. VLPs from the capsid protein of RHDV were generated and constructed correctly assembled into RHDV-

VLPs. PoBMDCs were generated as previously described⁽²⁾. Briefly, poBMDC were generated by cultivating porcine bone marrow cells for 8 days in RPMI-1640 supplemented with 100 ng/ml recombinant porcine granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (rpGM-CSF, R&D). PoBMDCs were incubated with RHDV-VLPs at two different concentrations (50 and 10 µg/ml) or stimulated with TLR-4 ligand (LPS, 10 µg/ml, SIGMA) as positive control.

PoBMDCs in our assays were CD172a⁺ SLAI⁺, SLAII⁺, CD80/86⁺, CD11R3⁺, CD16^{low}, CD163^{low}, CD1^{low}, CD11R1⁻ and CD4⁻. At four time points (4, 8, 16, 24 hours) poBMDC phenotype and production of cytokines (IFN- α , TNF- α , IL-18, IL6) were analysed.

Results. RHDV-VLPs-stimulated poBMDCs presented activated phenotype compared with untreated cells. SLAII, SLAI, CD80/86 were up-regulated in a dose dependent manner after 24 hours as compared with untreated cells. Moreover, RHDV-VLPs activated poBMDCs for TNF- α , IFN- α , IL-18 and IL-6 secretion in a dose dependent manner.

PoBMDCs were high responders to LPS and RHDV-VLPs compared to unstimulated cell by cytokine secretion. Sequential kinetics were induced whereby IFN- α peaked at 8 hours, IL-18 and TNF- α at 16 hours, and IL-6 production progressively increased after 4 hours up to 24 hours.

Conclusions. Our data showed that the RHDV-VLPs modulate the poBMDCs response *in vitro* supporting their immunogenic potential for new vaccine development against animal viral infections.

References

1. Crisci E. et al., Virology (2009).
2. Kekarainen T. et al., Vet Immunol Immunopathol (2008).

O-065

INFECTION BY SWINE, AVIAN AND THE PANDEMIC HUMAN INFLUENZA A 2009 VIRUS DIFFERENTIALLY UP-REGULATE SURFACE MARKERS AND CYTOKINE SECRETION ON PORCINE DENDRITIC CELLS *IN VITRO*. T. Müssá¹, M. Pujol¹, C. Rodríguez-Carriño¹, L. Córdoba¹, E. Crisci¹, N. Busquets¹, J. Maldonado², J. Domínguez³, L. Fraile¹, M. Montoya¹. ¹Centro de Recerca en Sanidad Animal, Bellaterra. ²Laboratórios HIPRA. ³Departamento de Biotecnología, INIA

Introduction and objective. Dendritic cells (DC) link innate and adaptive immune system, expressing specialized pattern-recognition receptors which recognise particular pathogen-associated molecular patterns. Furthermore, there is growing evidence that the so-called "early" cytokines play an important role in influenza virus infection. Our main goal was to characterize the interaction of porcine bone marrow derived dendritic cells (poBMDC) with swine, avian and human influenza virus *in vitro*.

Material and methods. Porcine BMDC were generated and DC morphology and virus infection evaluated by transmission electron microscopy (TEM). poBMDC were stimulated with TLR agonists (Poly-IC, LPS, R837 or CpG or infected with 10⁴ TCID₅₀/f the following viruses A/Swine/Spain/80598-LP1/2007(H3N2), pandemic A/Catalonia/63/2009(H1N1),high pathogenic A/Chicken/Italy/13474/99(H7N1) and low pathogenic A/Anas platyrhynchos/Spain/1877/2009(H7N2). TLR agonists-stimulated cells were analysed by flow cytometry at 24h whereas infected-DC phenotype was analysed at 16 and 24 hours. IFN- α , TNF- α , IL-12 and IL-18 secretion were analysed by ELISA at 4, 8, 16 and 24 hours post infection (pi). Virus replication was evaluated

by titration of infected cells-supernatants in Madin-Darby canine kidney cells (MDCK) and by RT-qPCR of infected cells at 4, 8, 16, 24h and 48h pi.

Results. Porcine BMDC revealed a defined vacuolar aspect with several dendritic processes in the cells by TEM. Control poBMDC in our assays were CD172a⁺, SLAI⁺, SLAII⁺, CD1^{low}, CD4⁻, CD11R1⁻, CD11R3^{low}, CD14^{low}, CD16^{low}, CD40⁻, CD80/86⁺ and CD163^{low}. Stimulation with TLR agonists induced up-regulation of SLAI, SLAII and CD80/86 and different kinetic profile in secreted cytokines, being high responders to Poly-IC and moderate responders to LPS. Infected-poBMDC presented different phenotype by means of SLAI, SLAII and CD80/86 up-regulation. Different cytokine kinetic profile of IFN- α , TNF- α , IL-18 and IL-12 were observed depending on the virus used. No viral progeny was detected in the supernatant of infected-DC. Ultrastructural changes were also detected in influenza infected-DC at TEM.

Conclusions. The different responses observed in TLR-stimulated or influenza infected poBMDC pave the way for understanding the relation between those virus and porcine DC for triggering immune response in swine, a crucial host in this viral infection.

O-066

EXOSOME CAPTURE AND PRESENTATION BY HUMAN PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS. P. Bastos-Amador, B. Pérez-Cabezas, M. Naranjo-Gómez, R. Pujol-Borrell, F.E. Borràs Serres. Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol, Badalona.

Introduction. Plasmacytoid dendritic cells (pDCs) constitute a minor population of blood cells whose best-known function is the secretion of IFN-I in response to viral infections. It has been broadly shown that pDCs are also capable of antigen presentation. Yet, the ability of these cells to capture and present exogenous antigens has not been addressed. Several authors have demonstrated that pDCs may capture soluble proteins or antigens bound to antibodies. Recently, their ability to phagocytose and present antigens entrapped into microparticles has been reported. Since exosomes were described as vesicles bearing functional MHC-peptide complexes the interest in the study of their function has increased enormously. These particles (50-100nm) have an endocytic origin, are secreted by several cell types and might function as a mechanism to spread alloantigens between dendritic cells.

Aim. To evaluate exosome capture by human plasmacytoid dendritic cells.

Methods. Peripheral dendritic cells were isolated from blood of healthy donors by sorting. Fluorescent exosomes were purified from supernatants of Jurkat T cell line labeled with the lipophilic probe Vybrant Dio. Capture of exosomes were performed at 37°C or 4°C as control. The uptake was analyzed by flow cytometry and confocal microscopy. After 24 hours of capture, pDCs were incubated with autologous T cells (ratio 1:20) to measure exo-induced proliferation using CFSE loss as a marker.

Results. pDCs capture exosomes in a temperature dependent manner, although not as efficiently as their counterparts conventional dendritic cells. In some samples exosome capture by pDCs may reached nearly 70% at 24h but it was never as efficient as obtained for cDCs which could be nearly 90% positive for Vybrant Dio-labeled exosomes at shorter time points (12h). Exosome uptake doesn't induce nor prevent pDCs maturation induced by specific stimuli. Finally, pDCs are able to present alloantigens derived from exosomes.

Conclusions. Recent data pointed out pDCs as a critical cell type in tolerance induction in transplantation and autoimmunity. Capture of exosomes by pDCs may represent a way of alloantigen presentation for tolerance induction or graft rejection. The mechanism of interaction between pDCs and exosomes and their consequences need further studies.

SESIÓN 8: INMUNOGENÉTICA

Moderadores: M. Dolores de Juan (San Sebastián)
Manuel Muro (Murcia)

O-067

ARTRITIS REUMATOIDE: PREDICCIÓN DEL RIESGO PRODUCIDO POR LA COMBINACIÓN DE FACTORES AMBIENTALES Y GENÉTICOS. J. Varade López¹, L. Rodríguez¹, M. Fuentes Ferrer¹, A. Balsa², S. Cano³, D. Pascual-Salcedo², B. Fernandez-Gutierrez³, E. Gomez de la Concha³. ¹Hospital Clínico San Carlos, Mostoles. ²Hospital Universitario La Paz, Madrid. ³Hospital Clínico San Carlos, Madrid

Introducción. La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune de etiología compleja con múltiples factores, tanto ambientales como genéticos, implicados en su desarrollo. El locus HLA-DRB1 es el principal contribuyente a su desarrollo. Otras regiones involucradas en la susceptibilidad a AR son PTPN22, STAT4, TRAF1/C5 o OLIG3/TNFAIP3. Dado que los polimorfismos de riesgo asociados a AR solamente incrementan moderadamente la predisposición la combinación de estos factores junto con otros factores ambientales podría ayudar a anticipar el diagnóstico de esta enfermedad.

En este trabajo analizamos el riesgo de desarrollar la enfermedad combinando la información de múltiples variantes genéticas y ambientales asociadas a la AR.

Material y métodos. Para ello analizamos 737 pacientes de AR y 489 individuos sanos como controles. El genotipado de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en los loci PTPN22 (rs2476601), STAT4 (rs7574865), 6q23 (rs6920220 y rs10499194 y TRAF1/C5 (rs3791847) se realizó mediante sondas TaqMan. La caracterización de los alelos HLA-DRB1 se realizó por tecnología Luminex. La presencia de anticuerpos frente a péptidos citrulinados (anti-CCP) fue analizada por ELISA. La información sobre el hábito tabáquico se obtuvo mediante encuesta. Las OR fueron calculadas mediante regresión ordinal con el número de alelos de riesgo como variable independiente para analizar el desarrollo de la enfermedad. El análisis de tendencias se realizó mediante el test de χ^2 .

Resultados. Los individuos portadores de varios factores de susceptibilidad presentan un riesgo incrementado a padecer AR respecto al observado para cada marcador de forma independiente ($p=2.8 \times 10^{-9}$; OR: 3.69 vs. 2.56-1.42 respectivamente), siendo este efecto más pronunciado en los individuos que presentan anticuerpos anti-CCP ($p=1.08 \times 10^{-7}$, OR= 4.58). O más acentuado incluso en los individuos que son o han sido fumadores ($p=0.0004$, OR=6.28), observándose en este último caso un efecto similar al encontrado al estratificar la cohorte simultáneamente por presencia de anticuerpos anti-CCP y el hábito tabáquico ($p=0.0005$; OR=6.38).

Conclusiones. Nuestros datos sugieren que el tabaco actúa principalmente mediante la inducción de la generación de epítopos citrulinados.

O-068

ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO IL-10/TNF α EN PACIENTES DE ARTRITIS REUMATOIDE CON LA RESPUESTA CLÍNICA A CORTICOIDES, NIVELES DE CITOCINAS Y CÉLULAS TREG. B. de Paz Cazón¹, M. Alperi López², F.J. Ballina García², C. Prado Cueto¹, C. Gutiérrez Martín², A. Suárez Díaz¹. ¹Universidad de Oviedo, Oviedo. ²Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos. Analizar la posible influencia de los genotipos funcionales de IL-10 y TNF α en la respuesta clínica al tratamiento en pacientes de artritis reumatoide (AR) así como su efecto sobre los niveles de citocinas y células Treg.

Métodos. Se determinaron los polimorfismos genéticos presentes en el promotor de IL-10 (-1082G/A) y TNF α (-308G/A) mediante amplificación e hibridación con sondas aleloespecíficas. Los niveles séricos de citocinas se cuantificaron mediante ELISA, el porcentaje de células CD4 $^{+}$ CD25 $^{\text{high}}$ por citofluorimetría y la expresión de Foxp3 mediante RT-PCR a tiempo real. La respuesta clínica tras 6 meses de tratamiento ($n=125$) se determinó mediante el cambio en la actividad de la enfermedad ($\Delta\text{DAS}28$) y el porcentaje de respuesta al tratamiento (ACR).

Resultados. Mediante análisis de regresión lineal se encontró que el genotipo alto productor de IL-10 se asocia con una mayor respuesta al tratamiento, específicamente a la terapia con prednisona ($p=0.0003$). El estudio del efecto combinado de los polimorfismos de ambas citocinas indicó una asociación del genotipo alto IL-10/bajo TNF α con la buena respuesta a este tratamiento ($p=0.001$). Por otra parte, la cuantificación de citocinas séricas mostró niveles incrementados de TNF α , IL-6 y IL-18 en pacientes ($n=196$) comparados con controles, encontrándose una disminución de TGF β e IL-10. Sin embargo, en los pacientes analizados al diagnóstico ($n=32$) sólo se encontraron diferencias significativas en los niveles de IL-6 y TGF β . No se encontraron diferencias en los niveles de IL-17, el porcentaje de células CD4 $^{+}$ CD25 $^{\text{high}}$ y la expresión de Foxp3. El tratamiento recibido por los pacientes no mostró efectos significativos sobre los niveles de citocinas o de células Treg. Sin embargo, los pacientes tratados con prednisona portadores del genotipo buen respondedor a corticoides presentaron niveles más elevados de TGF β , FoxP3 y células Treg que los pacientes con otros genotipos, mientras que los niveles relativos de TNF α e IL-17 eran menores.

Conclusión. Los pacientes de AR con el genotipo alto productor de IL-10/bajo de TNF α presentan una mejor respuesta al tratamiento con prednisona, que puede ser debida, al menos en parte, a un incremento en los niveles de Foxp3 y células Treg junto con una reducción de mediadores inflamatorios.

O-069

PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CÉLULAS CD4 $^{+}$ DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. J.M. Lucena, A.M. Escalera Cárdenas, C. Abad Molina, A. Nuñez Roldan, J.R. García Lozano, M.F. González Escribano. Hospital Universitario Virgen Del Rocío, Sevilla.

Objetivo. Determinar el patrón de expresión de microRNA en células T CD4 $^{+}$ de sangre periférica en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES).

Material y Métodos. Se incluyeron muestras de 7 pacientes con LES: 4 asintomáticos y 3 en fase activa y 3 controles sanos. Las células T CD4 $^{+}$ se aislaron a partir de sangre periférica mediante micropar-

tículas magnéticas conjugadas con anti-CD4. El RNA se obtuvo con el miRNeasy Mini Kit separándolo en dos fracciones: una que contiene el RNAm y otra con los RNA de menos de 200 nucleótidos que incluye los microRNA. El cDNA se sintetizó con sistema Multiplex RT y el análisis de expresión se realizó mediante Real-Time PCR con las tarjetas microfluídicas TaqMan® Low Density Array A Human MicroRNA Panel v2.0 que incluyen 378 microRNA. El análisis estadístico se realizó con el programa StatMainer. Como controles internos se utilizaron RNU48, RNU44 y U6.

Resultados. El microRNA U6 tuvo que ser descartado como control interno porque se obtuvieron diferencias significativas en cuanto a su nivel de expresión entre el grupo de pacientes y controles. Los microRNA, miR-224, miR-143, miR-376c y miR-485-3p se encontraron sobreexpresados en pacientes con LES respecto a controles sanos. El microRNA, miR-576-5p, por el contrario, presentaba una expresión más baja en pacientes con LES que en controles sanos.

Conclusiones. Las células T CD4⁺ de sangre periférica de pacientes con LES presentan un patrón de expresión de microRNA distinto al de población sana.

O-070

ASOCIACIÓN DEL GEN TNF ∞ CON LA SÍNTESIS INTRATECAL DE IGM EN PACIENTES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. *M. L. Cava-
nillas¹, J.C. Álvarez-Cermeño², M. Bartolomé², M. Espiño², R. Arroyo¹,
E. Urcelay¹, L.M. Villar². ¹Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Hospital
Ramón y Cajal.*

Introducción. La heterogeneidad entre los pacientes de esclerosis múltiple (EM) en el curso de la enfermedad y en la respuesta a fármacos, podría reflejar distintos mecanismos patogénicos derivados de una heterogeneidad genética. Esta diversidad también se evidencia al estudiar las bandas oligoclonales IgM. La síntesis intratecal de IgM se produce en un 40% de los pacientes de EM que presentan brotes y está relacionada con un curso más agresivo.

El factor de necrosis tumoral α (TNF α) es una citoquina secretada por macrófagos activados presente en lesiones crónicas y agudas de EM. Existe síntesis intratecal de TNF α en pacientes con EM, y el nivel de esta citoquina en LCR podría correlacionar con la progresión de la enfermedad, pues su secreción aumenta durante los brotes.

Estudios en distintas poblaciones caucásicas asociaron polimorfismos del promotor del gen TNF α , localizado en el complejo HLA, con la susceptibilidad a EM independientemente del HLA-DRB1*1501.

Objetivo. Analizar si la síntesis intratecal de anticuerpos IgM oligoclonales pudiera asociarse con polimorfismos del gen TNF α .

Material y métodos. El estudio se realizó en 44 pacientes de EM con bandas oligoclonales IgM restringidas en LCR (M $^+$), en 100 pacientes sin dichos anticuerpos (M $-$) y en 600 controles. Se procedió al genotipado de 4 polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) del promotor del gen TNF α , utilizando tecnología Taqman y se analizaron también dos microsatélites. El genotipado de las muestras de EM fue ciego para el estatus IgM de los pacientes. El análisis estadístico se realizó con el test Chi-cuadrado (Epi Info v. 6.02). Las frecuencias haplotípicas fueron estimadas con el algoritmo de expectación-maximización (Haploview 6.0).

Resultados. Los SNPs TNF-238 y TNF-376 mostraron diferencias significativas en sus frecuencias alélicas entre los dos grupos de EM (29M $^+$ y 59M $-$) en una primera población y la replicación en una población independiente obtuvo resultados concordantes. El análisis global

evidenció diferencias fuertemente significativas al comparar las frecuencias alélicas entre los grupos M $^+$ y M $-$ (TNF-238: 19% vs. 4%; p= 0.0003 y TNF-376: 17% vs. 2%; p=0.0002). Las frecuencias de los alelos minoritarios de TNF-376 y TNF-238 se asociaron con una OR de 3.97 (p=9.6x10 $^{-6}$) y de 2.54 (p=0.0034), al comparar el grupo M $^+$ con el grupo de controles. El análisis haplotípico con los dos microsatélites no aportó información adicional.

Conclusión. La frecuencia del alelo TNF-376A aumenta casi 4 veces en el grupo de pacientes de EM con síntesis intratecal de IgM.

O-071

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS FUNCIONALES DEL GEN LILRA3 (ILT6) POR SECUENCIACIÓN DIRECTA. *D. Ordóñez Del Valle,
C. Vilches Ruiz. Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid.*

En el Leukocyte Receptor Complex (LRC, 19q13.4) se encuentran varias familias génicas de receptores del Sistema Inmunológico (LILR, LAIR y KIR) que activan o inhiben a diferentes subpoblaciones leucocitarias linfoides y mieloides, y que reconocen principalmente moléculas HLA de clase I. El gen A3 de la familia LILR (denominado previamente ILT6, LIR-4, CD85e o HM43) presenta en el 23,3% de los españoles una delección de 6'7 kb que afecta prácticamente a toda su región codificante. Esta delección se asocia de manera significativa a un mayor riesgo de padecer ciertas enfermedades autoinmunes, como la Esclerosis Múltiple (EM) o el Síndrome de Sjögren. Nosotros hemos demostrado que el riesgo de padecer EM se ve potenciado (Odds Ratio = 9,2; 95% CI = 4.08 - 20.75; p-valor < 10 $^{-6}$) por la presencia conjunta de la delección de LILRA3 y del alelo HLA-DRB1*1501.

Por otra parte, en la población japonesa son frecuentes las inserciones y los cambios de base que alteran el marco de lectura de LILRA3. Estas alteraciones tienen un significado biológico idéntico a la presencia de la delección porque inactivan funcionalmente a LILRA3. Además, en la población caucasoide británica se han descrito varios polimorfismos en la secuencia codificante de LILRA3 que inducen cambios de aminoácido.

La identificación de todas estas variaciones requiere un análisis preciso del gen completo, tanto de sus regiones codificantes, como de las no codificantes. En este trabajo presentaremos un método de obtención y análisis de la secuencia genómica de LILRA3 mediante una PCR de larga distancia que cubre toda su porción codificante (4,95 Kb), así como un resumen de los resultados obtenidos hasta el momento.

*Este trabajo ha sido financiado por un proyecto de investigación de la Fundación LAIR

O-072

VARIACIONES GENÉTICAS EN IL28B E INFECCIÓN DEL VIRUS DE LA HEPATITIS POR DIFERENTES GENOTIPOS VIRALES. *C. Abad Molina, M.A. Montes Cano, J.R. García Lozano, M. Romero Gomez, N. Barroso, J. Aguilar Reina, A. Nuñez Roldan, M.F. González Escribano. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.*

Introducción. Factores genéticos del hospedador pueden modificar el curso de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC). Recientemente, se ha asociado el locus IL28B con la respuesta al tratamiento en personas infectadas con el VHC.

Objetivo. Investigar la relación del locus IL28B con la infección por VHC.

Material y Métodos. Se incluyeron un total de 731 individuos: 284 con infección persistente (210 infectados por genotipo viral 1 y 66 por genotipo viral no-1), 69 individuos aclaradores espontáneos y 378 no infectados como grupo control. Los datos de respuesta al tratamiento se conocían en 219 pacientes, 113 de ellos tenían una respuesta sostenida al tratamiento y 106 no la presentaban. El genotipado se realizó usando sondas Taqman. La comparación de la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas se realizó mediante χ^2 .

Resultados. El genotipo CC se encontró aumentado en: a) Pacientes infectados por genotipo viral no-1 (66.7% frente a 39.1% en pacientes infectados por el genotipo viral 1, $p = 8.5 \times 10^{-5}$, OR = 0.32, 95%CI 0.17-0.60); b) Pacientes que presentan aclaramiento viral espontáneo (72.5% frente a 45.6% de los individuos que presentan infección persistente, $p = 6.2 \times 10^{-5}$, OR = 0.32, 95%CI 0.18-0.57); y por último, c) Pacientes con respuesta sostenida al tratamiento (60.2% frente a 32.1% encontrado en pacientes que no tienen una respuesta sostenida al tratamiento, $p = 3.2 \times 10^{-5}$, OR = 0.31, 95%CI 0.17-0.56)

Conclusión. Nuestros resultados sugieren una preferencia del genotipo viral por infectar a determinadas variantes de IL28B, así como asociación de este locus a la respuesta natural y mediada por tratamiento.

O-073

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS EN EL GEN IRF5 EN SUBGRUPOS DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. M.D.C. Cénit Laguna¹, K. Vandebroeck², I. Alloza², A. Antigüedad³, D. Otaegui⁴, J. Olascoaga⁴, M. García Barcina³, V. De Las Heras¹, R. Alvarez-Lafuente¹, M. Fernández-Arquero¹. ¹Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Neurogenomiks, Universidad del País Vasco. ³Hospital de Basurto. ⁴Inst. Investigación Sanitaria Biodonostia.

Objetivos. La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante que afecta al sistema nervioso central. Aparece en individuos genéticamente predispuestos tras la exposición a ciertos factores ambientales. Solamente se conoce el 50% de la carga genética responsable de dicha enfermedad. Esto pudiera ser debido, entre otras causas, a la existencia de genes que afecten solamente a un subgrupo de pacientes o a genes cuyo efecto se vea modificado por la interacción con otros genes o con el ambiente. El gen IRF5 ha sido asociado a varias enfermedades de carácter autoinmune. Un reciente estudio mostró asociación de polimorfismos en IRF5 con la susceptibilidad a padecer EM.

Evaluamos la asociación de polimorfismos en IRF5 con la susceptibilidad a EM y analizamos su posible asociación con el subgrupo de pacientes de EM con replicación activa de Herpes Virus 6 (HHV-6A) y con el grado de respuesta a interferón-β.

Materiales y métodos. Genotipamos los SNPs rs4728142 y rs3807306 en 1496 pacientes de EM y 1506 controles mediante tecnología TaqMan. Los pacientes tratados con interferón-β fueron clasificados como respondedores y no respondedores a dicha terapia atendiendo a criterios clínicos. Mediante PCR cuantitativa a tiempo real se determinó la presencia del HHV-6A en suero. Se comparan las frecuencias génicas mediante el test χ^2 .

Resultados. El análisis combinado de nuestros datos con los del estudio previo publicado muestra la asociación de los polimorfismos rs4728142 y rs3807306 con la susceptibilidad a padecer EM ($OR_{Mantel-Haenszel}=1,14$ ($p \leq 0,002$)).

Observamos que la frecuencia del alelo rs3807306T está significativamente incrementada en el subgrupo de pacientes con replicación

activa del HHV-6A con respecto al subgrupo de pacientes que no presentan replicación ($p=0,05$) y con respecto a controles ($p=0,016$, OR (95% CI)= 1,61 (1,07- 2,43)).

Además, la frecuencia del alelo rs3807306T parece incrementada en el subgrupo de pacientes respondedores a interferón-β con respecto a los pacientes no respondedores ($p=0,09$) y con respecto a controles ($p=0,15$, OR (95% CI)= 1,24 (0,91- 1,68)).

Conclusiones. El efecto descrito en EM del gen IRF5 parece deberse principalmente al subgrupo de pacientes que presentan replicación del HHV-6A. El gen IRF5 pudiera tener cierto papel en el grado de respuesta a interferón-β.

O-074

ANÁLISIS DEL REPERTORIO DE PÉPTIDOS ASOCIADOS A HLA-DR EN BAZO HUMANO. J.A. Collado Miguens, I. Álvarez Pérez, L. Muixí Ponsà, M. Carrascal Pérez, D. Jaraquemada. Universidad Autónoma de Barcelona, Bellaterra.

Introducción. El bazo es el principal órgano linfoide secundario donde se desarrolla la respuesta inmune adaptativa frente a antígenos procedentes del torrente sanguíneo. Para ello es necesaria la intervención de los linfocitos T CD4+, que responden a complejos formados por las moléculas de MHC de clase II propio con péptidos antigenicos procedentes de patógenos o proteínas propias alteradas. En condiciones no patológicas, las células presentadoras muestran péptidos propios a los linfocitos T. El conjunto de estos péptidos es representativo de los proteomas celulares presentes en el bazo, así como del material extracelular captado por las APCs. Aunque hay una gran base de datos sobre los péptidos asociados a moléculas de HLA en células linfoblastoides, sólo recientemente se ha empezado a abordar el análisis sistemático de los repertorios péptídicos asociados a moléculas de HLA procedentes de tejido humano, aunque aún no hay estudios sobre qué péptidos se presentan en bazo en ausencia de infección.

Objetivo. Estudio del repertorio de péptidos asociados a HLA de clase II, presentados en condiciones fisiológicas, en el bazo humano

Material y métodos. Se partió de muestras de tejido congeladas ($N=3$) que se sometieron individualmente a un proceso de homogenización mecánica y se lisaron en presencia de un detergente no iónico (NP-40) para la solubilización de los complejos péptido-MHC. Se hizo una inmunopurificación del lisado con un anticuerpo anti-HLA-DR (B8.11.2), acoplado a sefarosa. Se eluyeron los complejos pMHC en condiciones ácidas, desnaturizando todo el complejo. Los péptidos asociados al HLA-DR se purificaron mediante ultrafiltración utilizando centricones con un tamaño de corte de 10kDa. Los péptidos purificados se desalaron y se fraccionaron por SCX-HPLC. Las diferentes fracciones peptídicas se analizaron por espectrometría de masas en un LTQ acoplado "on line" a una RP-HPLC para una mejor resolución de los espectros de secuenciación.

Resultados. Se han secuenciado 1678 péptidos correspondientes a 646 proteínas, algunas comunes entre las diferentes muestras. Los datos han permitido el estudio de la procedencia de las proteínas parentales, la distribución de tamaño y la importancia de la ruta de presentación de los péptidos asociados a HLA-DR en condiciones fisiológicas. Los repertorios fisiológicos de péptidos de clase II provenientes de bazo humano se han comparado con sistemas no fisiológicos como son las líneas celulares linfoblastoides. Los datos muestran un gran solapamiento de los repertorios de cada alelo estudiado.

do, con una diferencia notable: un porcentaje considerable de péptidos del bazo (entre el 34 y el 56%) proceden del espacio extracelular, de proteínas parentales tanto solubles como componentes del citosqueleto.

Conclusiones. Se presenta el mayor análisis del repertorio péptido asociado a HLA-DR en un tejido linfoide secundario. A pesar de ser muestras heterozigotas, la asignación a alelo de los péptidos ha sido posible. Los péptidos provienen principalmente de proteínas expresadas en células B y de suero y mayoritariamente degradadas en la vía endocítica. La característica principal de estos repertorios en comparación de los datos estándar utilizados hasta ahora para definirlos, es la presencia de péptidos de origen extracelular.

O-075

IMPLICACIÓN DE LA MOLÉCULA PDCD1 EN LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO DE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C. J.R. Vidal Castiñeira, A. López Vázquez, R. Diaz Peña, R. Pérez, C. López Larrea. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos. PDCD-1 (programmed cell death-1) es una molécula reguladora inhibidora de linfocitos T. Varios estudios han descrito una asociación de diversos polimorfismos del gen PDCD-1 con una serie de enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico o la artritis reumatoide, así como en infección por CMV en trasplantados renales. El presente trabajo tiene como objetivo analizar la posible implicación de los polimorfismos de PDCD-1 y sus haplotipos, con la respuesta al tratamiento de la infección crónica por el virus de la Hepatitis C (HCV).

Material y métodos. Se incluyeron en este estudio 274 pacientes con infección por HCV. Estos pacientes fueron monitorizados durante el tratamiento combinado (Peg-IFN-Alpha y rivabirina) y durante el periodo post-tratamiento. Al final de este periodo se clasificaron en no respondedores (NR) y en respondedores (R) en función de la presencia de RNA-HCV en suero. Se analizaron los polimorfismos PD-1.3 G/A, PD-1.5 C/T y PD-1.9 T/C mediante PCR-RFLP. La expresión de PD-1 en CD4⁺ y CD8⁺ se determinó mediante citometría de flujo en 32 pacientes. Las frecuencias haplotípicas se determinaron mediante el programa PLINK.

Resultados. 121 pacientes se clasificaron como NR y 153 pacientes alcanzaron una respuesta sostenida. Encontramos una distribución de PD-1.3 diferente en los 2 grupos. PD-1.3 A estaba aumentado en pacientes respondedores mientras que PD-1.3 G estaba aumentado en pacientes NR ($p=0.008$, OR= 2.97, 95% CI=1.28-7.07). No se encontró ninguna asociación adicional con la respuesta al tratamiento viral. Se observó además que el haplotipo CGC (wild-type) se encontraba más aumentado en pacientes NR frente a pacientes que respondían adecuadamente al tratamiento ($p<0.05$, OR= 1.73, 95% CI=1.04-2.88). Finalmente observamos que los pacientes con el polimorfismo PD-1.3 A presentaban una menor expresión PD-1 en CD8⁺ en comparación con el wild-type.

Conclusiones. Con este estudio identificamos un nuevo factor genético asociado a la respuesta al tratamiento viral de la infección por HCV. La presencia del polimorfismo PD-1.3 A, asociado a una menor expresión de PD-1, parece condicionar una mejor respuesta al tratamiento de la infección por HCV, probablemente a causa de una menor inhibición de la respuesta mediada por linfocitos CD4⁺ y CD8⁺.

O-076

CONTRIBUCIÓN DE MARCADORES SNPs A LA SUSCEPTIBILIDAD A ESONDILITIS ANQUILOSANTE EN LA REGIÓN CROMOSÓMICA 19Q13. R. Díaz Peña¹, A.M. Aransay Bañares², J. Bruges Armas³, C. López Larrea¹. ¹Unidad de Histocompatibilidad y Trasplante, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo, Asturias. ²Unidad de Genómica Funcional, CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia, Derio, Bizkaia. ³Servicio Especializado de Epidemiología y Biología Molecular, Hospital de Santo Espíritu de Angra do Heroísmo, Angra do Heroísmo, Azores, Portugal

Objetivos. Este estudio fue diseñado con el objetivo de llevar a cabo un genotipado de alta densidad mediante marcadores SNP en población HLA-B27 positiva dentro de la región cromosómica 19q13 y observar su asociación con EA. También se analizaron otros genes candidatos, como IL23R, ERAP1, IL17A, IL10RA, IL17RA, TNFRSF11B, TNFSF11, TNFRSF11A, NOD2, CYP2D6, y otras regiones cromosómicas en las que se localizan genes de interés, como el cromosoma 5q (IL3, CSF2, IL4, IL5 y IL13), el cromosoma 21q (IL10RB, IFAR2, IFNAR1 y IFNGR2) y el cromosoma 2 (genes de familia IL1).

Material y métodos. Se analizaron 249 pacientes EA y 302 controles sanos, HLA-B27 positivos. Se diseñó un panel a la carta que contenía 1536 tag SNPs entre los genes y regiones candidatas seleccionadas, basándose en las frecuencias alélicas europeas descritas por el proyecto HapMap. El genotipado de alta densidad se llevó a cabo utilizando la tecnología Golden-Gate (Illumina-Inc.'s). Todos los individuos fueron tipados para HLA-B.

Resultados. Dos SNPs (rs8111398 y rs1055234) en dos genes diferentes (LAIR2 y CNOT3) revelaron asociaciones significativas con EA ($P<10^{-3}$). Análisis de haplotipos también revelaron implicación de regiones en EA: Región comprendida entre los genes CDC42EP5 y LAIR2 (~15.5 kb; $P<0.0005$); y entre CNOT3 y TMC4 (~6.7 kb; $P<0.001$). Además, definiendo bloques haplotípicos, 2 bloques de 2 y 3 SNPs localizados entre los genes CDC42EP5 y LAIR2 mostraron asociación con EA ($P=9.0 \times 10^{-4}$ y $P = 0.001$, respectivamente).

Conclusiones. El trabajo permitió encontrar regiones localizadas dentro del cromosoma 19q asociadas a EA. Estas regiones se localizan próximas a genes candidatos en la susceptibilidad a EA, concretamente LAIR2 y CNOT3. En el estudio se hipotetiza con el papel que LAIR2 podría tener en el incremento de la susceptibilidad a EA, ya que es capaz de unir péptidos de colágeno, pudiendo actuar de mediador proinflamatorio.

O-077

IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS DE HLA-DR DERIVADOS DE LA SEMENOGLINA-1 EN TIMO HUMANO. I. Álvarez¹, R. Colobrán², J. Collado¹, F. Canals³, B. Kyewski⁴, R. Pujol-Borrell², D. Jaraguemada¹. ¹Unitat d'Immunologia. Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Bellaterra. ²Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol. ³Institut d'Oncologia. Hospital Vall d'Hebron. ⁴German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany.

Objetivos. El timo es el órgano linfoide donde maduran los linfocitos T y se genera el repertorio inmunocompetente. Para que los linfocitos T no reconozcan tejidos propios en periferia, los timocitos sufren procesos exhaustivos de selección en el timo, donde los TCRs interactúan con complejos de MHC-peptídos propios. Para generar tolerancia, los péptidos deberían representar todos los potenciales ligan-

dos de los linfocitos T en periferia, incluyendo aquellos derivados de antígenos específicos de tejido (TRAs). La expresión de algunos TRAs se regula por el Autoimmune Regulator (AIRE). En este trabajo nos hemos propuesto describir el repertorio peptídico asociado a HLA-DR en timo humano y comprobar la existencia de péptidos asociados a HLA-DR provenientes de TRAs.

Material y métodos. Se utilizaron muestras de timos procedentes de cirugía cardíaca pediátrica. El tejido se homogeneizó y los péptidos asociados a las moléculas de HLA-DR se purificaron mediante cromatografía de inmunofluoración y ultrafiltración. Para la identificación de los péptidos asociados a HLA-DR, las muestras peptídicas se analizaron por espectrometría de masas de trampa iónica. Se realizaron experimentos de PCR cuantitativa (qPCR) para estudiar la transcripción de autoantígenos en diferentes muestras.

Resultados. Se identificaron 131 ligandos naturales de HLA-DR de timo humano. La mayoría de péptidos provenían de proteínas de membrana o extracelulares. Se identificaron dos péptidos (que forman un *nested set*) procedentes de la semenogelina 1 (codificado por el gen *SEMG1*), una proteína abundante en el semen y potencial TRA. Mediante qPCR se confirmó que la semenogelina-1 es un TRA dependiente de AIRE. Se confirmó la transcripción de la *SEMG1* en timo al mismo nivel que otros TRAs. La expresión de *SEMG1* estaba restringida a una población de células epiteliales tímicas medulares (mTECs) con niveles altos de MHC de clase II.

Conclusión. Mediante el uso de espectrometría de masas y qPCR hemos identificado un ligando natural de HLA-DR procedente de la semenogelina-1 en timo humano. La semenogelina-1 es un TRA con expresión tímica similar a otros autoantígenos. La expresión de *SEMG1* es dependiente de AIRE. La población celular que expresa *SEMG1* es una población de mTECs de alta expresión de MHC de clase II.

SESIÓN 9: INMUNODEFICIENCIAS I

Moderadores: Manel Juan (Barcelona)
Margarita López Trascasa (Madrid)

O-078

NUEVAS MUTACIONES EN EL GEN TNFRSF6 EN PACIENTES ESPAÑOLES CON SINDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE. *L. Martínez-Martínez¹, C. González-Santesteban¹, M.V. Rubiales¹, M. Pradas¹, M.Á. Martínez-Carretero¹, Y. Barrios², P. Soler³, I. Badell¹, O. de la Calle-Martín¹. ¹Hospital Sant Pau- UAB, Barcelona. ²Hospital Universitario de Canarias. ³Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona.*

Objetivos. El Síndrome Linfoproliferativo Autoinmune (ALPS) es una alteración genética que afecta a la apoptosis. El ALPS se caracteriza por la aparición durante la infancia de linfadenopatías, hepatosplenomegalia, citopenias autoinmunes y aumento ($>1,5\%$) de linfocitos T doble negativos (DNT: CD3⁺/TCRalfa-beta⁺/CD4-/CD8-) en sangre periférica. La mayoría de los casos ($>65\%$), conocidos como ALPS tipo Ia, están causados por mutaciones herederizadas dominantes en la línea germinal en el gen *TNFRSF6*, que codifica la proteína CD95 (Fas).

Material y Métodos. El estudio incluyó a 32 pacientes procedentes de diferentes hospitales españoles que cumplían criterios clínicos (linfadenopatía, esplenomegalia y/o citopenias) y de laboratorio (hipergammaglobulinemia y elevadas células T DN) de ALPS. Se ana-

lizó el gen *TNFRSF6* en todos los pacientes. En casos seleccionados en los que no se hallaron mutaciones en dicho gen, se analizaron *TNFSF6* (Fas ligando) y *CASP-10* (caspasa-10).

Resultados. 26 de los pacientes (86%) eran heterocigotos para una mutación única en el gen *TNFRSF6* (ALPS Ia). Se describieron 7 alteraciones diferentes que afectaban a los exones 2, 8 y 9. Cuatro de estas mutaciones no habían sido previamente descritas (E20X, Y216fsX13, IVS8+3A->G y L226P). Estas mutaciones incluían inserciones, defectos de splicing, mutaciones missense y nonsense. Los otros 6 pacientes no tenían mutaciones ni en *TNFRSF6*, *TNFSF6* ni *CASP-10*, por lo que fueron clasificados como ALPS tipo III. Los pacientes ALPS Ia tenían niveles séricos muy elevados de IL-10 e IgE comparado con los controles y familiares portadores de la misma alteración. Estos marcadores se encontraron elevados en los pacientes ALPS III pero de una forma no tan remarcable, a excepción de un caso. Este último caso es una niña con una clínica muy severa de ALPS con niveles muy elevados de IL-10, IgG, IgA e IgE. En esta paciente se descartaron mutaciones en *TNFRSF6*, *TNFSF6*, *CASP-8*, *CASP-10*, *N-Ras* y *FADD*.

Conclusiones. La combinación de elevados linfocitos T DN ($>1,5\%$) con niveles séricos incrementados de IL-10 e IgE está fuertemente asociado a mutaciones en Fas. Esto permite la orientación de los pacientes con signos clínicos de ALPS a una evaluación más directa hacia la secuenciación del gen *TNFRSF6* y otros genes relacionados con la apoptosis. En estos pacientes se han descrito 4 nuevas mutaciones en *TNFRSF6* (E20X, Y216fsX13, IVS8+3A->G y L226P), así como 2 familias con numerosos miembros afectos.

O-079

DIVERSIDAD CLÍNICA EN UNA FAMILIA CONSANGUÍNEA CON MUTACIONES EN EL GEN RAG-1. *L. Martínez-Martínez¹, C. González-Santesteban¹, M.V. Rubiales¹, M. Pradas¹, I. Badell¹, P. Soler², O. de la Calle-Martín¹. ¹Hospital Sant Pau- UAB, Barcelona. ²Hospital de la Vall d'Hebrón, Barcelona.*

Objetivos. Las mutaciones en los genes *RAG* causan Inmunodeficiencia Severa Combinada (SCID), Síndrome de Omenn (OS) o un fenotipo intermedio denominado Omenn-like. Además de la mutación existen otros factores que determinan el fenotipo final. Presentamos 3 casos de una misma familia con presentación clínica y evolución muy diferentes.

Material y métodos. El caso clínico 1 es un varón caucásico nacido en el año 2005, que a partir del segundo mes de vida sufre múltiples cuadros infecciosos (pielonefritis, muguet oral, enteritis) acompañados de eritrodermia exfoliativa. Es trasplantado a los 8 meses de vida de un hermano no HLA idéntico (9/10). La evolución del TMO fue excelente, sin embargo, a los 21 meses post-TPH se detecta un súbito empeoramiento con resultado fatal. El caso 2 es un varón prematuro, hermano del caso 1, nacido en 2009, que desde el nacimiento sufre eritrodermia exfoliativa generalizada con todo tipo de complicaciones sistémicas que le llevan al *exitus* en el segundo mes de vida. El caso 3 es una niña prematura, prima hermana de los dos casos anteriores, nacida en 2010 y también con eritrodermia generalizada. Se trata de una familia consanguínea con antecedentes previos de fallecimientos en la infancia.

Ante la sospecha diagnóstica de SCID/OS, se realizan estudios de poblaciones linfocitarias por citometría de flujo, ensayos de linfoproliferación y determinación de niveles de inmunoglobulinas. Así mismo, se secuencian los genes *RAG-1* y *RAG-2*.

Resultados. El caso 1 presentaba linfopenia con ausencia de linfocitos B e inversión del cociente CD4/CD8. Los linfocitos T eran propios y expresaban CD45RO en superficie, pero los ensayos de linfoproliferación demostraron que eran anérgicos. Tras el TPH, las poblaciones se normalizaron, incluyendo los linfocitos B. Sin embargo, el infiltrado masivo acompañado de sepsis coincide con una nueva ausencia de linfocitos B y aumento de IgE. El caso 2 presentaba linfocitosis, sin inversión del cociente CD4/CD8 pero también con ausencia de linfocitos B. Los linfocitos T eran de memoria con marcadores de activación (HLA-DR), de lo que se deduce una expansión en periferia. El caso 3 presentaba linfopenia, con ausencia de linfocitos B y sin inversión del cociente CD4/CD8. Sus linfocitos T también eran CD45RO+. Los niveles de IgG, IgA, IgM e IgE eran indetectables en los casos 1 y 2; por el contrario, en el caso 3, a pesar de la ausencia del resto de isotipos, los niveles de IgE eran muy elevados (364 UI/mL), lo que también ocurrió en el caso 1 tras la recidiva post-TPH de su enfermedad (313 UI/mL).

El análisis de los genes RAG mostró una delección en homocigosis en el gen RAG-1 de todos ellos: c.631delT (mutación previamente descrita). Los padres eran portadores de la misma.

Conclusiones. Los 3 pacientes tenían la mutación c.631delT, sin embargo, el caso 1 debutó con un SCID aunque tras el TPH rebrotó como un OS; el caso 2 presentó un síndrome mixto SCID/OS, mientras que el caso 3 tiene una presentación típica de Omenn.

O-080

30 AÑOS DE EXPERIENCIA EN EL HOSPITAL DOCE DE OCTUBRE EN EL SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA (CGD). V. Pérez-Aradas, E. Mancebo, S. Lermo-Rojo, P. Talayero, J. Ruiz-Contreras, L.I. González-Granado, P. Rojo, D. Blázquez, M.J. Torres Collado, L.M. Allende. Hospital Doce de Octubre, Valdemoro.

Objetivos. El presente estudio describe las características clínicas y epidemiológicas, las infecciones detectadas, y los principales microorganismos que infectan al grupo de pacientes con CGD en estudio (1980-2010).

Materiales y métodos. En este trabajo se incluyen 14 pacientes con CGD procedentes de la Unidad de Inmunodeficiencias en un periodo de 30 años. Los pacientes con sospecha clínica de CGD se les realizó estudio inmunológico: NBT, bioluminiscencia o citometría de flujo utilizando el ensayo oxidativo DHR y se confirmó mediante estudio genético.

Resultados. Un total de 14 casos fueron diagnosticados de CGD, provenientes de 10 familias distintas; de los cuales el 86% mostró una herencia ligada al X y el resto herencia autónómica recesiva. La edad de inicio de síntomas estuvo comprendida entre los 4 y 144 meses, con una media de 34 meses. La edad media del diagnóstico fue de 11,5 años (6 m-17a). Los procesos infecciosos más frecuentes fueron: la neumonía (15,4%), la adenitis cervical (12,5%), fiebre de origen desconocido (10,2%), osteomielitis (8,8%) abscesos (8,1%), entre otros. De estos, se aisló organismo causal en el 28,6% de los casos. Los principales gérmenes aislados fueron: *Staphylococcus aureus* y *Salmonella sp* (23% cada uno), *Serratia marcescens*, *Streptococcus*, *Nocardia* y *Aspergillus fumigatus* (5,8% cada uno), entre otros. Se objetivó la presencia de granulomas en un 5,1% de los casos, siendo ésta la principal complicación no infecciosa.

Conclusiones. La clínica de la CGD es heterogénea, sin embargo, es la neumonía su forma de presentación más frecuente. El tiempo trans-

currido desde el inicio de los síntomas hasta el diagnóstico genético es prolongado, por tanto, consideramos de gran importancia el conocimiento de esta patología por parte de los equipos clínicos, para que ante la sospecha de una probable CGD se pueda actuar de forma inmediata con los procedimientos diagnósticos y terapéuticos pertinentes.

O-081

DOS NUEVAS MUTACIONES EN ATM EN UN CASO DE ATAXIA-TELANGIECTASIA. R. López Blanco¹, M.J. Bernal¹, M.T. Martínez de Saavedra¹, M. Ley¹, A. Brusco², C. Rodríguez¹, F. Mora¹. ¹H.U. Puerta del Mar, Cádiz. ²Universidad de Turín, Italy

Un niño de 3 años y 6 meses fue remitido a consulta de Inmunología con sospecha de Ataxia-telangiectasia para valoración de función inmune y estudio genético. Presentaba ataxia de la marcha y alteraciones oculomotoras, leves telangiectasias oculares y niveles de alfafeto-proteína elevados. Presentó infecciones respiratorias de repetición y un episodio de neumonía, con buena respuesta al tratamiento antibiótico. Había completado el calendario vacunal para la edad, incluyendo triple vírica, sin reacciones adversas. El estudio de inmunidad mostró las siguientes alteraciones: deficiencia de IgG2 e IgG3 y niveles elevados de IgM. La producción de Ac frente a polisacáridos y VHB fue adecuada, pero no produjo niveles protectores de Ac frente a sarampión, rubeola ni parotiditis. El fenotipo linfocitario mostró elevación de células NK, de linfocitos T de memoria y de linfocitos T gammadelta-T. La respuesta proliferativa *in vitro* a mitógenos fue normal.

La secuenciación del mensajero el gen ATM mostró una delección de dos pares de bases (c.8873_8874delTT) en heterocigosis. Esta mutación no está descrita en la literatura. A nivel de la proteína la mutación daría lugar a un codón de STOP en el primer triplete después de la delección (p.F2958X) como resultado se produciría un proteína truncada que carece de los 99 aminoácidos del extremo carboxilo terminal. Con una probabilidad muy alta se trata de una mutación patogénica dada la importancia del cambio estructural que ocurriría en la proteína, el cual afecta al dominio catalítico de la misma.

Mediante MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) se consiguió detectar la segunda mutación: una gran delección que afecta a varios exones del gen ATM. Esta delección se consiguió caracterizar a nivel de ARN mensajero y de ADN genómico. La delección se produce entre el exon 34 y el intrón 38: (c.5129_5762+1116del9264). En cDNA se detecta un transcrito que carece de los exones 34 a 38. La perdida de estos exones da lugar a un frameshift (p.Glu1669AspfsX16). La proteína que produciría este transcripto carecería de los 1388 aminoácidos finales. Aunque esta delección no está descrita, sin duda se trata de una mutación patogénica dadas las importantes consecuencias deducidas para la proteína.

O-082

CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA Y MOLECULAR DE LA PRIMERA FORMA AUTOSÓMICA RECESIVA DE SÍNDROME HIPER IGE (DOCK8) EN ESPAÑA. S. Lermo-Rojo, E. Mancebo, P. Talayero, V. Pérez-Aradas, J. Ruiz-Contreras, L.I. González-Granado, M. Menchén, M.J. Díaz-Madroñero, S. Sanromán, L.M. Allende. Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Objetivos. Diagnóstico genético de un paciente con sospecha clínica de síndrome Hiper IgE (HIES).

Paciente y métodos. Paciente varón de 17 años de edad, nacido de progenitores no consanguíneos, madre fallecida de un linfoma. El paciente sufre candidiasis mucocutánea desde el primer año de vida, alergia al huevo, asma e infecciones respiratorias recurrentes. Ha desarrollado enfermedad pulmonar crónica de patrón obstructivo y bronquiectasias en ambos pulmones. Infecciones cutáneas por *Molluscum contagiosum*. Pápulas en la cara compatibles con epidermodisplasia verruciforme y numerosas verrugas planas. En el examen inmunológico se aprecian cadenas kappa en sangre y orina, compatibles con una gammopathía monoclonal de significado incierto, eosinofilia con niveles elevados de IgE y respuesta linfoproliferativa normal. Se realiza estudio genético de la forma autosómica dominante (STAT3) y de la recesiva más frecuente (DOCK8).

Resultados. El paciente no presenta alteraciones en el gen STAT3, mientras que en DOCK8 se detecta una delección del exón 16 a nivel de mRNA, debido a una mutación puntual en DNA en heterocigosis en posición +5 del intrón 16 (GTAAG por GTAAA). Esta mutación cambia la pauta de lectura, provocando la aparición de un codón stop prematuro. Se observan tanto en el paciente como en su padre, dos SNPs en homocigosis en la región inicial del gen (exones 2 y 3), lo que sugiere una gran delección en heterocigosis en esa zona. Los resultados del análisis de dosis génica apoyan esta sospecha.

Conclusiones. Nuestros resultados documentan el primer caso descrito en España de HIES autosómico recesivo por mutaciones en DOCK8. Los defectos de este gen han de considerarse en pacientes con HIES de clínica típica de la forma recesiva: infecciones cutáneas víricas, carcinoma o epidermodisplasia de células escamosas, infecciones pulmonares sin pneumatoceles y ausencia de alteraciones extrainmunitarias a excepción de afección del sistema nervioso central. El diagnóstico genético, aunque laborioso es necesario para confirmar el diagnóstico clínico y proporcionar consejo genético.

O-083

CUATRO NUEVAS FAMILIAS ESPAÑOLAS CON DEFICIENCIA COMPLETA DE FACTOR I . M. Alba Domínguez¹, M.J. Melero², J.I. González-Granado³, J.A. Trujillo⁴, P. Soler⁵, S. Garrido¹, A. López-Lera¹, P. Nozal¹, M. López-Trascasa¹. ¹Hospital Universitario La Paz, Madrid. ²Hospital Infanta Cristina, Badajoz. ³Hospital Doce de Octubre, Madrid. ⁴Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres. ⁵Hospital Vall de Hebrón, Barcelona.

Objetivos. El Factor I (FI) es una serín proteasa circulante que actúa como regulador esencial de la cascada del Complemento. Rompe e inactiva a C3b y C4b (constituyentes de la C3 y C5 convertasas).

La proteína humana es un heterodímero compuesto por una cadena pesada (H) no catalítica de 50kDa, unida mediante dos puentes disulfuro a una cadena ligera (L) catalítica de 38kDa.

La deficiencia de FI, un defecto de herencia autosómica recesiva, ocasiona un consumo incontrolado de C3 (elemento central de las tres vías de activación del Complemento), así como de FB y FH. Esto impide tener un mecanismo eficaz de defensa mediado por dicho sistema perteneciente a la Inmunidad Innata.

Hemos caracterizado bioquímica y genéticamente cuatro familias que presentaban un perfil clínico sugerente de esta inmunodeficiencia primaria asociada a bajos niveles de C3.

Material y Métodos. Se obtienen muestras de suero y ADN de 4 pacientes y sus familiares directos.

Los niveles de inmunoglobulinas, C3 y C4 se midieron mediante nefelometría. Los niveles de factor I, factor H así como la presencia de

anticuerpos anti-Factor H se analizaron mediante técnicas de ELISA. Además, se ha realizado un análisis cualitativo de Factor I circulante mediante Western Blot.

La actividad hemolítica del complemento (CH-50) y la presencia del anticuerpo C3 NeF se realizaron mediante ensayos hemolíticos.

Se ha abordado el estudio molecular en los cuatro pacientes mediante técnicas de PCR y secuenciación.

Resultados. Los cuatro pacientes presentaban un perfil compatible con activación de la vía Alternativa del Complemento (bajos niveles de C3, Factor B, Factor H) y ausencia de Factor I.

El estudio molecular está permitiendo identificar las mutaciones responsables del defecto en cada uno de los cuatro pacientes.

Uno de los pacientes es homocigoto para una mutación ya caracterizada. Dos pacientes son heterocigotos compuestos para 2 mutaciones nuevas y 2 descriptas. En el último paciente, aún en estudio, hemos caracterizado una mutación, ya descrita, en heterocigosis.

Conclusiones. La deficiencia completa del Factor I, regulador del Sistema del Complemento, se presenta con una clínica y un perfil de Complemento característico. La clínica se caracteriza por la presencia de diversas infecciones de repetición y en algunas ocasiones por procesos autoinmunes.

Ante la presencia de un perfil de consumo de Complemento prolongado en el tiempo, deberían incluirse en el estudio de los pacientes el estudio de factores que regulan la vía Alternativa como son: el Factor H, el C3NeF, la Properdina y el Factor I.

La deficiencia de factor I, es un defecto genético que posiblemente esté subestimado como ocurre en otras inmunodeficiencias primarias, aunque actualmente los análisis de este regulador se realizan en el despistaje bioquímico-genético por la implicación de mutaciones en heterocigosis con el Síndrome Hemolítico Urémico atípico (aHUS).

O-084

HIPOGAMMAGLOBULINEMIA SECUNDARIA A RITUXIMAB EN PACIENTES CON LNH DE CÉLULA B: IMPORTANCIA CLÍNICA, VALORACIÓN Y VALIDEZ DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN LA VALORACIÓN DE POLIMORFISMOS DE FC-RIII. P. Carrasco, J. Iglesias, N. Matamoros. Hospital Son Dureta, Palma de Mallorca, Llucmajor.

Objetivos. La evidencia científica ha revelado en los últimos años una serie de casos clínicos de pacientes con LNH tratados con Rituximab (RTX) que después de la suspensión (mayor a 9 meses) del tratamiento, continúan con una severa depleción de célula B e hipogammaglobulinemia. La importancia de las variantes alélicas en algunos FcγRs, en particular en el receptor de baja afinidad FcγRIIIa (CD16), es cada vez mayor para valorar la eficacia en la terapia con anticuerpos monoclonales. El polimorfismo G559T del gen FCGR3A (CD16A) resulta en dos alotipos del FCγRIIIa; con valina o fenilalanina en la posición 158. Este polimorfismo, modula la unión a IgG1 y el mecanismo de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (CCDA). Nuestro objetivo es realizar una evaluación de estos pacientes, determinando la importancia clínica de la hipogammaglobulinemia y estudiar si la presencia del polimorfismo en el FCγRIIIa es relevante en el contexto de la deplección crónica de célula B presente en estos pacientes. Por otra parte pretendemos determinar la validez y utilidad clínica de la citometría de flujo (CF) como técnica de screening para valorar dicho polimorfismo.

Material y métodos. Para la estandarización de la técnica de valoración de los polimorfismos de FCγRIIIa mediante CF se estudiaron 40

controles sanos. Se utilizaron los siguientes anticuerpos monoclonales: CD16-FITC (MEM154; Santa Cruz Biotechnology) que requiere la presencia de valina en la posición aminoacídica 158, CD16-FITC (3G8; Santa Cruz Biotechnology) que presenta igual reactividad para la valina o fenilalanina en la posición 158, Goat anti mouse-FITC (Dako), CD56-PE (BD) y CD3-ECD (BC). Se analizó la expresión de MEM-154 y 3G8 en células NK y granulocitos. También se estudiaron 4 pacientes con LNH de célula B que presentaban hipogammaglobulinemia tras 9 meses de suspensión del tratamiento con RTX. Se evaluaron los niveles de inmunoglobulinas circulantes, población linfocitaria B, historia clínica de infecciones y necesidad de terapia sustitutiva con gammaglobulina (GGIV).

Resultados. Todos los pacientes presentaron niveles de IgG<500 mg/dl, disminución severa de isótipos IgA e IgM, disminución de subclases de IgG, persistencia de depresión linfocitaria de célula B (<3%) y presencia de infecciones de repetición (respiratorias, digestivas y urinarias principalmente). Al cabo de 6 meses de seguimiento, todos comenzaron terapia sustitutiva con GGIV. Los resultados preliminares de la valoración de la CF como técnica de screening para el estudio de los polimorfismos, muestran que no es capaz de discriminar entre los diferentes polimorfismos (F/F, F/V, V/V), si bien estos resultados deben ser comprobados por biología molecular.

Conclusiones. Los pacientes estudiados con hipogammaglobulinemia secundaria presentaban una importante clínica de infecciones y confirmaron que esta nueva inmunodeficiencia requiere de un estudio previo exhaustivo, seguimiento y probablemente terapia sustitutiva con GGIV. Por otra parte la persistencia de la depresión linfocitaria de célula B, incluso después de 2 años en algunos pacientes, reafirma las diferencias individuales en respuesta al tratamiento con RTX, lo que nos sugiere en relación al polimorfismo de FcγRIIIa la necesidad de su estudio. Los hallazgos de las alteraciones moleculares en estos pacientes, clínicos y analíticos, superponibles a los pacientes con Inmunodeficiencia Variable Común (IVC), pueden ser útiles para conocer la etiopatogenia de las alteraciones en el stop madurativo de la población B que se ha descrito en estos pacientes.

O-085

PAPEL DE LA MUTACIÓN A91V EN LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA FAMILIAR TIPO 2: PREVALENCIA EN POBLACIÓN MARROQUÍ Y ESPAÑOLA. N. Lanio¹, V. Daza¹, N. Martínez-Pomar¹, N. Romo², A. Ferreira³, M.C. García³, J.A. Salinas¹, G. Fontán³, M. López-Botet², N. Matamoros¹. ¹Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca. ²Universitat Pompeu Fabra, Barcelona. ³Hospital La Paz, Madrid.

Introducción. Mutaciones en el gen de la Perforina-1 (*PRF1*) se asocian a Linfohistiocitosis Hemofagocítica Familiar tipo 2 (FHL2), síndrome raro de herencia autosómica recesiva, caracterizado por proliferación de histiocitos con marcada actividad hemofagocítica. La sustitución aminoacídica A91V (c.272C>T) ha sido descrita como un polimorfismo neutral en base a su alta frecuencia en algunas poblaciones. Sin embargo, la evidencia clínica y ensayos funcionales posteriores, han demostrado que podría tratarse de una mutación que afecta tanto el nivel de expresión de la proteína, como su capacidad citolítica, especialmente en individuos heterocigotos compuestos que portan otra mutación en *PRF1*.

Objetivos. Establecer la prevalencia de dicha mutación en población sana marroquí y española. Esclarecer el posible papel patogénico de la mutación A91V en individuos heterocigotos con familiares afectados de FHL2.

Paciente y métodos. Estudio molecular del gen *PRF1* por secuenciación directa de ADN en 145 controles (100 españoles-45 marroquíes). Análisis por citometría de flujo de la expresión de perforina en células NK y ensayo de citotoxicidad contra la línea celular K562, de mujer clínicamente sana de origen marroquí (A91V/G149S), madre de niño afecto (G149S/G149S).

Resultados. El análisis molecular del gen *PRF1* en los controles revela que la frecuencia de la mutación A91V es similar a la descrita en series anteriores para raza caucásica y superior en poblaciones endogámicas. Los ensayos funcionales realizados para el caso descrito (A91V/G149S), demuestran afectación, tanto en la expresión de perforina como en la capacidad citotóxica de las NKs. Sin embargo, al preincubar las células con IL-2 se restaura parcialmente la función citotóxica, sin observarse este efecto en el paciente homocigoto (G149S/G149S).

Conclusiones. Los resultados descritos demuestran que la mutación A91V en individuos heterocigotos compuestos podría causar deficiente función citotóxica y convertir a los portadores en candidatos a sufrir un cuadro clínico más suave y/o de aparición tardía. Por tanto, recomendamos un seguimiento clínico preventivo, especialmente si se detecta otra mutación en *PRF1*, *UNC13D* o *STX11*. La alta frecuencia observada de la mutación A91V en la población control, aconseja ampliar el estudio molecular a los familiares de pacientes con FHL2, valorando siempre su presencia.

O-086

LOS LINFOCITOS B DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN PRODUCEN NIVELES REDUCIDOS DE INMUNOGLOBULINAS EN RESPUESTA A LIGANDOS DE TLR9 (CPG-ODN) O ANTI-CD40 + IL-21. A. Clemente Ximenis, J. Pons De Ves, N. Matamoros Flori, J. Iglesias Alzueta, C. Martínez García, J.M. Ferrer Balaguer. Instituto Universitario de Investigación en Ciencias de la Salud (IUNICS), Hospital Universitario Son Dureta, Palma de Mallorca.

La Inmunodeficiencia Variable Común (IVC) es un defecto humoral caracterizado por hipogammaglobulinemia, pobre respuesta a vacunación y mayor susceptibilidad a padecer infecciones recurrentes causadas por bacterias capsuladas. Algunas mutaciones genéticas y/o polimorfismos descritos apuntan a defectos intrínsecos del linfocito B y de la colaboración T/B durante la respuesta inmunitaria. Sin embargo se desconoce la causa subyacente a la inmunodeficiencia en la mayoría de pacientes.

Objetivos. Estudiar la diferenciación y producción de inmunoglobulinas de los linfocitos B de pacientes con IVC y controles sanos en respuesta a la estimulación con ligandos bacterianos específicos de TLR9 (CpG-ODN) o simulando la colaboración con el linfocito T mediante anti-CD40 combinado con IL-21. Evaluar la contribución de la señalización a través del BCR.

Material y métodos. Los linfocitos B de 16 pacientes y 17 controles sanos se purificaron mediante selección negativa a partir de muestras de sangre periférica. Posteriormente, se cultivaron (1×10^5 células/pocillo) durante 11 días en presencia de CpG-ODN (0,6 µg/ml) o anti-CD40 (1 µg/ml) + IL-21 (100 ng/ml) en combinación o no con anti-IgM (5 µg/ml).

El nivel de expresión de CD38 en membrana, como marcador de diferenciación, se determinó por citometría de flujo. La producción de IgG, IgA e IgM se cuantificó mediante CBA FlexSet en los sobrenadantes de cultivo.

Resultados. El grado de diferenciación alcanzado (expresión de CD38) fue inferior en los linfocitos B de los pacientes sólo al estimular con anti-CD40+IL21+anti-IgM.

La secreción de IgG e IgA fue inferior en linfocitos B de pacientes independientemente del estímulo utilizado.

La producción de IgM fue también inferior en IVC tras estimulación con CpG-ODN, pero comparable a los controles en respuesta a anti-CD40+IL-21.

La adición de anti-IgM a los cultivos no aumentó la secreción de inmunoglobulinas en los controles ni la restauró en los pacientes.

Conclusiones. Los linfocitos B de pacientes con IVC no se diferencian óptimamente ni en respuesta a ligandos de TLR9 (CpG-ODN) ni a las moléculas mediadoras de la interacción T/B estudiadas (anti-CD40+IL-21). Ello sugiere un amplio defecto en las vías de señalización responsables de la diferenciación del linfocito B a célula productora de anticuerpos.

O-087

MÉTODOS DIAGNÓSTICOS EN EL ESTUDIO DE INMUNODEFICIENCIAS ASOCIADAS CON DEFECTOS DE REPARACIÓN DE DNA. M.J. Recio Hoyas¹, E. Martínez Busto¹, L. Woodbine², E. Riballo², J.R. Regueiro¹, P. Jeggo². ¹Facultad de Medicina. Universidad Complutense, Madrid. ²Genome Damage and Stability Centre. Sussex University, United Kingdom.

Las inmunodeficiencias asociadas con defectos de reparación de DNA, constituyen un grupo de desórdenes caracterizados por linfopenia T y/o B, radiosensibilidad clínica y, en algunos casos, aparición de determinados tipos de tumores. Los genes responsables de estas patologías codifican para una serie de proteínas implicadas en las vías de reparación de DNA, entre las que se encuentran Artemis, Ligasa IV y Cernunnos (XLF).

En este trabajo se describen los estudios de reparación realizados en dos pacientes con clínica de inmunodeficiencia y radiosensibilidad clínica.

Casos clínicos. Paciente 1. Numerosos episodios de infecciones por bacterias y hongos en piel y mucosas, linfopenia T severa y niveles disminuidos de inmunoglobulinas. Fallece a los 3 meses de edad.

Paciente 2. Varón de 4 meses de edad que presenta clínica SCID, expansión T oligoclonal y varios rasgos dismórficos, entre los que destaca la presencia de microcefalia.

Los análisis de reparación, en ambos pacientes, se llevaron a cabo en fibroblastos irradiados (γ -IR) obtenidos a partir de biopsia de piel. Los estudios de supervivencia celular mostraron una disminución del número de colonias respecto a individuos control, lo que nos indica que las células de estos pacientes son radiosensibles. Por otro lado, los estudios de inmunofluorescencia (anticuerpos α - γ H2AX y α -CENP-f) realizados para monitorizar la cinética de reparación de roturas de DNA de doble cadena en las distintas fases del ciclo celular mostraron defectos en fase G2. Los resultados en fase G1 fueron similares a los obtenidos en individuos control.

Los resultados obtenidos apuntan a un posible defecto en algunas de las proteínas reparadoras de daño en el DNA. Los estudios de secuenciación realizados en el paciente 2 han descartado Ligasa IV y Cernunnos como genes responsables de la patología. Por el contrario, el Western-blot de Artemis realizado en el paciente 1, revela una banda de menor tamaño que podría corresponder a una proteína truncada. Actualmente estamos realizando el estudio molecular para confirmar este resultado.

Conclusión. Estas técnicas sirven para diagnosticar con rapidez posibles inmunodeficiencias asociadas con defectos de reparación de DNA y para profundizar en el papel de las proteínas reparadoras en el desarrollo de tumores. Es importante recordar que se necesitan fibroblastos, bien de biopsia o bien de raspados bucales.

SESIÓN 10: INMUNOTERAPIA

Moderadores: Luis AlvarezVallina (Madrid)

Francisco Lozano (Barcelona)

O-088

T CELL ALLOREACTIVITY IS ENHANCED BY CTLA-4 BLOCKADE WITH TREMELIMUMAB ONLY WHEN CD4⁺ CD25⁺ REGULATORY T LYMPHOCYTES ARE DEPLETED IN VITRO AND IN VIVO. C. Alfaro Alegria¹, N. Suarez², J. Dubrot¹, A. Palazón¹, S. Hervás-Stubbs¹, I. Martínez-Forero¹, S. Martin-Algarra², B. Sangro², F. Lecanda¹, J.L. Pérez-Gracia², I. Melero¹. ¹CIMA, Pamplona. ²CUN.

Anti-CTLA-4 monoclonal antibodies that block the interaction of CTLA-4 with CD80 and CD86 such as tremelimumab and ipilimumab are currently being tested in the clinic for cancer treatment exploiting their properties to de-repress tumor-specific cellular immunity. Addition of the fully human anti-CTLA-4 (tremelimumab) to cultures of human T cells with allogenic dendritic cells did not increase proliferation. Magnetic bead-mediated elimination of CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} cells before setting up those alloreactive cultures also largely failed to increase primary proliferation. In contrast, pre-depletion of CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} and culture in the presence of tremelimumab synergistically resulted in increased proliferation and DC:T cell aggregation. These effects were much more prominent in CD4 than in CD8 T cells. The synergy mechanism can be traced to enhanced CTLA-4 expression in effector cells as a result of T_{reg} elimination, thereby offering more targets to the blocking antibody. Human T cells and allogenic DC were coinjected in the peritoneum of Rag2^{-/-} IL-2R γ ^{-/-} mice. In these conditions, tremelimumab injected intravenously did not significantly enhance alloreactive proliferation unless Treg cells had been pre-depleted. Synergistic effects *e in vivo* were again largely restricted to the CD4 T cell compartment. Similar results were observed with PBL and allogenic DC obtained from patients suffering from advanced solid malignancies. These experiments indicate that tremelimumab therapy may benefit from previous or concomitant T_{reg} depletion.

O-089

IMMUNOTHERAPEUTIC AGONIST ANTI-CD137 MAB ACT ON TUMOR ENDOTHELIAL CELLS TO ENHANCE ADHESION MOLECULES AND RECRUITMENT OF ACTIVATED T LYMPHOCYTES. A. Palazón García¹, J. Dubrot Armendariz¹, A. Rouzaud Subirá¹, S. Hervás-Stubbs¹, I. Martínez-Forero¹, A. Morales-Kastresana¹, A. Teijeira¹, A. Martínez², M. Jure-Kunkel³, I. Melero¹. ¹CIMA, Pamplona. ²CIBIR. ³Bristol Myers-Squibb Pharmaceutical Research Institute.

Agonist anti-CD137 mAb are being used for the treatment of cancer in mice and in clinical trials based on their co-stimulatory effects on primed T cells and perhaps on other cells of the immune

system. We provide evidence both at the protein and the mRNA level, indicating that CD137 is selectively expressed on the surface of tumor endothelial cells. Interestingly CD137 is up-regulated on mouse endothelial cell lines under conditions of hypoxia. Treatment with anti-CD137 mAb in *Rag^{-/-}* mice does not result in any measurable anti-angiogenic effects. By contrast, CD137-mediated *in vivo* stimulation of tumor endothelial cells with monoclonal antibodies increases the surface expression of the adhesion molecules ICAM-1, VCAM-1 and E-selectin. As a result, CD137^{-/-} activated T lymphocytes entered more avidly into tumor tissue when adoptively transferred to mice that are being treated with agonist anti-CD137 mAb. The enhanced entrance of activated T lymphocytes into the malignancy can be neutralized with anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 blocking antibodies. Accordingly, stimulation of CD137 does not only enhance T cell activation but also augments their traffic into the malignant tissue through direct actions on the blood vessels that irrigate the tumor, thereby providing an additional mechanism of action for the immunotherapeutic effects.

O-090

TREATMENT WITH ANTI-CD137 MABS CAUSES INTENSE ACCUMULATIONS OF LIVER T CELLS WITHOUT SELECTIVE ANTITUMOR IMMUNOTHERAPEUTIC EFFECTS IN THIS ORGAN. *J. Dubrot¹, F. Milheiro¹, C. Alfaro¹, A. Palazón¹, I. Martínez-Forero¹, A. Morales-Kastresana¹, M.C. Ochoa¹, S. Hervás-Stubbs¹, M. Jure-Kunkel², L. Chen³, I. Melero^{1,3} CIMA, Pamplona. ²Bristol Myers-Squibb Pharmaceutical Research Institute, United States. ³Sidney Kimmel Cancer Center. Johns Hopkins Medical School, United States.*

Background/Aims. Cancer therapy with agonist anti-CD137 mAbs has been shown to induce immune-mediated tumor rejections in mice and equivalent agents of this kind are currently being tested in cancer patients. Previous reports indicated that CD137 stimulation induces polyclonal infiltrates of T lymphocytes in the liver. This study characterizes the liver infiltrates, the target-dependency of the phenomena and addresses the question of whether tumors nested in the liver are a more favourable target for CD137-based immunotherapy.

Methods. Liver infiltrates were studied with conventional histology and multiple colour flow cytometry of total liver leukocytes. CD137^{-/-} mice, mice with a single rearrangement of the TCR (OT-1 mice) and *Rag^{-/-}* mice were used to clarify molecular requirements. Mice implanted with MC38 colon carcinomas either subcutaneously or inside the liver were used for comparative studies under treatment with agonist anti-CD137 mAbs.

Results. CD137 treatment caused mononuclear inflammation in portal spaces of the liver, which gave rise to moderate increases in transaminases without signs of cholestasis. Marked increases in the numbers of CD8⁺ T cells were observed, including CD8⁺ T lymphocytes co-expressing CD11c. Infiltrates were absent in CD137^{-/-} mice and mitigated in mice harbouring a single transgenic TCR on their CD8 T cells. Despite of the tumor-independent accumulation of T cells in the liver, immunotherapeutic effects were not more prominent against tumors located in this organ.

Conclusions. Target-dependent effects of CD137 stimulation lead to liver infiltration with T cells, but lymphocyte enrichment in this organ does not privilege this site for immunotherapeutic effects against transplanted tumors.

O-091

CUANTIFICACION DE ENFERMEDAD MINIMA RESIDUAL POR CITOMETRIA DE FLUJO CON ALTA SENSIBILIDAD. *E. Domingo, C. Moreno, A. Sánchez-Ibarrola, C. Panizo, J.A. Páramo, J. Merino. Clínica Universidad de Navarra, Pamplona.*

La citometría de flujo es la técnica de elección para la cuantificación rutinaria de enfermedad mínima residual (EMR) en pacientes con neoplasias hematológicas. Sin embargo, su sensibilidad es 10⁴, un logaritmo por debajo de las técnicas moleculares. En el presente trabajo nos planteamos el objetivo de desarrollar un protocolo de citometría de flujo que permita alcanzar una sensibilidad similar al PCR cuantitativo y que pueda aplicarse de forma rutinaria en el laboratorio diagnóstico.

Material y Métodos. Se utilizaron 16 muestras EMR+ (Mieloma Múltiple y LLC-B) con una infiltración en torno a 0.01%. La cuantificación del grado de infiltración se llevó a cabo por procedimiento estándar en un citómetro FACSCanto (Becton-Dickinson) con técnica de 6 colores (se calculó la media de 5 procedimientos independientes de marcaje y análisis). Estas muestras se diluyeron 10 veces con leucocitos normales con el fin de obtener una infiltración en torno a 10⁻⁵. El análisis de EMR en las muestras diluidas se llevó a cabo por medio de la adquisición de 6 millones de leucocitos, que se marcaron y adquirieron en tubos independientes, a razón de 2 millones por tubo.

Resultados. En primer lugar se comprobó que la adquisición de 6 millones de leucocitos en tubos independientes es realizable (estabilidad de la fluorescencia inter-tubo) y aplicable al análisis diario de un laboratorio diagnóstico (se exploró la posibilidad de acortar el tiempo por medio del aumento en la tasa de adquisición sin que se afecten los resultados). El procedimiento se validó comparando la cuantificación de EMR por citometría de flujo y PCR cuantitativo en diluciones sucesivas de una muestra de Leucemia Linfoblástica Aguda BII Phi+ (10⁻³ a 10⁻⁵).

Con este protocolo se cuantificó EMR en muestras de Mieloma Múltiple y LLC-B con una infiltración en torno a 10⁻⁵, obteniéndose en todos los casos una medición exacta y precisa. La especificidad de la técnica se confirmó por medio del análisis de 10 millones de leucocitos normales, tanto de médula ósea como de sangre periférica (n = 6).

Conclusión. La adquisición de 6 millones de leucocitos es realizable con un citómetro digital de forma rutinaria, permitiendo alcanzar una sensibilidad de 10⁻⁵ en análisis de EMR, manteniéndose la exactitud, precisión y especificidad de la técnica.

O-092

TERAPIA GÉNICA DE PACIENTES CON HIPER-IGM LIGADA AL CROMOSOMA X (XHGM1) MEDIANTE EL USO DE VECTORES LENTIVIRALES REGULADOS. *S. Torres Rusillo, Z. Romero García, M. Cobo, P. Muñoz, J.D. Unciti Broceta, A.K. Vega Bogado, F. Martín, I.J. Molina. Universidad De Granada / CIBM, Armilla.*

Objetivos. El Síndrome de hiper IgM ligado al cromosoma X (X-HGM1) es una inmunodeficiencia primaria causada por mutaciones en el gen que codifica para la proteína CD40L, presente en linfocitos T CD4⁺. Recientes estudios en animales revelan que corregir el defecto en progenitores hematopoyéticos puede llevar consigo el desarrollo de un severo síndrome linfoproliferativo, probablemente a consecuencia de la expresión no regulada del vector terapéutico. Así, nuestro

objetivo será transducir de forma eficiente linfocitos T primarios de pacientes XHIM1 con un vector lentiviral terapéutico inducible y tejido-específico, en el que la expresión del transgén CD40L se encuentre dirigida por el propio promotor de éste.

Material y métodos. Se construyó el vector lentiviral pCD40L-CD40L, con el promotor específico de CD40L y el gen terapéutico. Las células diana fueron linfocitos T de pacientes XHIM1. Tras la transducción, los linfocitos fueron aloestimulados, para obtener la población CD4+. La detección de la proteína CD40L se realizó por citometría de flujo.

Resultados. Los linfocitos T de pacientes XHIM1 transducidos por el vector lentiviral pCD40L-CD40L, expresan CD40L sólo tras aloestimulación y estimulación con PMA+Ionomicina. Esta situación refleja la capacidad del vector de expresar la proteína CD40L sólo en condiciones de activación.

Conclusión. El vector lentiviral pCD40L-CD40L es capaz de aumentar, de forma específica y regulada, la expresión en superficie de CD40L en linfocitos T de pacientes XHIM1.

O-093

ESTUDIO DE LA BIOCOMPATIBILIDAD Y TOXICIDAD DE NANOPARTÍCULAS INORGÁNICAS EN LÍNEAS CELULARES HUMANAS. B. Díaz Freitas¹, T. Lozano¹, M. Peleteiro¹, I. Pastoriza Santos², M. Arruebo³, R. Ibarra³, L. Liz Marzan⁴, A. González Fernández¹. ¹Universidad de Vigo. Laboratorio de Inmunología, Vigo. ²Universidad de Vigo. ³Instituto de Nanociencia de Aragón (INA), Zaragoza. ⁴Universidad de Vigo.

Introducción. Los recientes avances en el campo de la Nanotecnología han permitido desarrollar nuevos nanomateriales y herramientas con gran potencial e impacto socio-económico, principalmente en el campo biomédico donde estos materiales pueden permitir mejorar las técnicas de diagnóstico y la terapia de muchas enfermedades, especialmente en la detección y en el tratamiento del cáncer. Los nanomateriales ofrecen oportunidades únicas en el diseño de nuevos instrumentos clínicos y en la mejora de los ya existentes, pero sobre todo, las nanopartículas (NPs) se han propuesto como transportadores de fármacos, en el desarrollo de biosensores y de vacunas, en la destrucción de células tumorales mediante hipertermia y como agentes de contraste debido a su gran versatilidad en composición, tamaño y funcionalidad.

Objetivo. El uso de NPs en aplicaciones biomédicas puede ofrecer claros beneficios, pero antes de su uso *in vivo* es importante tener en cuenta su potencial toxicidad y si son capaces de inducir una respuesta inmunológica. Las NPs pueden inducir agregación, inflamación, toxicidad, fagocitosis, alergia, etc. por lo que es necesario poner a punto técnicas que permitan evaluar estas cuestiones antes de su aplicación.

Métodos. Se han estudiado a través de diferentes técnicas la toxicidad y la biocompatibilidad (MTT, LDH, QSSC, Azul Tripán, fagocitosis, activación del complemento, producción de ROS, modelación de marcadores de membrana, etc.) de NPs inorgánicas de diferente composición y tamaño en varios tipos celulares humanos.

Resultados. Muchas de las NPs analizadas se agregan en condiciones fisiológicas, además, se ha encontrado que la toxicidad es dependiente de la dosis y existe variabilidad entre diferentes tipos celulares, la técnica empleada y el lote de NPs estudiado. Por otro lado, algunas NPs interfieren con las técnicas utilizadas.

Conclusiones. Se han puesto a punto diferentes técnicas que permiten analizar la toxicidad y la respuesta inmunológica dependiendo de las características y propiedades de cada tipo de NP. Nuestros resul-

tados muestran que debido a variabilidad encontrada según el tipo celular analizado y las características de las NPs es necesario utilizar diferentes técnicas y líneas celulares para estudiar la toxicidad y biocompatibilidad de los nanomateriales.

O-094

EL "TARGETING" EX VIVO A CÉLULAS DENDRÍTICAS DE UN ADENOVIRUS QUE EXPRESA EL ANTÍGENO NS3 DEL VHC AUMENTA SU MADURACIÓN Y LA INDUCCIÓN DE RESPUESTAS ANTIVIRALES IN VITRO E IN VIVO. I. Echeverría Beistegui¹, A. Pereboev², L. Silva¹, A. Zabaleta¹, J.I. Rieu-Bof¹, F. Borrás-Cuesta¹, J.J. Lasarte¹, J.I. Esteban¹, J. Prieto¹, P. Sarobe¹. ¹CIMA Universidad de Navarra, Pamplona. ²University of Alabama at Birmingham, United States.

Objetivos. La eliminación del virus de la hepatitis C (VHC) está asociada a la inducción de potentes respuestas celulares mediadas por linfocitos T. Para activar a los linfocitos T es necesaria la correcta presentación del antígeno por las células dendríticas (CD) maduras. El objetivo de este trabajo ha sido desarrollar una estrategia que sea capaz de aumentar las funciones de las CD, con el fin de mejorar su inmunogenicidad.

Metodología. Se han utilizado moléculas adaptadoras que contienen el receptor coxsackie-adenovirus unido al CD40L murino o humano (CFm40L o CFh40L) para transducir ex vivo CD con un adenovirus recombinante que codifica la proteína NS3 del VHC (AdNS3). Se analizó la transducción, maduración e inmunogenicidad de las CD *in vitro* e *in vivo*.

Resultados. CFm40L potenció la maduración de las CD de ratón, la producción de IL-12, y aumentó la expresión de moléculas coestimuladoras 4-1BBL, OX40L y CD70. La transducción de las CD con AdNS3 y CFm40L aumentó la presentación del antígeno NS3 *in vitro*, resultando en una mayor activación de linfocitos T productores de IFN-γ. Además, la inmunización de ratones con estas CD activó potentes respuestas CD4 y CD8 frente al antígeno NS3. Del mismo modo, CFh40L aumentó la transducción y maduración de las CD humanas derivadas de monocitos. La comparación de las CD transducidas con AdNS3 y CFh40L de pacientes con hepatitis crónica C o donantes sanos mostraron niveles similares de maduración. Por último, en pacientes con hepatitis crónica C, estas CD indujeron respuestas específicas frente a NS3, a diferencia de las CD transducidas únicamente con AdNS3.

Conclusión. Los resultados muestran que esta molécula adaptadora aumenta la eficacia de las CD transducidas con AdNS3, sugiriendo que esta estrategia podría aplicarse como vacuna terapéutica frente al VHC.

O-095

EFICACIA DEL RITUXIMAB EN EL TRATAMIENTO DEL PÉNFIGO FOLIÁCEO: ESTUDIO DE UNA PACIENTE. E. Zumaquero¹, S. Arias-Santiago², S. García-Rodríguez¹, A. García-Pérez¹, P. Navarro¹, M.A. Fernández-Pugnaire², M. Zubiaur¹, J. Sancho¹. ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla (Granada), Armilla. ²Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada.

Una mujer de 65 años ingresa en el Servicio de Dermatología por cuadro de lesiones ampollosas y costrosas de dos meses de evolución siendo diagnosticada de pénfigo foliáceo. La necesidad de dosis eleva-

das de corticoides para controlar el cuadro determinan un síndrome de Cushing yatrógeno por lo que se decidió iniciar tratamiento con Rituximab, a dosis de 375 mg/m² una vez a la semana durante 4 semanas.

Objetivo del estudio. Hacer un seguimiento de los parámetros inmunológicos y clínicos de la paciente antes y después del tratamiento con Rituximab.

Materiales y Métodos. Previo al tratamiento y después de cada infusión de Rituximab se procede a la extracción de sangre de la paciente y de un control sano obteniéndose plasma y células mononucleares (PBMCs). Usando un sistema multiparamétrico (BioPlex) se han cuantificado simultáneamente los niveles de 10 citoquinas en el plasma de la paciente. El análisis de marcadores de superficie se lleva a cabo mediante citometría de flujo. Tras estimulación de los PBMCs con una mezcla de los superantígenos SEE y SEB se estudia la formación de conjugados y expresión de marcadores de activación por citometría de flujo, la formación de sinapsis inmunológicas maduras mediante microscopía confocal y la secreción de citoquinas en los sobrenadantes por BioPlex.

Resultados. Tras el tratamiento con Rituximab se observa: Deplección total de linfocitos B CD19+ desde la primera infusión, con descenso de los niveles de IgA sérica y mantenimiento de la IgG. Disminución de los niveles de IL-6 en plasma al inicio del tratamiento e incremento en fases posteriores. Aparición de una subpoblación de linfocitos T muy positiva para CD38. Fuerte disminución en la formación de la sinapsis inmunológica, menor expresión de CD69 en respuesta a superantígenos y menor producción de citoquinas. Sin embargo, la mejora clínica no se hace evidente hasta trascurridos tres meses, no apareciendo nuevas lesiones a lo largo de los dos años de seguimiento. La reconstitución parcial de linfocitos B CD19+CD20+ solo se observa a partir de 21 meses de tratamiento.

Discusión y Conclusiones. La disminución de la producción de citoquinas y la menor capacidad de activación de los linfocitos T *in vitro* parecen estar directamente relacionados con la ausencia de linfocitos B CD19+ en sangre periférica y la menor capacidad de presentación antigenica derivada de ello. Desde el punto de vista clínico, el tratamiento con Rituximab permitió la reducción de dosis de corticoides y azatioprina, que producían importantes efectos adversos, con desaparición de la mayoría de las lesiones a partir de los tres meses de iniciarse el tratamiento. Rituximab se presenta como un tratamiento de segunda línea para aquellos casos de pénfigo foliáceo rebeldes al tratamiento convencional o para disminuir los efectos secundarios clásicos de los corticoides o inmunosupresores.

O-096

ESTUDIO DEL HLA SOLUBLE COMO MARCADOR DE RESPUESTA AL TRATAMIENTO INMUNOMODULADOR EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. S. Mirete Bachiller¹, R. Álvarez Lafuente², L. Costa Frossard¹, M. García Montijo², N. Marín Crespo¹, M.I. Domínguez Mozo², M. Espiño Martínez¹, J.C. Álvarez Cermeño¹, L.M. Villar Guimerans¹. ¹Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ²Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Objetivo. Los antígenos de Clase I solubles (sHLA) ejercen un papel inmunomodulador, induciendo la apoptosis de los linfocitos T antivados. Los niveles séricos de estas moléculas aumentan en los pacientes de esclerosis múltiple (EM) tratados con interferón beta (IFNB). En este trabajo estudiamos si los niveles séricos de estas moléculas también aumentan durante el tratamiento con Acetato de Glatiramero y Natalizumab, otros fármacos que se utilizan actualmente en la EM. También comparamos la cinética del aumento de sHLA en

las distintas presentaciones de IFNB y relacionamos los niveles de estas moléculas con la respuesta clínica al tratamiento.

Materiales y Métodos. Se siguió durante 1 año a 65 pacientes con EM que iniciaron diferentes tratamientos (14 Rebif, 11 Betaferon, 20 Avonex, 14 Copaxone, 6 Tysabri). Se monitorizó la aparición de brotes o el aumento de discapacidad durante este tiempo.

La detección de sHLA en suero se realizó a través de un ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio. Se midió al inicio del tratamiento y a un mes, tres, seis y 12 meses. Además, se ensayó la presencia de anticuerpos neutralizantes anti IFNB en todos los pacientes, a fin de descartar que los resultados del estudio estuviesen afectados por la aparición de dichos anticuerpos.

El análisis estadístico se realizó mediante Tests de Anova y U-Mann Whitney

Resultados. Los niveles de sHLA no aumentan durante el tratamiento con Acetato de Glatiramero o Natalizumab. En cuanto al IFNB, la cinética de aumento fue similar y más temprana en los pacientes tratados con IFNB a dosis más altas (Rebif y Betaferón). El aumento se aprecia al mes de tratamiento, alcanza el máximo a los tres meses y se mantiene constante a partir de entonces. La cinética de aumento de sHLA para de pacientes tratados con IFNB a dosis más bajas (Avonex) fue más tardía, alcanzando valores similares a los de Rebif y Betaferón a los 6 meses de tratamiento. Los porcentajes de aumento fueron similares en los pacientes con una respuesta clínica completa y en aquellos que experimentaron brotes o aumento de discapacidad durante el tratamiento, pero los valores basales fueron más bajos en estos últimos ($P=0.01$).

Conclusiones. Pacientes tratados con interferón a altas dosis presentan un aumento temprano en las concentraciones de sHLA. La concentración de sHLA soluble de pacientes tratados con Avonex también experimenta un aumento, que se iguala a partir de los 6 meses con los de Rebif y Betaferón. Los niveles basales de sHLA fueron más elevados en pacientes con respuesta clínica completa. Esto podría indicar una relación entre los niveles de estas moléculas y la respuesta a IFNB en la EM. Sin embargo, no se observaron aumentos de sHLA en relación a los tratamientos con Acetato de Glatiramero o Natalizumab. Esto demuestra que esta molécula no se relaciona con el mecanismos de acción de estos dos fármacos.

O-097

¿QUÉ INFLUENCIA TIENE LA EXPRESIÓN DE ZAP-70 EN LA CAPACIDAD MIGRATORIA DE LAS CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA? M. Alfonso Pérez¹, A.E. Beltrán¹, S. Guasch Vidal¹, C. Cuesta Mateos¹, J.M. Zapata², C. Muñoz Calleja¹. ¹Hospital Universitario de La Princesa, Madrid. ²Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols", CSIC/UAM.

Introducción y objetivo. La tirosina kinasa ZAP-70 ("70 Kd zeta associated protein"), en condiciones fisiológicas, se expresa en linfocitos T, donde tiene un papel esencial en la transducción de señales tras la activación del receptor de células T. También se ha demostrado su expresión ectópica en células tumorales de varios síndromes linfoproliferativos de células B, entre ellos, la leucemia linfática crónica (LLC). En esta enfermedad, la positividad para ZAP-70 se considera un factor de mal pronóstico, si bien su papel patogénico no está bien caracterizado.

El receptor de quimioquinas CCR7 y sus ligandos, las quimioquinas homeostáticas CCL19 y CCL21, median el "homing" linfocitario hacia órganos linfoides secundarios (OLS) y parecen responsables de la localización de las células tumorales de LLC en OLS, considerados

nichos de supervivencia para dichas células. En este sentido, se ha sugerido que el peor pronóstico de los pacientes ZAP-70+ podría estar en relación con una mayor capacidad migratoria de sus células tumorales en respuesta a los ligandos de CCR7 presentes en los OLS.

Objetivo. Estudiar cómo afecta la expresión de ZAP-70 a: 1) la intensidad de expresión de CCR7 y su endocitosis tras la activación; 2) a los procesos de migración y adhesión celular en presencia de los ligandos de CCR7.

Materiales y métodos. Se obtuvieron muestras de sangre periférica de pacientes que cumplían los criterios morfológicos e inmunofenotípicos de LLC, tras la firma de consentimiento informado según requisitos de la declaración de Helsinki. La expresión de CCR7, ZAP-70 y VLA-4 se analizó mediante citometría de flujo en las células B CD19+. La expresión de ZAP-70 se cuantificó en forma de índice (MIF linfocitos B/MIF linfocitos T), estableciéndose un punto de corte a partir del análisis de muestras de donantes sanos. Con células mononucleares aisladas mediante centrifugación en gradiente de densidad, realizamos ensayos de migración en Transwell, de endocitosis de CCR7 y adhesión a fibronectina en presencia de CCL19 y CCL21.

Resultados

	CCR7				Migración (%)				Adhesión (%)				Endocitosis (%)												
	n	MFI	n	Basal	CCL19	CCL21	n	Basal	CCL19	CCL21	n	CCL19	CCL21	n	CCL19	CCL21									
ZAP-70+	11	182.7 ± 10	3.3 ± 10	51.4 ± 50.6	45.3 ± 52.7	4	40.3 ± 42.4	41.9 ± 52.6	36.7 ± 53.8	4	51.1 ± 18.0	37.9 ± 14.9	ZAP-70-	15	294.4 ± 11	1.6 ± 1.4	27.6 ± 22.0	39.1 ± 25.0	3	7.9 ± 6.8	7.2 ± 8.5	4.6 ± 4.4	7	46.6 ± 13.7	25.3 ± 15.2

Conclusiones. La expresión de CCR7 en células de LLC es ligeramente inferior en pacientes ZAP-70+ aunque los resultados no alcanzan significación estadística ($p=0.089$) A pesar de esta pequeña diferencia, ni la migración ni la adhesión a fibronectina en presencia de CCL19 ó CCL21, son diferentes entre células de LLC ZAP-70+ y ZAP-70-. Sin embargo, de forma interesante, la migración y la adhesión en ausencia de estímulo tienden a ser mayores en células ZAP-70+, si bien somos conscientes de la necesidad de aumentar el número de muestras. Por su parte, la endocitosis de CCR7 en presencia de sus ligandos ocurre con igual intensidad en células de LLC ZAP-70+ que ZAP-70-.

Es por tanto posible que la capacidad invasiva "constitutiva" en términos de migración y adhesión de las células de LLC ZAP-70+ sea mayor que la de las ZAP-70-, diferencia que desaparecería ante un estímulo quimiotáctico.

SESIÓN 11: INMUNODEFICIENCIAS II

Moderadores: Nuria Matamoros (Palma de Mallorca)
Jose Ramón Regueiro (Madrid)

O-098

FORMA GRANULOMATOSA DE LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN, A PROPOSITO DE UN CASO. *I. Hidalgo Izquierre, A. De Andres Martin, J.L. Castañer Alabau, G. Silva Carreras, E. Roldan Santiago. Hospital Ramon y Cajal, Madrid.*

Objetivos. Plantear la necesidad de consensuar protocolos de fentipaje y manejo clínico de una de las formas más graves e incapacitantes de la IDVC.

Materiales y métodos. Presentamos a una mujer que a los 57 años se le diagnostica de IDVC; actualmente se encuentra en tratamiento con inmunoglobulina intravenosa (IGIV). Al diagnóstico presentaba bronquiectasias e infecciones de repetición de vías respiratorias altas con 1 episodio de neumonía extra-hospitalaria y artralgias, sin otra sintomatología típica de la IDVC. Las radiografías de tórax realizadas no mostraron alteraciones patológicas, siendo consideradas normales, realizándose un TAC en el que se describe la presencia de bronquiectasias sin adenopatías ni otras alteraciones significativas.

Al año del diagnóstico la paciente acude al servicio de urgencias por disfagia alta para sólidos de una semana de evolución acompañada de afonía intermitente y sensación de cuerpo extraño. No presenta síndrome constitucional asociado. Siendo valorada por otorrinolaringología, se constata la existencia de una adenopatía de 1 cm, blanda, no adherida y no dolorosa, que comprime estructuras anatómicas. Se realiza una PAAF con diagnóstico de linfadenitis reactiva, sin presencia de células malignas en ganglio ni en sangre periférica. En aproximadamente 2 años, aparecen múltiples adenopatías látero-cervicales, submandibulares, mediastínicas, retroperitoneales y pélvicas, hepatoesplenomegalia, afectación difusa y generalizada del parénquima pulmonar con múltiples imágenes nodulares. En ninguno de los estudios anatomo-patológicos ni inmunológicos se ha observado malignidad siendo diagnosticados como granulomas no caseificantes.

Durante este tiempo debutó con trombopenia (168.000-140.000/ μ l) de posible origen autoinmune, sin anemia ni otras citopenias.

Actualmente presenta un importante deterioro clínico general con una gran disminución de su capacidad pulmonar y aparición de diarreas intermitentes sin aparente causa infecciosa, que no presentaba al momento del diagnóstico; el empeoramiento clínico está claramente relacionado con el aumento del tamaño y numero de sus granulomas.

Resultados. En la IDVC está indicada la realización del estudio de las sub-poblaciones linfocitarias, especialmente los linfocitos B (LB) en estadios madurativos. Al diagnóstico, en la paciente se observó una disminución de los LB de memoria (CD19+CD27+), inversión del cociente CD4/CD8 y aumento de los linfocitos T activados; sin realizarse otros estudios de fenotipo. Posteriormente, a raíz de la clínica que desarrolló la paciente, el estudio inmunofenotípico fue ampliado acorde con lo descrito actualmente para las formas severas de la IDVC granulomatosa (clasificación EUROclass).

Conclusión. Las alteraciones encontradas, sobre todo fenotípicas, se correlacionan con la forma severa de la IDVC granulomatosa. Actualmente no se contempla dentro del protocolo de estudio la realización de fenotipos especiales para detectar estas formas, ya que tampoco se sabe si las alteraciones fenotípicas descritas actualmente se producen desde el comienzo de la enfermedad o aparecen evolutivamente. Sin embargo, una vez establecida la forma granulomatosa, el deterioro es rápido y no se observa regresión de a pesar de las terapias actualmente aplicadas (corticoides, anti-TNF).

O-099

DEFICIENCIA DE ADA EN PACIENTE CON LINFOPENIA SEVERA Y NEUMONITIS INTERSTICIAL BILATERAL POR VIRUS DE LA GRIPE H1N1. *P. Talayero, E. Mancebo, S. Lermo-Rojo, V. Pérez-Aradas, L.I. González-Granado, J. Ruiz-Contreras, M. Menchén, M.J. Díaz-Madroñero, M.J. Castro, L.M. Allende. Hospital 12 de Octubre, Madrid.*

Objetivo. Diagnóstico genético de lactante de 6 meses de edad remitido por sospecha clínica de Inmunodeficiencia Combinada Severa.

Paciente y métodos. Varón de 6 meses de edad con neumonitis intersticial bilateral por virus de la gripe A H1N1, gastroenteritis aguda por rotavirus y malnutrición grave. Se realizó estudio inmunológico de poblaciones linfocitarias e inmunoglobulinas y estudio genético de secuenciación de las regiones codificantes de los genes RAG1, RAG2 y ADA.

Resultados. El estudio inmunológico reveló una linfopenia severa (100 células/ μ L) con fenotipo T-B-NK⁺ e hipogammaglobulinemia (IgG 270 mg/dL, IgA <40 mg/dL, IgM <25 mg/dL). Ante la gravedad del cuadro clínico e inmunológico presentado, se le realizó trasplante de médula ósea de donante no emparentado con buen prendimiento. Los resultados del estudio genético (que se obtuvieron tras la realización del trasplante) no revelaron ningún cambio respecto a la secuencia consenso en los genes RAG1 y RAG2, sin embargo se evidenciaron dos cambios en heterocigosis (Leu107Pro; 1050-1054delGAAGA) en el gen ADA. Dichos cambios ya estaban descritos como causantes de SCID, y su presencia en heterocigosis fue confirmada en los progenitores.

Conclusiones. La deficiencia de ADA supone el 15% de las SCID y el 30% de las SCID de herencia autosómica recesiva, siendo por tanto una de las etiologías genéticas más frecuentes. Este hecho hace que, ante un cuadro clínico de patología pulmonar infecciosa severa o recurrente acompañado de la presentación de linfopenia muy severa, se dirija el estudio genético hacia el gen ADA.

O-100

DEFECTOS EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL TCR EN HETEROZIGOTOS PARA MUTACIONES EN CD3GAMMA O DELTA.
M. Muñoz-Ruiz, V. Pérez-Flores, L.M. Allende, H. Takada, W.W. Schamel, S.S. Kiliç, O. Sanal, C.M. Roifman, E. Fernández-Malavé, J.R. Regueiro. Universidad Complutense de Madrid/Facultad de Medicina, Madrid.

Introducción. Los portadores de mutaciones graves en CD3G ($\gamma^{+/-}$) o CD3D ($\delta^{+/-}$) son sanos, pero muestran una pequeña reducción en el número total de linfocitos $\alpha\beta$ y $\gamma\delta$ en sangre periférica. Tratamos, en este contexto, de averiguar si presentan otros defectos en linfocitos T y extender el trabajo a ratón.

Métodos. Citometría de flujo comparativa, biotinilación y ensayos funcionales.

Resultados. Un análisis detallado de la expresión en superficie del TCR/CD3 usando un amplio rango de anticuerpos CD3-específicos muestra una reducción consistente de su unión en heterocigotos (60-90% de los controles). Esta reducción es estable *in vitro* en células T $\gamma^{+/-}$ transformadas (40-60% de los controles). La biotinilación en superficie y el marcaje intracelular confirman estas observaciones, sugiriendo que hay menos proteína CD3 en linfocitos humanos $\gamma^{+/-}$ y $\delta^{+/-}$. Las células T primarias de ratones $\gamma^{+/-}$, $\delta^{+/-}$ y $\epsilon^{+/-}$ también muestran una unión reducida de anticuerpos anti-CD3 (40-50% de los controles). De hecho, algunos anticuerpos anti-CD3 (17A2, 7D6) no pueden distinguir entre $\gamma^{+/-}$ y $\gamma^{-/-}$ en células Tαβ de ratón. La disminución en la expresión del TCR en humanos y ratones correlaciona con defectos en parámetros funcionales tardíos (proliferación inducida por anti-CD3, pero no por IL-2 o PMA+ionomicina), mientras que los eventos tempranos de activación se encuentran disminuidos en humanos (inducción de CD69 en $\gamma^{+/-}$) y normales en ratones (inducción de CD69 en $\gamma^{+/-}$, $\delta^{+/-}$ o $\epsilon^{+/-}$).

Conclusiones. Los heterocigotos portadores de mutaciones en CD3G, CD3D y CD3E muestran un deterioro parcial pero con-

sistente de la expresión y función del TCR/CD3. Estos resultados podrían ser de valor diagnóstico (detección de portadores de mutaciones en CD3), pero también pueden dar información de la función específica de cada cadena si se objetivan defectos específicos de cadena.

O-101

ESTUDIO POBLACIONAL DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA MUTACIÓN E52DEL EN MYD88.
L. Carretero-Iglesia¹, M. Pascal¹, O. Fernández¹, D. Comas², M. López-Nevot³, R. De Pablo⁴, O. Vall⁵, J.I. Aróstegui¹, J. Yagüe¹, A. Más⁶, M. Juan Otero¹. ¹Hospital Clínic i Provincial de Barcelona, Barcelona. ²CEXS-UPF-PRBB, Spain. ³Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Universidad de Granada, Granada. ⁴Hospital Puerta de Hierro, Madrid. ⁵Hospital del Mar, Barcelona. ⁶Australia, India, Francia.

La deficiencia de MyD88 es una Inmunodeficiencia primaria del sistema inmune innato definida a través de 9 pacientes homozigotos para mutaciones que bloquean la función de la molécula señalizada de la vía TIR (Receptores TLR e IL1). Característicamente estos pacientes presentan sensibilidad a Pneumococo, *Staphylococcus aureus* y algunos gram negativos, desarrollando cuadros infecciosos habitualmente con poca inflamación e incluso sin fiebre. Además hacia los 9-10 años parece que desaparece esta sensibilidad y los individuos no muestran mayor número de infecciones de lo habitual. De las 5 familias de la descripción inicial (*von Bernuth H et al, Science 2008, 321:691*) 3 de ellas acumulaban 6 individuos con la mutación 160del3, designada como E52del, todas ellas familias de la etnia gitana.

Objetivos. Definir el grado de penetración de la mutación E52del en nuestra población especialmente en DNAs de población gitana sana, y en otras poblaciones relacionadas.

Material y Métodos. Muestras de DNA genómico: 400 gitanos españoles de diversos orígenes geográficos (Barcelona, Madrid y Granada), 100 gitanos de Bulgaria, 300 donantes no-gitanos españoles sanos, 200 individuos de muestras de la India (estado de Gujarat). El cribaje de la mutación se hace con Qiaxcel System (Qiagen) o con HRM (High Resolution Melting) por PCR en tiempo real y se recomprueba los casos de mutación por secuenciación convencional.

Resultados. En los resultados preliminares de 200 individuos de etnia gitana, 9 de ellos eran heterocigotos para E52del (frecuencia alélica = 1,63 %), mientras que ninguno de los 200 no gitanos ni de los 100 hindúes estudiados mostraron la mutación.

Conclusiones. La inesperadamente alta prevalencia de esta mutación observada en estos estudios preliminares en la etnia gitana, tiene una relevancia especial dada la alta consanguinidad observada en este grupo. Los resultados obtenidos nos impulsan a ampliar el análisis a una población mayor y a considerar que la posibilidad de detectar descendientes afectos es mayor de lo esperado.

O-102

EL GEN MSH5 NO ES UN FACTOR ETIOLÓGICO EN LA DEFICIENCIA SELECTIVA DE IGA PERO DEFINE AL SUBGRUPO DE SUSCEPTIBILIDAD DE HLA-DRB1*0102.
N. Del Pozo Rodríguez¹, L.M. Medrano¹, A. Ferreira², M.C. García Rodríguez¹, C. Núñez¹. ¹Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Hospital La Paz, Madrid.

Introducción. La etiología de la deficiencia selectiva de IgA (DIgA) está influenciada por variantes genéticas en la región cromo-

sómica 6p21, donde se localiza el HLA, aunque la susceptibilidad observada no ha sido adscrita a ningún gen o genes específicos. Basándose en aspectos funcionales y estudios de asociación previos, se ha propuesto un posible papel etiológico del gen *MSH5*, ubicado en esa misma región cromosómica. Sin embargo, el extenso desequilibrio de ligamiento en la región HLA obliga a realizar análisis adicionales.

Nuestro objetivo ha sido evaluar el papel de ciertos SNPs del gen *MSH5* en DlgA, considerando su desequilibrio de ligamiento con otros marcadores HLA clásicamente asociados (*DRB1*0102* y *B*08-DR*03*).

Material y Métodos. Realizamos un estudio con 146 tríos compuestos por individuos con DlgA y ambos progenitores, todos ellos de origen caucásico. Todas las muestras fueron genotipadas mediante sondas TaqMan para 2 SNPs del gen *MSH5*: rs28381349 (L85F), en el exón 3; y rs3131378, en el intrón 12. El genotipado de otros marcadores HLA se llevó a cabo mediante PCR-SSOP (*Polymerase Chain Reaction – Sequence Specific Oligonucleotide Probe*) o mediante ensayos TaqMan para SNPs altamente correlacionados. El alelo minoritario de cada uno de los SNPs de *MSH5* estudiados se encuentra en un haplotipo de susceptibilidad HLA a DlgA (85F en HLA-*DRB1*0102* y rs3131378_C en *B*08-DR*03*), por ello los datos familiares se usaron para establecer los haplotipos incluyendo dichos marcadores, lo que permitió realizar análisis estratificados.

Resultados. Los análisis TDT mostraron resultados significativos al considerar los polimorfismos estudiados en el *MSH5*. Sin embargo, los análisis estratificados considerando otros alelos del HLA excluyen un posible papel etiológico del gen *MSH5*. No obstante, el alelo minoritario del polimorfismo L85F define al subgrupo portador de susceptibilidad dentro de los portadores del haplotipo *DRB1*0102*.

Conclusiones. El gen *MSH5* no parece tener un papel etiológico en DlgA, como previamente se había postulado. Sin embargo, el alelo 85F (rs28381349_T) permite definir, junto con *DRB1*0102*, un haplotipo de susceptibilidad a esta enfermedad. El factor causal dentro de ese haplotipo ha de encontrarse en el extremo telomérico de HLA de clase II ó en HLA de clase I ó III, puesto que marcadores centroméricos en HLA II presentan la misma composición alélica en todos los haplotipos que presentan *DRB1*0102*.

O-103

EFEKTOS INMUNOLÓGICOS SECUNDARIOS AL ESTRÉS PSI-COLÓGICO PRODUCIDO POR EL DIAGNÓSTICO DE CÁNCER DE MAMA. A. Corell¹, P. Mora², N. López-Fernández¹, M. Nocito², L. Barrero², R. Reinoso³, M.E. Mateo¹, M. Martino³. ¹Universidad De Valladolid, Valladolid. ²Hospital Clínico Universitario de Valladolid, Valladolid. ³IOBA-Universidad de Valladolid.

Objetivos. Determinar las alteraciones inmunológicas secundarias al estrés psicológico asociado al diagnóstico de cáncer de mama en mujeres españolas y evaluar su evolución al año del diagnóstico.

Material y métodos. 80 mujeres diagnosticadas de cáncer de mama participaron en este estudio prospectivo. El nivel de estrés psicológico y la ansiedad atribuible al diagnóstico del cáncer fueron evaluados mediante tests psicológicos (STAI). Para la evaluación del sistema inmune se analizaron diferentes parámetros inmunológicos: 1) inmunoglobulinas séricas y factores de complemento; 2) subpopula-

ciones linfocitarias, viabilidad y etapa apoptótica, capacidad fagocítica y explosión oxidativa de monocitos y granulocitos; 3) función celular adaptativa, medida como la producción de ATP de los linfocitos CD4 tras la estimulación con PHA. Todos estos parámetros fueron analizados en el momento de la intervención quirúrgica (extirpación del tumor) y un año después de la operación, tras haber concluido todos los tratamientos quimioterápicos y/o radioterápicos post-quirúrgicos.

Resultados. La respuesta funcional de las células CD4 aumentó significativamente al año de la intervención. El índice de producción de ATP (estimuladas/basal) en el momento de la intervención fue de 5.3 mientras en la segunda visita (tras cirugía y tratamiento) dicho índice de ATP ascendió a 11.9, siendo esta diferencia estadísticamente significativa. En cuanto a la inmunidad innata, tanto la capacidad fagocítica como la respuesta oxidativa de los monocitos fueron significativamente superiores al año de haber sido tratadas respecto al momento de la cirugía. Hubo correlaciones significativas entre el nivel de estrés y/o ansiedad y los parámetros inmunológicos estudiados.

Conclusiones. El estrés psicológico asociado al cáncer de mama provoca alteraciones inmunológicas disminuyendo la respuesta celular innata y adaptativa. Estas alteraciones son dependientes del grado de estrés y ansiedad. Una vez que el estrés cesa y se ha "superado" la enfermedad, se produce una recuperación de la capacidad fagocítica y de la respuesta oxidativa de los monocitos, así como una clara mejoría de la respuesta funcional de los linfocitos T CD4.

O-104

HIPERZINCEMIA: SÍNDROME AUTOINFLAMATORIO CRÓNICO E INFECCIÓN RECURRENTE. I. Sologuren Marrero¹, I. Barrios Del Pino², E. Herrera Ramos¹, R. López Almaraz², E. Santiago Quintana¹, Y. Florido Ortega¹, N. González Quevedo¹, E. Colino Gil³, O. De La Calle⁴, J.I. Aróstegui Gorospe⁵, C. Rodríguez Gallego⁵. ¹Hospital Universitario de Gran Canaria "Dr" Negrín, Las Palmas De Gran Canaria. ²Hospital Universitario De Canarias, Santa Cruz De Tenerife. ³Hospital Universitario Insular Materno Infantil, Las Palmas De Gran Canaria. ⁴Hospital Sant Pau, Barcelona. ⁵Hospital Clínic De Barcelona, Barcelona.

Introducción. Las inmunodeficiencias primarias (IDP) son un grupo heterogéneo de enfermedades. Los pacientes presentan generalmente infecciones recurrentes, aunque los síndromes autoinflamatorios se caracterizan por episodios no provocados de inflamación. Entre estos últimos cabe destacar las inflamasomopatías (alteraciones en la activación de IL-1β, Fiebre Mediterránea Familiar -FMF-, Síndrome hiper IgD -HIDS-, criopirinopatías -FCAS, MWS, NOMID/CINCA-) y los defectos del TNF-receptor (TRAPS), que presentan episodios de inflamación estériles, crónicos o generalmente periódicos.

Paciente. Varón con infecciones recurrentes por Gram negativos desde los 17 días de edad: abscesos perianales y de glúteo, absceso hepático por *E. coli* y sepsis nosocomial por *P. aeruginosa*. El paciente presentaba frecuentemente neutropenia, anemia y trombocitopenias graves. Retraso estaturo-ponderal.

Resultados. En cultivos de sangre total no activados se observaron valores muy altos de citocinas inflamatorias, que no respondían a la estimulación con lipopolisacáridos. Se confirmó un síndrome de inflamación crónico: PCR 75-206 mg/L; VSG 72-164 mm/hora; ferri-

tina 941-4652 mg/dL; fibrinógeno 713 mg/dL y fiebre persistente, incluso en ausencia de infección. Se descartaron IDP clásicas, los síndromes autoinflamatorios asociados a inflamasoma, TRAPS y otros síndromes autoinflamatorios.

La presentación clínica sugirió síndrome de hiperzincemia e hiper-calprotectinemia, una enfermedad muy rara (7 casos descritos), que se cree debida a una alteración de la producción de calprotectina (S100A8/A9). Se confirmaron valores extremadamente altos de Zn y S100A8/A9. Al compararlo con pacientes con HIDS, FMF, CINCA/NOMID, o TRAPs, el niño presentaba valores hasta 1000 veces más elevados de S100A8/A9 y de S100A12 (dos alarminas del citoplasma del neutrófilo con potente actividad proinflamatoria), niveles similares de IL-6 y elastasa de neutrófilos e inferiores de IL-8. El paciente fue tratado con ciclosporina A (CsA) y seguido durante dos años. Se aprecia una remisión de los síntomas de la enfermedad (fiebre, PCR, hemoglobina, clínica), que correlaciona perfectamente con la bajada de niveles de IL-6, pero no se aprecia efecto en otros mediadores proinflamatorios (S100A8/A9, S100A12, TNF- α , IL-1B, IL-8) o con niveles de Zn.

Conclusiones. El déficit de hiperzincemia causa una IDP con aumento de susceptibilidad a infección y síndrome autoinflamatorio persistente, no periódico. Responde a tratamiento con CsA, con un efecto clínico que correlaciona con bajada de niveles de IL-6 sérica. No se conoce la etiología. Nuestros datos indican que no es debido a desregulación de S100A8/A9.

O-105

LINFOPENIA CD4⁺ IDIOPÁTICA Y NIVELES DE EXPRESIÓN CD95/FAS: CORRELACIÓN CON SUSCEPTIBILIDAD A LA APOPTOSIS. *F. Silva Carreras, I. Hidalgo Izquierre, R. Alenda Asensi, E. Roldan Santiago, J.L. Castañer Alabau, A. Andrés Martín. Hospital Ramon y Cajal, Madrid.*

Objetivos. Caracterizar la linfopenia CD4⁺ idiopática como una entidad asociada a la sobreexpresión de CD95/Fas mediante análisis por citometría de flujo.

Material y Métodos. Dos pacientes varones de 48 y 65 años en los que se observó una progresiva inversión del cociente CD4/CD8 con serología negativa para VIH, virus linfotrópicos T y ausencia de otras inmunodeficiencias primarias. Caso 1: asintomático desde el inicio remitido por linfopenia importante (346/ μ L) observado en un hemograma. Caso 2: asintomático y remitido por inversión de cociente CD4/CD8 (0,6 y valor absoluto de linfocitos T CD4+ 282/ μ L), hallazgo durante seguimiento por una adenopatía en la que el estudio citológico por PAAF fue compatible con proceso reactivo.

Se estudió el porcentaje y el nivel de expresión del antígeno CD95 en los linfocitos CD4⁺ de ambos pacientes y de controles sanos, así como la inducción *in vitro* de apoptosis con el anticuerpo anti-CD95 (clón CH11), determinada como células Anexina + en cultivos de 24 horas.

Resultados. El porcentaje de células positivas para el antígeno CD95 en la población T CD4⁺ en controles sanos fue muy variable, por lo que no fue un buen parámetro diferenciador con respecto a los enfermos. Por el contrario, se detectó una población con intensidad media de fluorescencia (IMF) para CD95-PE \geq 300 (unidades arbitrarias), población no presente en sanos. Tal IMF correlacionó con la apoptosis *in vitro*, tanto espontánea como inducida con el clón CH11 (apoptosis

espontánea: 48% en enfermos, 8% en sanos; apoptosis inducida: 64% en enfermos, 15% en sanos).

Conclusiones. El nivel de expresión de CD95 es un excelente indicador de la linfopenia CD4 idiopática que, además, indica un "switch" del antígeno desde su forma inactiva hasta su forma activa.

O-106

INMUNODEFICIENCIA TAB-GD+B+NK+ DE COMIENZO TAR-DÍO CAUSADA POR UNA MUTACIÓN DE SPLICING EN EL GEN CD3D. *C. Chean Pacheco¹, J. Navarro Capistegui¹, D. Gurbindo Gutierrez¹, I. Gordillo Gutierrez¹, P. Pérez Breña², M.C. García Rodríguez³, P. Aparicio Rubio³, M.J. Recio⁴, J.R. Regueiro⁴, J. Gil Herrera¹. ¹Hospital General Universitario Gregorio, Madrid. ²Centro Nacional de Microbiología, Madrid. ³Hospital Universitario La Paz, Madrid. ⁴Universidad Complutense ee Madrid.*

Introducción. Todos los pacientes descritos con defectos en CD3% presentan inmunodeficiencia combinada severa (IDCS) en el primer semestre de vida y ausencia completa de linfocitos T incluyendo ambos linajes α/β y γ/δ .

Objetivo. Estudiar las características diferenciales de un caso de IDCS causada por una mutación de splicing en el gen CD3D.

Paciente y Métodos. Varón diagnosticado de IDCS a los 14 meses, con retraso ponderoestatural, dermatitis atópica, *muguet*, neumonía, crisis epileptiformes, diarrea por *Cryptosporidium* y colangitis esclerosante. Sometido a trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH, alogénico de donante familiar haploidéntico) a los 22 meses; el día +10 post-TPH presentó recuperación leucocitaria, y +12 un 100% de células del donante en sangre periférica (XX, por FISH con sonda CrX/Y). Utilizamos citometría de flujo (BD Bioscience), incorporación de H3Thy, nefelometría, ELISA y hemaglutinación.

Resultados. Al ingreso, los linfocitos totales eran normales (3300 células/ μ L) con linfopenia T (14%, 532 células/ μ L) a expensas de células TCR $\alpha\beta^+$ (CD4⁺ y CD8⁺, fenotipo de memoria y repertorio V β limitado), y un número normal de células TCR $\gamma\delta^+$; ambas coexpresaban CD25 y eran de origen antólogo. El tamaño del timo era normal pero las células T CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺ permanecieron muy bajas hasta el TPH. A pesar de la expresión reducida de CD3, TCR $\alpha\beta$ y TCR $\gamma\delta$, encontramos respuestas linfoproliferativas T *in vitro*. Los linfocitos NK (29%, 1102 células/ μ L) y B (54%, 2054 células/ μ L) eran normales, así como la IgG, IgA e IgM séricas.

Sin embargo, no se indujeron respuestas específicas tras inmunización (toxoido tetánico, virus Influenza y VHB). La hiperIgE (2141-4525 KU/L) e hipereosinofilia (800 - 5200/ μ L) se mantuvieron durante toda la evolución pre-trasplante. 9 meses post-TPH, los linfocitos CD3⁺ (3496/ μ L) se han normalizado, revertido la relación entre TCR $\alpha\beta$ (36%) $\gamma\delta$ (1%), aumentado la cifra de CD4⁺CD45RA⁺CD31⁺, y descendido la IgE sérica a 235 KU/L. La sintomatología digestiva ha mejorado, y desaparecido la presencia de *Cryptosporidium* en heces.

Conclusión. Se trata del primer caso de inmunodeficiencia selectiva de células T α/β (T $\alpha/\beta-\gamma\delta$ +B+NK+), y se asocia con un repertorio limitado de células T funcionales, comienzo tardío de las manifestaciones clínicas y rasgos Ommen-like. La reversión de las alteraciones inmunológicas y mejoría clínica del paciente tras el TPH apoyan la patogenicidad de esta nueva mutación en el gen CD3D.

SESIÓN 12: INMUNOLOGÍA TUMORAL

Moderadores: Ignacio Melero (Pamplona)
Angel M. García Lora (Granada)

O-107

REGRESIÓN DE METÁSTASIS TRAS INMUNOTERAPIA: IMPLICACIÓN DE GENES EFECTORES DE LA RESPUESTA INMUNITARIA Y LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA. R. Carretero¹, E. Wang², A.I. Rodríguez¹, A. Engle¹, M.L. Ascierto¹, F. Camacho³, F.M. Marincola², F. Garrido¹, T. Cabrera⁴. ¹Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ²National Institutes of Health. ³Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. ⁴Universidad de Granada, Granada.

Objetivos. Los tratamientos contra el cáncer basados en la activación de la respuesta inmunitaria no están demostrando los resultados esperados. Solo un bajo porcentaje de pacientes muestran una completa regresión tumoral, mientras que otro gran porcentaje no muestra una respuesta a la terapia, existiendo un grupo de respuesta mixta (regresoras y progresoras). El objetivo de este estudio es el análisis del patrón de expresión genómica de las diferentes lesiones de un paciente con respuesta mixta.

Material y métodos. Tras tratamiento immunoterápico con células tumorales antílogas más BCG, se obtuvieron 5 metástasis, 3 progresoras y 2 regresoras. El patrón de expresión génica analizado mediante microchips de expresión génica (30000 genes). Mediante el programa IPA se estudiaron las interacciones entre los genes diferencialmente expresados y las rutas metabólicas afectadas. Los resultados se confirmaron mediante marcaje con anticuerpos monoclonales.

Resultados. Se detectaron diferencias significativas en 424 genes ($p<0.05$) entre metástasis regresoras y progresoras. 131 de los genes sobreexpresados en metástasis regresoras están implicados directamente en la respuesta inmunitaria, incluyendo HLA clase I y II, genes activados por interferón (ISGs) como IRF1 y STAT 1 y moléculas efectoras (IEFs) como granzima B CD16, TCR... Las rutas metabólicas activadas durante la regresión son la presentación antigénica y el rechazo inmunitario. Las tinciones inmunohistoquímicas mostraron que existe un patrón de infiltración diferente entre los 2 grupos de metástasis, y que las metástasis progresoras no tienen expresión de HLA B y C

Discusión. Los análisis demostraron claramente que las metástasis en regresión tienen mucho más activadas las vías del rechazo inmunitario (ISGs e IEFs). Por lo tanto se demuestra que la inmunoterapia es capaz de activar la eliminación de alguna metástasis, pero otras pueden evitarla y progresar. Los datos muestran que las moléculas HLA juegan un papel fundamental en el reconocimiento y eliminación tumoral. Si la inmunoterapia no puede recuperar la presentación de antígenos tumorales a los linfocitos, se impide que el sistema inmunitario pueda reconocerlo y activar la respuesta de rechazo frente al tumor.

O-108

NIVELES SÉRICOS DE INTERLEUCINA 6 EN PACIENTES SOMETIDOS A COLONOSCOPÍA DIAGNÓSTICA POR SOSPECHA DE CÁNCER COLORRECTAL. A. Fernández Suárez, M.A. Marín Moreno, J.L. Domínguez Jiménez, J.M. Aguilar Benítez, J.J. Puente Gutiérrez, D. Fatela Cantillo, M.J. De La Torre Calzada, O. Elorza Maza, J.M. Díaz Iglesias. Hospital Alto Guadalquivir, Andújar.

Introducción. La interleucina-6 (IL-6) es una citocina pleiotrópica perteneciente a la familia de las hematopoietinas. Está implicada

en la activación de los hepatocitos para provocar la síntesis de proteínas de fase aguda. La producción de IL-6 se induce rápidamente en las reacciones inflamatorias que acompañan la muerte cerebral, lesiones, traumas, estrés, infecciones y diversas neoplasias.

Objetivos. Determinar los niveles séricos de la IL-6 en pacientes con sospecha de cáncer colorrectal (CCR) sometidos a colonoscopia diagnóstica, para evaluar su utilidad como marcador en esta patología. Como objetivo secundario se intentará averiguar si existe alguna relación entre la concentración de IL-6 y las principales variables pronósticas (anatomía patológica).

Material y Métodos. Los pacientes incluidos procedían de tres hospitales de la provincia de Jaén adscritos a la Empresa Pública Hospital Alto Guadalquivir. Todos los pacientes presentaban sospecha clínica de CCR, siendo remitidos por Aparato Digestivo a la Unidad de Endoscopias para realizar una colonoscopia diagnóstica. Se recogieron muestras de suero consecutivamente entre abril de 2008 y julio de 2009. Todos los análisis fueron realizados antes del procedimiento de colonoscopia. Se tuvieron en cuenta los ritmos circadianos de la IL-6, realizando todas extracciones de suero a la misma hora de la mañana (10:30 horas). Los niveles séricos de IL-6 (pg/mL) se analizaron mediante un inmunoensayo "ECLIA" de electroquimioluminiscencia concebido para ser utilizado en los analizadores cobas e601 del Modular cobas® 6000 (Roche Diagnostics). Los niveles séricos de IL-6 no seguían una distribución normal. Los datos se analizaron mediante el programa SPSS, versión 11.0.

Resultados. Se recogieron muestras de suero a 170 pacientes [edad media 61.5 años (20-93), 54.1% mujeres]. La colonoscopia seguida de la anatomía patológica confirmó el diagnóstico de CCR en 30 pacientes. El resto de diagnósticos encontrados fueron: 36 pacientes presentaron pólipos (20 hiperplásicos y 16 adenomas, siendo 11 de ellos adenomas avanzados), 59 enfermedades digestivas benignas, 5 neoplasias no CCR, 4 otras patologías no tumorales ni digestivas (cólico nefrítico, EPOC, síndrome de Sjögren, pólipos endometriales), y en 36 pacientes no se evidenció ninguna patología relevante. La mediana (percentil 25 – percentil 75) de la concentración sérica de IL-6 para el grupo con CCR fue 5.68 pg/mL (3.77-10.17), para el grupo de pólipos 3.09 pg/mL (2.00-6.16), para el grupo con enfermedades digestivas benignas 2.48 pg/mL (1.58-6.05), para otros cáncer no CCR 8.55 pg/mL (1.63-11.73) y para los pacientes sin evidencia de enfermedad 2.77 pg/mL (1.66-3.96). De acuerdo a la clasificación TNM, los niveles de IL-6 para T1, T2, T3 y T4 fueron 1.75 pg/mL (1.50-2.00), 4.72 pg/mL (2.93-8.55), 5.54 pg/mL (4.00-9.40) y 30.03 pg/mL (20.10-51.65) respectivamente. Sólo se encontraron diferencias significativas para T4 ($p=0.021$). Se encontraron valores muy elevados para N3 y M1. Los niveles de IL-6 sólo correlacionaron con las variables tamaño tumoral (cm) y tumor primario (Rho de Spearman 0.433, $p=0.027$ y 0.435, $p=0.021$ respectivamente). La IL-6 no mostró ninguna variación en su concentración dentro del grupo de pólipos (tamaño, morfología o número de pólipos, tipo de adenoma, presencia de adenoma avanzado). El área bajo la curva ROC (95% CI) para la IL-6 fue de 0.691 (0.587-0.795). Un punto de corte de 6.7 pg/mL de IL-6 mostraba una sensibilidad del 43.3% con una especificidad del 80.7% para la detección del CCR.

Conclusiones. La rentabilidad diagnóstica de la IL-6 para la detección del CCR es limitada, mostrando una sensibilidad similar a la del antígeno carcinoembriionario (CEA). Por otra parte, su especificidad es moderada, y no está restringida a este tipo de tumor, comportándose como una proteína de fase aguda. Su correlación con las variables tamaño tumoral y tumor primario (T) podría indicar una potencial aplicación como marcador pronóstico.

O-109

DESCUBRIMIENTO DE BIOMARCADORES ÚTILES EN EL DIAGNÓSTICO PRECOZ EN CÁNCER COLO-RECTAL MEDIANTE LA DETECCIÓN DE AUTO-ANTÍGENOS. *M. Fuentes García¹, M. González González², J.M. Sayagües¹, R. Bartolome Casado¹, J. Labaer², J. García¹, A. Orfao¹. ¹Universidad de Salamanca-CSIC, Salamanca. ²Center for Personalized Medicine, Tempe, United States.*

Los biomarcadores, particularmente aquellos con un alto valor predictivo, tienen un elevado potencial en Oncología, incluyendo la monitorización de la terapia o indicando progresión y/o detección precoz. Para descubrimiento de biomarcadores se ha empleado el propio sistema inmune del individuo, el cual produce respuestas humorales frente a proteínas antigenicas tumorales provenientes de alteraciones en niveles de expresión, mutación, degradación y/o localización. La presencia de anticuerpos frente proteínas tumorales antigenicas puede realizarse incluso antes de la aparición del cáncer. El reciente desarrollo de arrays de proteínas ofrece una herramienta ideal para el cribado selectivo de miles de proteínas frente a los sueros de los pacientes.

Objetivos. Detectar auto-anticuerpos frente a proteínas tumorales antigenicas de pacientes de cáncer colo-rectal en diferentes estadios sin presentar metástasis y su posterior validación.

Metodología. Mediante un novedoso sistema de arrays de proteínas, denominado NAPPA (*Nucleic Acids Programmable Protein Arrays*) (Science 2004, 305:86-90, Nature Methods 2008, 5:535-8) se realizará el screening de 25 sueros de pacientes con Cancer-Colorectal y 25 pacientes pre-y post- tratamiento neoadyuvante frente a más de 2000 proteínas humanas tumorales antigenicas.

Resultados y Conclusión. Se han detectado anticuerpos frente a proteínas tumorales como por ejemplo entre otras: K-RAS, p53, CXCL1, SPARC, gastrin,... Estos resultados se han validado mediante iFISH (*Fluorescence in situ hybridization*) y SNPs arrays mostrando alteraciones genéticas en aquellas células tumorales diferentes en aquellos pacientes con respuesta favorable en el tratamiento neoadyuvante.

O-110

INFILTRACIÓN DE CÉLULAS TREGULADORAS (CD4⁺FOXP3⁺) Y CD8⁺LAP⁺ Y AUSENCIA DE CÉLULAS TH17 EN PIEZAS TUMORALES DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO. *A. Aguinaga Barrilero¹, A. Gutiérrez Calvo², J.M. Martín Villa¹. ¹Facultad de Medicina, UCM, Madrid. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.*

Objetivo. Se han realizado diversos estudios sobre la posible influencia de las células T reguladoras de las células Th17 en la proliferación de los tumores. Nuestro objetivo es valorar simultáneamente la presencia de ambas poblaciones en pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Material y métodos. Se han obtenido muestras de tejido tumoral y de sangre de 4 pacientes, 2 muestras de sangre adicionales de pacientes y 5 muestras de sangre de individuos control. Se han valorado por citometría de flujo marcadores de superficie y citoquinas específicas de las distintas poblaciones T (CD3, CD4, CD8, CD25, FOXP3, IL-17, IL-4, IFNγ). Como citoquina asociada a las células T reguladoras se ha analizado en este estudio el TGF, a través de la expresión de LAP (latency associated peptide), que forma el complejo inactivo latente TGF, y se detecta en la superficie celular.

Resultados. Los resultados obtenidos revelan un aumento significativo de células T reguladoras (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺) infiltrantes del tumor

en los pacientes con respecto al porcentaje de dichas células encontrado en las muestras de sangre de los individuos control ($3,3\pm2,5\%$ vs $0,4\pm0,5\%$; $p=0,014$). Las diferencias son casi significativas cuando se consideran las muestras de sangre de los pacientes ($3,3\pm2,5\%$ vs $0,8\pm1\%$; $p=0,052$). También hay diferencias significativas en la proporción de células CD4⁺FOXP3⁺ (CD25⁺), que se ve aumentada en el tejido tumoral con respecto a la encontrada en sangre tanto de pacientes ($3,2\pm2,1\%$ vs $0,6\pm0,7\%$; $p=0,03$) como de individuos control ($3,2\pm2,1\%$ vs $0,14\pm0,1\%$; $p=0,014$).

Además, hemos encontrado células CD8⁺ LAP⁺ en el tejido tumoral de pacientes, significativamente incrementadas con respecto a lo encontrado en la sangre de individuos control ($2,6\pm1,8\%$ vs $0,4\pm0,6\%$; $p=0,034$). Sin embargo, no hay diferencias significativas en la población CD4⁺ LAP⁺. Si consideramos el parámetro LAP⁺ (independientemente del fenotipo CD4⁺ o CD8⁺) se alcanza una significación marginal ($p=0,05$) cuando comparamos tejido tumoral y sangre de controles. Creemos que es la primera vez que se describe este hallazgo en humanos. Estudios previos habían descrito la presencia de células CD8⁺ LAP⁺ en un modelo animal de EAE con un papel supresor. En conjunto, nuestros datos sugieren un incremento de la expresión de LAP en pacientes respecto a sanos, independientemente del origen (sangre o tejido) o el tipo (CD4 o CD8) de la población celular analizada.

Finalmente, no se han encontrado datos relevantes con relación a la población de células Th17.

Conclusiones. Estos resultados sugieren que los mecanismos inmunitarios de inmunosupresión (Treg) están más presentes en el ambiente tumoral que mecanismos de proinflamación (Th17) y que, dentro de la función reguladora/inmunosupresora, no sólo las células del linaje CD4, ampliamente estudiadas, tienen un papel, sino también las células CD8.

*Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PS09/02096). Ana Aguinaga Barrilero es beneficiaria de una beca predoctoral concedida por la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

O-111

LA DEFECTUOSA EXPRESIÓN DE LA CADENA CD3ZETA EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO NO SE DEBE A CAMBIOS EN LA SECUENCIA DEL CDNA NI A BAJOS NIVELES DEL CORRESPONDIENTE ARNm. *A. Aguinaga Barrilero¹, M. Pérez Blas¹, A. Gutiérrez Calvo², N. Rodríguez Pérez¹, A. Blázquez², I. Lasa², J. Martín², J.M. Martín Villa¹. ¹Facultad de Medicina, UCM, Madrid. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.*

Objetivo. Estudiar la expresión de la cadena CD3ζ en linfocitos T de sangre periférica en un grupo de pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Material y métodos. Se obtuvieron muestras de sangre mediante venopunción de 34 pacientes con adenocarcinoma gástrico y 19 individuos sanos control y se aislaron linfocitos T de sangre periférica. Además, se obtuvo ARNm mediante extracción con Trizol y se retrotranscribió a cDNA. La determinación de los marcadores celulares (CD3ζ, CD3ε y CD45), se realizó mediante citometría de flujo. Se realizó secuenciación del cDNA obtenido y se midieron los niveles de ARNm mediante PCR cuantitativa.

Resultados. Se observó una expresión disminuida de la cadena CD3ζ en linfocitos T de pacientes, tanto en porcentaje de células que expresan esta cadena ($91\pm8\%$ vs $93\pm9\%$, $p=0,04$) como en valor de fluorescencia media (Mean Fluorescence Intensity, MFI; 405 ± 516 vs 729 ± 479 ,

$p=0.057$). De una manera concordante, otras cadena pertenecientes al complejo TCR-CD3, (tal como CD3 ϵ) mostraron también una menor expresión ($68\pm15\%$ vs $77\pm6\%$, $p=0.03$; MFI 265 ± 64 vs 334 ± 74 , $p=0.002$), mientras que otras moléculas fuera de este complejo (CD45) no mostraron diferencias. Estudios adicionales de secuenciación del cDNA de CD3 ζ y medición de niveles del correspondiente ARNm, no revelaron diferencias entre los pacientes y los individuos control.

Conclusiones. Se confirma una baja expresión de la cadena CD3 ζ en linfocitos T de sangre periférica en pacientes con adenocarcinoma gástrico. El hecho de no encontrar diferencias en el cDNA ni en los niveles de ARNm apunta a que el defecto responsable de esta baja expresión parece estar localizado a nivel post transcripcional.

*Este trabajo ha sido financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria (FIS) (PI050572). Ana Aguinaga Barrilero y Noelia Rodríguez Pérez son beneficiarias de una beca predoctoral concedida por la Universidad Complutense de Madrid (UCM).

O-112

INDUCCIÓN DE APOPTOSIS EN CÉLULAS T LEUCÉMICAS POR LOS INHIBIDORES DE METILACIÓN DE ADN ZEBULARINE Y DECITABINE. *M.J. Ruiz Magaña, J.C. Morales Camino, M.A. Saldívia, M.D.C. Ruiz Ruiz. Universidad de Granada/Cibm, Armilla.*

Objetivos. Las alteraciones epigenéticas juegan un papel fundamental en el desarrollo y progresión de tumores. Una de las principales modificaciones epigenéticas en humanos es la metilación del ADN, alteración que suele provocar el silenciamiento de genes supresores de tumores. Existen compuestos farmacológicos que inducen la hipometilación del ADN y pueden revertir estas mutaciones siendo de gran interés en la terapia antitumoral. El objetivo de este trabajo ha sido conocer el efecto de los agentes desmetilantes decitabine y zebularine en células T leucémicas y en linfocitos T normales y su capacidad para inducir apoptosis en dichas células.

Material y métodos. Como células T leucémicas se usaron las líneas celulares Jurkat, CEM-6 y MOLT-4. Los linfocitos T normales se aislaron por selección negativa a partir de muestras de sangre de donantes voluntarios sanos; se activaron con fitohemaglutinina y anti-CD28 durante 20 horas y se mantuvieron 5 días en medio suplementado con IL-2. La determinación de células apoptóticas se realizó mediante tinción con ioduro de propidio y análisis citofluorimétrico. La expresión de proteínas se analizó mediante Western Blot. La producción de especies reactivas de oxígeno, la caída de potencial de membrana mitocondrial y la activación de la proteína pro-apoptótica Bak se ensayaron mediante citometría de flujo. El daño al ADN se determinó mediante ensayo cometá.

Resultados. Decitabine y zebularine inducen apoptosis dependiente de caspasas y de la activación de la ruta intrínseca o mitocondrial en líneas celulares T leucémicas, pero no en células T normales, en reposo o activadas. Además, estos agentes desmetilantes inducen daño al ADN y regulan la expresión de proteínas relacionadas con la inducción de apoptosis (como Apaf-1, Bax o c-IAP2). Las cinéticas de inducción de apoptosis, de inducción de daño al ADN y de regulación de proteínas sugieren que el mecanismo de acción antitumoral de estos agentes podría ser en cierto modo independiente de su actividad como inhibidores de la metilación del ADN.

Conclusiones. Los agentes desmetilantes decitabine y zebularine pueden ser una estrategia terapéutica interesante en el tratamiento de leucemias de células T dados sus múltiples efectos y su acción selectiva sobre células leucémicas.

O-113

REGULACIÓN DE LA ACCIÓN CITOTÓXICA DE LINFOCITOS T ACTIVADOS POR INHIBIDORES DE HISTONA DEACETILASAS. *C. Ruiz-Ruiz, C. Gómez-Jiménez, M.J. Ruiz-Magaña, M.A. Saldívia. Universidad de Granada, Armilla*

Objetivos. Los inhibidores de histona deacetilasas (HDACi) regulan la expresión de proteínas relacionadas con apoptosis, como ligandos y receptores de muerte, en células tumorales, induciendo así apoptosis en dichas células y modulando su sensibilidad a otras drogas terapéuticas. Nosotros hemos estudiado la posible capacidad de los HDACi para regular la expresión de ligandos de muerte en células con capacidad citotóxica y de esta manera potenciar la acción de las mismas sobre células tumorales.

Material y métodos. Se obtuvieron PBMCs de donantes voluntarios sanos por centrifugación en gradiente Ficoll-Histopaque y se descartaron los monocitos tras adhesión al frasco de cultivo. Las células T se aislaron por selección negativa mediante separación magnética y su activación se llevó a cabo por incubación durante 20 horas en presencia de fitohemoaglutinina-M y anti-CD28. Las células T activadas se utilizaron tras 5 días de cultivo en medio suplementado con IL-2. Como modelos de células tumorales se usaron células HeLa, SKBr3 y MCF-7 y como células normales células dediduales estromales. Los HDACi utilizados fueron vorinostat, MS-275, ácido valproico y butirato sódico. La determinación de células apoptóticas se realizó mediante citometría de flujo tras tinción del ADN con ioduro de propidio. El análisis de expresión de proteínas de membrana se llevó a cabo mediante citometría de flujo y la expresión de ARNm se determinó mediante PCR a tiempo real.

Resultados. El cocultivo de células tumorales con células T activadas en presencia de los mencionados HDACi, potencia la acción citotóxica de dichas células T. Este efecto no se observa cuando se utilizan células T en reposo y ocurre específicamente sobre células tumorales. Analizamos la capacidad de dichos inhibidores para regular la expresión de ligandos de muerte en células T activadas encontrando que no hay cambios en la expresión de TRAIL, aunque sí se incrementa la expresión de CD95L. Además las células tumorales, tras el tratamiento con los HDACi, son más sensibles a la apoptosis mediada por CD95L y otros ligandos de muerte.

Conclusiones. Los inhibidores de HDAC pueden regular la acción citotóxica de células T activadas sobre células tumorales ejerciendo un doble efecto: aumentando la sensibilidad de las células tumorales e incrementando la capacidad citotóxica de los linfocitos T.

O-114

GENERACIÓN DE ANTICUERPOS MULTIVALENTES PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUMORES SÓLIDOS *IN VIVO*. *Á. Cuesta Martínez¹, D. Sánchez-Martín¹, L. Sanz¹, M. Compte¹, L. Kremer², F.J. Blanco³, L. Álvarez-Vallina¹, ¹Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda. ²Centro Nacional de Biotecnología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas. ³CIC bioGUNE, Parque Tecnológico de Bizkaia.*

Objetivos. A partir del desarrollo de la tecnología del hibridoma para la generación de anticuerpos monoclonales y junto con el desarrollo de las técnicas de ingeniería genética, se han generado una gran variedad de anticuerpos recombinantes (AcR) con capacidad para localizar depósitos tumorales *in vivo*.

En este trabajo estudiamos las propiedades estructurales y funcionales *in vitro* e *in vivo* de un nuevo armazón proteico de origen eu-

riótico capaz de generar AcR trivalentes, denominado *Trimerbody*, formado por un anticuerpo monocadena (scFv) unido al dominio NC1, responsable de la trimerización del colágeno XVIII.

Material y métodos. Se realizaron estudios estructurales para la determinación de su naturaleza multimérica y estudios funcionales de ELISA frente al antígeno específico del scFv. Para determinar la ganancia en afinidad funcional (avidez) del *Trimerbody* frente al scFv monomérico, se realizaron estudios de Resonancia del Plasmón de Superficie (SPR). La localización de depósitos tumorales *in vivo* se realizaron mediante la conjugación de los anticuerpos con un fluorocromo de emisión cercana al infrarrojo

Resultados. Los estudios estructurales (centrifugación analítica y cromatografía de afinidad) demuestran que el *Trimerbody* se presenta en solución como una estructura trimérica perfecta, con un peso molecular de 110 kDa.

Los estudios funcionales demuestran que el nuevo formato *Trimerbody* presenta mayor capacidad de unión que el formato monomérico, indicando que el armazón NC1 no altera la capacidad de unión del scFv a su antígeno. Los datos obtenidos mediante SPR demuestran que el *Trimerbody* aumenta las constantes de unión respecto del scFv, con una mejora en 100 veces la afinidad funcional por su antígeno.

Los ensayos de localización de depósitos tumorales *in vivo* demuestran que el *Trimerbody* presenta mejores características para la localización de tumores sólidos, con mayor intensidad de señal y mayor tiempo de retención, que el mismo anticuerpo en formato monomérico.

Conclusiones. Estos datos indican que el armazón NC1 para la trimerización de scFvs mejora las propiedades funcionales *in vitro*, así como sus propiedades farmacocinéticas para la localización tumoral *in vivo*. Estos datos abren nuevas alternativas para la mejora y el desarrollo de procedimientos diagnósticos no invasivos del cáncer humano.

O-115

LA QUINASA ROCK: ¿UNA NUEVA DIANA TERAPÉUTICA EN EL TRATAMIENTO DE LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA?
C. Cuesta Mateos, M. Alfonso Pérez, S. Guasch, A. Beltran Nuñez, J.M. Zapata, C. Muñoz Calleja. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

Introducción. La Leucemia Linfática Crónica de células B (LLC-B) es una neoplasia incurable a fecha de hoy, caracterizada por una infiltración diseminada de células tumorales en médula ósea y órganos linfoides secundarios (OLS). Estos OLS proporcionan microambientes de supervivencia para las células de LLC que pueden así escapar a las terapias citotóxicas contribuyendo a la progresión de la enfermedad.

En este sentido, el receptor de quimioquinas CCR7 y sus ligandos, las quimioquinas homeostáticas CCL19 y CCL21, parecen jugar un papel esencial en la entrada de las células de LLC en los OLS. Previamente, nuestro grupo ya demostró que células de LLC de pacientes con linfadenopatía clínica migraban más eficientemente a los ligandos de CCR7 y que una de las vías principales implicadas en esta migración es la vía de la pequeña GTPasa RhoA.

Fasudil es un inhibidor químico de ROCK, la molécula efectora de RhoA, que actualmente se utiliza para el tratamiento de enfermedades cardiovasculares y para mejorar la capacidad cognitiva de las víctimas de infarto o en pacientes con Alzheimer.

Objetivo. Investigar el papel del fasudil en las vías de señalización dependientes de CCR7 tras activación con sus ligandos CCL19

y CCL21, implicadas en migración y supervivencia celular de las células de LLC, en busca de nuevas aplicaciones en el campo de la oncohematología.

Material y métodos. Se realizaron estudios de quimiotaxis y de apoptosis en presencia de fasudil y de los ligandos de CCR7, las quimioquinas CCL19 y CCL21. La activación de la GTPasa RhoA se estudió mediante ensayos de pull-down y el papel de la inhibición del fasudil sobre los sustratos de Rho mediante ensayos de inmunoblot.

Resultados. La actividad quimiotáctica inducida por los ligandos de CCR7, CCL19 y CCL21, en células de LLC se redujo significativamente en presencia de fasudil. Para descartar que la inhibición de la migración fuera debida a un efecto tóxico se realizaron experimentos de viabilidad celular en presencia de fasudil a 24, 48 y 96 horas que demostraron que la viabilidad de las células tratadas con fasudil es equiparable a la de las células sin tratar. Con el fin de confirmar que la inhibición de la migración tiene lugar a través del bloqueo de la vía Rho/ROCK/MLC se realizaron ensayos de inmunoblot en los que se constató que fasudil inhibe la fosforilación de MLC inducida por CCL19 o CCL21.

Conclusión. Estos resultados sugieren que los inhibidores de la vía RhoA/ROCK/MLC pueden tener una aplicación terapéutica en la LLC-B ya que bloquearíamos la entrada de las células de LLC en los nichos de supervivencia que constituyen los OLS, haciéndolas más sensibles a la terapia de elección empleada en cada caso. Pretendemos explorar esta posibilidad en ensayos preclínicos en un modelo murino de la enfermedad utilizando fasudil como agente único o en combinación con agentes terapéuticos de primera elección como fludarabina, ciclofosfamida o rituximab.

SESIÓN 13: INMUNIDAD Y TRASPLANTE

Moderadores: Jose Luis Vicario (Madrid)
Eduard Palou (Barcelona)

O-116

VALOR PRONÓSTICO DE LA DETERMINACIÓN DE IL-10 Y ANTICUERPOS ANTI-HLA SOLUBLE TRAS RECHAZO EN TRASPLANTE DE CORAZÓN. B. Manzanares Martín, R. Gonzalez Fernandez, J.M. Arizón Del Prado, M. Fries Casas, A. López Granados, J. Peña Martínez. Hospital Reina Sofía, Córdoba.

La IL-10 se postula que pueda jugar un importante papel en la tolerancia de los órganos trasplantados debido a su acción inmuno-supresora y antiinflamatoria. También la determinación de Acs anti-HLA soluble resulta de interés en el diagnóstico del rechazo.

Objetivos. Establecer si los niveles de IL-10 y de anticuerpos anti-HLA soluble tienen valor pronóstico en la evolución tras rechazo del trasplante de corazón y su importancia para predecir el riesgo posterior de padecer infecciones y rechazo.

Material y métodos. Se analizaron 25 pacientes trasplantados de corazón en nuestro hospital. Se recogieron muestras pretrasplante y postrasplante (días 1, 3, 5, 7, 15, 30 y posteriormente un control al mes hasta el año). Durante un cuadro infeccioso o de rechazo se realizaron determinaciones cada 2 días. Para la determinación en suero de IL-10 se utilizó la técnica Quantikine de R&D Systems. También se determinaron Ac anti-HLA soluble (técnica Pra-stat de Sangstat). El diagnóstico y grado de rechazo se hizo por criterios clínicos y anato-

mopatológicos según protocolos de seguimiento vigentes en este hospital. Los cuadros infecciosos fueron diagnosticados según los criterios establecidos en cada caso.

Resultados. La elevación de las cifras de IL-10 en el período posterior al episodio de rechazo se relaciona con una buena evolución del trasplante mientras que la falta de elevación de los valores de IL-10 o la disminución de ellos después del rechazo parece estar relacionado con una mala evolución del trasplante. La disminución de las cifras de acs anti-HLA soluble después del rechazo se relaciona con pronóstico favorable y buena evolución del rechazo. La falta de disminución o la elevación de las cifras de Anticuerpo anti-HLA soluble (PRA) después del rechazo se van a relacionar con mal pronóstico y mala evolución del trasplante,

Conclusión. Estos resultados podrían aconsejar la monitorización de los enfermos transplantados de forma rutinaria con estas determinaciones.

O-117

ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTI-HLA POR TECNOLOGÍA LUMINEX EN LA PREDICCIÓN DEL RECHAZO AGUDO EN PACIENTES DE TRASPLANTE RENAL. *J.L. Santiago, M.Á. Figueiredo, A. Rodríguez De La Peña, A. Sánchez-Fructuoso, I. Pérez-Flores, A. Barrientos. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.*

El trasplante renal sigue siendo a día de hoy la mejor terapia en pacientes con insuficiencia renal terminal para mejorar tanto su supervivencia como su calidad de vida. Aunque el rechazo agudo del injerto ha disminuido considerablemente en los últimos años, debido fundamentalmente a la mejora de los tratamientos inmuno-supresores, la realidad es que su impacto en la supervivencia del injerto a largo plazo ha sido menos eficaz de lo esperado. Es de sobra conocido que los anticuerpos donante específicos (ADEs) son un factor importante tanto en la aparición de episodios de rechazo como en la supervivencia del riñón. Sin embargo, el papel de los anticuerpos anti-HLA presentes en los pacientes antes del trasplante sigue siendo controvertido.

El propósito del estudio fue analizar si los pacientes con ADEs presentes en su suero antes del trasplante tenían peor pronóstico que los pacientes con anticuerpos anti-HLA pre-trasplante pero que no eran donante específicos. Los que presentaron algún episodio de rechazo fueron biopsiados y todos los pacientes hiper-inmunizados (HI) fueron sometidos al mismo protocolo de inducción: Timoglobulina, Tacrolimus, Micofenolato y esteroides.

Se analizó el suero del día del trasplante de 23 pacientes HI mediante el estudio *Single Antigen por Luminex*. Encontramos ADEs preformados en 13 pacientes que presentaron una mayor incidencia de rechazo humorar (OR=6.4; p=0.057) y celular (OR=14.4; p=0.02) que los pacientes con anticuerpos anti-HLA no donantes específicos. Además, la supervivencia del injerto a 2 años fue significativamente inferior en este mismo grupo (60% vs 100; p=0.01), de hecho los 5 pacientes que fueron trasplantados presentaban ADEs pre-trasplante. El valor predictivo de estos anticuerpos fue casi del 100% en los pacientes con ADEs positivos pre-trasplante que habían perdido el injerto anterior en el primer año post-trasplante.

En conclusión, los anticuerpos anti HLA específicos frente al donante presentes en el suero del receptor antes del trasplante se asocian con un mayor riesgo de rechazo agudo y una supervivencia del injerto menor y se deben evitar en pacientes con perdida temprana del injerto en trasplante previos.

O-118

ALTA PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-HLA-DQ EN EL TRASPLANTE RENAL, EN PACIENTES CON GLOMERULOPATÍA DEL TRASPLANTE. *A. López Vázquez, J.M. Baltar, R. Alonso Arias, B. Suárez Álvarez, P. Menéndez, C. Díaz Corte, E. Gómez Huertas, F. Ortega Suárez, C. López Larrea. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.*

Introducción. La Glomerulopatía del trasplante (GT) es una patología caracterizada por el depósito de C4d en capilares peritubulares y la multilaminación de la membrana basal glomerular con imágenes en doble contorno. Se encuadra en el rechazo crónico activo mediado por Ac de la clasificación de Banff-07. Se ha descrito la alta prevalencia de anticuerpos anti HLA de clase II en pacientes con esta patología.

Objetivos. Analizar la prevalencia y especificidad de los Ac anti-HLA en la GT.

Métodos. Estudio retrospectivo con 11 trasplantes renales diagnosticados de GT. Se realizó la determinación de la presencia de anticuerpos anti HLA mediante los kits One-Lambda Labscreen Single Antigen de clase I y II.

Resultados. Solamente 3 pacientes presentaban Anticuerpos anti-HLA de clase I, que ya habían sido detectados pretrasplante y en ningún caso resultaron ser específicos de donante. La totalidad de los pacientes estudiados presentaban Ac anti-HLA de clase II, 8/11 frente a HLA-DQ solamente (73%), 1/11 frente a HLA-DR y DQ (9%), 1/11 frente a HLA-DR y DP (9%) y 1/11 frente a HLA-DP (9%). En ninguno de los casos estudiados se detectaron Ac anti HLA de clase II pre-trasplante. Dada la elevada prevalencia de Ac anti HLA-DQ, se evaluó mediante inmunohistoquímica y utilizando un anticuerpo monoclonal específico de esta molécula, su expresión en biopsias renales, encontrando un patrón de tinción similar a los depósitos de C4d que aparecen en el rechazo humorar, mayoritariamente en el endotelio de capilares peritubulares. En 9 de las 11 biopsias estudiadas se detectaron además depósitos de complemento,

Conclusiones. La elevada prevalencia de Ac anti-HLA-DQ así como la expresión de esta molécula en biopsias de pacientes con GT sugieren que HLA-DQ juega un papel predominante en el desarrollo de dicha patología. La determinación y el seguimiento post-trasplante de estos anticuerpos puede ser una herramienta muy útil en la detección precoz de la GT lo cual podría permitir el tratamiento de esta patología previo al establecimiento de un daño irreversible del injerto.

O-119

LABSCREEN SINGLE ANTIGEN CORRELACIONA MEJOR CON EL CROSSMATCH POR CITOMETRÍA DE FLUJO QUE LABSCREEN MIX. *L. Burgos Rodríguez, C. Moreno Parado, E. Domingo Rodríguez, J. Merino Roncal, A. Sánchez Ibarrola. Clinica Universidad De Navarra, Pamplona.*

La producción de anticuerpos frente a antígenos HLA se considera un claro factor de mal pronóstico para la supervivencia del órgano transplantado. Sin embargo bajos niveles de anticuerpos anti HLA pueden no ser perjudiciales, sino incluso beneficiosos para el pronóstico del injerto. La mayor sensibilidad de las técnicas de fase sólida (Luminex) para la detección de anticuerpos anti HLA obliga a correlacionar estos datos con los obtenidos mediante otras técnicas de

menor sensibilidad. En general los datos disponibles en la bibliografía son datos reales de series de trasplantados que correlacionan el crossmatch con datos previos de Luminex. Estas correlaciones han defraudado las expectativas debido presumiblemente a las características técnicas del ensayo y a la variabilidad de los anticuerpos que se detectan.

Material y Métodos. En el presente estudio hemos analizado la reactividad de 37 sueros de pacientes con anticuerpos anti HLA mediante las técnicas de Luminex, citometría de flujo y microlinfocitotoxicidad. Para la citometría de flujo ($n=71$ crossmatches) hemos enfrentando los sueros a 16 células tipadas para HLA de clase I, de tal forma que cada uno de los sueros presentan reactividad frente a un único antígeno de los expresados en los linfocitos tipados. Finalmente hemos comparado los resultados obtenidos de la citometría de flujo con los de fase sólida tanto en sistemas que detectan mezclas antigenicas (LABScreen Mix, One Lambda) como antígenos únicos (LABScreen Single Antigen, One Lambda).

Resultados. Se comprueba una correlación estadísticamente significativa ($r=0,83$) entre los valores de Luminex antígeno único y los movimientos de canal en la citometría de flujo. Hemos realizado un cálculo matemático para la definición del punto de corte de la fase sólida ($MFI= 6883$). Como cabría esperar, el LABScreen Single Antigen correlaciona mejor con la citometría de flujo que el LABScreen Mix ($r=0,49$).

Conclusiones. En este estudio hemos definido la intensidad media de fluorescencia con significado clínico relevante en la tecnología Luminex, mediante correlación con los datos de citometría de flujo y citotoxicidad.

O-120

VALORACIÓN DEL ESTADO INMUNOLÓGICO DE PACIENTES TRASPLANTADOS HEPÁTICOS INFECTADOS CON VHC. *J.M. Lucena, L. Barrera, C. Bernal Pulido, M.Á. Gómez Bravo, A. Núñez Roldán, M.F. González Escribano. Hospital Universitario Virgen Del Rocío, Sevilla.*

Objetivo. Valorar el estado inmune de pacientes trasplantados de hígado con infección por virus de hepatitis C (VHC) tanto antes del trasplante como durante el primer año post-trasplante mediante la monitorización de la activación de células T CD4⁺.

Material y métodos. Se incluyeron 13 pacientes infectados con VHC y trasplantados de hígado. El nivel de activación de células T CD4⁺ se monitorizó en función de la concentración de ATP (Immuknow®, Cylex). En cada paciente se realizaron 5 determinaciones: una antes del trasplante y las demás a los 15, 30, 90 y 180 días post-trasplante. Para establecer los niveles de concentración de ATP en células CD4⁺ en individuos sanos se utilizaron muestras de sujetos sin patología hematológica ni hepática. En cada muestra, además de la cantidad total de ATP en sangre, se determinó la concentración de células CD4⁺ mediante citometría de flujo y la concentración de ATP/célula CD4⁺. El análisis estadístico se realizó mediante el test no paramétrico Mann-Whitney U.

Resultados. En las muestras pre-trasplante, los pacientes infectados VHC presentan una cantidad total de ATP inferior a los controles sanos (133.3 ng/ml vs. 375.1 ng/ml, $p<0.0001$). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas con respecto a la concentración de ATP/célula CD4⁺ entre pacientes y controles sanos (0.33 pg/cel vs 0.42 pg/cel, $p=0.271$). A lo largo de estudio post-trasplante, se obser-

vó un incremento de la cantidad de ATP/célula CD4⁺ en los primeros 30 días ($p<0.0001$) y una disminución posterior hasta alcanzar los niveles previos del trasplante a los 180 días ($p=0.16$).

Conclusiones. La determinación de la concentración de ATP/célula CD4⁺ es más útil para comparar el nivel de activación de las células CD4. Durante el primer mes post-trasplante las células T CD4⁺ presentan un nivel de activación mayor como consecuencia de la reacción frente al órgano trasplantado. Pasado este tiempo el nivel de activación vuelve a los niveles previos al trasplante.

O-121

CARACTERIZACION DE SUBPOBLACIONES FUNCIONALES T Y B EN TRASPLANTE CARDIACO: ASOCIACION CON RECHAZO CELULAR. *J. Carbone Campoverde, A. Gallego López, N. Lanio Amador, J. Navarro Caspistegui, N. Del Pozo Rodríguez, J. Fernandez Yañez, E. Fernandez-Cruz, E. Sarmiento Marchese. Hospital Gregorio Marañón, Madrid.*

Introducción. Se desconoce el rol exacto de distintas subpoblaciones funcionales linfocitarias en la patogenia del rechazo definido clásicamente como celular tras el trasplante cardiaco. El rechazo celular se caracteriza por un infiltrado inflamatorio que incluye predominantemente linfocitos.

Objetivo. En este estudio evaluamos prospectivamente la dinámica de distintas poblaciones funcionales de linfocitos T y B en sangre periférica de 46 receptores adultos de trasplante cardiaco y su asociación con el desarrollo de rechazo celular.

Métodos. Inducción: 2-dosis de Daclizumab, 1 mg/kg IV (día 0 y 14); mantenimiento: tacrolimus o ciclosporina, micofenolato mofetil y prednisona. Estudios inmunológicos: Determinaciones seriadas de linfocitos B naïve y memoria; linfocitos T naïve, memoria, activados, reguladores y efectores CD4⁺ y CD8⁺. Estudio realizado mediante citometría de flujo en sangre total. Subpoblaciones linfocitarias expresadas como porcentaje del total de linfocitos CD19⁺, CD4⁺ o CD8⁺. Tiempos de estudio: Pre-trasplante, 7 días, 1 mes, 3 meses, 6 meses y un año post-trasplante. Los episodios de rechazo celular se definieron según criterios de la ISHLT incluyendo sólo grados 2R o superiores. El diagnóstico de rechazo celular se hizo a través de biopsia endomiocárdica realizada por protocolo o cuando aconteció clínica sugestiva. Los rechazos fueron tratados con bolos IV de metilprednisolona (250-500 mg/d) por 3 días, o prednisona 100 mg PO por 3 días consecutivos seguidos de reducción de la dosis.

Resultados. Los pacientes que tuvieron rechazo celular moderado o severo ($n=9$) en comparación con aquellos que tuvieron función estable del injerto mostraron a día 7 porcentajes más bajos de linfocitos B naïve (CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺, $p=0.04$), de células reguladoras CD4⁺ (CD4/CD127^{low}FoxP3⁺, $p=0.081$) y más altos de células CD8⁺ de memoria efectoras (CD8⁺CD45RA-CCR7⁻, $p=0.037$). A los 3 y 6 meses, los porcentajes de linfocitos B naïve fueron más bajos en los pacientes con rechazo ($p=0.06$ and $p=0.019$, respectivamente), mientras que el porcentaje de linfocitos B de memoria con cambio de isotipo (CD19⁺CD27⁺IgM⁺IgD⁺) fueron más altos ($p=0.022$ y $p=0.064$, respectivamente).

Conclusión. Los datos sugieren que niveles más altos de linfocitos B de memoria podrían estar implicados en la patogenia del rechazo celular. El rol potencial de las alteraciones de los distintos compartimentos de linfocitos B como biomarcadores de rechazo queda por definir.

O-122

VIGILANCIA DE ANTICUERPOS ESPECÍFICOS ANTI-HAEMOPHILUS INFLUENZAE EN PACIENTES CON TRASPLANTE CARDIACO E INFECCIONES. N. Del Pozo Rodríguez, E. Sarmiento, J. Navarro, J. Rodríguez-Molina, P. Muñoz, J. Fernández-Yáñez, J. Palomo, E. Fernández-Cruz, J. Carbone. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción. Se ha descrito que la hipogammaglobulinemia IgG puede ser un parámetro útil para identificar pacientes de trasplante cardíaco (TC) en riesgo de infecciones después del TC. La medición de anticuerpos específicos anti-polisacárido capsular *Haemophilus influenzae* tipo B (IgG anti-Hib) puede ser útil en la evaluación del estatus de la inmunidad humoral en pacientes con inmunodeficiencias. La vacuna anti-Haemophilus influenzae no se encuentra en el calendario vacunal previo al trasplante.

Objetivo. Evaluación de anticuerpos específicos IgG anti-Hib en una cohorte de pacientes TC con o sin complicaciones infecciosas bacterianas.

Materiales y Métodos. Realizamos estudio prospectivo en 70 pacientes con TC 2003-2009 (edad media=53,34 años, rango:22-69); Hombres=48 (68,6%), Mujeres=22 (31,4%). Se realizó la medición en suero de niveles de anticuerpos específicos IgG anti-Hib, mediante ELISA (Binding Site®): pre-trasplante (basal), 7 y 30d post-TC. Todas las muestras pre y post-trasplante fueron estudiadas al mismo tiempo. Terapia de inducción utilizada: Metilprednisolona y anticuerpos monoclonales anti-CD25. Terapia inmunosupresora de mantenimiento: Tacrolimus/Ciclosporina, Micofenolato mofetil y Prednisona. Se utilizó profilaxis universal con ganciclovir. Episodio Clínico: infección bacteriana que requirió terapia intravenosa durante el primer año de seguimiento post-TC.

Resultados. 21 pacientes TC (30%) tuvieron infecciones bacterianas. Microorganismos aislados: *Acinetobacter baumanii*, *Corynebacterium spp*, *Enterobacter aerogenes*, *Enterococo spp*, *Escherichia coli*, *Haemophilus influenzae B*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphilococcus aureus*, *Staphilococcus epidermidis*, *Sternotrophomomas maltophilia*, *Streptococo viridians*. En los pacientes TC observamos una disminución significativa de IgG anti-Hib tanto a día 7 (0,765mg/L) como a 30 días (0,655mg/L) post-TC respecto al basal (1,05mg/L), rango=0,11-9mg/L; p=0,008 y p<0,001 respectivamente, IC: 95%. Observamos en pacientes infectados una tendencia a disminución de IgG anti-Hib al mes (1,10±1,28mg/L) vs basales (2,00±2,56mg/L) p=0,055; IC:95%. Se observó una tendencia a menor concentración IgG anti-Hib 7 días post-TC en pacientes infectados vs no infectados (1,21±1,99 vs 2,01±2,47mg/L). Los niveles IgG anti-Hib basales y 30d post-trasplante eran similares en infectados y no infectados. Se ha sugerido que niveles anti-Hib >1mg/L son protectores a largo plazo.

Conclusiones. La vigilancia de IgG específica anti-Hib, en el seguimiento del trasplante cardíaco, tiene el potencial de identificar a aquellos receptores en alto riesgo de desarrollar infecciones bacterianas.

O-123

SIMULTANEOUS IMMUNE MONITORING OF SPECIFIC ANTI-CYTOMEGALOVIRUS HUMORAL AND CELLULAR RESPONSES IN HEART TRANSPLANT PATIENTS. E. Sarmiento Marchese¹, N. Lanio Amador¹, J. Carbone Campoverde¹, A. Gallego López¹, J. Navarro Caspistegui¹, J. Fernandez-Yáñez¹, R. Alonso¹, P. Muñoz¹, F. Kern².

¹Gregorio Marañón University Hospital, Madrid. ²Brighton and Sussex Medical School, Sussex, UK, United Kingdom.

Background. CMV reactivation is frequent and not harmless after heart transplantation (HT). Kern and Sarmiento have previously observed that assessment of specific humoral and cellular responses could identify patients at risk of CMV disease^(1,2).

Objective. To prospectively define combined quantitative thresholds of protective humoral and cellular CMV-specific responses after HT that discriminate patients at risk of CMV reactivation.

Patients. 38 CMV-seropositive adult HT patients receiving prophylactic IV ganciclovir (5 mg/kg bid during 14 days). Induction: daclizumab (day 0 and 14). Maintenance: tacrolimus or cyclosporine, mofetil mycophenolate and prednisone. Nine patients (24%) presented CMV reactivation, three of whom developed CMV disease.

Methods. Proportions of interferon-gamma producing peripheral blood CD4 and CD8 T-lymphocytes after ex vivo activation with CMV-IE-1 and pp65 peptide pools and serum titers of anti-CMV IgG were measured by flow-cytometry and ELISA, respectively. Pre-HT and 30d samples were collected. CMV antigenemia was detected by IF and confirmed by PCR during six months follow up.

Results. Pre-HT: CMV-IgG titer was higher in patients without antigenemia (24375 vs 9009, p=0.009). This difference remained at 30d (18162 vs 5682, p=0.002). Pre and 30d median values of CD8 responses were not statically different between the two groups but intra-patient analysis of IE1 responses showed that frequencies diminished more markedly over time in patients who developed CMV reactivation. Optimum Cut-off values after ROC analysis were 15500 titer for CMV-IgG and 0.41% for IE1-CD8/IFNγ⁺ frequencies at 30d post-HT. To calculate the positive and the negative predictive value (PPV and NPV), cases presenting both results below the cut-off were defined as "positive" and the rest as "negative". Cross-table analysis and the Wilson method provided PPV of 47% and NPV of 100% a sensitivity of 100% and specificity of 64% with and accuracy of 73% (95%CI). There were not significant differences among distinct clinical variables. Post-HT bacterial infections were more prevalent in patients who developed CMV reactivation.

Conclusion. The combined analysis of quantitative humoral and cellular responses could be a valuable monitoring tool for the design of prolonged prophylaxis strategies in selected patients.

References

1. JEM 2005;201(7):1031-36.
2. Int Immunopharmacol 2009;9(6):649-52.