

SESIÓN 1: AUTOINMUNIDAD

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

P-001

ESCLEROSIS SISTÉMICA Y ANTICUERPOS ANTI-RNA POLIMERASA III. V. Pérez Aradas, B. Joven, E. Pérez Aradas, M. Talise Astier, S. Lermo, M. Sevilla Sánchez, Y. Paredes, D. Valero Hervás, J. Alfaro, A. Serrano, P. Carreira. Hospital Doce de Octubre, Valdemoro

La Esclerosis sistémica (ES) es una enfermedad reumática autoinmune muy heterogénea caracterizada por daño microvascular y fibrosis de la piel y otros órganos. Estos pacientes presentan anticuerpos antinucleares como son los anticuerpos anticentrómero (ACA) y anti-topoisomerasa (Scl-70) (ATA) que se encuentran relacionados con distintas manifestaciones clínicas de la enfermedad. Sin embargo, estos dos son positivos en aproximadamente el 50% de los pacientes con esclerosis sistémica. Existen otros anticuerpos con características distintas cuyas principales dianas son las RNA polimerasas I, II y III (ARA) y que son los que se relacionan con mayor frecuencia con la enfermedad. Los pacientes con positividad para anticuerpos RNA polimerasa III no presentan ninguno de los demás anticuerpos que suelen encontrarse en pacientes con ES, como los ACA, ATA y anti-PM/Scl. Por tanto estos pacientes forman un grupo serológico separado. La prevalencia de este anticuerpo puede variar desde un 5% al 25%. Se ha demostrado que estos pacientes tienen un mayor riesgo de sufrir la forma cutánea difusa de la esclerodermia y una elevada probabilidad de desarrollar afectación cutánea mayor y nefropatía hipertensiva.

Objetivos. 1) Analizar la incidencia de anticuerpos anti RNA Polimerasa 3 (pol3) en pacientes con esclerosis sistémica (ES), y 2) Comparar las características clínicas del grupo de pacientes Pol3 (+) con los grupos de pacientes anti-topoisomerasa I (aScl70) (+) y anticentrómero (ACA) (+).

Pacientes y métodos. Pacientes con ES vistos en la consulta de reumatología entre enero y mayo de 2009, cuyas características habían sido incluidas previamente en una base de datos con información demográfica y clínica recogida prospectivamente. Se analizó el suero para la presencia de anticuerpos Pol-3, mediante ELISA. Las características clínicas de los pacientes Pol-3 (+) se compararon con las de otros dos grupos de pacientes: uno con aScl70 (+) y otro con ACA (+). Se utilizó Odds ratio con IC del 95% para medir la fuerza de asociación entre las variables cualitativas, y prueba t para muestras independientes para analizar las diferencias entre variables cuantitativas.

Resultados. De los 73 pacientes con ES analizados, 16% eran positivos para Pol3 y negativos para ACA y aScl70. Cinco tenían enfermedad difusa, 3 afectación muscular, 3 fibrosis pulmonar y 1 crisis renal, pero ninguno tenía hipertensión pulmonar (HP). Comparando el 16%

Pol3 (+) con el grupo de 65 pacientes con ES y aScl70 (+), los pacientes Pol3 (+) tenían una incidencia menor de fibrosis pulmonar (OR=0,02; 95%CI 0,05-0,85; p=0,04); y con el grupo de 98 pacientes ACA (+), los pacientes Pol3 (+) eran más jóvenes al inicio de la enfermedad (33 vs 48 años, p=0,02), y presentaban más enfermedad difusa (OR=4,6; 95%CI 1,2-16,8; p=0,03), más áreas avasculares en la capilaroscopia (OR=6,5; 95%CI 1,6-26,8; p=0,01), más contracturas en flexión (OR=7,0; 95%CI 1,2-41,7; p=0,05) y mayor afectación muscular (OR=6,9; 95%CI 1,4-34,7; p=0,03).

Conclusiones. Los anticuerpos anti-RNA polimerasa 3 aparecen en el 16% de nuestra población de pacientes con una edad menor al inicio de la enfermedad, afectación cutánea difusa, mayor afectación muscular y menor frecuencia de fibrosis pulmonar.

P-002

EXPRESIÓN DE FOXP3 Y OTROS MARCADORES DE CÉLULAS REGULADORAS EN PACIENTES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. C. Prado Cueto¹, J. Gómez Arbesú², B. De Paz Cazón¹, J. Rodríguez Carrio¹, P. López Suárez², C. Gutiérrez Martín², A. Suárez Díaz¹. ¹Universidad de Oviedo, Oviedo. ²Hospital Universitario Central de Asturias.

Objetivos. El análisis de las células Treg Foxp3+ en el LES ha mostrado resultados contradictorios, habiéndose descrito recientemente una elevada expresión de este marcador en linfocitos CD25-. Por ello nos propusimos cuantificar la expresión de marcadores de células Treg en linfocitos CD4+ de pacientes de LES en función de su expresión de CD25.

Pacientes y métodos. Mediante citometría de flujo se analizó la expresión de CD4, CD25, Foxp3, CD127, CD45RO, CCR4 y CCR6 así como los niveles séricos de IFN α , RANTES y MIP1 α en 19 controles y 69 pacientes de LES, de los que se registraron parámetros clínicos e inmunológicos, actividad (SLEDAI) y tratamiento recibido durante los últimos tres meses.

Resultados. El porcentaje de células FoxP3+ y Foxp3+CD127-/low aparece significativamente elevado en pacientes comparado con controles (p<0,001 y p<0,007, respectivamente). Este incremento no se debe a las células Treg clásicas, ya que la frecuencia de células CD25high-Foxp3+ y CD25highCD127-/low es similar en ambos grupos, mientras que la población CD25highCCR4+CCR6+ desciende (p<0,041). El alto porcentaje de células Foxp3+ en pacientes se debe a la elevada expresión de este marcador en linfocitos CD25- (p<0,0005) y CD25low (p<0,0004), observándose también una mayor proporción de células CD25lowCD127-/low (p<0,008), de acuerdo con su estado de activación celular. Además, se encontró una correlación negativa entre los porcentajes de CD25-Foxp3+ y CD4+ (r=-0.404, p<0,00009), población que disminuye en pacientes de LES durante el transcurso de la enfermedad, siendo significativo un año después del diagnóstico (p<0,004). De hecho, clasificando a los pacientes en función de este parámetro, sólo aquéllos con una evolución mayor de 1 año presentan un porcen-

taje elevado de células Foxp3+ ($p<0,0003$) y CD127-/low ($p<0,002$) en la subpoblación CD25-, mientras que en los pacientes de diagnóstico reciente los porcentajes son similares a los controles. No se observó correlación con SLEDAI, título de anti-dsDNA o niveles séricos de IFN α , RANTES o MIP1 α .

Conclusiones. Los linfocitos CD4+CD25-Foxp3+ están aumentados en el LES, fundamentalmente en pacientes con una duración de la enfermedad mayor de 1 año. Este incremento podría deberse en parte a la apoptosis o muerte selectiva de células activadas Foxp3- en pacientes con un proceso inflamatorio crónico.

P-003

EVALUACIÓN DEL VALOR DIAGNÓSTICO DE LAS BIOPSIAS DE BULBO DUODENAL EN NIÑOS CON ENFERMEDAD CELÍACA. A. Andrés Martín, N. Marín Crespo, S. Mirete Bachiller, C. Camarero Salces, G. Roy Ariño. Hospital Ramón Y Cajal De Madrid, Madrid.

Objetivos. Comparar la distribución de las distintas sub-poblaciones de linfocitos intra-epiteliales (LIEs) en bulbo duodenal frente a duodeno distal, con el fin de poder ser utilizado en el diagnóstico de la enteropatía celíaca.

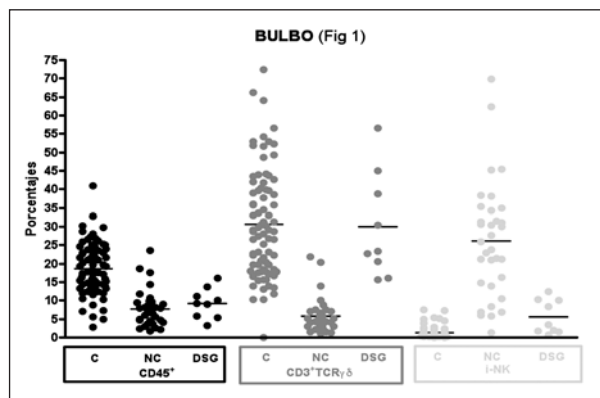
Material y métodos. Se han analizado por citometría de flujo (CTM) 81 biopsias procedentes de pacientes celíacos (C), 33 de no celíacos (NC) y 9 de celíacos en tratamiento (DSG), obtenidas de duodeno distal y bulbo, comparando las 3 sub-poblaciones que se utilizan en el diagnóstico rutinario en nuestro Servicio: CD45+, CD3+TCR $\gamma\delta$ +, CD103+CD3- (NK intestinales). Todos los resultados se confirman con los datos histológicos y serológicos.

Resultados. En la tabla 1 se muestran los porcentajes (media \pm ES) de las diferentes sub-poblaciones analizadas comparando los datos obtenidos en duodeno (D) frente a bulbo (B), sin que se observen diferencias estadísticamente significativas.

Tabla 1.

	Celíacos		No celíacos		DSG	
	D	B	D	B	D	B
CD45+	19,9 \pm 0,7	18,7 \pm 0,7	8,9 \pm 0,7	7,8 \pm 0,9	11,7 \pm 1,7	9,3 \pm 1,4
CD3+ TCR $\gamma\delta$ +	29,9 \pm 1,4	30,7 \pm 1,6	6,7 \pm 1,1	5,8 \pm 0,8	29,0 \pm 4,8	29,9 \pm 4,7
i-NK	1,5 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2	31,8 \pm 3,0	26,2 \pm 2,7	7,0 \pm 1,3	5,6 \pm 1,5

En el bulbo se reproducen las diferencias estadísticamente significativas ($P<0,001$) que se observan en la distribución de las sub-poblaciones del duodeno entre los diferentes grupos diagnósticos (Fig. 1).



Conclusiones. Confirmamos una buena técnica diagnóstica para la enfermedad celíaca basada en las alteraciones inmunológicas de la enfermedad, que no es parcheada y se mantiene constante a lo largo del duodeno, pudiendo también utilizarse en los casos de diagnóstico dudoso (dato que se presentará en la sesión).

P-004

CARACTERIZACIÓN DE PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTI PÉPTIDOS CITRULINADOS. E. Ruiz Ortiz De Arrizabaleta¹, D. Grados², A. Marín¹, I. Salvador¹, A. Teniente Serra¹, A. Briega¹, S. Holgado², M. Martínez-Morillo², X. Tena², R. Pujol-Borrell¹, E. Martínez-Cáceres¹. ¹LIRAD-BST-HUGTIP, Badalona. ²REUMATOLOGÍA-HUGTIP.

Introducción. La determinación de Ac anti-péptidos citrulinados tiene valor diagnóstico y pronóstico en la artritis reumatoide (AR), con una sensibilidad similar a la del factor reumatoide y una mayor especificidad. A pesar de eso, se ha descrito su presencia en otras enfermedades y en personas sanas.

Objetivo. Describir las características clínicas de una cohorte de pacientes con Ac anti-péptidos citrulinados positivos.

Pacientes y métodos. Estudio retrospectivo realizado en el HUG-TiP (población de referencia: 700.000 habitantes) durante el periodo 2007- Febrero 2010. Se revisaron las historias clínicas de los pacientes con valores de Ac anti-péptidos citrulinados (anti-vimentina citrulinada mutada) ≥ 20 U/ml excluyendo aquellos casos sin información clínica. Técnica utilizada: ELISA Anti-VMC (Orgentec).

Resultados. Se realizaron 1.310 determinaciones, de las cuales 449 fueron positivas (34,3%). Se analizaron 335 pacientes (109 hombres (32,5%) y 226 mujeres (67,5%)).

En 240 casos (71,6%) los pacientes presentaron una enfermedad reumática asociada. El 67,9% de los pacientes con AR presentaron valores >100 U/ml; eran especialmente elevados en las formas seropositivas y erosivas. En los casos de conectivopatías y vasculitis los valores encontrados fueron entre 20 y 50 U/ml. Siendo >50 U/ml solo en 7 pacientes: 3 LES, 3 Sínd. Sjögren (SS) y 1 poliarteritis nodosa (PAN). La distribución en enfermedad de Still, reumatismo palindrómico y AR del anciano fue similar para todos los valores. El 73% de artritis no filiadas presentaron valores entre 20-50 U/ml. En el grupo miscelánea (artritis psoriásica, artritis por microcristales, polimialgia reumática, sarcoidosis, artritis asociada a enfermedad inflamatoria intestinal y artritis postinfecciosa) el 71,4% presentó valores <50 U/ml. Tan solo superó el valor de 100 U/ml 1 caso de polimialgia reumática, 1 caso de condrocalcinosis y 1 paciente con neoplasia de pulmón.

Noventa y cinco casos (28,4%) no presentaron enfermedad reumática asociada. 16 pacientes (17%) presentaron valores >50 U/ml (3 fumadores). En 6 casos los valores fueron >100 : 2 casos de nefropatía hipertensiva, 2 de neumopatía (hipertensión pulmonar y fibrosis pulmonar idiopática), 1 de anemia hemolítica autoinmune y 1 caso de drepanocitosis.

Conclusiones. A pesar que los Ac anti-péptidos citrulinados son muy específicos de AR, se han descrito en otras enfermedades reumáticas. Valores >50 U/ml tienen un valor predictivo positivo (VPP) del 66% (76% si >100 U/ml) para el diagnóstico de AR, mientras que si consideramos como positivo un valor >20 U/ml, el VPP baja hasta el 39,1%. Por ello, en pacientes sin patología articular, valores entre 20-

50 U/ml deben considerarse negativos y esta determinación ha de ser valorada sólo en el contexto de una enfermedad reumática.

P-005

ALTERACIONES DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. L. García Ortiz¹, O.M. Garibay Vargas¹, G. García Castillo¹, M.E. Vargas Camaño¹, M.D.C. Chima Galán¹, J.C. Pérez Razo¹, J. Gutiérrez Salinas¹, J.J.M. Zaragoza Saavedra². ¹Centro Médico Nacional 20 De Noviembre ISS-STE, Ciudad De México, Mexico. ²Instituto Nacional De Cancerología, Mexico.

Objetivo. Identificar si existe diferencia en la cuenta de subpoblaciones linfocitarias (CD3, CD4, CD8) y en el cociente CD4/CD8 entre pacientes con esclerosis múltiple y controles sanos.

Introducción. La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad neurológica que con frecuencia causa invalidez, se caracteriza por una respuesta inflamatoria en la sustancia blanca, en donde las células T activadas entran al SNC y desencadenan una respuesta autoinmune. La liberación de citocinas por los linfocitos CD4+ cerca de las vainas de mielina puede mediar el daño directo y aumentar el ataque citolítico de los macrófagos y otras células inflamatorias. La cronicidad de la enfermedad puede inducir a las células CD8+ a inhibir la producción de IgG por medio de las células B y la disminución de las células CD4+ parece correlacionarse con supresión funcional. Al inicio de las recaídas los linfocitos CD8 están disminuidos en sangre periférica, secundariamente la relación CD4/CD8 esta aumentada. Aún no se sabe si esta alteración es resultado de la enfermedad o si se trata de una inmunodeficiencia que predispone a este padecimiento. No existen estudios donde se evalúen alteraciones en las subpoblaciones de linfocitos en pacientes con EM.

Material y métodos. Se realizó una investigación de casos y controles, de tipo observacional, transversal, prospectiva, comparativa y abierta, en donde se estudiaron 38 pacientes con esclerosis múltiple diagnosticados de acuerdo a los criterios de McDonald1 de 18 a 65 años de edad, atendidos por los servicios de Neurología e Inmunología del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" - ISSSTE. El grupo control estuvo constituido por 38 personas sanas, pareadas por sexo y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes ni neurológicas, que acudieron al Banco de Sangre del mismo Centro Médico. Se tomaron muestras sanguíneas, previo consentimiento informado, de cada uno de los participantes para la determinación de CD3, CD4 y CD8 por citometría de flujo. Se realizó un análisis exploratorio de las medidas de tendencia central de cada variable, y para determinar diferencias estadísticamente significativas entre los grupos se utilizó la prueba de T de Student.

Resultados. Las medias de las determinaciones de CD3, CD4, CD8 y del cociente CD4/CD8 en los pacientes con EM fueron las siguientes: 1109, 732, 383 y 2.45; mientras que en los controles se encontró: 1592, 953, 614 y 1.78, respectivamente. Los valores de t (3.52, 2.45, 3.92 y 2.21, gl= 75, $\alpha=0.05$) mostraron diferencias estadísticamente significativas para CD3, CD8 y el cociente CD4/CD8 ($P<0.05$).

Conclusiones. CD3 en los pacientes con EM los muestra portadores de linfocitopenia T. Los linfocitos CD8 también se encontraron disminuidos, lo cual condiciona un aumento en la relación CD4/CD8, como se ha reportado en este y otros trabajos. Queda por demostrar si esta disminución está asociada a una respuesta a infección viral crónica o es constitucional en estos enfermos.

P-006

ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTIHIPOFISARIOS (AAH) EN PACIENTES CON TRAUMATISMO CRANEOENCEFÁLICO (TCE). B. Dávila De Las Fuentes, A. Madrazo Atutxa, I.M. Martínez Morán, F. Murillo Cabezas, A. Leal Cerro, M.A. Montes Cano, A. Núñez Rolán. HHUU Virgen Del Rocío, Dos Hermanas, Sevilla.

Introducción. El hipopituitarismo es una complicación frecuente del TCE. Los posibles mecanismos que subyacen tanto en la recuperación como en el agravamiento de la función de la glándula pituitaria no están claros. La dinámica de cambios observados en la función de la hipófisis sugiere que el TCE podría disparar mecanismos de autoinmunidad responsables de esta alteración.

Objetivo. Investigar la prevalencia de AAH en pacientes con TCE.

Métodos. Se han estudiado 31 pacientes con TCE (26 varones/5 mujeres), con una edad media de $32,40 \pm 9,71$ años y con una GCS ≤ 8 , seguidos durante un año tras el TCE. Ninguno tenía antecedentes de patología autoinmune ni alteración hipofisaria. Se realizó un estudio de AAH durante la fase aguda, a los 6 y 12 meses del seguimiento mediante técnica de inmunofluorescencia indirecta, utilizando como sustrato secciones de lóbulo hipofisario anterior de primate (Euroimmun, Lubeck, Germany) e IgG preabsorbida con tejido de mono con el fin de minimizar el ruido de fondo.

Resultados. El 51,6% (16/31) presentaron un déficit aislado de hormona del crecimiento (GH). El resto no presentó déficit hormonal alguno. La presencia de AAH se detectó en 7 (22,6%). En 1 caso se detectó AAH a los 6 meses y en otro a los 12 meses, teniendo ambos un déficit aislado de GH. En los 5 casos restantes la presencia de AAH se detectó en la fase aguda. En 2 de ellos los AAH persistieron durante el seguimiento y no presentaron alteración hormonal. En los tres restantes, se negativizaron los anticuerpos, presentando solo uno de ellos déficit de GH.

Conclusión. Hemos encontrado una prevalencia elevada de AAH en los pacientes de nuestra población (TCE). Sin embargo, la presencia de alteraciones hipofisarias no parece estar relacionada con la existencia de AAH.

P-007

ESTUDIO COMPARATIVO ENTRE DOS ENZIMOINMUNOENSAYOS E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA PARA EL ANÁLISIS DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES. M.J. Martínez Becerra, C. Serrano Del Castillo, P. Tramón Gutierrez, M.J. Rodríguez Iglesias, P. Palomino Díaz. Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid.

Objetivos. El objetivo de nuestro estudio es comparar los resultados obtenidos al estudiar los anticuerpos antinucleares (ANA) por dos enzimoimmunoensayos (ELISA) diferentes con los observados por inmunofluorescencia indirecta (IFI) así como con los datos de las historias clínicas para evaluar su sensibilidad y especificidad.

Material y métodos. El estudio consiste en una evaluación prospectiva de un total de 144 sueros procedentes de diferentes servicios clínicos recopilados entre Noviembre 2009-Abril 2010.

Cada suero se analizó por dos técnicas de ELISA diferentes: ELiA ANA CTD Screen - Phadia® Diagnostics, Uppsala, Sweden- y el kit de QUANTA Lite® ANA -INOVA Diagnostics®, San Diego, CA-. Simultáneamente analizamos estos sueros por IFI (utilizando portas con dos tipos de sustrato diferentes: líneas celulares hep2 y cortes de triple tejido de rata -estómago, riñón e hígado-, ambos de INOVA®).

Las especificidades antigénicas correspondientes a los patrones observados en la IFI se confirmaron en cada caso mediante Inmunoblot (BlueDot. D-tek®) y ELIA® IgG ImmunoCap (Phadia® Diagnostics).

Resultados. Los datos de sensibilidad y especificidad que se obtuvieron al comparar ELIA ANA CTD Screen frente a IFI fueron 76% y 80% (VPP 0,71, VPN 0,84), mientras que con QUANTA Lite® ANA fueron 96% y 58% respectivamente (VPP 0,60, VPN 0,96).

Cuando comparamos los datos clínicos con los resultados obtenidos por ELIA ANA CTD Screen se observa una sensibilidad del 82% y una especificidad del 89%, con un VPP de 0,85 y un VPN de 0,86; los datos de sensibilidad y especificidad obtenidos con QUANTA Lite® ANA fueron 94% y 62% (VPP 0,66, VPN 0,92), mientras que por IFI fueron 75% y 88% respectivamente (VPP 0,84, VPN 0,81).

Conclusiones. Los resultados obtenidos reflejan que ELIA ANA CTD Screen presenta unos datos de especificidad similares a los obtenidos por IFI, considerado actualmente el método gold-standard para el cribado de ANA; sin embargo, QUANTA Lite® muestra una mayor sensibilidad y una menor especificidad; esto nos hace plantearnos cuál es el balance sensibilidad-especificidad deseado en un método preliminar de cribado de ANA. La incorporación de extractos de células hep2 podría explicar la mayor sensibilidad de QUANTA Lite® ANA.

P-008

VALOR DIAGNÓSTICO DE LOS ANTICUERPOS ANTI PÉPTIDO DE GLIADINA DEAMINADA. M. Alba Domínguez, E. Martínez-Ojinaga Nadal, J. Sarria Oses, B. San José, R. Álvarez Doforno. Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Antecedentes. La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía inmune causada por una sensibilidad al gluten en individuos genéticamente susceptibles, que afecta al 1% de la población.

Los métodos de diagnóstico serológico constituyen una herramienta no invasiva de cribado de individuos de riesgo y población general. El conocimiento de la eficacia diagnóstica de los marcadores serológicos en el diagnóstico de la EC varía de forma considerable de unos estudios a otros debido a múltiples factores, como son la selección de pacientes, diferencias poblacionales y variabilidad metodológica. La disponibilidad de nuevos kits comerciales para determinar anticuerpos contra péptido específico de la gliadina, ha creado expectativas para mejorar la detección serológica de la EC.

Objetivos. Estudiamos la validez diagnóstica de los marcadores serológicos utilizados en la rutina diaria para despistaje de EC y de los nuevos Anticuerpos anti péptido de Gliadina Deaminada isotipo IgG (GDG) e IgA (GDA).

Pacientes y Métodos. Se estudiaron 156 pacientes con un diagnóstico específico, 41 celíacos sin gluten, 44 celíacos con gluten y 71 no celíacos. En la muestra total hay 131 pacientes en edad pediátrica (74 son \leq de 3 años) y 25 pacientes adultos (\geq 16 años).

Se realizó la detección de Ac anti endomisio (EM) mediante Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) utilizando portas de esófago de mono (IMMCO).

Se determinaron los niveles de anticuerpos anti Transglutaminasa (anti TG), anti gliadina (AG) y anti péptido de gliadina deaminada (anti GD) de isotipo IgA e IGG mediante ELIA en ImmunoCAP 250 (Phadia), punto de corte sugerido por la casa comercial \geq 10 UI/mL.

Los resultados se analizaron empleando el programa estadístico SPSS. La validez diagnóstica de los ensayos fue calculada por análisis de la curva ROC (Receiver operating characteristic).

Resultados. Del análisis estadístico concluimos que para nuestra muestra, los marcadores que ofrecen diferencias estadísticamente significativas entre los grupos estudiados son los Ac anti endomisio, Ac anti TGA, Ac anti TGG y Ac anti GDG.

La especificidad y sensibilidad de los Ac anti EM fue del 97,2 y 95,5% respectivamente. El mejor punto de corte para los Ac anti TGA es de 15 UI/mL obteniéndose una sensibilidad y especificidad del 88,6% y 90,1% respectivamente.

Con respecto a los Ac anti TGG, para el punto de corte sugerido por la casa comercial 10UI/mL, obtenemos un 54,5% y un 100% de sensibilidad y especificidad, no siendo mejorado al cambiar dicho punto.

Para el marcador de los Ac anti GDG se ha obtenido un 93,2% de sensibilidad y una especificidad del 91,5%, ajustando el punto de corte a 7UI/mL.

Se analizaron los marcadores en los pacientes menores o iguales a 3 años y se encontró una especificidad y sensibilidad para los Ac anti TGA del 96% y 94% y para los Ac anti GDG del 96% y 91,6% respectivamente.

Conclusiones. En función de los resultados obtenidos en este estudio se aconseja realizar el despistaje inicial de enfermedad celíaca con la prueba Ac anti TGA estableciendo el punto de corte para esa técnica de 15 UI/mL. En niños \leq 3 años deberá ir acompañada de la determinación de Ac anti GDG aconsejándose un punto de corte de 7UI/mL.

Los Ac anti endomisio se utilizarían como técnica de apoyo en los casos dudosos.

P-009

METHOTREXATE EFFECT IN DISTRIBUTION AND APOPTOSIS OF LYMPHOCYTE POPULATIONS IN PATIENTS WITH RECENT-ONSET RHEUMATOID ARTHRITIS. G. Parada Hemoza¹, D. Díaz Martín¹, L. Chara Velarde¹, J. Chevarria Montesinos¹, A. Sánchez Atrio², Z. Moreno Villegas¹, L. Ortega Moreno¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto². ¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Purpose. To determine the effect and response to treatment with methotrexate on the distribution and susceptibility to apoptosis of different peripheral blood lymphocyte subsets of patients with recent-onset rheumatoid arthritis (RA).

Methods. We obtained peripheral blood samples of 21 patients diagnosed with recent-onset RA, before treatment and after 3 and 6 months of methotrexate treatment. We calculated the DAS-28 score to determine response to treatment and classifying patients into two groups: Satisfactory response (SRP) (n=15) (DAS28 \leq 3,2) and unsatisfactory response (URP) (n=6) (DAS28 \geq 3,2). Peripheral blood mononuclear cells were isolated and characterized using monoclonal antibodies and annexin-V by flow cytometry. The susceptibility to spontaneous and Phytohemagglutinin induces apoptosis was determined after 24 hour culture.

Results. We observed a significant increase in the percentage of activated helper T cells (CD3+CD4+ CD25+) in patients compared to controls, initially and during treatment. We also observed significant decrease of NK-cells in URP respect to SRP and controls, except at 6 months of treatment. In the course of treatment we observed a lower percentage of apoptotic T lymphocytes (CD3+) in URP and apoptotic activated helper T cells (CD3+CD4+CD25+) in both groups compared to controls. We also observed a decrease in the percentage of apoptotic NK-cells in SRP. At 24 hours of cultures, there was an increased

percentage of apoptotic cytotoxic T lymphocytes (CD3+CD8+CD28-) in URP with respect to SRP and controls, as well as a decrease in the percentage of apoptotic B lymphocytes compared to controls during treatment.

In Phytohemagglutinin induced apoptosis, during treatment we observed a significant decrease in the percentage of apoptotic cytotoxic T lymphocytes (CD3+CD8+) of patients with respect to controls. We also found an increase in the percentage of apoptotic B lymphocytes in PRS compared with controls.

Conclusions. Patients with recent-onset RA, showed alterations in the distribution and apoptosis of lymphocytes characterized by increased percentage of activated helper T cells and reduction of the percentage of apoptotic NK-cells. Methotrexate alters the distribution and apoptosis, increasing the percentage of activated helper T cells, apoptotic NK-cells and apoptotic CD3+CD8+CD28- cells while decreasing the percentage of T lymphocytes (CD3+) and B apoptotic in PRI but not in PRS.

P-010

UTILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS DEAMINADOS DE GLIADINA COMO PARÁMETRO ADICIONAL PARA EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA EN EL LABORATORIO CLÍNICO. P. Carrasco¹, J.M. Ferrer¹, S. Gordillo², R. Ferrer¹, N. Matamoros¹, E. Bravi³. ¹Hospital Son Dureta, Lluçmajor. ²Inverness Medical Ibérica³ Eurospital, Trieste.

Objetivo. La sensibilidad y especificidad de los anticuerpos anti-transglutaminasa (ATGA) para la detección de enfermedad celiaca se aproxima al 100%. Los anticuerpos anti-gliadina (AGA) tienen un valor limitado debido a su baja sensibilidad y especificidad. Recientemente se han desarrollado nuevos kits para la identificación de anticuerpos específicos contra péptidos deaminados de gliadina (PDG) para proporcionar una herramienta sensible y específica.

Nuestro objetivo fue evaluar la sensibilidad, especificidad y rendimiento de PDG en comparación a ATGA y AGA, actualmente utilizados en nuestro laboratorio.

Materiales y métodos. 216 muestras enviadas a nuestro laboratorio para estudio serológico de EC: Grupo 1: 137 muestras seleccionadas por ser positivas para ATGA y/o AGA. Estas incluyeron 67 celíacos, 6 pacientes celíacos con deficiencia selectiva de IgA, 4 celíacos en dieta sin gluten y 60 pacientes no celíacos. Grupo 2: 79 muestras seleccionadas por ser negativas para ATGA y AGA.

La detección serológica de ATGA y AGA se realizó mediante kits Elisa de Eurospital (Eu-tTG-IgA, Eu-tTG-IgG y α -gliatest IgA) y la detección de PDG IgA e IgG se realizó mediante Gliapép-A y Gliapép-G, respectivamente. Los anticuerpos anti-endomisio IgA (EMA) fueron detectados mediante inmunofluorescencia indirecta sobre portas de esófago de mono (IMMCO).

Resultados. Grupo 1: En los 67 pacientes con EC, Eu-tTG-IgA fue positiva en 99% de los casos, EMA en 89% y AGA en 73%. La positividad de Gliapép-A fue de 79% y para Gliapép-G de un 86% mientras su uso combinado obtuvo una positividad en 89% mostrando un mejor rendimiento que AGA.

Los pacientes con deficiencia de IgA fueron correctamente identificados por Eu-tTG-IgG y Gliapép-G.

De los 60 no celíacos, sólo 8 fueron positivos para Eu-tTG-IgA, 9 para Gliapép-G y 24 para Gliapép-A. 59 de 60 pacientes no celíacos fueron positivos para AGA.

Grupo 2: De los 79 sueros negativos para ATGA y AGA, todos fueron negativos para Gliapép-A y sólo 5 fueron positivos para Gliapép-G. Uno de ellos presentó un título alto de Gliapép-G y fue posteriormente diagnosticado como celíaco con deficiencia de IgA. Los otros 4 pacientes presentaban títulos bajos de Gliapép-G (<20 UI/ml) y correspondieron a pacientes pediátricos en estudio de EC pendientes de diagnóstico.

Conclusiones.

- PDG no pueden sustituir a ATGA en el diagnóstico de enfermedad celiaca, debido a su menor sensibilidad y especificidad.
- PDG pueden ser útiles por su alto valor predictivo negativo. PDG-IgG muestran una alta especificidad comparados con AGA, evitando la biopsia intestinal innecesaria de pacientes afectados por otros trastornos gastrointestinales.
- PDG-IgG son útiles para detección de pacientes celíacos con deficiencia selectiva de IgA. Usados en combinación con ATGA pueden evitar la cuantificación sérica de IgA en todos los sueros.
- PDG pueden ser utilizados en el diagnóstico precoz de enfermedad celiaca en niños con ATGA y AGA negativos.

P-011

UTILIDAD DEL RECuento E INMUNOFENOTIPAJE DE LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN LA MUCOSA INTESTINAL EN EL DIAGNÓSTICO DE ENFERMEDAD CELÍACA. J. Melero Ruiz, M. García Cerrada, M.L. Vargas Pérez, J.J. Fernández De Mera, M.I. Muñoz Sanjuan, E. Doblaré Castellano, C. Gonzalez Roiz. Hospital Infanta Cristina, Badajoz.

Introducción. El recuento elevado de los linfocitos intraepiteliales (LIE) totales es un hallazgo histológico clave en la Enfermedad Celiaca (EC). Los rangos de normalidad varían dependiendo de la técnica empleada.

Objetivo. Determinar el rango normal de los LIE y su lifograma (LIE-TCR $\gamma\delta$ y LIE-NK-Like) por citometría de flujo y establecer su rentabilidad diagnóstica en EC (población infantil y adulta).

Materiales y métodos. Se obtuvo biopsia duodenal y suero de 246 niños y 461 adultos con sospecha de EC. El diagnóstico histológico se basó en criterios histológicos clásicos (Marsh I o mayor) y/o serología positiva para EC (221 niños y 98 adultos con EC activa). El grupo control se constituye por individuos con biopsia Marsh 0 y serología celiaca negativa (25 niños y 363 adultos). Se realizó conteo de los LIE por citometría de flujo (y la proporción CD3+) (se expresan la media \pm DS). Se comparan los grupos con el test U de Mann-Whitney.

Resultados. Comparados con la población control, los niños con EC activa muestran aumento de la población de LIE (24,25 \pm 10,06 frente a 8,48 \pm 4,12), aumento de la proporción de TCR $\gamma\delta$ (29,26 \pm 13,18 frente a 11,48 \pm 6,78); y disminución de LIE-NK-Like (4,74 \pm 9,25 frente a 30,49 \pm 20,50). Al analizar el lifograma intraepitelial en la población adulta los resultados son: LIE (22,69 \pm 10,43 frente a 9,69 \pm 5,5), LIE-TCR $\gamma\delta$ (26,85 \pm 13,02 frente a 8,45 \pm 7,86) y LIE-NK-like (2,08 \pm 2,62 frente a 19,67 \pm 14,86). Se eligieron los puntos de corte de mayor rentabilidad clínica según las curvas ROC. En la población infantil se establecieron como puntos de corte: %LIE >14,2% (ABC 0,946; 95% IC 0,916-0,976); %TCR $\gamma\delta$ >16,5% (ABC 0,898; 95% IC 0,852-0,945); y de %NK-Like<10,1% (ABC 0,944; 95% IC 0,915-0,973). En la población adulta: %LIE > 14,2% (ABC 0,887; 95% IC 0,848-0,927); %TCR $\gamma\delta$ >16,1% (ABC 0,903; 95% IC 0,872-0,934) y %Nk-Like < 4,4% (ABC 0,960; 95% IC 0,942-0,977).

Conclusiones. La alteración del linfograma, fuera de los rangos establecidos de los 3 parámetros analizados, muestra una especificidad del 100% para el diagnóstico de EC Activa en el niño y en el adulto. El inmunofenotipaje de los LIE es una técnica muy útil en el diagnóstico de la EC que complementa el estudio anatomopatológico clásico aumentando su especificidad.

P-012

DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL ENTRE PANCREATITIS AUTOINMUNE Y CÁNCER DE PANCREAS: UTILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-ANHIDRASA CARBÓNICA II Y ANTI-ALFA 2 AMILASA. M. Sánchez Castañón, G. De Las Heras, C. Gomez, M. López Hoyos. Hospital Universitario Marques De Valdecilla, Santander.

Se ha descrito la presencia de diversos autoanticuerpos (autoAcs) en el suero de pacientes con pancreatitis autoinmune (PAI), aunque su empleo como marcadores diagnóstico y el perfil de autoAcs a emplear es materia de debate. Los más frecuentemente asociados son los Ac anti-anhidrasa carbónica II (AC-II) y, más recientemente, los anti-alfa 2 amilasa (AMY). En este trabajo hemos analizado la utilidad de distintas combinaciones de autoAcs junto con los niveles séricos de IgG4 para el diagnóstico de PAI. Estudiamos 106 pacientes con sospecha clínica de PAI y 94 como control de enfermedad que fueron vistos en nuestras consultas entre Junio de 2003 y Octubre de 2009. Los Acs anti-AC-II y anti-AMY se midieron mediante ELISA casero, mientras que los niveles de IgG4 se cuantificaron mediante nefelometría. Los resultados mostraron una sensibilidad igual para ambos autoAcs (83%) pero la especificidad fue mayor para los Ac anti-AMY (88%) que para los anti-AC-II (76%). La presencia de niveles elevados de IgG4 fue el marcador más específico (95%) pero con la sensibilidad más baja (58%). La combinación de niveles elevados de IgG4 y Ac anti-AMY o la combinación de IgG4 elevada junto con Acs anti-AC-II y -AMY tuvo la mayor especificidad (99%) y VPP (86%), pero con la sensibilidad más baja (50%). Cuando se combinó sólo la presencia de ambos autoAcs, la sensibilidad fue la más alta (75%) con un VPN elevado (98%). Sin embargo, la especificidad y VPP fue de 93% y 47%, respectivamente. Fue muy importante la ausencia total de Acs anti-AMY en los pacientes con cáncer de páncreas. En resumen, la combinación de la presencia de Acs anti-AC-II y -AMY con niveles elevados séricos de IgG4 es de gran utilidad en el diagnóstico diferencial entre PAI y cáncer de páncreas. Financiación.- FIS, IFIMAV.

P-013

DESPISTAJE DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES ASOCIADOS A CONECTIVOPATÍAS MEDIANTE ELISA. ESTUDIO EN PARALELO FRENTE A INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA. J.A. García Trujillo, S. Romero Chala, C. Cámara Hijón, L. Fernández Pereira. Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres.

Introducción. El estudio de anticuerpos antinucleares (ANA) se ha convertido en una determinación rutinaria de laboratorio y su solicitud ha crecido exponencialmente en los últimos años. Su interpretación requiere considerable experiencia, y existen numerosas discrepancias interlaboratorios. Aunque su sensibilidad es buena para las enfermedades del tejido conectivo, su especificidad es baja, pudiendo aparecer en numerosas enfermedades autoinmunes, infecciones, tumores e incluso en personas sanas. Se han hecho muchos esfuerzos en des-

arrollar un sistema no subjetivo y automatizado que pueda distinguir entre ANAs específicos de enfermedades del tejido conectivo y no específicos.

Objetivos. En este estudio hemos evaluado y comparado los ANAs realizados por Inmunofluorescencia indirecta y un nuevo ELISA automatizado desarrollado para detectar anticuerpos asociados a enfermedades del tejido conectivo (Elia CTD Screen, Phadia).

Métodos. 213 sueros enviados consecutivamente al laboratorio para descartar ANAs fueron analizados en paralelo mediante Inmunofluorescencia indirecta y Elia CTD screen (UNICAP 250). Los casos positivos fueron confirmados por Inmunoblot (IB) de ENAs, dsDNA por ELISA y por Crithidia luciliae.

Resultados.

- 144 sueros fueron negativos por ambas técnicas.
- 20 sueros fueron positivos por ambas técnicas. 18 de ellos fueron también positivos por inmunoblot o EIA-DNAs. Los 12 pacientes que tenían una enfermedad del tejido conectivo estuvieron en este grupo (SLE, Sjögren, esclerodermia y EMTC). 2 de estos 20 que habían dado un resultado positivo débil fueron negativos por IB y EIA DNAs (tenían una gastritis atrófica y una poliartralgia).
- 8 sueros fueron Elia-CTD screen positivos pero ANA-IFI negativos, uno de ellos tenía un Ro52 y VHC, 1 RNP y conectivopatía indiferenciada, 3 fueron EIA-DNAs positivos pero no tenían una enfermedad específica. En 3 no pudimos detectar ningún antígeno por IB.
- 41 sueros fueron ANA-IFI positivos pero CTD negativos. Ninguno de ellos tenía una enfermedad del tejido conectivo.

Conclusiones. Elia CTD screen tuvo una sensibilidad comparable a ANA-IFI y una especificidad superior (94,3% vs 78.8%). Creemos que podría ser una buena técnica de cribado, al menos en pacientes de Atención Primaria, donde el número de pacientes ANA negativos llega en nuestra experiencia al 80% de los casos.

Tabla 1.

ANA-IFI	Pos Neg	ANA-CTD		61 153 186	213
		Pos 20 8	Neg 41 144 28		

P-014

RELACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-NUCLEOSOMA CON LA ACTIVIDAD DEL LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO. L. Mozo Avellaned, J. Gómez Arbesú, J.L. Martín Alonso, A. Menéndez González, C. Gutiérrez Martín. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos. Análisis de la eficacia de los Ac anti-nucleosoma (NC), cuantificados mediante dos ELISA con distinta composición antigénica, en la evaluación de la actividad y la nefropatía en el lupus eritematoso sistémico (LES). Los NC han sido propuestos como el principal antígeno en la patofisiología del LES y, además, existe una amplia evidencia sobre la asociación de los Ac anti-nucleosoma (anti-Nc) con el daño orgánico. A pesar de ello, existen datos contradictorios sobre la eficacia de la determinación de estos autoAc en el diagnóstico y seguimiento del LES. Debido a la complejidad del antígeno, se ha sugerido que la composición antigénica utilizada en el método de evaluación puede ser una de las causas de estas diferencias observadas.

Material y métodos. Un ELISA utiliza mononucleosomas intactos humanos mientras que el otro utiliza NC altamente purificados. El estudio incluyó 106 pacientes de LES que cumplen los criterios del ACR. La actividad de la enfermedad se evaluó en 49 pacientes mediante un SLEDAI modificado en el que se excluyó la puntuación correspondiente a los Ac anti-dsDNA. En 28 pacientes, se confirmó la nefritis lúpica mediante biopsia.

Resultados. El SLEDAI se correlacionaba significativamente con los niveles de Ac anti-NC obtenidos con el ELISA con NC intactos como antígeno (0,387, $p < 0,01$, test Spearman) pero no con ELISA que emplea NC purificados. No se encontró asociación entre nefritis y la presencia de Ac anti-NC por ninguno de los dos métodos aunque los niveles de significación eran claramente mayores en el caso del ELISA con NC purificados. Finalmente, los niveles de Ac anti-dsDNA se correlacionaban mejor con el SLEDAI y nefritis que los de los anti-NC.

Conclusiones. La correlación entre los niveles de Ac anti-NC y la actividad del LES está influenciada por la composición antigénica, siendo mayor cuando se utilizan NC intactos. La pérdida de proteínas antigénicamente importantes durante el proceso de purificación puede ser una de las causas.

P-015

ALTA EFICACIA DIAGNOSTICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PEPTIDOS DEAMIDADOS DE GLIADINA DE ISOTIPO IGG PARA EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD CELIACA EN NIÑOS. L. Mozo Avellaneda, J. Gómez Arbesú, E. Escanlar Montese-rín, C. Bousño García, C. Gutiérrez Martín. Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivo. Evaluar la eficacia diagnóstica para la enfermedad celíaca (EC) de dos tests anti-peptidos deamidados de gliadina (dGp) IgA e IgG (Phadia, Freiburg, Alemania) en comparación con la de los anti-gliadina nativa IgA (anti-Glia).

Material y métodos. Se analizaron los sueros al diagnóstico de 100 pacientes con EC (37 niños ≤ 5 años y 63 > 5 años), positivos para Ac anti-transglutaminasa IgA y biopsia duodenal Marsh I-IV. El grupo control consistió en 100 individuos (32 ≤ 5 años y 68 > 5 años) con biopsia negativa, otras enfermedades autoinmunes o alergia a alimentos. La determinación de Ac anti-dGP IgG también fue evaluada en 6 pacientes celíacos con déficit de IgA.

Resultados. Los tres Ac analizados mostraban potencias diagnósticas (AUC) elevadas y similares. La más alta se obtuvo con anti-dGp IgG (99,5%) y la más baja con anti-Glia IgA (97,8%). Los Ac anti-dGp de ambos isotipos presentaron una sensibilidad y VPN similares y superiores a los obtenidos con los Ac anti-Glia IgA. Respecto a la especificidad y al VPP, los Ac anti-dGp IgG mostraron los valores más elevados. En los niños ≤ 5 años, los Ac anti-dGp IgG presentaron los valores más altos para todos los parámetros, llegando al 100% en todos ellos. En el grupo > 5 años, los Ac anti-dGp IgG e IgA mostraron una eficacia diagnóstica diferente a la observada en el grupo de niños ≤ 5 años. Así, los Ac anti-dGp IgA eran superiores a los IgG respecto a sensibilidad, VPP y VPN mientras que los Ac anti-dGp mostraron la máxima especificidad. Finalmente, los 6 pacientes celíacos con déficit de IgA presentaban Ac anti-dGp IgG mientras que los anti-Glia IgG únicamente eran detectados en 5 pacientes.

Conclusiones. La eficacia diagnóstica para la EC de los Ac anti-dGp IgA e IgG depende de la edad del grupo estudiado. Así, los anti-dGp IgG muestran la mayor eficacia en niños para todos los paráme-

tros estudiados mientras que, en adultos, sólo son superiores a los de isotipo IgA respecto a la especificidad. Además, la incorporación de la determinación de Ac anti-dGP IgG en la rutina facilitaría el diagnóstico en pacientes con déficit de IgA.

P-016

NIÑO DE 5 MESES CON ALTOS NIVELES CIRCULANTES DE ANTICUERPOS ANTI- $\mu 2$ GLICOPROTEÍNA Y PÚRPURA TROMBOCITOPÉNICA IDIOPÁTICA. J.A. García Trujillo, S. Romero Challa, L. Fernández Pereira, C. Cámara Hijón. Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres.

Objetivos. Dilucidar el papel patogénico que juegan los anticuerpos anti- $\beta 2$ glicoproteína (2GPI) en un niño de cinco meses con trombocitopenia como único criterio diagnóstico de síndrome antifosfolípido.

Material y métodos. Se determinaron anticuerpos anticardiolipina (aCL IgG e IgM) y anti $\beta 2$ GPI por ELISA (Elia, Phadia, Sweden) a diferentes momentos.

Resultados. La trombocitopenia se resolvió con corticoides y una infusión de gammaglobulina IV, no repitiéndose más episodios. En cambio, los altos niveles de $\beta 2$ GPI se mantuvieron elevados hasta los 2 años de edad.

Tabla 1.

Edad	Plaquetas ($10^9/L$)	$\beta 2$ GPI IgG (UI/mL)	aCL IgG e IgM $\beta 2$ GPI IgM	Anticoagulante lúpico
5 meses	4	139,4	Negativos	No determ.
6 meses	480	142	Negativos	Positivo
10 meses	329	140	Negativos	Negativo
14 meses	445	177	Negativos	Negativo
19 meses	515	58	Negativos	Negativo
29 meses	291	22	Negativos	Negativo

Conclusiones. Si bien se ha descrito la presencia ocasional de anticuerpos anti $\beta 2$ GPI en niños sanos, siempre ha sido a títulos bajos. Sin embargo, en este caso además de presentarse a título elevado, coinciden en el tiempo con la aparición de la trombocitopenia y del anticoagulante lúpico. Todo esto parece indicar que realmente están jugando un papel patogénico en este paciente, siendo el caso más joven descrito hasta el momento.

P-017

AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES POST TRASPLANTE HEPÁTICO PEDIÁTRICO. M. Alba Domínguez, R. Álvarez Doforno, P. Jara, L. Álvarez. Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Antecedentes. El trasplante hepático es el tratamiento más efectivo para la enfermedad hepatobiliar en estadio final que presenta síntomas intratables. Los autoanticuerpos son detectados frecuentemente en receptores de un trasplante hepático y su aparición es un fenómeno relativamente frecuente. La presencia de estos autoanticuerpos, de los que se desconoce el significado, puede estar relacionada con una disfunción o daño hepático ya sea por una situación de rechazo del injerto, recurrencia de la patología de base o el desarrollo de una enfermedad autoinmune de Novo.

Objetivo. El objetivo de este estudio es 1) Conocer la prevalencia de los anticuerpos no órgano-específicos en un grupo de pacientes

pediátricos trasplantados de hígado y seguidos en el laboratorio. 2) Detección de autoanticuerpos raros e inusuales en triple tejido y HEP-2. 3) Identificación de los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos.

Materiales y métodos. En este estudio se han incluido 96 pacientes pediátricos trasplantados de hígado y con un tiempo postrasplante igual o mayor de 12 meses. Se detectaron Autoanticuerpos no órgano-específicos: anticuerpos antinucleares (ANA), anti músculo liso (AML), antimitocondriales (AMA) y antimicrosomales de hígado y riñón (LKM), anti citosol hepático tipo 1 (LC1) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre portas de triple tejido de rata y células HEP-2 humanas (Euroimmun) considerándose positivo los títulos $> 1/80$. Para la identificación de los antígenos se empleó un Inmunoblot (IMB) sobre extracto de hígado humano donante y un dot-blot perfil hepático de proteínas purificadas ó recombinantes (Liver dot De-TEC).

Resultados. 1) De los 96 pacientes se detectaron 14 ANA positivos (14,6%), 2 con patrón homogéneo, 9 con patrón moteado y 3 con patrón nucleolar, todos a título medio-bajo excepto un caso que presentó títulos elevados. En tres pacientes se detectaron AML (3,1%) todos a títulos elevados. Un paciente con AMA (1%) a título elevado. Un paciente con Ac anti LKM (1%) a título elevado. Un paciente con LC1 (1%). 2) Dentro de los patrones inusuales específicos de hígado, se encuentra la tinción de canalículos biliares y sinusoides hepáticos. Sobre células HEP-2 destaca la presencia de un patrón citoplásmico granular y citoesqueleto. 3) Los antígenos identificados reconocidos por los autoanticuerpos en HEP-2 fueron midbody, NuMa y fibrilarina. Los AML reconocieron F-actina. Los AMA reconocieron la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. La especificidad del Ac anti LKM fue el citocromo P450-IID6. Los Ac anti citosol hepático reconocieron a la proteína formiminotransferasa ciclodeaminasa (LC1). La identificación del antígeno reconocido por los Ac anti canalículos biliares fue la proteína BSEP que se expresa exclusivamente en hígado.

Conclusión. En nuestra serie aparecen con poca frecuencia autoanticuerpos no órgano-específicos a título elevado después del trasplante hepático pediátrico.

De los autoanticuerpos raros e inusuales específicos del tejido hepático, hemos identificado el antígeno de la mayoría de los anticuerpos anti canalículos biliares como la proteína BESEP.

Es importante, en el seguimiento de los pacientes post-trasplante hepático, la detección de anticuerpos, la determinación de su especificidad antigénica y el estudio de la relación de los parámetros clínicos con los resultados del laboratorio.

P-018

ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. S. García-Rodríguez¹, E. Zumaquero-Martínez¹, E.J. Pavón-Castillero¹, P. Navarro-Cuesta¹, S. Arias-Santiago², J.L. Callejas-Rubio³, N. Ortego-Centeno³, J. Sancho-López², M. Zubiaur-Marcos¹. ¹Instituto Parasitología y Biomedicina, López-Neyra, CSIC, ARMILLA. ²Servicio de Dermatología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada. ³Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada.

Objetivo. En la patogénesis del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) están implicados factores genéticos y ambientales que tienen como consecuencia alteraciones en la regulación del sistema inmune. Se han evaluado las alteraciones en los niveles plasmáticos y de expresión de

un panel de citoquinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias), así como de los factores de transcripción que determinan la selección de linaje de células T en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LES respecto a controles sanos.

Material y métodos. Se determinó la concentración plasmática de 10 citoquinas: IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IFN-gamma y TNF-alfa en 56 pacientes con LES (SLEDAI 0-20) y 49 controles sanos mediante Bio-Plex precision pro assay (Bio-rad). En un subgrupo de 13 pacientes (SLEDAI 0-4) y 5 controles sanos se analizó en PBMCs la expresión génica relativa a controles sanos, mediante PCR cuantitativa a tiempo real de IL-1 beta, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IFN-gamma y TNF-alfa y de los factores de transcripción: T-bet (Th1), GATA3 (Th2), Foxp3 (Treg) y ROR-gamma-t (Th17); así como la expresión de los genes que codifican para las proteínas cinasas implicadas en señalización y supervivencia celular: MAPK1 y AKT1.

Resultados. Los pacientes con LES presentaron niveles plasmáticos significativamente elevados de las 10 citoquinas testadas. IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, e IL-13 eran las que mostraban un mayor incremento en relación a los controles sanos. En el subgrupo de 13 pacientes esta aumentada la expresión génica respecto a los controles sanos de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN-gamma estos aumentos son paralelos a sus niveles plasmáticos.

Se observó que la ratio T-bet (Th1)/GATA3 (Th2) esta aumentada en todos los pacientes de LES analizados con respecto a controles sanos, no se observó correlación con el SLEDAI. Se observa una correlación entre los niveles de expresión de T-bet con ROR-gamma-t (Th17) (Spearman $r=0.8956$, $p<0,0001$); así como entre la expresión de IL-6 y ROR-gamma-t ($r=0.6264$, $p<0,0220$). 3) 7 de los 13 pacientes de LES que presentan aumentos en la expresión de T-bet, presentan igualmente aumentos en la expresión de Foxp3 (Treg), ROR-gamma-t(Th17), MAPK1 y AKT1.

Conclusiones. Los pacientes con LES presentan niveles plasmáticos aumentados de citoquinas proinflamatorias (IL-6), Th0 (IL-2) y Th2 (IL-5, IL-10 e IL-13), confirmándose dicha disregulación a nivel de expresión de los genes que codifican para algunas de estas citoquinas. Esta situación proinflamatoria se confirma con el aumento del balance T-bet (Th1)/GATA3 (Th2) y de la expresión ROR-gamma-t (Th17).

P-019

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL SUERO DE RATONES C57BL/6 SILVESTRES RESPECTO A RATONES C57BL/6 DEFICIENTES PARA CD38 EN UN MODELO DE ARTRITIS REUMATOIDE. A. Rosal-Vela¹, J. Postigo², S. García-Rodríguez¹, E. Zumaquero¹, M.V. Longobardo¹, A. Lario¹, P. Navarro¹, R. Merino³, J. Merino², M. Zubiaur¹, J. Sancho¹. ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla, Spain. ²Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander. ³Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC.

El suero es una herramienta de diagnóstico muy válida y fuente de información acerca del estado fisiológico del individuo. El estudio de la expresión diferencial de proteínas séricas puede ser útil en la búsqueda de biomarcadores específicos de enfermedad. La técnica de Proteomine[®] permite reducir el rango dinámico del proteoma sérico disminuyendo la concentración de las proteínas mayoritarias y aumentando la de las menos abundantes, consiguiéndose una mayor diversidad de especies proteicas.

Objetivo. Análisis proteómico del suero mediante expresión diferencial 2-D-DIGE para el diagnóstico molecular de la artritis por inmu-

nización con colágeno de tipo II, modelo animal de artritis reumatoide, empleando ratones silvestres (wt) y ratones deficientes en CD38 (CD38ko). Los ratones CD38ko presentan diversas deficiencias en la respuesta inmunológica antígeno-específica, de ahí su interés en estudio de la artritis reumatoide como patología autoinmune.

Materiales y métodos. Utilización del kit Proteominer Protein Enrichment (BioRad) de pequeña capacidad con el suero de los ratones wt o CD38ko afectados por la enfermedad; precipitación de la muestra mediante 2-D Cleanup Kit (BioRad) y resuspensión en buffer compatible con marcaje DIGE. El diseño experimental de DIGE comprende el marcaje alternativo de las muestras wt y CD38ko con el Cy3 y Cy5; un pool de todas las muestras se marca con Cy2 como estándar interno. Se mantuvo la proporción de 500 μ g proteína/400pmol CyDye recomendada. Sistema Protein IEF Cell (BioRad) para la 1ª dimensión y sistema Criterion (BioRad) para la 2ª. La digitalización de los geles se realizó mediante Typhoon Imager 9400 (GE Healthcare) y el análisis de las imágenes mediante el software DeCyder 6.0 (GE Healthcare). Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS-MALDI-TOF). Validación por Western-blot.

Resultados. Tras el análisis de los geles 2-D, se detectaron aproximadamente unas 300 manchas proteicas presentando 30 de ellas diferencias de expresión notables entre wt y CD38ko. De estas últimas, el 30% presentan una variación en la expresión \leq -1,5 veces y el 70% de \geq 1,5 veces.

Conclusiones. La utilización del Proteominer® en combinación con el análisis diferencial de proteínas (sistema DIGE), la identificación de las proteínas por MS-MALDI-TOF y la posterior validación por técnicas alternativas nos ha permitido detectar proteínas relativamente poco abundantes cuya expresión varía significativamente en ratones deficientes en CD38 respecto a ratones silvestres en el contexto de la artritis reumatoide experimental. Estudios posteriores irán dirigidos hacia tejidos linfoides como ganglios o bazo.

P-020

EL DESCENSO DE LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS B CD27IGMIGD EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO SE ASOCIA A LA PRODUCCIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS. B. Rodríguez-Bayona¹, A. Ramos-Amaya¹, J.J. Pérez Venegas², C. Rodríguez¹, J.A. Brieve¹. ¹Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz. ²Hospital de Jerez, Cádiz.

Objetivos. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la hiperreactividad de las células B y la producción de gran variedad de auto-anticuerpos (Ac). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto, entre otras alteraciones, una reducción significativa de la subpoblación de linfocitos B CD27IgM IgD en la sangre de pacientes con LES, alteración que es más acusada en pacientes en fase de actividad clínica, pero que incluso se observa en la mayoría de los pacientes en fase de remisión clínica. El objetivo del presente estudio consistió en valorar la relación existente entre las alteraciones en la distribución de las subpoblaciones B circulantes observadas y el estado de autoinmunidad sistémica, reflejado por la presencia de auto-Ac séricos.

Materiales y métodos. El estudio de subpoblaciones B se realizó en un grupo de 69 pacientes con LES reclutados consecutivamente y en 31 controles sanos. El marcaje combinado con CD19, CD27 e IgD por citometría de flujo permite diferenciar 5 subpoblaciones linfoides B: linfocitos B *naïve* (CD19+CD27-IgD+), linfocitos B CD27 IgM

IgD (CD19+CD27+IgD+), de memoria *switched* (SW) (CD19+CD27+IgD-), de memoria doble-negativa (DN) (CD19+CD27-IgD-) y células plasmáticas (CP) (CD19+CD27++IgD-). En pacientes con LES se determinó la presencia de ANA, Ac anti-ENA y anti-ADNdc.

Resultados. En el grupo de pacientes con LES se observó un aumento de las subpoblaciones de linfocitos B de memoria DN y de CP, y una disminución de la subpoblación B CD27 IgM IgD. Además, la disminución de la subpoblación CD27IgMIGD estaba en relación con la detección de elevados niveles de auto-Ac séricos (ANA, anti-DNAdc y anti-ENA) mientras que el aumento de CP y de linfocitos B de memoria DN se asociaba exclusivamente a la presencia de Ac anti-ADNdc.

Conclusiones. El grado de disminución de la subpoblación de linfocitos B CD27 IgM IgD está ligado a un estado general de autoinmunidad, asociándose a la producción de gran variedad de auto-Ac, mientras que el aumento de CP y de linfocitos de memoria DN se relaciona específicamente con la producción de Ac anti-ADNdc. Estos hallazgos sugieren un posible papel de los linfocitos B CD27 IgM IgD en la patogénesis del LES.

P-021

SV¿UN NUEVO ANTIGENO TUMORAL IMPLICADO EN UN SÍNDROME PARANEOPLÁSICO? M.T. Ciudad García, M. Agustí, M.V. Rubiales, C. Gelpí. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Unidad docente Universidad Autónoma de Barcelona, Córdoba.

Muchas enfermedades paraneoplásicas del sistema nervioso central son inmunomediadas. La presencia de autoanticuerpos antineuronales en suero y líquido cefalorraquídeo de estos pacientes es la principal evidencia que lo confirma. Estos anticuerpos reaccionan con proteínas neuronales que a su vez están expresadas en las células del tumor. Por tanto, su caracterización es la base para un test rápido, útil y diagnóstico, de forma que se pueda asociar una sintomatología a un tipo de neoplasia que aún no se haya conseguido detectar físicamente.

El objetivo de este trabajo es el estudio de una nueva especificidad de anticuerpo antineuronal presente en el suero de una paciente con síndrome paraneoplásico asociado a carcinoma de ovario.

Material y métodos. En el análisis de anticuerpos antineuronales empleamos test comerciales con proteínas recombinantes; inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de tejidos y sobre células en cultivo; inmunoblot con extractos de cerebro y cerebelo de rata fetal, de carcinoma de ovario y de cerebro humano.

Resultados. Mediante inmunofluorescencia indirecta estos anticuerpos reconocen un antígeno nuclear en cortes de cerebro y cerebelo de cobaya, en cerebro humano y en las líneas de carcinoma de ovario humano, UV-20 y UVH1. No reconocen otras líneas celulares de carcinoma de pulmón, laringe y cervix. Tampoco se detecta fluorescencia en tejidos de hígado, riñón, estómago y timo de rata y riñón humano, ni en neutrófilos humanos de sangre periférica. Mediante inmunoblotting el suero de esta paciente reconoce dos proteínas de aproximadamente 90 y 45 kDa de peso molecular tanto en extractos de cerebro y cerebelo de rata fetal como en extractos de las líneas de carcinoma de ovario mencionadas. No muestra reactividad con extractos de otras líneas celulares.

Conclusiones. Presentamos una nueva especificidad de anticuerpos antineuronales asociados a un síndrome paraneoplásico, que puede ser útil en la investigación y diagnóstico de estas enfermedades.

Asimismo serán una herramienta útil para el estudio del antígeno asociado al tumor. Estudios de reactividad cruzada de estos anticuerpos nos permitirán demostrar su especificidad para antígenos del sistema nervioso central y carcinoma de ovario.

Finalmente demostramos la utilidad de las técnicas descritas para el estudio de posibles nuevos anticuerpos ligados a tumor y síndrome neurológico.

P-022

VALOR DIAGNÓSTICO DEL INMUNOFENOTIPO DE LIES PARA EL ESTUDIO DE ENFERMEDAD CELÍACA EN POBLACIONES PEDIÁTRICA Y ADULTA. M. Sáenz Cuesta, L. Arriarán, P. Etxaniz, A. Prada, M.D. De Juan, E. Cuadrado, A. Muñagorri, A. Gómez, I. Urreta, J. Eizaguirre. Hospital Donostia, Donostia-San Sebastián.

Introducción. Para el diagnóstico de Enfermedad Celíaca (EC) se utilizan diferentes pruebas: anatomía patológica (AP) de biopsia intestinal según grados de Marsh; anticuerpos anti tTG IgA; genotipo de HLA-DQ e inmunofenotipo de LIEs. En los algoritmos actuales no está considerado este último. La documentación sobre su poder diagnóstico es limitada.

Objetivo. Evaluar cuál es el aporte del inmunofenotipo de LIEs en el diagnóstico de EC en dos poblaciones estudiadas.

Material y método. Población pediátrica: 146 niños: 103 con diagnóstico de EC; 43 descartada EC.

Población adulta: 203 pacientes: 37 con diagnóstico de EC; 118 descartada EC; 48 sin diagnóstico definitivo.

La AP de biopsias se estableció según grados de Marsh; los anticuerpos anti tTG IgA se midieron con ELISA; el estudio de inmunofenotipo de LIEs se realizó mediante citometría de flujo y el análisis de HLA-DQ con técnica de PCR-SSP-DNA.

El estudio estadístico fue confeccionado con "systat package".

Resultados

Tabla 1.

Variable	Punto de corte	S (IC 95%)	E (IC 95%)
Adultos			
LIEs	TCR $\gamma\delta$ >10 y 103 ζ 3<5	75,7 (59,9-86,6)	92,4 (86,1-95,9)
AP		60,0 (46,6-74,4)	96,4 (91,2-98,6)
Ac anti tTG	12	64,9 (48,8-78,2)	96,4 (91,2-98,6)
LIEs + AP		45,7 (30,5-61,8)	100 (96,8-100)
LIEs + tTG		54,1 (38,4-69,0)	99,2 (95,4-99,9)
Niños			
LIEs	TCR $\gamma\delta$ >10 y 103 ζ 3<5	82,5 (74,1-88,7)	100 (91,6-100)
AP		76,8 (67,5-84,0)	95,2 (84,2-98,7)
Ac anti tTG	12	93,1 (86,4-96,6)	97,6 (87,7-99,6)
LIEs + AP		66,0 (56,3-74,5)	100 (91,8-100)
LIEs + tTG		80,2 (71,4-86,8)	100 (91,8-100)

El valor predictivo negativo de la prueba HLA-DQ2/8 en EC es de 93,3% (IC de 70,2-98,8) para adultos y de 77% (IC de 49,7-91,8) en niños.

Conclusiones

- En adultos el inmunofenotipo de LIEs incrementa la Especificidad en un 7,6% al sumarse a la AP y en un 6,8% junto a tTG.
- En niños el estudio de LIEs presenta mayor Sensibilidad que los resultados de AP.
- Las diferencias de Sensibilidad y Especificidad para una misma prueba entre las dos poblaciones puede deberse al diferente criterio clínico utilizado en el diagnóstico.
- Consideramos al estudio de LIEs como prueba adyuvante en la confirmación de EC.

P-023

DEFICIENTE ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON PÉNFIGO EN RESPUESTA A LA ESTIMULACIÓN CON SUPERANTÍGENOS. 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, Spain. ²Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada.

El pénfigo es una enfermedad autoinmune grave considerada rara por su baja frecuencia. Se caracteriza por la formación de autoanticuerpos (antidesmogleína 1 y 3) que destruyen los puentes de unión intercelulares de la piel y mucosas favoreciendo la formación de ampollas intraepidérmicas.

Objetivo del estudio. Hacer un estudio de los parámetros inmunológicos de un conjunto de 8 pacientes diagnosticados de pénfigo.

Materiales y métodos. Se procede a la extracción de sangre de los pacientes y controles sanos obteniéndose plasma y células mononucleares (PBMCs). Usando un sistema multiparamétrico (BioPlex) se han cuantificado simultáneamente los niveles de 10 citoquinas en el plasma de los pacientes y controles sanos. 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 sinapsis inmunológica mediante microscopía confocal, la formación de conjugados y la expresión de marcadores por citometría de flujo, la secreción de citoquinas por BioPlex.

Resultados. Se observa: Niveles de citoquinas similares en plasma de pacientes y de controles, a excepción de un paciente con mala respuesta al tratamiento con final de éxitus que presentaba niveles elevados de IL-6. Incremento de una subpoblación de células B con fuerte expresión de CD38, probablemente células plasmáticas responsables de la producción de anticuerpos. Menor porcentaje de la subpoblación CD56bright en células NK con propiedades inmunorreguladoras. Aparición de una población de granulocitos de baja densidad en PBMCs. Disminución en la formación de conjugados T:B, menor incremento en la expresión de CD38 en células T y menor producción de citoquinas en respuesta a superantígenos.

Discusión y conclusiones. La deficiente activación de los linfocitos T de pacientes con pénfigo inducida por superantígenos, que se constata por una deficiente formación de conjugados linfocito T:linfocito B y/o una disminución en la formación de sinapsis inmunológicas maduras, podría estar relacionada con una menor capacidad de presentación antigénica por parte de los linfocitos B de sangre periférica de estos pacientes. Para demostrarlo definitivamente sería necesario realizar experimentos con péptidos específicos para desmogleína 1 o 3.

P-024

ESTUDIO COMPARATIVO DE GLIADINA Y GLIADINA DEAMIDADA EN PACIENTES CON ENFERMEDAD CELIACA. S. Toro Llamas. Hh.Uu. Virgen Del Rocío, Estepa.

Introducción. La enfermedad celíaca (EC) es una patología autoinmune que se manifiesta tras la ingesta de gluten en individuos genéticamente predispuestos. Se caracteriza por inflamación del intestino delgado, atrofia vellositaria, malabsorción y otras complicaciones derivadas. El diagnóstico definitivo se basa en la biopsia duodeno-yeyunal, aunque actualmente disponemos de marcadores serológicos que

apoyan su diagnóstico. Entre ellos, los anticuerpos frente a Gliadina (AGA), Transglutaminasa (tTG) y Endomisio (EMA) que presentan altos valores de sensibilidad y especificidad. Recientemente se ha incorporado una variante deamidada de la gliadina.

Objetivo. Comparar si la determinación de anticuerpos frente a Gliadina vs Gliadina deamidada mejora la sensibilidad y especificidad en pacientes diagnosticados de EC.

Pacientes y métodos. Se incluyeron un total de 42 sujetos con sospecha de EC, de los cuales tras la biopsia se confirmó el diagnóstico en 37 pacientes, de los cuales 32 eran pediátricos (un caso diagnosticado con déficit selectivo de IgA) y 5 adultos. La determinación de anticuerpos se llevó a cabo mediante la técnica ELISA usando UNICAP- 250 de Phadia.

Resultados. Al comparar los resultados de ambos parámetros en el grupo completo observamos que el 36.1% (13/36) fueron positivos para gliadina y el mismo porcentaje se obtuvo para la gliadina deamidada 36,1% (13/36). Cuando seleccionamos los pacientes con EC y anticuerpos frente a tTG positivos los resultados fueron de un 27.8% (10/36) y de un 47,2% (17/36) para la gliadina y gliadina deamidada respectivamente. Cuando estudiamos el grupo pediátrico, observamos que los sujetos afectados por EC y positivos para tTG y gliadina fue de 22,6% (7/31) frente al 42% (13/31) de los pacientes de EC positivos para tTG y gliadina deamidada.

Conclusión. Nuestros resultados sugieren que la tTG junto a la gliadina deamidada proporcionan mayor especificidad y sensibilidad en el estudio serológico de la EC que la tTG y Gliadina.

P-025

DETECCIÓN DE AUTOANTICUERPOS ASOCIADOS A NEUROPATÍAS PARANEOPLÁSICAS. R. Alenda Asensi, J.M. Vazquez Miralles, F.G. Silva Carreras, Á. Carrasco Sayalero. Hospital Universitario Ramón Y Cajal, Madrid.

Objetivo. Destacar la importancia de los anticuerpos onconeuronales, en la búsqueda de una neoplasia, presentes en un paciente con síndrome neurológico: síndrome paraneoplásico (PNS).

Material y métodos. Varón de 81 años, procedente del servicio de Neurología de nuestro Hospital con diagnóstico de "Leve Polineuropatía Sensitiva Mixta en MMII", para el cual nos pidieron estudio de anticuerpos onconeuronales en muestra de suero.

Realizamos el estudio de estos anticuerpos por dos técnicas, deben de dar positivas ambas para informar la presencia de anticuerpos:

- Inmuno-fluorescencia indirecta (IFI) con anticuerpos de la clase IgG (Euroimmun) con diluciones en suero a 1/10 y 1/100.
- Inmuno-Blot (Enzimo-inmunoensayo) (Euroimmun)

Resultados. En el estudio por IFI se observó un patrón compatible con anticuerpo anti-Hu.

En el estudio por inmuno-blot se observó una banda clara a la altura del antígeno Hu.

Con el informe por el Servicio de Neurología de: "polineuropatía mixta sensitiva" y la detección de los anticuerpos anti-Hu se realizaron estudios complementarios que dieron con el hallazgo en el estudio por TAC de un aumento en la masa parahiliar izquierda de 4'5 cm, la cual se confirmó por biopsia como carcinoma epidermoide con zonas basaliodes.

Conclusión. Los anticuerpos anti-Hu son de gran utilidad durante el estudio de un síndrome neurológico para orientar al clínico hacia la búsqueda de una posible neoplasia.

SESIÓN 2: CÉLULAS B Y ALERGIA

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

P-026

CLINICAL SIGNIFICANCE OF CROSS-REACTIVITY BETWEEN TOBACCO AND LATEX. A. San Miguel, F.J. Martín Gil, A. Armentia Medina, B. Bartolome. Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid.

Background. Recently, allergen cross-reactivity was observed between tobacco and other species of Solanaceae family (tomato, potato, aubergine and egg plant). We have recently studied IgE response to tobacco in asthmatic patients sensitised to *Lolium perenne* (rye grass pollen) and have found that 30 % of tobacco responsive patients had also latex sensitisation.

Objective. The aim of our study was to investigate the possibility of cross-reactivity among tobacco and latex in asthmatic patients with IgE response to latex.

Methods. We performed a study on tobacco and latex exposure in 15 patients suffered from asthma and latex sensitisation that were randomly chosen from our data base of sensitive-latex patients. All these patients were tested in order to try to identify tobacco and latex as possible allergens that might cause clinical specific response (prick-tests, specific IgE to tobacco, latex and related allergens, bronchial challenge (BC), patch tests with tobacco, latex and nicotine, rubbing tests) and immunological response: immunoblotting, immunoblotting-inhibition and EAST-inhibition.

Results. Positive prick and BC with specific IgE > 0,35 kU/L to tobacco was demonstrated in 11 asthmatics that were also sensitised to rye grass. Tobacco IgE level was related with sensitisation to latex ($p < 0.002$), but not with other vegetables that belong to the Solanaceae family. EAST-inhibition and immunoblotting-inhibition showed the existence of cross-reactivity between tobacco and latex.

Conclusions. There exists cross-reactivity between latex and tobacco allergens. Smoking patients with IgE response to tobacco may be a risk population for latex sensitisation.

P-027

ALERGIA ALIMENTARIA A SEMILLAS Y SINDROME ANTIFOSFOLIPIDICO (SAP). A. San Miguel Hernandez¹, A. Armentia Medina¹, M.A. Mazon Ramos¹, F. Pineda², J. Crespo¹, J. García Frade¹, B. Martín Armentia¹, M. Herrero¹. ¹Hospital Universitario Río Hortega. Valladolid, Valladolid, Spain. ²Laboratorios Diater. Madrid.

Es conocido que las reacciones alérgicas severas por alimentos involucran los sistemas gastrointestinal, cutáneo, ocular, respiratorio y cardiovascular.

Las reacciones anafilácticas a alimentos casi siempre se producen de un modo inmediato al estímulo y pueden ser diagnosticadas por pruebas cutáneas, determinaciones de IgE específica y provocación oral si es necesario, pero las complicaciones clínicas de este síndrome están aún por establecer.

Hemos detectado casos de anafilaxia alimentaria seguidos de trombosis severa en menos de tres meses. En todos los casos, la ana-

filaxia fue producida por ingestión de alérgenos vegetales (semillas y frutas).

Material y métodos. Se han seleccionado aleatoriamente 52 pacientes afectados por anafilaxia producida por semillas o frutos. También se han seleccionado aleatoriamente 30 pacientes, que presentan criterios de SAP, procedentes del Servicio de Medicina Interna y de la base de datos del Servicio de Hematología. Todos los pacientes han sido estudiados en la misma forma: una detallada historia clínica de alergia, pruebas cutáneas con una completa batería de 36 alérgenos, incluyendo "Prick" con el alérgeno vegetal sospechoso, IgE específica medida por el método CAP y provocación bronquial en caso de asma. Los estudios controlados a doble ciego con placebo de provocación oral se han realizado sólo en caso necesario. Se han incluido 10 controles no atópicos a los que se les ha realizado las mismas pruebas. El consentimiento informado fue obtenido en todos los pacientes.

Los sueros utilizados en este estudio han sido los de 52 pacientes con anafilaxia, 30 pacientes que sufrían de SAP, un grupo de 10 pacientes no alérgicos y 4 controles con SAP y lupus eritematoso sistémico (LES) con trombosis. Ninguno de los pacientes control registraron síntomas de alergia.

La sensibilización a las semillas o frutos fue considerada como la presencia de: a) una o más pruebas cutáneas positivas. b) un test CAP-*FEIA* Phadia positivo > 0,35 UI/ml o c) una provocación específica positiva. Todos los pacientes fueron informados de los objetivos del estudio y ensayos del estudio a fin de tratar de identificar la sensibilización a un alérgeno vegetal como factor de riesgo de SAP.

También se ha llevado a cabo la medición de anticuerpos anticardiolipina IgG e IgE específica para los alimentos vegetales mediante ELISA y CAP-*FEIA* (Phadia), respectivamente. Además, hemos realizado estudios de inhibición de inmunotransferencia para los alérgenos vegetales sospechosos, utilizando la avellana como alérgeno común.

Resultados. Entre los pacientes afectados de anafilaxia, 15 (28,84%) presentaron niveles positivos (moderados y ligeramente altos) de anticuerpos anticardiolipina y síntomas secundarios. De estos pacientes, 11 tuvieron trombosis: 2 de ellos presentaron trombosis de ambas venas; 4 de una vena iliaca, 1 de ambas venas ilíacas y cava inferior; 1 diarrea con sangrado y daño abdominal; y 3 pérdida fetal.

Entre los pacientes diagnosticados previamente como SAP, algunos presentaron hipersensibilidad a semillas y a frutas, ambas confirmadas por el estudio alérgológico anteriormente descrito.

Los sueros de los pacientes mostraron unión IgE a varias proteínas incluidas en las fracciones hidro e liposoluble (contenidas en la fracción oleosa de las lipoproteínas de membrana) de las oleosinas (de PM entre 16,7 y 14,7 kDa).

De los 9 pacientes con Prick negativo, 4 mostraron IgE positiva y respuesta a las fracciones liposolubles de la avellana. Todos los pacientes eran jóvenes (20 ± 6 años) y mujeres.

Las lipoproteínas de membrana (contenidas en la fracción oleosa) podrían aparecer como un grupo de proteínas con capacidad de sensibilización, no demostrada hasta la fecha.

Conclusiones. En resumen, a pesar de la fuerte asociación entre anticuerpos anticardiolipina y trombosis, el papel patogénico de la trombosis en el desarrollo de la misma permanece por elucidar. Sin embargo, hemos descrito un nuevo mecanismo que involucra la hipersensibilidad a alérgenos lipoproteínicos. El conocimiento de estos nuevos enfoques patogénicos podría identificar nuevas dianas terapéuticas y, por consiguiente, mejorar la monitorización de estos pacientes.

P-028

TLR4-INDEPENDENT UPREGULATION OF ACTIVATION MARKERS IN MOUSE B LYMPHOCYTES INFECTED BY HRSV. D. López, M.Á. Rico, S. Infantes, M. Ramos, A. Trento, C. Jonhstone, J.A. Melero, M. Del Val. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda.

Human respiratory syncytial virus (HRSV) is the most common cause of severe respiratory infections in infants and young children, often leading to hospitalization. In addition, HRSV poses a serious health risk in immunocompromised individuals and the elderly. It has been reported that this virus can infect mouse antigen-presenting cells, including B lymphocytes. In these B cells, HRSV infection upregulates the expression of activation markers, including MHC class II and CD86, but not MHC class I molecules. Here, we report that HRSV infection of spleen B lymphocytes downregulated TLR4. Either blocking with anti-TLR4 antibody or genetic deletion, but not functional deficiency of TLR4, moderately reduced the infectivity of HRSV in B lymphocytes. HRSV-infected B lymphocytes with deleted TLR4 upregulated MHC class II and CD86 molecules to the same levels as TLR4+ wild type B cells. Since the activation of monocytes and macrophages by HRSV was previously reported to depend on TLR4, the current study indicates that these cells and B lymphocytes respond to HRSV infection with different activation pathways.

P-029

ALTERACIONES EN EL COMPARTIMENTO DE CÉLULAS B EN PACIENTES CON LLC-B ASOCIADAS A LA EXPRESIÓN DE ZAP-70. M.Á. Sánchez Luengo¹, Z. Moreno Villegas¹, G. Parada Hermoza¹, L. Ortega Moreno¹, D. Díaz Martín¹, H. Barcenilla Rodríguez¹, J. Moserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, E. Reyes Martín¹, M. Álvarez De Monsoto². ¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Introducción. Las células B de los pacientes con LLC-B son muy similares morfológicamente a las células B maduras de individuos sanos a excepción de los casos de LLC-B atípica o mixta. Sin embargo presentan características fenotípicas propias que sirven para su diagnóstico algunas de estas características fenotípicas pueden relacionarse con el estado pronóstico, supervivencia y/o posible respuesta a tratamiento.

Objetivos. Estudiar el fenotipo de células B en pacientes con LLC-B según el factor pronóstico ZAP-70.

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 la distribución y activación de las células B se utilizaron anticuerpos frente a los antígenos de superficie CD3, CD5, CD19, CD21, CD23, CD38, CD40, CD80, CD86, HLA-DR.

Resultados. Se observó un fuerte incremento significativo en el número absoluto de células B en los pacientes con LLC-B ZAP-70+ respecto a los pacientes ZAP-70- y los controles sanos (18.261,61 vs 11.613,38 y 163,20 respectivamente) así como de su porcentaje (83,11 vs 69,39 y 9,79). El estudio de la expresión de los diferentes marcadores de células B reflejó notables diferencias entre los dos grupos de pacientes con LLC-B según la expresión de ZAP-70 mostrando los pacientes ZAP-70+ un incremento significativo respecto a los pacien-

tes ZAP-70- tanto del número absoluto como del porcentaje de células B CD38+, CD5+ y CD40+, y porcentajes más bajos de células B CD21+. Por otra parte los pacientes ZAP-70+ presentaron un descenso significativo del porcentaje de células B que expresan las moléculas de coestimulación CD80+ y CD86+.

Conclusiones. La expresión de ZAP-70 se asocia con una linfocitosis de células B CD5+, CD38+ y CD40+ y una disminución del porcentaje de células B que expresan CD80+ y CD86+. Lo cual puede estar relacionado con la mayor agresividad del tumor en estos pacientes y su peor respuesta a tratamientos y por tanto a su peor pronóstico.

P-030

PAPEL DE LAS DISTINTAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS B EN LA SÍNTESIS INTRATECAL DE INMUNOGLOBULINAS EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. M. Espiño Martínez, J.C. Álvarez Cermeño, M.C. Sádaba Argai, N. Marín Crespo, E. Roldán Santiago, P. González Porqué, L.M. Villar Guimerans. Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivo. Estudio de las subpoblaciones de linfocitos B CD5- y CD5+ en el líquido cefalorraquídeo (LCR) de los pacientes con esclerosis múltiple remitente-recidivante (EM-RR) y su relación con la síntesis intratecal de IgM e IgG.

Materiales y métodos. Pacientes: se estudiaron 51 pacientes con EM-RR que presentaban bandas oligoclonales de IgM frente a los lípidos de la mielina (ML+), 141 pacientes con EM-RR que no presentaban dichas bandas (ML-), 26 pacientes con otras enfermedades neurológicas inflamatorias del SNC (OENI) y 43 pacientes con otras enfermedades neurológicas no inflamatorias del SNC (OENN).

Métodos. La detección de bandas oligoclonales de IgM se realizó mediante isoelectrofoque e inmunoblotting. La cuantificación de la IgG, IgM y albúmina se llevó a cabo mediante nefelometría. La existencia de síntesis intratecal de IgG e IgM se determinó a través de los índices de IgG e IgM. Los valores del índice de IgG mayores de 0,77 indican síntesis intratecal de IgG. Los valores del índice de IgM por encima de 0,1 indican síntesis intratecal de IgM. Las células de sangre periférica y LCR se marcaron con los anticuerpos monoclonales: anti CD19-FITC, anti CD5-PE y anti CD45-PerCP. El análisis de las poblaciones celulares se realizó en un citómetro de flujo FACSCanto (Becton Dickinson). Los resultados se analizaron con el test de Mann-Whitney y el test exacto de Fisher.

Resultados. El porcentaje de linfocitos CD5+ está claramente aumentado en los pacientes con síntesis intratecal de IgM ($1,44 \pm 0,22\%$ vs $0,82 \pm 0,11$, $p < 0,0001$). Además, los valores del índice de IgM se correlacionan estrechamente con los porcentajes de las células B CD5+ en LCR ($p < 0,0001$). Esto demuestra que esta subpoblación está implicada en la síntesis intratecal de IgM en la EM. Sin embargo, no hay diferencias en esta subpoblación entre los pacientes con y sin síntesis intratecal de IgG ($0,94 \pm 0,14\%$ y $0,91 \pm 0,11\%$, NS). Los valores del índice de IgG se correlacionan con los porcentajes de la población de linfocitos B CD5- en el LCR. Esta población parece ser responsable de la síntesis intratecal de IgG.

Conclusiones. La subpoblación de linfocitos B CD5+ es la principal responsable de la síntesis intratecal de IgM en los pacientes ML+ mientras que la subpoblación B CD5- esta implicada en la síntesis intratecal de IgG en la EM.

P-031

EXPRESIÓN DE LA CADENA ALFA DE LA IL15 Y SU RELACIÓN CON MARCADORES GENÉTICOS DE LA ENFERMEDAD CELIACA. V. Benito Zamorano¹, J.A. Garrote Adrados², B. Martínez Abad¹, S. Vallejo Díez¹, E. Montalvillo Álvarez¹, J.M. Marugán De Miguel-sanz², L. Fernández Salazar², E. Arranz Sanz¹. ¹Facultad De Medicina-I.B.G.M. Universidad De Valladolid, Valladolid. ²Hospital Clínico Universitario De Valladolid.

Estudios previos de nuestro laboratorio indican que los pacientes con enfermedad celiaca (EC) tienen una mayor expresión de IL15Rα en muestras de biopsia duodenal.

Objetivo. Caracterizar la expresión de IL-15Rα en células mononucleares de sangre periférica (CMSP), tanto de individuos con genética positiva de enfermedad celiaca (HLA-DQ2+) como individuos sanos control. A su vez, dentro de cada grupo se diferencian población adulta e infantil. Identificar las sub-poblaciones celulares que lo expresan y cuantificar si existen diferencias cuantitativas en su expresión.

Material y métodos. Se utilizaron muestras de sangre periférica de individuos control sanos sin alteraciones relacionadas con la enfermedad celiaca (14 adultos, edad media 50 años, rango 20-73; 23 niños, edad media 6,2 años, rango 2-14) y de pacientes con sospecha clínica de enfermedad celiaca y genética positiva para HLA-DQ2 (4 adultos, edad media 41 años; 13 niños, edad media 4,2 años, rango 1-12 años).

Las células fueron extraídas de las muestras de sangre por gradiente de densidad. Se identificaron mediante anticuerpos monoclonales diferentes sub-poblaciones celulares (linfocitos T CD4+, linfocitos T CD8+, Linfocitos B, células NKs, iNKTs) y se detectaron por citometría de flujo los niveles de expresión de IL15Rα en dichas poblaciones.

Resultados. En los adultos, se observa una disminución estadísticamente significativa en la población de linfocitos T CD4+ ($p = 0,01$) y en la expresión de IL-15Rα en linfocitos T CD8+ ($p = 0,03$).

En la población infantil se observan diferencias estadísticamente significativas en las poblaciones de linfocitos T CD8+ ($p = 0,01$); linfocitos iNKT ($p = 0,03$) y en linfocitos B ($p = 0,04$); sin embargo, no se observan cambios estadísticamente significativos en la expresión de IL-15Rα entre las diferentes poblaciones.

Conclusión. Se estudian por separado población infantil y población adulta, ya que previamente se ha observado que los niveles de expresión de las diferentes células y moléculas difieren.

El aumento de la expresión de IL15Rα no se refleja en los linfocitos de la sangre periférica, al contrario que en biopsias intestinales. Esto podría indicar que el aumento observado en biopsias intestinales en pacientes con enfermedad celiaca no es constitutivo, sino inducido en la mucosa intestinal.

P-032

PAPEL DE N-RAS EN LA DIFERENCIACIÓN FUNCIONAL DE LINFOCITOS T CD8+ MADUROS EFECTORES Y DE MEMORIA. S. Iborra¹, M. Ramos¹, S. Lázaro¹, F. Aguilar¹, E. Santos², D. López¹, E. Fernández-Malavé³, M. Del Val⁴. ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. ²Centro de Investigación del Cáncer, IBMCC, CSIC-USAL, Universidad de Salamanca. ³Universidad Complutense de Madrid. ⁴Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III y Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos. Determinar la relevancia individual de la isoforma N-ras en la función de linfocitos T CD8+ maduros.

Material y métodos. a) Estudio de la activación de linfocitos T CD8+ normales y deficientes en N-ras in vitro e in vivo. b) Caracterización de la respuesta de memoria de linfocitos T CD8+ tras inmunización con células dendríticas y péptido, así como tras infección con el virus vaccinia. c) Estudio de la expresión de factores de transcripción y vías de señalización implicados en la diferenciación funcional de linfocitos T CD8+ de memoria o efectores.

Resultados y conclusiones. N-ras no es necesario para la activación de un linfocito T CD8+, ni para la adquisición de un fenotipo efector durante una respuesta primaria. Por el contrario, la señalización a través de N-ras es esencial para la supervivencia de linfocitos T CD8+ durante la fase de contracción de la respuesta así como para la diferenciación funcional a memoria. Este fenotipo en linfocitos T CD8+ deficientes en N-ras correlaciona con la expresión defectiva del factor de transcripción eomesodermina, característico de células de memoria.

SESIÓN 3: CÉLULAS NK

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

P-033

NORMAL 0 21 MICROSOFTINTERNETEXPLORER4. J.G. Casado¹, E. Delgado², M.C. Guarnizo², R.G. Roncero¹, S. Morgado¹, B. Sánchez-Correa¹, J.J. Gordillo¹, J. De Julián², R. Tarazona¹. ¹Universidad de Extremadura/Facultad de Veterinaria, Cáceres. ²Norba, Ginecología y Reproducción S.L., Cáceres.

Introducción. Los prostasomas son pequeñas vesículas secretadas por la glándula prostática que se fusionan al espermatozoide transfiriendo iones, lípidos y proteínas de superficie que mejoran su movilidad, licuefacción y capacitación. En el tracto genital femenino, el descenso de pH incrementa la fusión de prostasomas con espermatozoides permitiendo así la adquisición de nuevas proteínas que protegen al espermatozoide de las defensas inmunitarias. Por otro lado, el aparato reproductor femenino se considera un ambiente potencialmente hostil para los espermatozoides con diferentes subpoblaciones de células NK en el tracto genital superior e inferior.

Objetivos. Puesto que se ha sugerido que las células NK representan un importante componente de la repuesta inmune innata en el tracto reproductor, en este trabajo se ha analizado el papel de los prostasomas en la regulación de la actividad NK.

Material y métodos. Los prostasomas en pacientes normozoospermicos (definidos según los criterios de la OMS) se aislaron por ultracentrifugación y cromatografía y se analizaron fenotípicamente por citometría de flujo después de su acoplamiento con microsféricas de carboxilato. El fenotipo y la funcionalidad de las células NK se determinó mediante citometría de flujo (expresión de CD244, IFN-gamma intracelular y CD107a/b en membrana) tras el cocultivo de células NK con diferentes concentraciones de prostasomas.

Resultados. El análisis por citometría demostró que los prostasomas expresan altos niveles de CD48 y ausencia de ligandos para receptores activadores NKG2D y DNAM-1. La interacción de células NK con prostasomas provocó un descenso de la expresión de CD244 así como un descenso de la actividad NK en términos de producción de IFN-gamma y capacidad de desgranulación.

Conclusiones. Los resultados obtenidos in vitro demuestran el papel de los prostasomas en la inmunomodulación de la actividad NK. El descenso de la actividad NK observado en células NK cocultivadas en presencia de prostasomas sugiere que estas vesículas podrían inmunomodular el microambiente del tracto genital femenino. La interacción NK-prostasomas podría ser considerado un nuevo mecanismo para prolongar la supervivencia del espermatozoide e incrementar el éxito reproductivo.

P-034

ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE DNAM-1 EN LAS CÉLULAS NK DE PACIENTES DE LEUCEMIA MIELOIDE AGUDA. B. Sánchez Correa¹, I. Gayoso², J. Bergua³, J. García Casado¹, S. Morgado¹, R. Solana², R. Tarazona¹. ¹Facultad De Veterinaria, Cáceres. ²Imibic-Universidad De Cordoba-Hospital Reina Sofia, Cordoba, ³Hospital San Pedro De Alcantara, Cáceres.

Objetivos. Estudios realizados en pacientes diagnosticados de Leucemia Mieloide Aguda (LMA) sugieren que las células NK juegan un papel esencial en la defensa del organismo frente a neoplasias de origen hematológico. Sin embargo, la rápida progresión de la enfermedad y la elevada incidencia de recaídas tras el tratamiento sugiere que los blastos de leucemia escapan del reconocimiento por las células del sistema inmune. Se han descrito anomalías en la expresión de algunos receptores activadores de la citotoxicidad y/o de sus ligandos en el momento del diagnóstico que podrían estar relacionadas con esta respuesta deficiente de las células NK y por tanto con la resistencia de las células leucémicas a la lisis. En el presente trabajo procedemos a analizar en profundidad las alteraciones en la expresión del receptor activador DNAM-1 en las células NK de pacientes de LMA, así como el mecanismo implicado en dicho fenómeno.

Material y métodos. Las muestras analizadas se obtuvieron de sangre periférica de 40 pacientes diagnosticados de LMA en el Hospital San Pedro de Alcántara y de 47 individuos control. El estudio se realizó de acuerdo con la Declaración de Helsinki y fue aprobado por el Comité Ético de la UEX y del Hospital. Una vez aisladas, las células de sangre periférica fueron analizadas por citometría de flujo empleando para ello los anticuerpos de interés. En los ensayos en los que se realizaron cocultivos se emplearon PBMCs de individuos control y células leucémicas (ratio 1:5). Tras 48 horas de incubación se analizó la expresión en superficie del receptor DNAM-1 en las células NK. El análisis estadístico de los resultados se realizó empleando el programa SPSS15.

Resultados.

- Los pacientes de LMA menores de 65 años presentan un descenso significativo en la expresión de DNAM-1 en la superficie de las células NK al compararlos con los individuos control del mismo rango de edad.
- El análisis de los ligandos de DNAM-1 en la superficie de los blastos leucémicos muestra que la mayoría de los pacientes de LMA expresan al menos un ligando para dicho receptor activador. Dicha expresión no presenta correlación con la edad ni con el subtipo FAB.
- Existe una correlación inversa entre la expresión de DNAM-1 y su ligando CD112 en las células NK de los pacientes de leucemia menores de 65 años.
- Los resultados obtenidos tras realizar los cocultivos entre PBMCs de individuos sanos y células leucémicas con diferentes fenotipos sugieren que el descenso en la expresión de DNAM-1 observado en las células NK de los pacientes de LMA es consecuencia del con-

tacto directo entre DNAM-1 y los ligandos de dicho receptor expresados en la superficie de los blastos leucémicos

Conclusiones. Las células leucémicas son capaces alterar la expresión en superficie del receptor activador DNAM-1. Esta alteración podría considerarse un mecanismo de escape tumoral, que podría emplearse como nuevo marcador pronóstico de la supervivencia en pacientes con LMA.

P-035

INCREMENTO DE CÉLULAS INKT $V\alpha 24+$ EN EL EPITELIO DUODENAL DE PACIENTES CELIACOS. POSIBLE PAPEL EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD CELIACA. E. Montalvillo Álvarez¹, J.A. Garrote Adrados², B. Martínez Abad¹, S. Vallejo Díez¹, V. Benito Zamorano¹, C. Calvo Romero², L. Fernández Salazar², E. Arranz Sanz¹.
¹Facultad De Medicina/IBGM, Universidad De Valladolid, Laguna De Duero. ²Hospital Clínico Universitario de Valladolid.

Objetivo. Establecer las diferencias en la población intraepitelial de células iNKT en el duodeno de pacientes celíacos en actividad con respecto a los pacientes no celíacos, tanto con afectación de la mucosa duodenal por otras patologías como con duodeno no afectado.

Pacientes y método. Se utilizaron explantes de duodeno obtenidos por técnica endoscópica. 8 pacientes celíacos en actividad no tratados (aEC; serología y genética positivas, atrofia vellositaria y alteraciones en el linfograma propias de Enfermedad Celíaca, EC), 6 pacientes no celíacos sin afectación duodenal (CsNo-EC; serología y genética negativas, sin alteraciones histológicas ni de linfograma) y 7 pacientes con algún tipo de patología diferente a EC en la mucosa duodenal (CpNo-EC; serología y genética negativas, sin atrofia vellositaria y con alteraciones en el linfograma diferentes a las de EC).

Los explantes se procesaron para la extracción de los Linfocitos Intraepiteliales (LIEs). Las células iNKT fueron identificadas mediante anticuerpos específicos para la cadena $V\alpha 24$ del TCR, detectados por citometría de flujo. Los datos se analizaron estadísticamente mediante el test ANOVA (significación estadística $p < 0,05$).

Resultados. Se observa un aumento estadísticamente significativo de la población de células iNKT en los celíacos en actividad (aEC mean= 7,46% del total de LIEs) comparado con el resto de los grupos (CsNo-EC mean= 1,81% del total de LIEs, CpNo-EC mean= 2,90% del total de LIEs). Además, en los celíacos en actividad predomina claramente el fenotipo de célula iNKT $V\alpha 24+CD4+CD8-$ sobre el resto (aEC mean= 84,39% del total de iNKTs), mientras que en los CsNo-EC y CpNo-EC el porcentaje de iNKTs con fenotipo $V\alpha 24+CD4+CD8-$ es mucho menor (mean= 47,20% y 51,14% del total de iNKTs respectivamente).

Conclusión. Los pacientes celíacos presentan un mayor porcentaje de células iNKT en el compartimento intraepitelial del duodeno, las cuales desarrollan principalmente un fenotipo $V\alpha 24+CD4+CD8-$. De acuerdo a estudios moleculares previos de nuestro grupo, los celíacos en actividad expresan un aumento de $V\alpha 24$ (representativo de las iNKTs) y de IFN γ comparado con el resto de grupos, lo que refuerza los datos presentados aquí. Teniendo en cuenta que las células iNKT $V\alpha 24+CD4+CD8-$ se han descrito como células duales que tras su estimulación son capaces de producir de forma rápida grandes cantidades de citoquinas tanto de tipo Th1 (IFN γ) como Th2 (IL4) (La Cava, A. et al. 2006), nuestros resultados sugieren que esta población intraepitelial de iNKTs podría estar implicada en la inmunopatogénesis de la EC y, posiblemente, contribuyen de forma importante a la secreción de IFN γ (sin mediación de IL12), principal citoquina implicada en la lesión tisular propia de esta enfermedad.

P-036

PAPEL DE NCR EN LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS NK Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN ANCIANOS. N. Rojas-Colonelli¹, I. Gayoso¹, B. Sánchez-Correa², M.D.C. Campos¹, A. Pera¹, R. Tarazona², R. Solana¹. ¹Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. ²Universidad de Extremadura.

Las células dendríticas (DC) y las células asesinas naturales (NK) interactúan por contacto celular, resultando una activación bi-direccional de ambas. Las células NK activan sus funciones citotóxicas y se favorece la maduración de las DC. Asimismo tras esta interacción se eliminan las DC inmaduras. En estas interacciones intervienen los receptores NKp30 y DNAM1. Estudios en nuestro laboratorio indican que existe un descenso significativo en la expresión de estos receptores en células NK de ancianos. En este trabajo analizamos la interacción entre células NK y células dendríticas y los receptores implicados en la misma en jóvenes y ancianos.

Las DC se generaron in vitro a partir de PBMCs de donantes sanos. Por cultivo durante 6 días, en presencia de IL-4 y GM-CSF. Se estudió la expresión de CD11c como marcador de células dendríticas. Las células NK fueron enriquecidas mediante inmunoseparación magnética (>80% son CD3negCD56+). Ambos tipos celulares fueron co-cultivados a razón de 5:1 DC:NK durante 48 horas. Como control de la activación las DCs se estimularon con LPS (DC maduras) o se dejaron sin tratar (DC inmaduras). Las células fueron evaluadas fenotípicamente por medio de citometría de flujo.

Las DC de jóvenes maduras con LPS mostraron un aumento en la expresión en superficie de los marcadores de activación CD86 y CD83, al compararlos con las DC sin estimular. La interacción DC-NK indujo la activación y maduración de las DCs, observándose un aumento en superficie tanto de CD86 como CD83, similares a los encontrados en las DC estimuladas con LPS. En ancianos la expresión de estos marcadores en células dendríticas resultó descendida al compararlo con jóvenes, lo que indica una alteración en la interacción DC-NK.

La interacción de las NK con las DC induce la maduración de éstas últimas, lo que posiblemente esté implicado en la respuesta inmune innata de ambos tipos celulares. Nuestros resultados previos que muestran un descenso en la expresión de los receptores NKp30 y DNAM1 en ancianos, ambos implicados en la interacción NK:DC, sugieren que este descenso puede participar en la alteración en la interacción DC-NK y contribuir al deterioro de la respuesta inmune adaptativa en personas de avanzada edad.

P-037

ESTUDIO DE EXPANSIÓN DE POBLACIONES LGL EN PACIENTES CON LINFOCITOSIS PERIFÉRICA. L. Arriarán Aronés, M. Sáenz Cuesta, M.D.C. Montes Fernández, P. Echaniz Aizpuru, M.D. De Juan Echavarrí, A. Prada Iñurrategui, E. Cuadrado Del Barrio. Hospital Donostia, San Sebastián.

Introducción. Los linfocitos granulares grandes (LGL) son células efectoras de la respuesta inmune que intervienen tanto en la inmunidad innata (NK CD3-) como en la respuesta adaptativa (NK CD3+), su expansión es muy frecuente en la clínica, pudiendo presentarse desde una forma indolente hasta proliferaciones agresivas sobre todo asociadas a las células NK.

Diseño. Estudio retrospectivo de estas expansiones y su asociación a determinados procesos clínicos.

Material y métodos. Estudio retrospectivo de 1.431 linfocitosis recibidas en nuestro laboratorio durante el periodo 2008-2009, de los cuales 179 fueron expansiones NK (12,5%). Sólo en 92 se pudo completar el estudio.

La metodología del estudio incluyó inmunofenotipo linfocitoide LGL y realización de reordenamiento de TCR por biología molecular.

Resultados. Fenotipo NK según patologías

Tabla 1. Fenotipo NK según patologías

Patologías	n = 92	Fenotipo NK %	Fenotipo CD3+ TCR + TCR -	Linfocitosis media absoluta LGL	Nro casos LGL>400	
Procesos endocrinos	11	27	54	18	1734	9/11
Proceso reumatológicos	1	1	-	1	789	1/1
Procesos infecciosos	12	25	42	33	2527	12/12
Procesos neoplásicos	9	55	33	11	2389	4/9
TPH	8	12	87	-	2365	8/8
Procesos hematológicos:	16	25	44	31	911	9/11
Otras causas	35	37	43	20	1344	29/35

Discusión- conclusiones. 1) Se observa una linfocitosis LGL absoluta (>400cel/ul) en todos los grupos estudiados, siendo más significativa en el grupo de los procesos infecciosos y en el grupo de post TPH. 2) La expansión más frecuente es la NK/CD3+ (70%) lo que nos lleva a continuar el estudio de reordenamiento de TCR por Biología molecular. 3) En todos los pacientes post TPH la expansión es de células NK+/CD3+ de carácter monoclonal. Se recomienda realizar seguimiento de estos pacientes hasta la reconstitución del repertorio de células T y estudiar la influencia del quimerismo en el desarrollo de este repertorio. 4) En los procesos neoplásicos se observa un mayor porcentaje de células con fenotipo NK+/CD3-.

SESIÓN 4: CÉLULAS T

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

P-038

LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS ÓSEAS MODULAN LA PROLIFERACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD4+ PERIFÉRICOS. A. Varas, V.G. Martínez, C. Hernández-López, L. Hidalgo, A. Entrena, J. Valencia, M.N. Vázquez, A. Zapata, R. Sacedón, A. Vicente. Facultad Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivos. Las Proteínas Morfogenéticas Óseas (BMPs) desempeñan un papel crucial durante la embriogénesis y organogénesis de vertebrados, y también se ha descrito que llevan a cabo diversas funciones en tejidos adultos con capacidad auto-renovadora. Varios autores han demostrado que distintas BMPs están implicadas en el control de la proliferación de células precursoras hematopoyéticas y también de linfocitos B. En el timo, se ha descrito previamente que las BMPs regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación de los timocitos. Asimismo, se ha demostrado la expresión de receptores para BMPs en líneas celulares linfoblastoides así como en la línea Jurkat TAG. En este estudio, se pretende estudiar la expresión y posible función de las BMPs en los linfocitos T CD4+ periféricos.

Material y métodos. Linfocitos T CD4+ naive fueron aislados mediante selección negativa inmunomagnética a partir de ganglios linfocitos de ratones BALB/c mantenidos en condiciones SPF. Las células T se cultivaron en medio libre de suero y se estimularon con anticuer-

pos anti-CD3 con o sin anticuerpos anti-CD28. En algunos cultivos se añadieron diferentes dosis de rhBMP2 o rhBMP4. La expresión y funcionalidad de la vía de señalización BMP se estudió por citometría de flujo, y la influencia de las BMPs en la tasa proliferativa de los linfocitos T se analizó tras incorporación de BrdU y detección por ELISA.

Resultados. En este estudio nosotros evidenciamos que las células T CD4+ periféricas expresan los tres tipos de receptores tipo I de BMP (BMPRIA, BMPRII, BMPRIII), y que la proporción de células T que expresan los receptores para BMPs incrementa notablemente tras estimulación con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD3 más anti-CD28. La vía de señalización BMP es funcional en estas células T CD4+ periféricas puesto que al cultivarlas en presencia de BMP4 se incrementan los niveles de Smad1 fosforilada. Además, nuestros resultados demuestran que la adición de BMP2 y BMP4 durante la estimulación con anti-CD3/CD28 modula de manera diferencial la proliferación de las células T CD4+.

Conclusiones. En conjunto, los resultados indican que la vía de señalización BMP juega un papel en las respuestas de células T.

P-039

MULTIPLE, NON-CONSERVED, INTERNAL VIRAL LIGANDS NATURALLY PRESENTED BY HLA-B27 IN HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS-INFECTED CELLS. D. López¹, S. Infantes¹, E. Lorente¹, E. Barnea², I. Beer², J.J. Cargnolini³, R. García¹, F. Lasala¹, M. Jiménez¹, A. Admon². ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. ²Department of Biology, Technion-Israel Institute of Technology. ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC/Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Cytotoxic T lymphocyte (CTL)-mediated death of virus-infected cells requires prior recognition of short viral peptide antigens that are presented by HLA class I molecules on the surface of infected cells. The CTL response is critical for the clearance of human respiratory syncytial virus (HRSV) infection. Using mass spectrometry analysis of complex HLA-bound peptide pools isolated from large amounts of HRSV-infected cells, we identified nine naturally processed HLA-B27 ligands. The isolated peptides derive from six internal, not envelope, proteins of the infective virus. The sequences of most of these ligands are not conserved between different HRSV strains, suggesting a mechanism to explain recurrent infection with virus of different HRSV antigenic subgroups. In addition, these nine ligands represent a significant fraction of the proteome of this virus, which is monitored by the same HLA class I allele. These data have implications for vaccine development as well as for analysis of the CTL response.

P-040

UNUSUAL VIRAL LIGAND WITH ALTERNATIVE INTERACTIONS IS PRESENTED BY HLA-CW4 IN HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS-INFECTED CELLS. D. López¹, S. Infantes¹, E. Lorente¹, J.J. Cargnolini², M. Ramos¹, R. García¹, M. Jiménez¹, S. Iborra¹, M. Del Val¹. ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. ²Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC/Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.

Short viral antigens bound to human major histocompatibility complex (HLA) class I molecules are presented on infected cells. Vaccine development frequently relies on synthetic peptides to identify optimal HLA class I ligands. However, when natural peptides are analyzed,

more complex mixtures are found. By immunoproteomics analysis, we identify here a physiologically processed HLA ligand derived from human respiratory syncytial virus matrix protein that is very different from what was expected from studies with synthetic peptides. This natural HLA-Cw4 class I ligand uses alternative interactions to the anchor motifs previously described for its presenting HLA-Cw4 class I molecule. Finally, this octameric peptide shares its C-terminal core with the H-2Db nonamer ligand previously identified in the mouse model. These data have implications for the identification of antiviral CTL responses and for vaccine development.

P-041

CASPASES IN VIRUS-INFECTED CELLS CONTRIBUTE TO RECOGNITION BY CD8⁺ T LYMPHOCYTES. D. López¹, M. García-Calvo², G. Smith³, M. Del Val¹. ¹Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. ²Department of Metabolic Disorders & Diabetes, Merck Research Laboratories. ³Department of Virology, Faculty of Medicine, Imperial College London.

CD8⁺ cytotoxic T lymphocytes recognize infected cells in which MHC class I molecules present pathogen-derived peptides that have been processed mainly by proteasomes. Many infections induce a set of proteases, the caspases involved in apoptosis or inflammation. Here we report that processing and presentation of a short vaccinia virus-encoded antigen can take place also by a non-proteasomal pathway, which was blocked in infected cells with chemical inhibitors of caspases. By cleaving at non-canonical sites, at least two caspases generated antigenic peptides recognised by T lymphocytes. The sites and the peptidic products were partially overlapping but different to those used and produced by proteasomes in vitro. Antigenic natural peptides produced in infected cells by either pathway were quantitatively and qualitatively similar. Finally, co-expression of the natural vaccinia virus protein B13, which is an inhibitor of caspases and apoptosis, impaired antigen presentation by the caspase pathway in infected cells. These data support the hypothesis that the numerous cellular proteolytic systems, including those induced during infection, such as caspases involved in apoptosis or in inflammation, contribute to the repertoire of presented peptides, thereby facilitating immunosurveillance.

P-042

DISTRIBUCIÓN DIFERENCIAL DE CÉLULAS INKT Y NTREGS EN EL TEJIDO DIANA DE LA RESPUESTA AUTOINMUNE. L. Usero Redrejo¹, E. Codina¹, M. Boshuizen¹, C. Xufré¹, R. Planas², M. Vives-Pi², D. Jaraquemada¹, M. Martí¹, C. Roura-Mir¹. ¹Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Bellaterra. ²Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona.

En enfermedades autoinmunes humanas se ha descrito una frecuencia y función reducida de células inmunoregulatoras, T Natural Killer invariantes (iNKT) y células T reguladoras (nTregs), ambas importantes en el control de la autoreactividad. Estas células además de regular otros tipos celulares se regulan mutuamente. Partiendo de la hipótesis que estas dos poblaciones de células cooperan en el control del proceso autoinmune, nos propusimos analizar su coexistencia en muestras de tejido humano con autoinmunidad.

Se analizaron muestras de páncreas total (TD), islotes purificados (ILL) y bazo (B) de un paciente diabético en el debut de la enfermedad así

como muestras de tiroides de pacientes con Graves-Basedow (GB) y Tiroiditis de Hashimoto (HT) y muestras control. El análisis se realizó por qPCR, amplificando la cadena Vα24-Jα18 del TCR o Foxp3 para cuantificar células iNKT y nTregs respectivamente. Asimismo, se analizó la presencia de ambos tipos celulares in situ por inmunofluorescencia en tejido pancreático de ratón NOD en diferentes fases de la patogénesis de T1D.

El análisis no detectó la expresión del TCR Vα24Jα18 en el páncreas control pero si en las muestras de T1D donde, además, la expresión fue superior en TD que en ILL. Contrariamente, la expresión de Foxp3 fue más elevada en ILL que en TD del páncreas diabético. Así, las células iNKT se concentraban preferentemente fuera de los islotes pancreáticos, mientras que las células nTregs eran reclutadas preferentemente en su interior. Sólo se pudo confirmar esta distribución diferencial por inmunofluorescencia en el páncreas de ratones NOD diabéticos (20 semanas), pero no en ratones prediabéticos (9 semanas) o en el debut de la enfermedad (14 semanas) donde no existía un patrón de distribución evidente.

En las muestras de tiroides autoinmune la expresión del TCR Vα24/Jα18 fue más alta que en los controles, detectando una importante variabilidad en muestras de GB. Contrariamente, la expresión de Foxp3 fue más elevada en las muestras control que en los tiroides autoinmunes. El análisis de los resultados mostró una correlación inversa entre la frecuencia de células T Foxp3+ y células Vα24/Jα18+ en los tiroides con autoinmunidad.

Estos resultados indicarían que las células nTreg e iNKT migran secuencialmente al tejido diana de la respuesta autoinmune donde las células nTregs regularían inicialmente la insulinitis con la colaboración de las células iNKTs en etapas posteriores.

P-044

APOPTOSIS ALTERATION OF NAIVE/EFFECTOR/MEMORY T CELL SUBSETS IN PATIENTS WITH RHEUMATOID ARTHRITIS.

D. Díaz Martín¹, L. Chara Velarde¹, J. Chevarría Montesinos¹, A. Sánchez Atrio², G. Parada Hermoza¹, Z. Moreno Villegas¹, L. Ortega Moreno¹, J. Monserrat Sanz¹, A. Prieto Martín¹, M. Álvarez De Mon-Soto².

¹Universidad de Alcalá de Henares, Alcalá de Henares. ²Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

Background. Dysregulation of T lymphocyte apoptosis has been involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis (RA).

Purpose. To investigate the spontaneous and induced apoptosis in specifically defined naïve/effector/memory subsets in circulating T lymphocytes from untreated and methotrexate (MTX) or anti-TNFα antibodies treated RA patients.

Methods. Peripheral blood mononuclear cells from untreated (20 patients) or treated with MTX (27 patients) or anti-TNFα antibodies (16 patients) RA patients and 14 healthy controls were purified and characterized using monoclonal antibodies and annexin V by eight color flow cytometry in a FACSAria sorter. The percentage of apoptotic lymphocytes was determined after 24 hour culture.

Results. A statistically significant decrease ($p < 0.05$) in spontaneous ex vivo apoptosis was found in naïve CD3⁺CD4⁺ cells (CD45RA⁺CD27⁺) from RA patients with respect to healthy controls. In CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes, we found a significant increase in spontaneous apoptosis in untreated patients that normalized after treatment in terminated and non terminated effector subsets (CD45RA⁺/CD27⁻). In mitogen-induced apoptosis, we found a significant decrease of apoptosis from RA patients with respect to healthy controls in CD4⁺ T cell subsets but no in CD8⁺ T cell subsets. Conclusions: Patients with RA show alterations in spontaneous

and mitogen-induced apoptosis within circulating naïve/effector/memory CD4⁺ and CD8⁺ T-cell subsets. MTX or anti-TNF α treatment normalizes the apoptosis misbalance in several T cell subsets.

P-045

N-RAS ES UN REGULADOR NEGATIVO DE LA EXPRESIÓN DE IL-17 EN LINFOCITOS. T. E. Fernández-Malavé¹, L. Stark Aroeira², S. Iborra². ¹Inmunología, Fac. Medicina, UCM, Madrid. ²Unidad de Investigación, Hosp. la paz, Madrid.

La citocina IL-17(A) identifica al linaje funcional Th17 y contribuye de forma esencial a la actividad fisiopatológica de estas células. La expresión de IL-17 es inducida en linfocitos T por señales iniciadas por el receptor de antígeno (TCR), pero la naturaleza de estas señales no ha sido establecida claramente. Las proteínas de la familia Ras (H-, K- y N-ras) son activadas rápidamente a través del TCR y actúan como interruptores moleculares que controlan respuestas celulares a distintos estímulos externos.

El presente estudio tuvo por objetivo la caracterización del papel de N-ras en la regulación de la expresión de IL-17 en linfocitos T, a través del uso de ratones deficientes de N-ras (N-ras^{-/-}).

Los linfocitos T de los ratones N-ras^{-/-} mostraron una producción aumentada de IL-17 en respuesta a la estimulación vía TCR in vitro con anticuerpo anti-CD3 ó concanavalina A, en comparación con los animales N-ras^{+/+} y H-ras^{-/-}. Esta sobreproducción de IL-17 por las células T N-ras^{-/-} activadas fue observada también en respuesta a antígeno en un modelo TCR transgénico, y en animales infectados con el parásito L. major. Sorprendentemente, a pesar de esta respuesta de IL-17 exacerbada, los ratones N-ras^{-/-} fueron menos susceptibles a la inducción de EAE, un modelo de neuroinflamación mediada de forma crítica por las células Th17.

En conclusión, nuestros resultados identifican a N-ras como un regulador negativo de la expresión de IL-17 en linfocitos T activados, y sugieren que otros factores, adicionalmente a la respuesta Th17, juegan un papel importante en el desarrollo de inflamación autoinmunitaria.

P-046

PAPEL DE LOS DOMINIOS DE CD3GAMMA EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL TCR/CD3. B. Garcillán¹, A.C. Guardo¹, V. Pérez-Flores¹, J.M. Martín-Fernández¹, B. Nielsen², C. Geisler², O. Sana³, L. Allende⁴, J.R. Regueiro¹. ¹Universidad Complutense, Madrid. ²University of Copenhagen. ³Hacettepe University Children's Hospital. ⁴Hospital 12 de Octubre.

La ausencia de CD3 γ (γ^-) se asocia a una linfopenia leve, con linfocitos T maduros cuyo TCR se expresa y señala mal y no se internaliza por ésteres de forbol (PMA). Estos defectos se normalizan al reexpresar la cadena CD3 γ , pero no está claro en qué dominios reside esa capacidad en estas células.

Objetivos. Definir el papel de los distintos dominios de CD3 γ en comparación con los de CD3 δ en la expresión y función del TCR $\alpha\beta$ humano deficiente de CD3 γ .

Material y métodos. Se analizó la expresión y función del TCR/CD3 tras introducir vectores retrovirales bicistrónicos que portaban las cadenas completas (dominios EC, TM e IC) CD3 γ ($\gamma\gamma\gamma$) y CD3 δ ($\delta\delta\delta$) y construcciones quiméricas con diferentes dominios de ambas cadenas $\delta\gamma\gamma$, $\gamma\gamma\delta$ y $\gamma\gamma$ (CD3 γ sin dominio intracitoplásmico) en la línea celular JGN (Jurkat Gamma Negative) y en linfocitos T de individuos γ^- .

Resultados. El dominio extracelular de CD3 γ , pero no el de CD3 δ , es necesario y suficiente para la reexpresión del TCR/CD3 en JGN. En contraste, para la normalización de la expresión del TCR/CD3 en los linfocitos T de individuos γ^- no basta con CD3 γ EC, si no que se requiere una cadena completa con al menos un dominio EC o IC de CD3 γ . Ciertas funciones (modulación por PMA) requieren el dominio IC de CD3 γ , otras (inducción de citocinas) requieren un dominio IC de CD3 γ o CD3 δ , otras (inducción de CD69, reclutamiento de Nck y monovalencia) son más débiles en quimeras con CD3 δ IC y otras (fosforilación de CD3 Δ y flujo de calcio) son independientes del dominio IC de la quimera.

Conclusiones. La cadena CD3 γ tiene funciones no redundantes con CD3 δ necesarias para la modulación del TCR/CD3 por PMA (en su dominio IC) y para su expresión normal en membrana (en sus dominios EC e IC), pero no para la inducción de diversas funciones analizadas

P-047

PAPEL DIFERENCIAL DE LAS CADENAS CD3 γ Y CD3 δ EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DEL COMPLEJO TCR/CD3 EN CÉLULAS T MADURAS. J. Reiné Gutiérrez, E. Martínez Busto, B. Garcillán, E. Fernández-Malavé, M.J. Recio Hoyas, J.R. Regueiro. Facultad de Medicina Universidad Complutense, Madrid.

Introducción. El receptor del linfocito T es un complejo multimérico integrado por diferentes cadenas, en las cuales las cadenas variables TCR (TCR α y TCR β) son las encargadas del reconocimiento antigénico, mientras que las cadenas invariantes CD3 (CD3 ϵ , CD3 γ , CD3 δ y CD3 ζ) son responsables del ensamblaje y expresión del complejo TCR/CD3, así como de la señalización intracelular. El papel específico de cada una de las cadenas CD3 dentro del complejo TCR, sigue siendo materia de discusión.

Objetivos. a) Determinar el papel de la cadena CD3 γ en la señalización del TCR en células deficientes de CD3 γ transformadas con *Herpesvirus saimiri* b) Silenciamiento de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la expresión y función de linfocitos T maduros.

Material y métodos. En los estudios de señalización monitorizamos: a) La fosforilación de las determinadas proteínas (ERK, JNK y p38) de la ruta de las MAPK quinasas en respuesta a anticuerpos anti-CD3 b) La expansión de iNKT (V α 24+V β 11+) en respuesta a α -GalCer (α -Galactosil-ceramida). En los estudios de silenciamiento los linfocitos T Jurkat fueron electroporados con un pool de oligos siRNA específicos. La expresión del complejo TCR/CD3 se monitorizó por citometría de flujo (SK7; BMA031) al cabo de 24 horas post-tratamiento. Para evaluar el grado de interferencia de las proteínas CD3 γ y CD3 δ se realizaron tinciones intracelulares con el antisuero α -CD3 γ (TG5) y western-blot con el anticuerpo α -CD3 δ (APA1/2), respectivamente.

Resultados y conclusiones. Nuestros resultados indican que la ausencia de CD3 γ no afecta a la fosforilación de ERK y p38 tras la estimulación (JNK no es informativo debido a su elevada actividad basal). Por otra parte, la expansión de las células iNKT en células deficientes de CD3 γ fue similar a la observada en células control. Por lo tanto, podemos concluir que en los linfocitos T maduros, la cadena CD3 γ no participa a través de las rutas analizadas. Los resultados de silenciamiento mostraron un papel diferencial de las cadenas CD3 γ y CD3 δ en la topología final del complejo TCR/CD3. Sin embargo, no se observaron diferencias funcionales, salvo la modulación mediada por PMA, selectivamente afectada en las células silenciadas con CD3 γ . Estos resultados sugieren la existencia de funciones redundantes y específicas para ambas cadenas.

P-048**IMPLICACIONES FUNCIONALES DE LA ROTURA PROTEOLÍTICA DEL ADAPTADOR LAT.** A. García-Blesa¹, M. Martínez-Florensa², C. López-Osuna³, A. Alonso⁴, F. García-Cózar¹, E. Aguado⁴.¹Universidad de Cádiz, Puerto Real. ²Hosp. Clínic, Barcelona. ³Hosp. Universitario de Puerto Real. ⁴Hospital Carlos Haya-Universidad de Málaga.

El reconocimiento de antígenos por parte de los linfocitos T es uno de los requisitos esenciales para una adecuada respuesta inmune a determinadas infecciones. Tras este reconocimiento a través del TCR, se desencadenan en las células T una serie de señales intracelulares en las que el adaptador de membrana LAT ("Linker for the Activation of T cells") tiene un papel central como plataforma sobre la que se unen y activan otras proteínas que intervienen en la cascada de señalización intracelular.

La correcta transducción de esas señales intracelulares puede conducir a la activación y proliferación de las células T, aunque en determinadas condiciones pueden provocar su entrada en apoptosis. La apoptosis es por tanto un fenómeno de enorme relevancia no sólo en el desarrollo y la homeostasis de organismos multicelulares, sino también para el correcto desarrollo de las respuestas inmunes. Cuando las células T entran en el proceso de muerte celular, se produce la activación de una serie de proteasas llamadas caspasas que, entre otras, tienen como dianas a varias moléculas implicadas en la transducción de señales de células T. En este trabajo, nuestro grupo demuestra que el adaptador de membrana LAT sufre una rotura proteolítica tras la inducción de apoptosis de células T. Además, hemos demostrado que LAT se rompe por al menos dos sitios y hemos encontrado cuáles son esos sitios. Por último, se han analizado las implicaciones funcionales de la rotura proteolítica de LAT para su función de transmisión de señales de activación de células T.

P-049**FUNCIONALIDAD DE LINFOCITOS T CD8 E INMUNOSENESCENCIA: RELACIÓN CON LA INFECCIÓN POR CMV.** A. Pera, I. Gayoso, M.D.C. Campos, N. Rojas, S. Cantisan, B. Sánchez, S. Morgado, J. Casado, R. Tarazona, R. Solana. Hospital Reina Sofía de Córdoba, Córdoba.

Los linfocitos T pueden producir múltiples citoquinas en cada momento, definiéndose un perfil de linfocitos principalmente monofuncionales o polifuncionales. A este respecto, se ha demostrado que existe una correlación entre la multifuncionalidad y una adecuada respuesta inmunitaria. Las células T CD8 multifuncionales se encuentran presentes en individuos con infecciones víricas bien controladas de virus como el Epstein-Barr, CMV, Influenza y VIH en no progresores. Los linfocitos T CD4 multifuncionales se correlacionan con protección frente a Leishmania en un modelo murino. En estos modelos la multifuncionalidad predice la progresión. Por tanto, la "calidad" de los linfocitos T que responden (entendida como la capacidad de una determinada célula de desarrollar múltiples funciones) es más importante que la "cantidad" de linfocitos T específicos. El objetivo de este trabajo se ha centrado en el estudio de la multifuncionalidad de linfocitos T CD8 de individuos jóvenes y ancianos sanos, y su posible relación con la infección por CMV. Para ello se ha estudiado el efecto de la edad sobre la capacidad multifuncional de las células T CD8 mediante la detección por citometría de flujo de CD107/INF γ /TNF, en individuos sanos en respuesta al péptido de CMV pp65 y a SEB (superantígeno). Los resultados indican que existen distintas poblaciones de linfocitos T CD8 con una, dos o tres de las funciones estudiadas tanto en individuos jóvenes como en individuos ancianos. Se encontraron diferencias en la respuesta frente a

pp65 o a SEB, observándose que la edad tiene un efecto sobre la capacidad multifuncional de las células estudiadas, en respuesta a CMV.

P-050**EL DOMINIO IG DE CD3D ES NECESARIO PARA EL DESARROLLO DE LOS LINFOCITOS TAB, PERO NO GD EN HUMANOS.**E. Martínez Busto¹, J. Reiné¹, Á. Mencía², J. Couso¹, D. Gurbindo³, J. Gil³, M.Á. Moreno-Pelayo², M.J. Recio¹, J.R. Regueiro¹. ¹Facultad de Medicina. UCM, Madrid. ²Unidad de Genética Molecular. Hospital Ramón y Cajal. ³Hospital General Universitario Gregorio Marañón.

La ausencia completa de CD3 δ en humanos se asocia a SCID temprana (5 meses) y con inmunofenotipo T α -, T $\gamma\delta$ -B+NK+. Estamos analizando un paciente con SCID tardía (14 meses) e inmunofenotipo T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ -B+NK+. El análisis molecular realizado en el paciente, muestra una nueva mutación localizada en el intrón 2 (IVS2+5G>A) del gen CD3D. La mutación afecta a una posición conservada del sitio donador para el procesamiento del RNA mensajero y causa la pérdida del exón 2. Este cambio se encuentra en homocigosis en el paciente y en heterocigosis en los padres. Ninguno de los 70 controles sanos analizados, utilizando el análisis de restricción con la enzima BsaI, presenta el cambio descrito, lo que lo excluye como un posible polimorfismo.

La proteína CD3 δ resultante pierde el dominio Ig, pero conserva el motivo CXXCXEXX, que linda con la región transmembranal y es necesario para el correcto ensamblaje del complejo TCR/CD3. Los estudios de transfección realizados en células 293T muestran que esta proteína CD3 δ sin exón 2, pero no sin exón 3, es estable in vitro. Este resultado explicaría la expresión, aunque disminuida, del complejo TCR/CD3 en los linfocitos T del paciente y la tinción normal con el anticuerpo APA1/2 específico de CD3 δ intracelular. El hecho de que exista una linfopenia T α , selectiva refleja el papel diferencial del dominio Ig de CD3 δ en la selección tímica de linfocitos T $\alpha\beta$ vs $\gamma\delta$. Los escasos linfocitos T α , del paciente son oligoclonales y se asocian a inmunopatología Th2 (hiperIgE, eosinofilia). Se especula sobre el posible papel protector de los linfocitos T $\gamma\delta$ en el paciente.

Conclusiones. Esta es la primera inmunodeficiencia de CD3 δ descrita asociada con una linfopenia T α , selectiva (T $\alpha\beta$ -T $\gamma\delta$ -B+NK+) y ayuda a establecer en el papel del dominio Ig de CD3 δ en el desarrollo de los linfocitos T $\alpha\beta$, pero no en $\gamma\delta$ en humanos.

P-051**RELEVANCIA DE LAS INTERACCIONES LIGANDO/RECEPTOR MEDIADAS POR CD5 EN LA HOMEOSTASIS DE POBLACIONES LINFOCITARIAS CON POSIBLE FUNCIÓN REGULADORA.** R. Fenutria¹, V. Gil², J. Sintés³, J. Merino⁴, C. Raman⁵, R. Merino⁶, P. Engel⁷, M. Ramos-Casals⁸, G. Soldevilla⁸, F. Lozano⁹.
¹Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer, Barcelona. ²Hosp. Clínic de Barcelona. ³Dpto. de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias, Univ. de Barcelona. ⁴Dpto. de Biología Molecular, Univ. de Cantabria, Santander. ⁵Dpt. of Medicine, University of Alabama. ⁶Dpto. de Biología Molecular, Univ. de Cantabria, Santander. ⁷Dpto. de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias, Univ. de Barcelona. ⁸Instituto de Investigaciones Biomédicas, Univ. Nacional Autónoma de México. ⁹Dpto. de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias, Univ. de Barcelona.

CD5 es una glicoproteína tipo I linfocitaria perteneciente a la Superfamilia de Receptores Scavenger Ricos en Cisteína (SRCR), que inclu-

ye tanto proteínas de membrana (e.g. CD6) como secretadas (e.g. SpA), que están implicadas en el desarrollo del Sistema Inmune y en la regulación de sus respuestas. CD5 está constitutivamente expresado en timocitos, en todos los linfocitos T maduros y en la subpoblación B1a de células B. Del estudio de modelos knock-out se ha demostrado que CD5 tiene un papel modulador negativo de las señales liberadas por el receptor de antígeno de las células T y células B.

En el presente estudio se describen datos fenotípicos obtenidos de un modelo transgénico murino generado en nuestro laboratorio que expresa una forma recombinante soluble del receptor CD5 humano (rshCD5tg) bajo el control del enhancer de las cadenas pesadas μ (Ep). Dichos animales presentan niveles séricos elevados de dichas formas solubles circulantes, susceptibles de unirse al/los ligando/s todavía desconocido/s de CD5 y de bloquear las señales intracelulares mediadas por este receptor. De acuerdo con esta hipótesis el análisis citofluorimétrico de distintas poblaciones linfocitarias, demostró una disminución significativa de células T reguladoras (CD4+CD25+FoxP3+) a nivel de timo y ganglios linfáticos, así como de células B1a (CD5+) en peritoneo y de Natural Killer (NK1.1+) en bazo. Estos datos sugieren que las interacciones moleculares mediadas por CD5 son relevantes para la homeostasis de determinadas poblaciones linfocitarias con funciones reguladoras.

Consecuentemente, los animales rshCD5tg presentaron formas más severas de modelos experimentales murinos de enfermedad autoinmune (Encefalitis Autoinmune Experimental y Artritis inducida por Colágeno II).

SESIÓN 5: INMUNIDAD E INFECCIÓN

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

P-052

ACTIVIDAD BACTERICIDA DEL SUERO HUMANO FRENTE A RHODOCOCCLUS EQUI. PAPEL DEL COMPLEMENTO. S. Remuzgo Martínez¹, L. Pilares Ortega², I. Beares Gómez², D. Padilla Castillo³, J. Navas Méndez⁴, J. Ramos Vivas¹. ¹Hospital Santa Cruz de Liencres, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla IFIMAV, Liencres. ²Hospital Santa Cruz de Liencres, Santander. ³Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), Arucas. ⁴Universidad de Cantabria, Santander.

Objetivos. El objetivo del presente trabajo es evaluar la actividad bactericida del suero humano frente a distintas cepas del patógeno oportunista humano *Rhodococcus equi*.

Material y métodos. Bacterias: 10 aislados clínicos de *R. equi* procedentes de pacientes con neumonía. Las cepas han sido clasificadas por métodos genotípicos y fenotípicos para determinar sus características de virulencia. Suero: Hemos obtenido sangre a partir de pacientes sanos y posteriormente hemos conseguido un pool de suero con el que hemos realizado ensayos de cinéticas de resistencia a la actividad antibacteriana del complemento.

Resultados y conclusiones. *R. equi* es un patógeno oportunista en personas inmunodeprimidas del que se tiene poca información respecto a la biología de su infección. En el presente trabajo hemos demostrado que la capacidad bactericida del suero humano depende del fenotipo de *R. equi*, evidenciando la presencia de cepas resistentes a dicha actividad bactericida. Hemos demostrado además, que entre los fenotipos y genotipos de esta especie, hay cepas que presentan una alta resistencia al suero humano y a las proteínas del complemento, la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos.

tipo de *R. equi*, evidenciando la presencia de cepas resistentes a dicha actividad bactericida. Hemos demostrado además, que entre los fenotipos y genotipos de esta especie, hay cepas que presentan una alta resistencia al suero humano y a las proteínas del complemento, la primera línea de defensa contra microorganismos patógenos.

P-053

CEPAS SUPER-INVASIVAS DE RHODOCOCCLUS EQUI INDUCEN LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS PRO-INFLAMATORIAS EN CÉLULAS PULMONARES HUMANAS. J. Ramos Vivas¹, S. Remuzgo Martínez¹, L. Álvarez Rodríguez², L. Pilares Ortega³, C. Santa Cruz Llata², I. Beares Gómez², F. Acosta Arbelo⁴, M. López Hoyos⁵, J. Navas Méndez³. ¹Hospital Santa Cruz de Liencres, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Liencres. ²Hospital Santa Cruz de Liencres, Liencres. ³Universidad de Cantabria. ⁴Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA), Arucas. ⁵Hospital Santa Cruz de Liencres, Liencres.

Objetivos. Examinar la inducción de citoquinas proinflamatorias por cepas de *Rhodococcus equi* aisladas de humanos, en células pulmonares.

Material y métodos. Hemos testado una batería de cepas de *R. equi* para determinar en qué medida esta especie es capaz de invadir células epiteliales humanas e inducir una respuesta pro-inflamatoria. Hemos producido un anticuerpo contra esta especie, para realizar estudios de inmunofluorescencia y ensayos de tinción diferencial. También hemos aplicado ensayos de protección con antibióticos para estudiar el tráfico intracelular de *R. equi* en células pulmonares A-549. Posteriormente, hemos utilizado citometría de flujo para determinar la producción de citoquinas mediante ensayos CBA.

Resultados y conclusiones. Hemos demostrado por primera vez que el patógeno oportunista *R. equi* es capaz de invadir células pulmonares humanas, lo que puede ser importante para establecer un estado de portador, y resistir al sistema inmunológico innato. Hemos demostrado también que en esta especie, el plásmido al que se atribuye su virulencia no es necesario para la invasión, y que las cepas super-invasivas sobreviven en el interior celular y son capaces de inducir IL-6 e IL-8 en células pulmonares humanas.

P-054

INTERACCIÓN DEL PATÓGENO HUMANO OPORTUNISTA HAFNIA ALVEI CON LA LÍNEA CELULAR FAGOCÍTICA J774. S. Remuzgo Martínez¹, I. Beares Gómez², L. Pilares Ortega³, D. Padilla Castillo⁴, F. Acosta Arbelo⁴, J. Ramos Vivas¹. ¹Hospital Santa Cruz de Liencres, Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla, Liencres. ²Hospital Santa Cruz de Liencres. ³Universidad de Cantabria. ⁴Instituto Universitario de Sanidad Animal (IUSA),

Objetivos. Evaluar la capacidad de adherencia del patógeno oportunista *Hafnia alvei* sobre la línea celular de macrófagos J774.

Material y métodos. Hemos caracterizado una colección de aislados clínicos de la especie *Hafnia alvei* mediante PCR, para identificar factores de virulencia implicados en la adherencia de esta especie a células fagocíticas. Hemos desarrollado anticuerpos contra diferentes cepas de *H. alvei* para estudiar mediante inmunofluorescencia las interacciones de este patógeno con células del sistema inmunitario. Mediante cinéticas de adherencia e internalización hemos estudiado el comportamiento de esta enterobacteria en contacto con macrófagos J774.

Resultados y conclusiones. Hemos comprobado como la diversidad fenotípica de *H. alvei* puede ser determinante para el control de la infección por parte de células del sistema inmunitario innato. Hemos evidenciado por primera vez que esta especie muestra "variación de fase" en presencia de células fagocíticas, ya que una misma cepa puede presentar células en fase ON (fenotipo rugoso, expresando fimbrias) o en fase OFF (fenotipo liso, sin producción de fimbrias). Esta variación de fase podría ser determinante en la evasión o en la adherencia a células del sistema inmunitario. Mediante microscopía electrónica de transmisión y microscopía láser confocal hemos estudiado en detalle tanto la superficie de las diferentes cepas, como su interacción con las células fagocíticas.

P-055

LA INTENSIDAD DE LA RESPUESTA A CMV CONDICIONA EL ESTADO FUNCIONAL E INMUNOLÓGICO EN LOS INDIVIDUOS DE EDAD AVANZADA. M.A. Moro García¹, R. Alonso Arias¹, 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, Oviedo.

Objetivos. El deterioro del sistema inmune se asocia con una menor supervivencia en ancianos, habiéndose definido incluso un perfil de riesgo inmunológico que incluye la inversión del cociente CD4/CD8 y la seropositividad a CMV. La capacidad funcional también se relaciona con su longevidad y existen determinados índices, como el de Barthel (IB), que permiten su clasificación. El objetivo de este trabajo fue estudiar si existe asociación entre el deterioro funcional e inmunológico en individuos de edad avanzada.

Material y métodos. Se estudiaron 100 ancianos procedentes de la residencia Santa Teresa de Oviedo, que fueron divididos en cuatro grupos, homogéneos en edad, según su IB. De mayor a menor capacidad funcional: grupo 0 (n=25), grupo 1 (n=25), grupo 2 (n=27) y grupo 3 (n=23). Se realizó caracterización de las subpoblaciones celulares por citometría de flujo, cuantificación de TRECs mediante "real time-PCR" y respuesta proliferativa y de activación (CD69, IFN- γ por ELISPOT) de células T frente a anti-CD3 y CMV. También se realizó cuantificación por ELISA del título de anticuerpos específicos frente al virus de la gripe y CMV.

Resultados. Los individuos con peor estado funcional presentaron niveles significativamente aumentados de células NK y disminuidos de linfocitos B, no encontrándose diferencias en otras poblaciones leucocitarias como polimorfonucleares, monocitos y linfocitos T. Presentaban también una proporción significativamente menor de células CD4+ y mayor de CD8+, con un cociente CD4/CD8 disminuido. Los niveles de TRECs en linfocitos T CD4+ fueron significativamente menores en los individuos de los grupos 2/3, correlacionándose con una menor frecuencia de las subpoblaciones de células naïve (CD45RA+CCR7+) y mayor de células efectoras (CD45RA-CCR7-). La respuesta celular frente a anti-CD3 disminuyó gradualmente a medida que empeoraba el estado funcional y aumentaba la respuesta de células específicas a CMV y el título de anticuerpos frente al virus. Inversamente, la respuesta funcional in vivo, valorada por el título de anticuerpos generados tras la vacunación frente al virus de la gripe fue mayor en los individuos con mejor estado funcional.

Conclusiones. Existe una clara asociación entre el deterioro funcional de los individuos de edad avanzada y el envejecimiento de su

sistema inmune, estando ambos parámetros directamente relacionados con la intensidad de la respuesta a CMV.

P-056

UTILIDAD DE UN TEST IN VITRO DE PRODUCCIÓN DE INTERFERÓN-G EN RESPUESTA A M. TUBERCULOSIS EN PACIENTES CON UVEITIS CRÓNICA POSTERIOR. S. Calleja Antolín, M. Cordero Coma, H.E. Torres Rivas, C. Cuellas, N. Aller, O. Del Árbol, A.I. De Castro, M.I. Sánchez Salazar, J.M. García Ruiz De Morales. Hospital de León, León.

Objetivos. Evaluar la utilidad de los nuevos test in vitro de producción de interferón-g en respuesta específica a antígenos de *M. tuberculosis* en una población seleccionada de pacientes inmunosuprimidos con uveítis posterior crónica idiopática.

Material y métodos

Diseño. Estudio prospectivo, intervencional; Estudio caso-control.

Método. Se investigó a 31 pacientes con uveítis crónica idiopática, o panuveítis para una respuesta inmune frente a tuberculosis. Se consideró una posible uveítis tuberculosa cuando los hallazgos oftalmológicos eran compatibles y se confirmaba una respuesta inmune específica frente a *M. tuberculosis*, con la realización in vitro de un ensayo de producción de interferón-g en respuesta a antígenos específicos (Quantiferon-TB GOLD, Cellestis). Se registro la respuesta a tratamiento antituberculostático.

Resultados. En 8 de 52 controles (15,38%) y en 10 de los 31 pacientes con uveítis (32,25%), el test del quantiferón-TB resultó positivo (OR: 2,69, IC: 0,90-7,59, p= 0,07). En 2 pacientes el resultado de la prueba fue indeterminado. Ocho pacientes positivos y uno negativo para Quantiferon, fueron inicialmente tratados para uveítis tuberculosa. Sólo uno de ellos tenía evidencia de afectación sistémica, ninguno había sido diagnosticado previamente de tuberculosis, habiendo recibido medicación inmunosupresora sistémica diversa, sin resultados óptimos sobre su patología inflamatoria ocular. Tras nueve meses de tratamiento antituberculostático, siete de los pacientes previamente Quantiferon positivo y uno de los quantiferon negativo mostraron un descenso de la inflamación ocular, con mejoría de su agudeza visual. No se observaron recaídas.

Conclusiones. El test de Quantiferon fue de utilidad en la toma de decisiones terapéuticas en pacientes inmunosuprimidos con uveítis crónica posterior en un área geográfica de prevalencia intermedia-alta de tuberculosis

P-057

PRESENCIA DE CÉLULAS NKT HUMANAS Y EXPRESIÓN DE CD1D EN LA INFECCIÓN CUTÁNEA POR LEISHMANIA INFANTUM. Y. Campos-Martín¹, P. Algara¹, Y. Ruano¹, J.A. Arribas¹, D. García Almagro¹, E. Martínez-Naves², M. Mollejo¹. ¹Hospital Virgen de la Salud, Toledo. ²Universidad Complutense, Madrid.

Introducción. La respuesta inmune frente a *Leishmania infantum* ha sido estudiada principalmente en animales de experimentación. Las Leishmanias poseen una enorme capacidad de resistencia a ambientes hidrolíticos debido a una densa superficie de glicolípidos que poseen en su cubierta, siendo CD1d el principal candidato para presentarlos. CD1d presenta antígenos a células T conocidas como NKTs. En humanos, ha sido estudiada la infección de células dendríticas in vitro

por *L. infantum* y se ha observado un aumento de expresión de CD1d tras la infección en la superficie celular. En estudios funcionales, células NKT autólogas responde a ese aumento de expresión, con una actividad citolítica frente a las células infectadas y con una producción INF-gamma, de gran importancia para el comienzo de una respuesta inmune efectiva.

Objetivo. Estudiar la presencia de células CD1d+ y NKT en muestras cutáneas humanas diagnosticadas de Leishmaniasis.

Metodología. Se han incluido las siguientes muestras: 15 biopsias cutáneas con leishmaniasis con amplificación por PCR de secuencias repetidas de *Leishmania infantum*; 15 biopsias cutáneas con procesos inflamatorios sin *L. infantum* (PCR negativas) y 8 biopsias cutáneas con psoriasis utilizadas como control. Los estudios de expresión de CD1d y NKT se han realizado con técnicas inmunohistoquímicas (CD1d) y de inmunofluorescencia (Valpha24). El estudio de reordenamiento del TCR semi-invariante (Valpha24/alphaQ/Vbeta11) en células NKT se ha realizado por PCR.

Resultados. En todas las biopsias cutáneas estudiadas con *L. infantum* la dermis muestra un denso infiltrado inflamatorio con un alto porcentaje de células que expresan CD1d, mientras que en las biopsias cutáneas inflamatorias sin *L. infantum* incluidas en el estudio, la expresión de CD1d es observada en menor número de células. La presencia de células NKT se observa en el 100% de las infecciones cutáneas *L. infantum* positivas, no observándose en los otros procesos inflamatorios sin leishmanias. En los casos incluidos de psoriasis, la expresión de CD1d es principalmente en la epidermis y en todos los casos se ha demostrado la presencia de células NKT por PCR, como ha sido descrito.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en este trabajo apoyan los ya obtenidos in vitro y confirman la alta expresión de CD1d y la importancia que juegan las células NKT en el comienzo de la respuesta inmune frente a la infección cutánea por *L. infantum*.

P-058

DESCENSO DEL NUMERO ABSOLUTO DE LINFOCITOS CD4+ ASOCIADO A NEUMONÍA POR PNEUMOCISTIS JIROVECI EN EL TRANSCURSO DE UNA INFECCION POR VIRUS INFLUENZA H1N1. P. Jiménez Gámiz, J.M. Gonzalez De Vega, M. Bernal, F. Valero, E.M. García Huertas, F. Garrido Torres-Puchol, F. Ruiz-Cabe- llo Osuna. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Una paciente de 49 años ingresó en Octubre de 2009 en el Servicio de Respiratorio de nuestro hospital presentando un cuadro de fiebre, disnea, tos e infiltrados bibasales en la radiografía de torax. El cuadro clínico se atribuyó a una infección por virus influenza H1N1 que fue confirmada mediante el análisis molecular de una muestra de un frotis faríngeo. La paciente mejoró clínicamente tras la instauración del tratamiento específico del proceso, pero una semana más tarde sufre un empeoramiento originado por una sobreinfección por *Pneumocistis jirovecii*, detectado en el lavado broncoalveolar. Durante la evolución del proceso las cifras de linfocitos totales experimentaron un descenso progresivo: desde 969 c/μL en el momento del ingreso hasta 562 c/μL cuando acontece la sobreinfección por *Pneumocistis jirovecii*. El análisis de las subpoblaciones linfocitarias mediante citometría de flujo reveló que la linfopenia era generalizada, afectando a las cifras de linfocitos T CD4+ (212 c/μL), linfocitos T CD8+ (153 c/μL) y de linfocitos B (38 c/μL). No se detectaron defectos funcionales en los linfocitos T CD4+ en un ensayo in vitro de activación linfocitaria tras la esti-

mulación con mitógenos. La linfopenia fue transitoria y las cifras de linfocitos recuperaron los niveles normales al resolverse el cuadro clínico.

La respuesta inmune del huésped se ve afectada en el curso de múltiples infecciones virales. La mayoría de las infecciones causadas por el virus H1N1 tienen un curso leve, sin embargo un pequeño número de pacientes presentan complicaciones respiratorias. Es posible que en estos casos el efecto del virus H1N1 sobre la respuesta inmune del paciente esté implicado. Sin embargo, debido a su reciente aparición, la inmunopatogénesis de la infección por el virus influenza H1N1 es poco conocida. El *Pneumocistis jirovecii* es un patógeno que causa neumonías en los pacientes inmunodeprimidos. El riesgo de neumonía por *Pneumocistis jirovecii* está asociado al descenso del número absoluto de los linfocitos T CD4+, incrementándose cuando este desciende por debajo de 200 c/μL. En el caso que presentamos el descenso transitorio y progresivo de las cifras de linfocitos T CD4 se asocia a una sobreinfección por *Pneumocistis jirovecii*. Otros autores han detectado descenso en las cifras de linfocitos T CD4+ y de linfocitos B en pacientes infectados por el virus influenza H1N1. Sin embargo, serán necesarios más estudios para establecer la asociación entre la linfopenia CD4 y la neumonía por *Pneumocistis jirovecii* en los pacientes infectados por el virus influenza H1N1. En este sentido, la determinación del número absoluto de linfocitos T CD4+ puede constituir un marcador muy útil para monitorizar el riesgo de desarrollar infecciones oportunistas e implantar la profilaxis específica.

P-060

PURIFICACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE RICINA EN MATRICES COMPLEJAS UTILIZANDO ANTICUERPOS ESPECÍFICOS. M.D.V. Jiménez Pérez, B. Fernández Frutos, I. Peraile Muñoz, J.C. Cabria Ramos. Instituto Tecnológico La Marañosa, San Martín de la Vega.

La toxina ricina, presente en las semillas de la planta "Ricinus communis" (Castor beans) pertenece a una familia de proteínas conocidas como inactivantes de los ribosomas (ribosome-inactivating proteins, RIPs), y es prototipo de toxinas de estructura A-B. La cadena B es una lectina que se une a una galactosa de la superficie celular, facilitando la entrada de la subunidad A al interior del citosol. La cadena A inhibe la síntesis de proteínas mediante la inactivación de los ribosomas de las células eucariotas conduciendo a la muerte celular.

Debido a su alta letalidad (LD₅₀ de 2g/Kg), su elevada estabilidad así como su facilidad de obtención está considerada como un arma biológica potencial.

Por todo ello es necesaria su identificación por métodos rápidos y específicos a partir de matrices de diferente complejidad.

Objetivos. Los objetivos de este trabajo y, por tanto, de la Unidad de Defensa Biológica del Instituto Tecnológico la Marañosa:

- Detección de ricina mediante la técnica inmunoenzimática ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay).
- Utilización de anticuerpos para la purificación de la Ricina de muestras complejas.

Material y métodos

- ELISA sandwich para detectar las subunidades A y B de la Ricina: la ricina al ser una molécula de elevado peso molecular (65 kDa) permite la obtención de anticuerpos monoclonales frente a diferentes regiones de la molécula. En concreto, para este trabajo se han utilizado anticuerpos monoclonales frente a la cadena A y frente a la cadena B respectivamente. Se han desarrollado métodos de

amplificación de la señal marcando con biotina el Anticuerpo monoclonal frente a la cadena B.

- Para la purificación de la Ricina de matrices complejas se utilizó una separación inmunomagnética. La aplicación de un campo magnético permite separar la ricina, previamente unida a las bolas magnéticas mediante un anticuerpo, del resto de la matriz.

Resultados. Los resultados obtenidos han sido la puesta a punto de una tecnología eficaz para la identificación de ricina, basada en una separación inmunomagnética previa a una cuantificación mediante ELISA tipo sandwich. Los resultados se expresan extrapolando los mismos en una curva patrón donde se representa la media de los resultados de absorbancia frente a diferentes concentraciones de ricina. La curva obtenida se ajusta a una ecuación logística de cuatro parámetros según la siguiente ecuación:

$$DO = A + \frac{B - A}{1 + \left(\frac{\text{concentración}}{EC_{50}} \right)^{-C}}$$

donde A es la absorbancia mínima, B es la absorbancia máxima y C es la concentración que produce un 50% de absorbancia máxima (EC_{50}) de la curva sigmoideal. El intervalo de confianza de la curva se basa en el cálculo de la t de Student.

Conclusiones. Este inmunoensayo, mediante la utilización de anticuerpos monoclonales específicos, ha demostrado ser una técnica versátil, robusta y simple en su realización, que permite la purificación e identificación de ricina en matrices complejas.

P-061

IDENTIFICACIÓN DE ESPORAS DE BACILLUS ANTHRACIS MEDIANTE LA CITOMETRÍA DE FLUJO COMO TÉCNICA INMUNOLÓGICA. I. Peraile Muñoz, M.D.V. Jiménez Pérez, B. Fernández Frutos, J.C. Cabria Ramos. Instituto Tecnológico La Marañosa, San Martín de la Vega.

Bacillus anthracis (*B. anthracis*) es el agente etiológico del ántrax, enfermedad que presenta asociada una alta tasa de mortalidad. Las esporas de *B. anthracis* se diseminan fácilmente, se encuentran de forma natural en el suelo de muchas regiones y son altamente resistentes frente a condiciones medioambientales extremas. Todo esto explica por qué las esporas de *B. anthracis* han sido históricamente utilizadas como armas biológicas. Por lo tanto la puesta a punto de técnicas capaces de detectar la presencia de esporas de *B. anthracis* con rapidez y precisión es un objetivo prioritario en la Unidad de Defensa Biológica del Instituto Tecnológico La Marañosa.

Objetivo. El objetivo de este trabajo es la utilización de la citometría de flujo como técnica inmunológica para la determinación de esporas de *B. anthracis* en diversas matrices.

Material y métodos. *B. anthracis* presenta gran similitud genética con muchas especies del género *Bacillus*, con las que, además, comparte hábitat, lo que dificulta su determinación específica e inequívoca en matrices ambientales. La detección precisa de esporas de *B. anthracis* mediante ensayos tradicionales que requieren la germinación de la spora y el crecimiento de células vegetativas tienen el inconveniente de ser lentos; otras técnicas, como las de Biología Molecular, son rápidas, no requieren la germinación de la spora, pero llevan asociados complicados protocolos para el tratamiento de la muestra. Las técnicas inmunológicas surgen como una poderosa alternativa en la detección de agentes susceptibles de ser utilizados como armas de guerra

biológica, dada la gran especificidad y rapidez de las reacciones antígeno - anticuerpo. Entre las técnicas inmunológicas destaca la citometría de flujo, que permite determinar simultáneamente diversos epítomos característicos de la spora de *B. anthracis*, en su mayoría presentes en el exosporium, mediante su unión específica a anticuerpos y/o péptidos marcados con distintos fluorocromos. Esta técnica, además de ser rápida y específica, no exige un laborioso procesamiento de la muestra, con lo que se minimizan los riesgos asociados a su manipulación.

Resultados. La detección específica de esporas de *B. anthracis* por citometría de flujo es posible mediante la utilización de marcadores específicos de su exosporium, como lo es el péptido ATYPLPIRGGGC (Williams y col., 2003) o determinados anticuerpos (Kuehn y col., 2009), diferenciándolas así de manera fiable y rápida de otras esporas del mismo género como *B. cereus* o *B. thuringiensis*. Además, también es posible determinar la posible virulencia de la cepa mediante el uso de un anticuerpo específico contra el antígeno protector PA (Schumacher y col., 2008).

Conclusiones. La citometría de flujo mediante la utilización conjunta de marcadores específicos, permite detectar específicamente y al instante esporas de *B. anthracis*, y determinar su posible virulencia, no exigiendo la muestra prácticamente ningún procesamiento.

P-062

ESTUDIO DE LA SUBPOBLACIÓN NK CD56-CD16+ DE PACIENTES HIV+ EN DIVERSAS SITUACIONES CLÍNICO-TERAPÉUTICAS. L. Castro Orgaz, M. Frias Casas, R. González Fernández, B. Manzanares Martín, M. Cobo Medina, L. Montes Torres, J. Peña Martínez. Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba, Córdoba.

Objetivos. Un importante componente de la inmunidad innata son las células Natural Killer. De estas células se han descrito tres subpoblaciones: CD56dim (función citotóxica), CD56^{bright} (función inmunorreguladora) y una tercera población menos estudiada CD56-CD16+ (baja citotoxicidad). Ciertos cambios en esta última población fueron inicialmente descritos en pacientes HIV+. Una de las características de esta población es su baja capacidad citotóxica, basado en esto el objetivo de este estudio es analizar la población CD56-CD16+ en pacientes HIV+ en diversas situaciones clínico-terapéuticas entre los que se encuentran aquellos pacientes a los que se les ha retirado el tratamiento.

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

Resultados. Los resultados obtenidos muestran un incremento significativo de la subpoblación CD56-CD16+ en pacientes HIV+ sin HAART respecto a aquellos pacientes HIV+ con HAART y a los donantes sanos (p<0,05). Este incremento sería en detrimento del resto de subpoblaciones CD56+ (dim y bright) que tienen tendencia a disminuir.

Conclusión. El análisis fenotípico de las células NK en pacientes HIV+ sin HAART ha mostrado que hay una pérdida selectiva de la población citolítica CD56+CD16+ y una expansión en la subpoblación

CD56-CD16+. En estos pacientes sin HAART dicha subpoblación expresa unos elevados niveles de iNKRs, principalmente el receptor inhibidor CD85j ó ILT2 y bajos niveles de NCRs, en comparación con la población CD56+.

P-063

CÉLULAS T CD4+ REGULADORAS EN NEONATOS DE MUY BAJO PESO Y RIESGO DE SEPSIS. M. Cianchetta Sívori, M. Sánchez-Luna, E. Zamora, E. Maderuelo, S. Villar, B. Alonso, B. Padilla, S. Sánchez-Ramón. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

La sepsis neonatal es una complicación grave en neonatos de muy bajo peso (MBP) y causa importante de secuelas graves y mortalidad en esta población. Por tanto, es necesario identificar marcadores predictivos tempranos de sepsis neonatal. Las células T reguladoras (Treg) son una subpoblación especializada de células T de origen tímico que participan en la tolerancia inmunológica y en la supresión de las respuestas efectoras.

Objetivo. Determinar los marcadores clínicos e inmunológicos capaces de predecir el riesgo de sepsis neonatal. **Materiales y Métodos:** Se incluyeron de forma consecutiva 37 neonatos de MBP (<1.500g). Se evaluaron parámetros clínicos y se realizó un estudio inmunofenotípico en sangre periférica mediante citometría de flujo de 4 colores (sangre del cordón umbilical (CU), 7 días y 1 mes de vida). **Resultados:** De los 37 neonatos de MBP incluidos en el estudio, 25 (67%) desarrollaron sepsis nosocomial a los $9,9 \pm 3,4$ días de vida, y 3 de los 25 (12%) niños que desarrollaron sepsis fallecieron. El único marcador clínico predictivo de sepsis fue la edad gestacional (EG), que fue significativamente menor en los neonatos de MBP que desarrollaron sepsis nosocomial ($p=0,005$). No se observaron diferencias en las células T CD4+ naïve, memoria, pre-efectoras y/o efectoras entre los neonatos de MBP que desarrollaron sepsis nosocomial y los que no desarrollaron sepsis. Por el contrario, los neonatos MBP que desarrollaron sepsis presentaban porcentajes de células Treg (CD4+CD25+hi y CD4+CD25+FoxP3+) aumentados (UCB $p<0,02$ y $p=0,29$, respectivamente). Observamos además una expresión significativamente mayor de perforina en las Treg en los neonatos MBP que desarrollaron sepsis ($p=0,05$). Las células Treg se presentaban una correlación inversa con la EG ($r=-0,46$; $p=0,005$).

Conclusiones. La expansión de células Treg en neonatos de MBP puede estar reflejando el desarrollo fisiológico del sistema inmunológico en el neonato durante el período de aprendizaje de tolerancia tímica. Los neonatos de MBP se enfrentan a los patógenos y otras amenazas durante una fase temprana del aprendizaje del timo, lo que puede interferir con las respuestas inmunológicas efectoras frente a patógenos, generando una respuesta tolerogénica, lo que conlleva un mayor riesgo de sepsis.

P-064

ESTUDIO DE PEPSINA EN LAVADO BRONCOALVEOLAR PARA DETECTAR REFLUJO GASTROESOFÁGICO EN PACIENTES ASMÁTICOS GRAVES. I. Toboso De Lamo, A. Pacheco, L.M. Villar, P. González. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos. El asma y otras patologías neumológicas crónicas suponen un grave problema sociosanitario en España. Estudios recientes

sugieren una asociación entre las formas graves de estas patologías y el reflujo esofagagástrico (REG), debido a que el epitelio laríngeo es mucho más sensible a los daños por la pepsina en medio ácido que el esofágico.

Este estudio pretende poner a punto un método sensible y poco invasivo de detección y cuantificación de pepsina por ELISA, en lavados broncoalveolares (LBA) de pacientes asmáticos de difícil manejo.

Material y métodos. Muestras biológicas: Como control positivo se utilizó jugo gástrico de pacientes sometidos a gastroscopias con fines diagnósticos. Las muestras de LBA se obtuvieron por aspiración bronqueoalveolar, se centrifugaron a 2500 rpm, se alicuotaron y se almacenaron a -80°C hasta su utilización.

Pacientes: Se estudiaron 30 muestras de 15 pacientes con asma grave.

Reactivos del ELISA. Placas Greiner bio-one, anticuerpo monoclonal de ratón frente a Pepsina A humana (Santa Cruz Biotechnology), anticuerpo IgG anti-pepsina porcina conjugado con biotina (Rockland) y Estreptavidina-peroxidasa (Jackson ImmunoResearch).

Condiciones finales del ensayo:

- Se tapiza la placa de ELISA con anticuerpo anti-pepsina A humana, durante toda la noche a 4°C .
- Se bloquea 1 hora con PBS BSA 1% a temperatura ambiente.
- Se incuban las muestras en el mismo tampón durante 45 minutos a temperatura ambiente.
- Se incuba con el anticuerpo conjugado con biotina 45 minutos y se revela la placa con OPD y H_2O_2 .

Resultados. El límite de detección del ELISA fue de 0,1 ng/mL de pepsina. El coeficiente de variación inter e intraensayo fue inferior al 10%.

Comparamos los resultados de las muestras de LBA con una receta patrón de jugo gástrico. Consideramos positivas, aquellas muestras de LBA cuya concentración de pepsina fue al menos el doble que la concentración media de pepsina en suero ($49,8-86,6 \mu\text{g/ml}$), para descartar posibles contaminaciones hemáticas. Cuatro de las 30 muestras de BAL estudiadas, resultaron ser positivas.

Discusión. Este ELISA, constituye un método sencillo, reproducible y eficaz, para la detección y cuantificación de pepsina en LBA. Futuros estudios, demostrarán la importancia del reflujo en las complicaciones de los pacientes con patologías neumológicas y demostrarán si la cuantificación de pepsina en LBA puede ser de utilizada como marcador clínico en dichos pacientes.

P-065

IMPORTANCIA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA TUBERCULOSIS PULMONAR LATENTE DE LA PRODUCCIÓN ANTÍGENO-ESPECÍFICA DE CXCL9, CXCL10 Y OTRAS CITOCINAS Y SU CORRELACIÓN CON LA PRODUCCIÓN DE INTERFERON-GAMMA Y LA REACCIÓN DE MANTOUX. N. Villegas¹, J.L. Arroyo², A. Ferrero¹, F. Ausín¹, P. Sánchez-Velasco¹, F. Leyva-Cobián¹, J.G. Ocejo-Vinyals¹. ¹Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Liencres. ²Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria.

Objetivos. El objetivo de nuestro estudio ha sido: (i) evaluar si la cuantificación de CXCL9 y CXCL10 y otras citocinas (CCL5, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70) producidas por células de sangre circulante tras estimulación con antígenos de Mycobacterium tuberculosis (MTB) (ESAT-6, CFP10 y TB7.7), podría ser de utilidad en el diagnóstico de la infección pulmonar latente causada por MTB en una población de bajo ries-

go para la infección, y (ii) evaluar la correlación entre la producción de estas citocinas con la producción antígeno-específica de IFN γ y con la prueba de Mantoux.

Material y métodos. Participaron en el estudio 303 donantes sanos procedentes del Banco de Sangre y Tejidos de Cantabria. Todos los donantes participantes en el estudio fueron evaluados clínica y epidemiológicamente y los datos registrados. En las muestras de sangre circulante se determinó la producción basal y tras estimulación con tres antígenos de MTB (ESAT-6, CFP10 y TB7.7) de las siguientes citocinas: IFN- γ , CXCL9, CXCL10, CCL5, IL-10, IL-12p40 e IL-12p70. Las concentraciones de IFN- γ se determinaron mediante ELISA y las de las otras citocinas mediante luminometría con un panel preformado comercialmente de las citocinas mencionadas.

Resultados. En 46 individuos (15,18%) la concentración de IFN- γ específico para MTB estaba elevada significativamente. Se descartó en ellos la presencia de una tuberculosis pulmonar activa. Se realizó la prueba de Mantoux en 29, resultando positiva en 27 de ellos. La producción de CXCL9 y CXCL10 se correlacionó con la producción de IFN- γ . Sin embargo, la producción de CXCL9 y CXCL10 estaba significativamente elevada en algunos donantes con producción normal de IFN- γ . En estos, la prueba de Mantoux fue positiva. Todos estos individuos habían sido vacunados con BCG.

Conclusiones. Estos resultados, indicarían que junto con la determinación de IFN- γ , la determinación de CXCL9 y de CXCL10 podría ser un complemento útil en el diagnóstico de la infección por MTB. Sin embargo, su especificidad es menor que la proporcionada por la determinación de IFN- γ , puesto que en aquellos individuos vacunados con BCG se obtienen resultados falsamente positivos.

P-066

PAPEL INMUNOMODULADOR DE LA TONSILA FARÍNGEA Y MUCOSA NASAL EN LA PATOGENESIS DEL HERPESVIRUS BOVINO-1. V. Molina Hernández, M.Á. Riscalde Moya, M. Pedrera Mazarro, P.J. Sánchez Cordón, G. García Jurado, J.C. Gómez Villamandos. Universidad de Córdoba, Córdoba.

El herpesvirus bovino tipo 1.1 (HVB-1.1), agente causal de la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR), es un alfa herpesvirus considerado el agente etiológico más importante del cuadro de enfermedades respiratorias bovinas, responsable de elevadas pérdidas económicas en la industria ganadera mundial. El virus penetra en el animal por vía aerógena, y replica en la mucosa de tonsilas y tracto respiratorio superior. Las tonsilas son estructuras linfopiteliales consideradas de gran importancia en la inmunidad mucosa local. Trabajos previos sugieren que están implicadas en la patogénesis del herpesvirus bovino-1, hecho que, unido a su localización estratégica, las hace de especial interés para su estudio. Con el fin de profundizar en el estudio del papel inmunomodulador de las tonsilas en la patogénesis de dicho agente, hemos trabajado sobre la caracterización inmunofenotípica y cuantificación de las subpoblaciones de células efectoras del sistema inmune, así como su actividad biosintética, en la tonsila faríngea y mucosa nasal de terneros infectados experimentalmente con HVB-1.1.

Para ello, se inocularon 8 terneros intranasalmente con la cepa Iowa del HVB-1.1 y se tomaron muestras de sangre en días previos y posteriores a la inoculación. Tras el sacrificio secuencial de los animales, se cogieron muestras de tonsila faríngea y mucosa nasal. La caracterización inmunofenotípica se realizó mediante técnicas de citometría de

flujo e inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales frente a linfocitos T (CD3), linfocitos T cooperadores (CD4), linfocitos T citotóxicos/supresores (CD8), linfocitos T γ / δ y linfocitos B. El estudio de los mediadores químicos (INF- γ e IL-4) se llevó a cabo por inmunohistoquímica.

Los resultados obtenidos muestran un descenso significativo en el número de linfocitos CD4+ y CD8+ circulantes al principio de la experiencia. Coincidiendo con el descenso de ambas subpoblaciones, existe una activación intensa de las estructuras linfoides en los órganos estudiados, que origina una recuperación de estas poblaciones a nivel sistémico. Los linfocitos T γ / δ , asociados a la protección de mucosas, presentan el mismo comportamiento de las poblaciones anteriores. A diferencia de éstas, los linfocitos B no muestran cambios significativos durante la experiencia. Unido a los cambios cuantitativos descritos, se observa una activación linfocitaria caracterizada por la expresión de INF- γ , indicativa de la instauración de una respuesta inmunitaria tipo I. Así, una adecuada respuesta inmune celular en la puerta de entrada del HVB-1.1 lograría detener su diseminación.

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

P-067

RESPUESTA PROINFLAMATORIA DE LOS MACRÓFAGOS EN INFECCIONES VÍRICAS CONCOMITANTES DEL TRACTO RESPIRATORIO SUPERIOR. V. Molina Hernández, M.Á. Riscalde Moya, M. Pedrera Mazarro, P.J. Sánchez Cordón, F. Romero Palomo, J.C. Gómez Villamandos. Universidad de Córdoba, Córdoba.

La diarrea vírica bovina (DVB) y la rinotraqueítis infecciosa bovina (IBR) son enfermedades del ganado bovino ampliamente distribuidas a nivel mundial, asociadas a importantes pérdidas económicas, que producen graves patologías gastrointestinales y respiratorias, respectivamente. El estudio de la mucosa nasal y tonsila, como órgano de entrada y replicación vírica primaria, es crucial para profundizar en la patogénesis de dichos procesos víricos. Los macrófagos, importantes elementos del sistema inmune, gracias a su capacidad fagocítica, función de presentación de antígenos y producción de citoquinas, son las principales células blanco de ambos virus. Por ello, el objetivo de este trabajo fue el estudio de los macrófagos en tonsila faríngea y mucosa nasal, tanto a nivel cuantitativo como de activación secretora, en terneros coinfectados experimentalmente con el virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) y el herpesvirus bovino tipo 1.1 (HVB-1.1).

Con este fin, 8 terneros, inoculados vía intranasal con la cepa no citopática 7443 del vDVB, se coinfectaron 12 días después intranasalmente con la cepa Iowa del HVB-1.1. Tras el sacrificio de los animales, se tomaron muestras de tonsila faríngea y mucosa nasal. El estudio de los cambios cuantitativos en la población de macrófagos se realizó mediante inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal MCA387. La activación secretora de los macrófagos se confirmó también mediante técnicas inmunohistoquímicas para la detección de distintos mediadores químicos (TNF- α e IL-1 α) sintetizados y liberados por estas células.

La presencia de macrófagos inmunomarcados fue considerablemente superior en las áreas interfoliculares que en el interior de las estructuras linfoides de la tonsila a lo largo de la experiencia. Sin embargo, los macrófagos intraepiteliales no mostraron cambios, mien-

tras que en la lámina propia, se observa un incremento tanto a nivel de tonsila como de mucosa nasal. A su vez, se observó un incremento significativo de células, principalmente macrófagos, reactivas frente a TNF α en las áreas interfoliculares de la tonsila. Sin embargo ni en folículos y en el resto de las estructuras tonsilares estudiadas se observaron cambios significativos en la expresión de los mediadores estudiados en las muestras empleadas. Se demuestra que los macrófagos no sólo no experimentan una activación proinflamatoria cuando están inoculados con DVB, sino que estos animales al coinfectarse con HVB-1.1 están incapacitados para experimentar una activación proinflamatoria.

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

P-068

DETECCIÓN Y CUANTIFICACIÓN MEDIANTE RT-PCR EN TIEMPO REAL DEL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA EN SANGRE Y TEJIDOS DE TERNEROS INFECTADOS EXPERIMENTALMENTE. V. Molina Hernández¹, P.J. Sánchez Cordón¹, M.Á. Rialde Moya¹, J.C. Gómez Villamandos¹, B. Rodríguez Sánchez², M. Pedrera Mazarro¹. ¹Universidad de Córdoba, Córdoba. ²Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos. Hasta la fecha, son escasos los estudios que hayan evaluado los cambios que se producen en los niveles del virus de la Diarrea Vírica Bovina (vDVB) en el transcurso de una infección mediante el empleo de técnicas de PCR cuantitativas. Con la finalidad de relacionar la presencia y evolución del virus, tanto en sangre como en los principales órganos linfoides, con el estado de inmunosupresión que caracteriza la infección, el principal objetivo de este estudio fue determinar y monitorizar, de manera secuencial, la concentración de genoma vírico tanto en sangre como en tejidos durante el curso de una infección aguda experimental.

Materiales y métodos. 8 terneros sin encastrar fueron inoculados por vía intranasal una cepa no citopática de genotipo 1 del vDVB. 2 animales permanecieron como controles sin inocular, siendo sacrificados al final del experimento. Se tomaron muestras de sangre entera a los 1, 2, 3, 5, 6, 8, 9, 12, 13 y 14 días post-inoculación (dpi), las cuales fueron congeladas a -80°C. Los animales fueron sacrificados en grupos de dos a los 3, 6, 9 y 14 dpi, siendo sometidos a una necropsia rutinaria en la que se tomaron y congelaron muestras de distintos tejidos. Tras la extracción del RNA, se llevó a cabo una RT-PCR en tiempo real empleando sondas TaqMan. Con el fin de normalizar diferencias entre las distintas muestras se empleó el gen de referencia GAPDH como control endógeno.

Resultados y conclusiones. Esta técnica demostró ser un método con una alta sensibilidad y especificidad para la detección y cuantificación del vDVB tanto en muestras de sangre como en tejidos, mostrándose como una herramienta de gran utilidad para el estudio de los mecanismos de diseminación y acantonamiento del virus. Desde el comienzo del experimento se pudieron detectar elevados niveles de genoma vírico en las tonsilas, lo que confirmó a este órgano como uno de los primeros lugares de replicación del virus. Además, se confirmó el especial tropismo del vDVB por órganos y tejidos linfoides secundarios con predominio de linfocitos B, así como el papel secundario del pulmón y del hígado en la replicación del virus.

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

P-069

EL DNA DE VIH-1 ASOCIADO A CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (VIH-1 DNA-PBMC) COMO MARCADOR PRONÓSTICO DE EVOLUCIÓN VIROLÓGICA EN LA INFECCIÓN CRÓNICA POR EL VIH-1. C. Rodríguez-Sáinz, R. Ramos, L. Valor, D.C. Hernández, J. Modrego, D. Alecsandru, E. Fernández-Cruz. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Objetivos. Recientemente en la infección aguda por el VIH-1 se ha analizado la carga viral de VIH-1 DNA-PBMC como un marcador predictivo en la progresión de la enfermedad alternativo a los marcadores surrogados estándar, VIH-1 RNA y células T CD4+. El objetivo del estudio es analizar en la infección crónica asintomática por el VIH-1 el valor pronóstico del VIH-1 DNA-PBMC para predecir la progresión virológica de la infección VIH-1.

Material y Métodos. En 115 individuos que han participado previamente en el ensayo clínico STIR-2102, analizamos de forma retrospectiva la carga DNA VIH-1 asociada a PBMC mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Pacientes naïve para la terapia antirretroviral fueron evaluados en el momento basal (basal pre-ART) y tras recibir seis semanas de ART previo a la aleatorización (basal post-ART). Se analizó mediante análisis de Kaplan-Meier y de Regresión de Riesgos Proporcionales de Cox el valor pronóstico de las variables VIH-1 DNA-PBMC, VIH-1 RNA plasmática y linfocitos T CD4+ en las basales pre-ART, post-ART y al final del estudio (mes 36).

Resultados. Tras el tratamiento (basal post-ART) los pacientes redujeron significativamente los niveles de VIH-1 RNA (siendo el 82% indetectable), manteniendo los valores de PBMC DNA VIH-1 elevados (media geométrica: 690 copias/106 PBMC). Las curvas de supervivencia Kaplan-Meier mostraron que los niveles de DNA-PBMC pre-ART y post-ART tienen poder predictivo (Log-Rank test: $p < 0,001$ y $p < 0,001$, respectivamente). Los niveles pre-ART de RNA VIH-1 mostraron un Log-Rank test: $p = 0,003$. Analizadas las variables en un modelo multivariante se observó que el nivel de DNA-PBMC post-ART tiene el valor predictivo más fuerte (HR ajustado, 2,51 [95% IC, 1,33-4,73, $p = 0,004$]) y es independiente del VIH-1 RNA (HR 1,74 [95% IC, 1,16-2,60, $p = 0,007$]).

Conclusiones. El VIH-1 DNA asociado a PBMC es un marcador con valor clínico para predecir la evolución virológica de individuos con infección crónica asintomática por el VIH-1. Este método de PCR permite cuantificar las formas lábiles de DNA asociadas a la replicación viral, que desaparecen tras ART, y las formas intracelulares permanentes, integradas y no integradas de DNA de mayor valor pronóstico.

P-070

ASOCIACIÓN DEL ALELO KIR3DS1 CON LA PÉRDIDA DE CORRELACIÓN ENTRE LA VIREMIA PLASMÁTICA RNA VIH-1 Y LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD8+ EN INFECCIÓN CRÓNICA ASINTOMÁTICA. D. Hernández Flórez, L. Valor, J. Modrego Ruiz, J. Navarro, E. Fernández-Cruz, C. Rodríguez-Sáinz. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Objetivos. Las formas activadoras e inhibidoras de los receptores KIR que expresan las células NK y los linfocitos T CD8+ participan en los mecanismos de defensa frente a la infección VIH-1. En la infección VIH-1 existe una correlación positiva entre la viremia plasmática VIH-

1 RNA y el % de linfocitos T CD8+ CD38+ activados. En individuos naïve para la terapia antirretroviral (ART) con infección reciente se ha asociado la presencia del receptor activador KIR3DS1 con la ausencia de correlación positiva entre los linfocitos T CD8+ CD38+ y los niveles de VIH-1 RNA en plasma. Hemos analizado la prevalencia del alelo KIR3DS1 en una cohorte de pacientes con infección VIH-1 crónica asintomática y su asociación con los linfocitos T CD8+ CD38+ y la viremia plasmática.

Materiales y métodos: Analizamos retrospectivamente el genotipo KIR3DS1/KIR3DL1 mediante PCR-SSP en la cohorte de 185 individuos incluida en el ensayo clínico STIR-2102. En 37 pacientes de la cohorte se cuantificó el VIH-1 RNA pre-ART, las subpoblaciones T CD4+ y T CD8+ y la expresión del marcador de activación CD38. En las comparaciones de grupos se utilizó el test no paramétrico de Mann-Whitney y para el análisis de correlación el coeficiente de Spearman.

Resultados. En los 185 individuos genotipados 82 fueron positivos para KIR3DS1 (44,3%). En el subgrupo de 37 pacientes, 19 fueron positivos para KIR3DS1 y 18 negativos para KIR3DS1. En los individuos portadores del alelo KIR3DS1 no se observó correlación entre la viremia VIH-1 RNA y el % de linfocitos T CD8+ CD38+ (Coeficiente de Correlación de Spearman $r = 0,284$; $p = 0,254$). Sin embargo, en los pacientes que carecían del alelo KIR3DS1 se observó una correlación positiva entre la viremia plasmática VIH-1 RNA y el % de células T CD8+ CD38+ activadas ($r = 0,503$; $p = 0,028$).

Conclusión. En pacientes naïve con infección VIH-1 crónica asintomática la presencia del receptor activador KIR3DS1 se asoció a la ausencia de correlación entre el % de linfocitos T CD8+ CD38+ activados y los niveles de la viremia plasmática VIH-1 RNA. Estos datos confirman el potencial papel del receptor activador KIR3DS1 en los mecanismos inmunológicos frente al VIH-1.

P-071

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO TER99GLN DEL GEN QUE CODIFICA LA QUIMIOCINA CXCL10 EN UNA COHORTE DE 135 PACIENTES ASINTOMÁTICOS CON INFECCIÓN POR EL VIH-1. C. Rodríguez-Sáinz, I. Martínez, J. Modrego, D.C. Hernández, D. Alecsandru, R. Ramos, E. Fernández-Cruz. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Objetivo. En la infección por el VIH-1 se ha descrito que la quimiocina CXCL10 puede favorecer la propagación del virus debido a que estimula la migración de los linfocitos T activados y monocitos hacia los órganos linfoides secundarios y a su capacidad de activar in vitro la replicación viral. No se han descrito variantes polimórficas del gen CXCL10 implicadas en la infección VIH-1. El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia del polimorfismo CXCL10 Ter99Gln (rs11 26858) y su asociación con el VIH-1 DNA intracelular en PBMC (VIH-1 DNA-PBMC) y la carga viral RNA VIH-1 plasmática (RNA VIH-1) en una cohorte de 135 individuos asintomáticos, naïve para la terapia antirretroviral (ART) con infección crónica por el VIH-1 que han participado en el ensayo clínico STIR-2102.

Material y métodos. El polimorfismo rs11 26858 se determinó retrospectivamente en 135 pacientes mediante discriminación alélica con PCR a tiempo real y sondas Taqman. Se analizaron también el VIH-1 DNA-PBMC y la RNA VIH-1 plasmática. Estos pacientes naïve para

la terapia antirretroviral fueron evaluados en el momento basal (basal pre-ART) y tras recibir seis semanas de ART.

Resultados. El genotipado mostró 134 individuos homocigotos para el alelo wild-type y un sólo individuo heterocigoto para el polimorfismo Ter99Gln. La prevalencia de la heterocigosis en la cohorte del estudio es 0,7% y la prevalencia del alelo 99Gln es 0,4%. Esta prevalencia es similar a la descrita para la población sana (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs=1126858). El paciente portador de la heterocigosis presentó la carga de DNA-PBMC mas elevada (32.560 copias/106 PBMC) en relación con la del resto de individuos VIH-1+ de la cohorte (mediana= 655 copias/106 PBMC). Después de seis semanas de ART los niveles de DNA VIH-1 del paciente heterocigoto se mantuvieron más elevados (10.645 copias/106) en relación con la respuesta al tratamiento del resto de individuos de la cohorte (mediana= 560 copias/106).

Conclusiones. La prevalencia de la heterocigosis para el polimorfismo rs1126858 en una cohorte de 135 individuos asintomáticos con infección crónica VIH-1 es del 0,7%. En nuestro caso el polimorfismo Ter99Gln se asoció a unos niveles intracelulares elevados de VIH-1 DNA y a una pobre respuesta al tratamiento antirretroviral.

P-072

REGULACIÓN DE LA MAQUINARIA TRADUCCIONAL CELULAR POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA. A. Quintas¹, A. Castelló², E. García-Sánchez¹, P. Sabina¹, M. Noga¹, L. Carrasco¹, Y. Revilla¹. ¹Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CBMSO), Madrid. ²European Molecular Biology Laboratory (EMBL).

Introducción. El Virus de la Peste Porcina Africana (VPPA) es un virus DNA con un genoma complejo capaz de infectar distintas especies de cerdo, causando una enfermedad aguda, altamente infecciosa y en la mayoría de los casos, letal. La infección por VPPA se caracteriza por la ausencia de una respuesta inmune capaz de neutralizar la infección, lo que ha impedido el desarrollo de una vacuna convencional. Como parásitos intracelulares, los virus son altamente dependientes de la maquinaria traduccional celular para llevar a cabo la síntesis de sus proteínas. Durante la infección por VPPA se produce una fuerte inhibición de la síntesis de proteínas celulares, mientras que las proteínas virales son eficientemente sintetizadas. Poco es lo que se conoce sobre los mecanismos moleculares a través de los cuales el virus controla la maquinaria traduccional celular.

Objetivo. Análisis del efecto de la infección de VPPA en el estado y localización de los componentes de la maquinaria traduccional celular.

Materiales y métodos. Análisis del estado funcional, la integridad y activación de los factores de iniciación de la traducción mediante ensayos de unión a proteína A sepharosa y Western Blot. Análisis de la localización de los mismos y otros orgánulos celulares, así como de proteínas virales mediante ensayos de microscopía confocal y microscopía electrónica.

Resultados. A pesar de la activación de caspasa-3 producida con la infección de VPPA, los niveles del factor de iniciación eIF4G permanecen constantes. Además, durante la infección los factores de iniciación eIF4G y eIF4E son fosforilados en los residuos Ser1108 y Ser209, respectivamente; mientras que el factor de regulación de eIF4E, 4E-BP es hiperfosforilado a tiempos tempranos de la infección e hipofosforilado a partir de las 18 horas post-infección, lo que provoca un incremento de la asociación de los factores eIF4G y eIF4E para formar el

complejo eIF4F. La infección no solo promueve la formación de eIF4F, si no que además provoca la redistribución del mismo a los sitios de replicación viral, conocidos como factorías virales. La activación de eIF4F es esencial para infección de VPPA puesto que la depleción de eIF4G y eIF4E en células COS-7 impide la acumulación de la proteína mayoritaria de la cápsida viral, p72. Otros componentes del complejo de iniciación de la traducción, como eIF2, eIF2a y eIF3b así como los ribosomas también se encuentran enriquecidos en la periferia de las factorías virales. En las células infectadas la red mitocondrial se encuentra polarizada, colocalizando con los ribosomas, mientras que a tiempos tardíos de la infección se observa una disminución de los ARNm polyadenilados del citoplasma y un incremento de los mismos en las factorías virales, correspondiendo probablemente a los ARNm virales.

Conclusión. El Virus de la Peste porcina africana activa la maquinaria de traducción celular y la distribuye alrededor de las factorías virales, junto con otros componentes celulares como los ribosomas y las mitocondrias, para favorecer la síntesis de sus proteínas. Este reclutamiento de la maquinaria traduccional, junto con la degradación de los ARNm polyadenilados parecen formar parte del mecanismo por el cual el virus inhibe la síntesis de proteínas celulares, facilitando la producción de las partículas virales.

SESIÓN 6: INMUNIDAD INNATA E INFLAMACIÓN

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

P-073

ACTIVACIÓN SELECTIVA DE TOLL-LIKE RECEPTOR 7 (TLR7) EN PACIENTES CON POLIMIALGIA REUMÁTICA Y ARTERITIS DE CÉLULAS GIGANTES. L. Alvarez-Rodríguez¹, V.M. Martínez-Taboada¹, C. Mata², J. Calvo Alen², J.I. Beares-Gomez¹, M.J. Marín¹, A. Fontalba¹, J.L. Fernandez-Luna¹, M. Aranzamendi¹, J. Agüero¹, M. López-Hoyos¹. ¹Hospital U. Marques de Valdecilla, Santander. ²Hospital Sierrallana, Torrelavega.

Objetivo. Estudiar la expresión y función de los miembros de la familia de los Toll-like receptor (TLR) en células mononucleares circulantes (PBMc) de pacientes con arteritis de células gigantes (GCA) y polimialgia reumática (PMR).

Material y métodos. Analizamos PBMc de 70 PMR, 20 GCA y 24 controles sanos de la misma edad (HC). La expresión de los TLR en distintas subpoblaciones de PBMcs se determinó por citometría de flujo. La función de los TLR se estudió estimulando PBMcs con ligandos específicos. Estos estudios también se realizaron en un subgrupo de pacientes con PMR/GCA en remisión clínica con corticosteroides (CS).

Resultados. Encontramos un aumento significativo en la expresión de TLR7 en células B, T y monocitos de pacientes con enfermedad activa comparado con los HC. A pesar del aumento en la expresión de TLR7, los monocitos circulantes de pacientes con enfermedad activa mostraron una respuesta in vitro disminuida (producción de citocinas circulantes pro-inflamatorias) tras estimulación con agonistas específicos de TLR7. Un posible defecto genético fue descartado tras no encontrarse cambios en varios SNPs en el gen promotor

de TLR7, y tras demostrar una respuesta normal a los agonistas específicos en pacientes en remisión completa sin tratamiento con CS. La estimulación de PBMcs de HC con plasma de pacientes con enfermedad activa indujo un aumento en la expresión de genes de la respuesta mediada por interferón-INF (IFN- β , IFIT1, IRF7 y USP18) determinada por RT-PCR, sugiriendo que la respuesta disminuida a los agonistas de TLR7 podría ser secundaria a una saturación de los receptores por un ligando natural. Como TLR7 reconoce fundamentalmente virus ssRNA, intentamos identificar la presencia de varios virus respiratorios en el plasma de los pacientes con resultados no concluyentes.

Conclusión. Estos datos sugieren una activación selectiva de TLR7 por un ligando(s) natural(es) en pacientes con PMR y GCA. A pesar de no poder identificar el posible agente causal en el plasma de los pacientes, el aumento en la expresión de genes de la respuesta mediada por IFN-tipo I tras estimular con plasma de pacientes sugiere una posible etiología viral en estos dos síndromes.

**El presente trabajo está financiado por becas de: MSC-Instituto de Salud Carlos III (PI050475 / PI080098), IFIMAV y la Fundación Mutua Madrileña*

P-074

LA EDAD Y LOS NIVELES DISMINUIDOS DE VITAMINA D SE ASOCIAN CON ALTERACIONES EN LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y EN LOS NIVELES DE CITOCINAS CIRCULANTES. L. Alvarez-Rodríguez, V.M. Martínez-Taboada, J. Beares-Gomez, M.J. Marín, M. García-Unzueta, J.A. Amado, M. Gonzalez-Paz, C. Santa Cruz Llata, M. López-Hoyos. Hospital U. Marques de Valdecilla, Santander.

Objetivo. Estudiar in vivo la influencia de la edad y los niveles de vitamina D en la función de la inmunidad innata y la producción de citocinas circulantes en individuos sanos.

Material y métodos. Los niveles séricos de 25-hidroxi-vitamina D (25-(OH)-D) se midieron en 71 individuos sanos. Las citocinas circulantes se determinaron por CBA. Las citocinas intracelulares se determinaron en células CD3+ y CD14+ por citometría de flujo. La expresión de los TLR en diferentes subpoblaciones de PBMcs y su función tras estimulación con ligandos específicos se determinaron también por citometría de flujo.

Resultados. Los niveles de 25-(OH)-D disminuían con la edad ($r=-0,399$; $p=0,001$). La expresión de TLR7 en células B ($r=-0,39$; $p=0,02$), T ($r=-0,35$; $p=0,05$) y monocitos ($r=-0,43$; $p=0,01$) se correlacionó negativamente con los niveles de 25-(OH)-D. La respuesta in vitro de TLR7 a agonistas específicos se correlacionó de forma significativa con los niveles séricos de 25-(OH)-D, especialmente en individuos controles mayores de 60 años. La expresión de TLR5 en células T ($r=-0,34$; $p=0,04$) y TLR8 en monocitos ($r=-0,37$; $p=0,04$) también se correlacionó de forma negativa con la 25-(OH)-D. La expresión de TLR1 en células T ($r=0,32$; $p=0,04$) y monocitos ($r=0,40$; $p=0,01$) se correlacionó con la edad. La función de TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 y 8 se correlacionó negativamente con la edad. Los niveles de 25-(OH)-D se correlacionaron negativamente con las citocinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-6) y la citocina anti-inflamatoria IL-10. La edad se correlacionó positivamente con los niveles de citocinas pro-inflamatorias (TNF- α , IL-1 β e IL-6), IL-10 y la citocina Th1, IL-12.

Conclusión. Los niveles séricos de 25-(OH)-D disminuyen con la edad y se acompañan de cambios en la expresión y función de determinados TLRs, especialmente los envueltos en respuesta viral. La edad

y los niveles de vitamina D tienen un claro impacto en la producción de citocinas circulantes.

**El presente trabajo está financiado por becas de: MSC-Instituto de Salud Carlos III (PI050475 / PI080098) e IFIMAV.*

P-075

ANGIOEDEMA HEREDITARIO POR DEFICIENCIA HOMOCIGOTA DE C1-INHIBIDOR. ESTUDIOS FUNCIONALES EN UN PACIENTE CON LA MUTACIÓN R378C REVELAN UN RESIDUO IMPORTANTE PARA LA REGULACIÓN DE LA VÍA DE LAS CININAS. A. López Lera¹, B. Favier², C. Drouet³, M. López Trascasa¹. ¹Hospital Universitario La Paz. CIBERER, Madrid. ²Université J. Fourier. ³Unité d'Exploration de l'Angioedème, CHU Grenoble, Francia.

Objetivos. El angioedema hereditario por deficiencia de C1-inhibidor (HAE, OMIM#106100) es una enfermedad rara con un patrón de herencia autosómico dominante en la que se han descrito más de 200 mutaciones heterocigotas distintas. Los únicos pacientes con deficiencia en homocigosis estudiados hasta la fecha, dos hermanos de origen consanguíneo con la mutación c.1576T>G (I440S), se caracterizaban por desarrollar un fenotipo de enfermedad inusual, con un patrón de consumo de complemento, ausencia de C1q circulante y variabilidad clínica (Blanch et al, JACI, 2006). En el presente trabajo, describimos un paciente de HAE con la mutación c.1198C>T (R378C) en homocigosis y profundizamos en el estudio funcional y conformacional de la proteína mutante. Así mismo, analizamos los mecanismos causantes del perfil de consumo de complemento que caracteriza a estos pacientes homocigotos y su evolución bioquímica y clínica durante 28 meses de tratamiento con andrógenos atenuados (Stanozolol).

Métodos. El perfil de complemento se caracterizó por nefelometría, ensayos hemolíticos específicos e inmunodifusión radial. Las alteraciones conformacionales del mutante R378C y su capacidad funcional de unión a dos de sus proteasas diana (C1s y Kalikreína), se estudiaron mediante ELISA y western blot en muestras de plasma fresco y sobrenadantes de células Cos-7 transfectadas de forma estable. Los niveles de expresión del gen de C1-inhibidor se analizaron por RT-qPCR y la activación del sistema ubiquitina-proteasoma se cuantificó mediante ensayos de fluorescencia con el sustrato marcado LLVY-AMC en lisados de monocitos del paciente.

Resultados. La proteína R378C circula en plasma en una conformación parcialmente latente. El C1-inhibidor R378C tiene una capacidad normal de unión a C1s, pero muy disminuida frente a Kalikreína, tanto en plasma como en sobrenadantes de células Cos-7. Los niveles de mRNA del paciente están marcadamente disminuidos en PBMCs. Los ensayos de fluorescencia demuestran una activación significativa del sistema ubiquitina-proteasoma, lo que sugiere, junto con los datos de expresión en células Cos-7, que existe un plegamiento anómalo y retención intracelular de esta proteína durante su procesamiento. Además, tanto los niveles y función de C1-inhibidor, como el perfil de consumo de complemento, se recuperaron por completo tras 28 meses de tratamiento con Stanozolol.

Conclusión. La mutación R378C en homocigosis causa un perfil de consumo de complemento similar al descrito en otros pacientes con mutaciones homocigotas. Esta sustitución induce una conformación parcialmente latente que reduce de forma específica la capacidad de unión a Kalikreína, lo que sugiere que la Arginina en posición 378 juega un papel central en la regulación de la vía de las cininas por C1-inhibidor.

P-076

ANÁLISIS DE SNPS DEL CLUSTER DE INTERLEUCINA-1 Y ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. R. López-Hernández, D. Lucas, G. Salgado, J.A. Campillo, P. Martínez-García, H. Salama, F. Boix, M. Miras, M.R. Álvarez-López, F. Carballo, M. Muro. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

The interleukin-1 (IL-1) system epitomises the highly regulated mechanism required for this to be achieved. Several related gene products interact with each other to adjust the response according to cellular requirements. IL-1 signalling via the IL-1 receptor type I (IL-1RI) is an important pathway in the inflammatory process, innate immunity and the immune response. IL-1 is a potent proinflammatory cytokine involved in the pathophysiology of several inflammatory and autoimmune diseases, is important for the synthesis of acute phase proteins, and it is a pyrogen cytokine. These physiological effects are mediated at the molecular level by the activation of JNK and p38 MAP kinases, and consequent up-regulation of genes via the transcription factors NF- κ B, AP-1 and C/EBP β . However, the relationship of these gene cluster polymorphisms with the immune response in inflammatory bowel disease (IBD) patients has not been explored. Thus, the aim of this study was to determine the relationship between IL-1 gene cluster polymorphism and the differential IBD pathologies in a Spanish population. In this case-control study, we evaluated 84 patients with IBD and 154 healthy subjects. The following polymorphisms were determined by luminex assay by PCR-SSOP technique: IL-1 α (-889C/T), IL-1 β (-511C/T and +3962C/T) (rs1143634 and rs1143633), IL-1R (Pst-1 1970C/T) and IL-1RA (Mspa-1 11100C/T). Furthermore, the genotypes were correlated with IBD, Crohn disease and Ulcerative Colitis pathologies. When investigating each polymorphism separately and in conjunction, no statistical differences in the IL-1 gene cluster genotype and allele distributions between the diagnosis groups and controls were found. In conclusion, IL-1 gene cluster polymorphisms do not seem to be associated with IBD pathologies.

P-077

PAPEL DE LOS FACTORES DEPENDIENTES DEL HUÉSPED (GENES HLA Y KIR) EN LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD POR CMV EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE ÓRGANO SÓLIDO. D.M. Valero Hervas, M. Castillo Rama, R. San Juan Garrido, F. López Medrano, J.C. Meneu, J. Delgado, J.M. Morales, P. Morales Pérez, M.J. Castro Panete, J.M. Aguado, E. Paz Artal. Hospital Universitario 12 De Octubre, Madrid.

Objetivos. La infección por Citomegalovirus (CMV) es una de las principales complicaciones tras el trasplante de órgano sólido (TOS) incrementando la morbilidad y mortalidad y favoreciendo mayores pérdidas de injerto. Dado que la inmunosupresión actual está dirigida a eliminar las células T efectoras la principal línea de defensa queda limitada a las células Natural Killer (NK) a través de sus receptores de superficie. Los principales receptores implicados son los Killer-like Immunoglobulin Receptors (KIR) que a través de la interacción con sus ligandos innatos, las moléculas HLA (C, B y A), mediarán la citólisis de las células infectadas.

El objetivo de este trabajo ha sido establecer la influencia de los factores genéticos dependientes del huésped, HLA y KIR, en la predisposición al desarrollo de infección o enfermedad por CMV, así como

buscar posibles relaciones entre éstos factores y el desarrollo de complicaciones post- trasplante.

Materiales y métodos. Se incluyeron 138 receptores de órgano sólido (79 renales, 42 hepáticos y 17 cardíacos) trasplantados en nuestro centro entre Marzo 2003 y Diciembre 2004. Se cuantificó la antigene-mia CMV mediante PCR a tiempo real (Light Cycler). El perfil genético para HLA-C se obtuvo por Dot Blot Reverso (Innogenetics), mientras que el tipaje de HLA-A y -B se determinó mediante placas comerciales con anticuerpos anti-HLA monoclonales (One Lambda). Finalmente, los haplotipos KIR se determinaron mediante técnicas de PCR-SSP (Invitrogen). Los resultados fueron analizados por el software informático SPSS v.12.

Resultados. No se observaron diferencias en el desarrollo de enfermedad e infección por CMV cuando se compararon los haplotipos KIR, aunque se observó mayor tendencia de enfermedad en aquellos con Bx frente a los que presentaron AA. Tampoco se observaron diferencias en la comparación por número de receptores KIR totales, activadores e inhibidores.

Los diferentes perfiles genéticos no ejercieron ningún efecto en la infección por CMV, sin embargo en el caso de enfermedad los pacientes con homocigosis para C1 presentaban mayor tendencia a presentarla con respecto a los homocigotos para C2. Se observó una relación estadísticamente significativa entre la presencia de alelos serológicos Bw4 y el desarrollo de enfermedad por CMV (OR=7.98; p= 0.05).

El análisis en función del número de interacciones de cada paciente entre su dotación de receptores KIR y de sus ligandos HLA-A, -B y -C no reveló ninguna asociación significativa en el desarrollo de infección o enfermedad.

Por último, en trasplante hepático se observó en el límite de la significación estadística, que un mayor número de receptores KIR totales (p=0,052) y receptores KIR activadores (p=0,054) ejercían una función protectora frente al desarrollo de enfermedad frente a CMV.

Conclusiones. La influencia en TOS de los sistemas HLA y KIR está por determinar. Aunque no parecen ejercer de forma global un papel protector, en el caso del trasplante hepático los resultados del estudio indican que sí podría proteger frente a la enfermedad. Además el alelo Bw4 podría considerarse como factor de predisposición a enfermedad por CMV en éste tipo de pacientes.

P-078

IDENTIFICACION DE UN ANTICUERPO MONOCLONAL CON ACTIVIDAD ANTI FACTOR H EN UNA PACIENTE CON ENFERMEDAD POR DEPOSITOS DENSOS. P. Nozal Aranda¹, S. Aguerrevere², M. Jozsi³, P. Sánchez-Corral¹, M. Ibernort⁴, M. López-Trascasa¹. ¹Hospital Universitario La Paz, Madrid. ²Hospital Germans Trias i Pujol. Badalona. ³Leibniz Institute for Natural Product Research and Infection Biology. Hans Knöll Institute, Jena, Germany. ⁴Hospital Germans Trias i Pujol., Badalona.

Objetivos. En la enfermedad por depósitos densos (EDD) se ha descrito una incapacidad para controlar la vía alternativa del complemento en el plasma, que puede ser debida a la presencia de autoanticuerpos frente a la convertasa de C3 (C3Nef), a la ausencia o falta de función del Factor H (FH), o a la inactivación de este regulador del sistema del complemento por anticuerpos. Esta última causa sólo ha sido descrita una vez en un paciente con glomerulonefritis membranoproliferativa tipo II. Aquí describimos la presencia de un autoanticuerpo anti-FH en una paciente diagnosticada de EDD con una gammapatía monoclonal.

Material y métodos. En el suero de la paciente se analizaron los niveles de inmunoglobulinas, factores del complemento (C3, C4, FH, FI) y la presencia de anticuerpos frente a ellos mediante nefelometría y técnicas de ELISA. Posteriormente se purificó su IgG mediante cromatografía de afinidad en columnas de Proteína G-Sepharosa. Por último se determinó la especificidad del anticuerpo y se caracterizó mediante técnicas de ELISA y Western Blot.

Resultados. La paciente presentaba un perfil de complemento compatible con una activación de la vía alternativa, presentando al inicio cifras bajas de C3 (54 mg/dl) y normales de C4, con C3Nef negativo. Entre los hallazgos serológicos destacaban un FH muy bajo (2.7 mg/dl) y la presencia de una paraproteína monoclonal IgG-lambda. Mediante ELISA se detectó la presencia de anticuerpos anti-FH, que resultaron estar mediados por la fracción IgG-lambda y que parecen reconocer la región N-terminal de la molécula (SCRs 1-7). Se detectó también que esta IgG además tiene actividad antiplasminógeno.

Conclusiones. En esta paciente, la incapacidad para controlar la activación del complemento se ve favorecida por la existencia de anticuerpos anti-FH, que parecen reconocer la región con actividad reguladora de esta molécula, impidiendo su función, lo que acaba provocando la aparición de la glomerulopatía de la EDD.

Los anticuerpos anti-FH han sido descritos en otras patologías, como en el Síndrome Hemolítico Urémico atípico, en cuyo caso están dirigidos contra el extremo C-terminal de la proteína lo que podría justificar la asociación de este anticuerpo a la EDD en esta paciente.

Existe además una actividad antiplasminógeno en la fracción IgG de la paciente, cuya aparición podría estar relacionada con los anti-FH, ya que numerosos patógenos poseen en su superficie proteínas que unen ambas moléculas para evadir su eliminación por el sistema del complemento en la respuesta inmune innata.

P-079

ANALYSIS OF LONG PENTRAXIN 3 AS A BIOMARKER IN PIGS. E. Crisci¹, L. Fraile¹, S. Valentino², M. Simon-Grifé¹, G.E. Martín-Valls¹, T. Mussá¹, B. Bottazzi², A. Mantovani², M. Montoya¹. ¹Centre de Recerca en Sanitat Animal (CRESA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona. ²Istituto Clinico Humanitas, Rozzano, Italy.

Objective. The aim of our study was to investigate the possible role of PTX3 as a biomarker in vivo and in vitro in pigs.

Materials and methods. For in vitro study, porcine bone marrow-derived DC (poBMDC) were generated and infected with a H3N2 swine influenza virus (A/Swine/Spain/80598-LP1/2007).

For in vivo study, sixteen conventional pig farms with history of pleuritis lesions and cranio-ventral lung consolidation were used. Blood from 20 randomly selected pigs from each farm was collected and selected acute phase proteins were determined in serum. Haptoglobin (Hp) was quantified by a spectrophotometric method (haemoglobin binding assay) (Tridelta Development Limited, Ireland). Pig-MAP levels were assessed with an ELISA kit (PigCHAMP ProEuropa, Spain) and CRP was determined using a commercial immunoturbidimetric method (Olympus System Reagent, OSR 6147). Moreover, sera from 48 conventional sows from parity one to eight showing high swine influenza virus (SIV) antibody titres were also used. PTX3 concentration in sera and culture supernatant was determined by sandwich ELISA against murine PTX3 with the following cross-reactive antibodies: 2C3 and 6B11 (Salio et al., 2008. Circulation 117 : 1055-1064). All the statistical analysis were performed using SPSS 15.0 software (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Results. The *in vitro* study showed that porcine myeloid bone marrow-derived DC produced PTX3 after infection with porcine influenza virus H3N2.

The *in vivo* results have shown that PTX3 serum levels did not correlate neither with Hp, CRP or Pig-MAP nor with lung lesions score in conventional swine farms. PTX3 concentration in SIV antibody positive sera of studied sows increased with the parity number showing statistical tendency between the youngest and the oldest sows ($p=0.07$). Moreover, there was no statistical correlation between SIV antibody titres and PTX3 amount in serum.

Conclusions. The present study has shown PTX3 *in vitro* production in porcine myeloid DC after SIV infection.

In vivo results have shown that PTX3 is not a good biomarker for chronic lung lesion status in swine farms when compared with Hp and Pig-MAP. However, PTX3 concentration in SIV antibody positive sera correlated with a greater exposure to infections, indicating that PTX3 might be used as a biomarker under certain conditions.

**This is the first analysis of PTX3 role in pigs but future studies will further characterize its possible implication in pathogenesis.*

P-080

INFLUENCIA DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA DE LAS PROTEÍNAS SURFACTANTES A1, A2 Y D EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y GRAVEDAD DE LA NEUMONÍA EN ADULTOS. E. Herrera Ramos¹, M.I. García Laorden¹, F. Rodríguez De Castro¹, J. Solé Violán¹, O. Rajas Naranjo², N. González Quevedo¹, Y. Florido Ortega¹, I. Sologuren Marrero¹, A.R. Domínguez Acosta¹, J.A. Marcos Y Ramos³, J.C. Rodríguez Gallego¹. ¹Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor, Las Palmas de Gran Canaria. ²Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. ³Hospital Doctor Jose Molina Orosa, Lanzarote

La neumonía es la primera causa de mortalidad por enfermedad infecciosa en países desarrollados. Además de las inmunodeficiencias primarias, variantes genéticas en otros genes con menor penetrancia pueden variar la susceptibilidad y gravedad de la enfermedad con herencia compleja. En pulmón sano, la inmunidad innata es debida principalmente a los macrófagos alveolares y a las proteínas surfactantes, (SP) A1, A2 y D, que actúan como opsoninas y son antiinflamatorias en ausencia de infección. Los genes de estas colectinas (SFTPA1, SFTPA2 y SFTPD) están organizados en un cluster en 10q21-24. Los ratones deficientes en SP-A y SP-D son muy susceptibles a la infección respiratoria.

Objetivos. Evaluar la asociación de SNPs no sinónimos y los haplotipos SFTPA1 (6Aⁿ), SFTPA2 (1Aⁿ) y SFTPD con la susceptibilidad y gravedad de la neumonía adquirida en la comunidad (NAC). Evaluar el desequilibrio de ligamiento (LD). Evaluar el efecto de las variantes en niveles de SP-A y SP-D.

Materiales y métodos. Se analizaron SNPs no sinónimos de SFTPA1, SFTPA2 y SFTPD (por SSP-PCR y RFLP) en 682 pacientes adultos con NAC y en 789 controles. Se infirieron haplotipos y se calculó el LD. Se estudió el efecto de la variabilidad genética en los niveles séricos de SP-A y SP-D.

Resultados. El alelo SFTPD aa11-C se asoció con niveles séricos más bajos de SP-D. No se observó asociación del genotipo con los niveles totales de SP-A. Tras corrección de Bonferroni, los haplotipos SFTPA1 6A² (OR=0,78; $p=0,0009$), SFTPA2 1A⁰ (OR=0,79; $p=0,0017$), SFTPA1-SFTPA2 6A²-1A⁰ (OR=0,77; $p=0,0005$) y SFTPD- aa11-C-(6A²-1A⁰) (OR=0,65; $P=0,00001$) se asociaron a un efecto protector frente a NAC,

mientras que SFTPA2 1A¹⁰ (OR=6,58; $p=0,00007$) y SFTPA1-SFTPA2 6A³-1A⁰ (OR=3,92; $p=0,00065$) predisponen a NAC.

Los haplotipos 1A¹⁰ y 6A-1A se asociaron con mayor mortalidad (a los 28 y 90 días), y con fracaso multiorgánico (FMO) y síndrome de distrés respiratorio agudo (SDRA) respectivamente. SFTPD aa11-C se asoció con el desarrollo de FMO y SDRA.

Conclusión. Este es el primer estudio de variabilidad de SP-A1, A2 y D en neumonía. Algunas variantes genéticas de SFTPA1, SFTPA2 y SFTPD se asocian significativamente con la susceptibilidad y la gravedad de la NAC.

P-081

UNA DIETA MUY BAJA EN CALORÍAS ANTES DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA PUEDE MEJORAR LOS PARÁMETROS INFLAMATORIOS Y LA RESISTENCIA A INSULINA UNA DIETA MUY BAJA EN CALORÍAS ANTES DE LA CIRUGÍA BARIÁTRICA PUEDE MEJORAR LOS PARÁMETROS INFLAMATORIOS Y LA RESISTENCIA A INSULINA. S. Calleja Antolín, R. Díez Rodríguez, M. Ballesteros Pomar, A. Calleja Fernández, N. Aller, M. Sánchez Salazar, O. Del Árbol Del Árbol, C. Cuellas, J.L. Olcoz Goñi, A.I. De Castro Rodríguez, J.M. García Ruiz. Hospital de León, León.

Objetivos. Evaluar la influencia de una dieta muy baja en calorías en pacientes obesos que van ser sometidos a cirugía bariátrica, sobre diversos parámetros inflamatorios que han sido involucrados en el desarrollo del síndrome metabólico de resistencia a insulina.

Material y métodos. Se incluyó prospectivamente a 45 pacientes en espera de cirugía bariátrica. Todos fueron sometidos a una dieta muy baja en calorías durante seis semanas antes de la cirugía. Se estudiaron antes y después de la dieta los siguientes parámetros: peso, HOMA, circunferencia en la cintura, CRP, IL1b, IL6, IL8, IL10, IL12, TNF- α , MCP 1, IP10, Resistina y Leptina (CBA Becton Dickinson, ELISA R&D).

Las variables cuantitativas fueron comparadas por el test de T-Student para muestras pareadas.

Resultados. La media de edad fue de 44 años (desviación estándar: 10,3), el 78% de los sujetos fueron mujeres.

La tabla 1 muestra los cambios estadísticamente significativos tras la dieta muy baja en calorías (VLCD). No se encontró significación en los valores de IL1b, IL6, IL8, IL10, IL12, TNF- α , y resistina.

Tabla 1. ($p<0,05$)

	Antes VLCD	Después VLCD
Peso (kg)	121,8 (16,8)	113 (16,6)
BMI (kg/m ²)	46 (5)	42,6(4,58)
P. cintura (cm)	130, 3 (13)	123,7 (11,9)
HOMA	6,1 (3,9)	3,9 (4,2)
MCP 1 (pg/ml)	437,4 (411)	1172 (966,53)
IP10 (pg/ml)	1324,2 (824,6)	356,7 (259,4)
Leptina (pg/ml)	79453,6 (48509,8)	50796,1 (37506,2)
CRP	10,4 (9,1)	7,9 (6,6)

Conclusión. Una dieta muy baja en calorías antes de la cirugía bariátrica puede ser útil para modificar algunos parámetros inflamatorios, pudiendo mejorar la Resistencia a la insulina. Los efectos a largo plazo de la dieta muy baja en calorías, sumada a la cirugía bariátrica deben ser evaluados en posteriores estudios.

P-082

ANÁLISIS DE CÉLULAS EPITELIALES Y LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN PACIENTES CON SÍNDROME DE OJO SECO. R. Reinoso¹, M. Calonge¹, E. Castellanos¹, M. Martino¹, I. Fernández², A. Corell¹. ¹IOBA-Universidad de Valladolid, Valladolid. ²Universidad de Valladolid, Valladolid.

Objetivo. Caracterizar fenotípica y funcionalmente células epiteliales conjuntivales y linfocitos intraepiteliales obtenidos mediante técnicas mínimamente invasivas en pacientes con síndrome de ojo seco.

Material y métodos. Las células conjuntivales fueron obtenidas mediante citología por cepillado en 23 pacientes diagnosticados de ojo seco de tipo evaporativo. La recolección de las células de la superficie ocular fue realizada antes y después de que los pacientes fueran sometidos durante dos meses a un tratamiento anti-inflamatorio tópico. Además, se analizaron 17 individuos sanos para realizar el análisis comparativo con la población enferma. Se realizaron diferentes ensayos mediante citometría de flujo para determinar el fenotipo de las células epiteliales y los subtipos de linfocitos intraepiteliales (IELs) presentes, la viabilidad y/o etapa apoptótica y el ciclo celular de las muestras obtenidas.

Resultados. La viabilidad celular del epitelio conjuntival fue notablemente inferior en los pacientes de ojo seco que en los individuos sanos. Además, se observó un descenso significativo de IELs CD4+ y de la proporción CD4/CD8 en los pacientes de ojo seco después del tratamiento anti-inflamatorio. La capacidad proliferativa del epitelio conjuntival fue significativamente menor en los pacientes de ojo seco que en los sujetos sanos.

Conclusiones. Las células epiteliales conjuntivales obtenidas mediante citología por cepillado de pacientes de ojo seco de tipo evaporativo presentan diferente viabilidad, apoptosis y capacidad proliferativa que las obtenidas de sujetos sanos. Después de 2 meses de tratamiento, las células CD8+ incrementaron mientras que las células CD4+ y la proporción CD4/CD8 disminuyeron, demostrando la naturaleza inflamatoria de esta patología ocular.

P-083

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE SLAMF8 EN MACRÓFAGOS HUMANOS Y DE RATÓN. L. Calvache, D. Rojas, M. Alemán, F. Abadía-Molina, A.C. Abadía-Molina. Universidad de Granada, Armilla.

Objetivo. Las moléculas de la familia de SLAM (signaling lymphocyte activation molecule, SLAM) consiste en nueve miembros, SLAMF1-9, que se vienen describiendo como moléculas de adhesión con un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmunitaria específica e innata. SLAMF8 es uno de los miembros de la familia descrito más recientemente y que se expresa principalmente en leucocitos humanos. Previamente, se ha observado que la expresión de SLAMF8 aumenta en células mononucleares humanas CD14+ con INF γ y disminuye tras ser estimuladas con LPS. Nosotros hemos querido analizar la expresión de SLAMF8, en células humanas y macrófagos de ratón con distintos estímulos, con objeto de determinar si se repite en este patrón.

Métodos. Distintas líneas celulares humanas y de ratón han sido estimuladas con bacteria, LPS y PMA. La Expresión de BLAME ha sido analizada mediante RT-PCR y mediante anticuerpos monoclonales. También analizamos la expresión de SLAMF8 en distintos tejidos de ratón mediante RT-PCR.

Resultados. De acuerdo con lo descrito previamente por Kingsbury et al, (2001) hemos observado que SLAMF8 se expresa en monocitos y macrófagos humanos cuando estos son estimulados con INF γ , aunque al contrario que éstos vemos que la expresión de SLAMF8 también aumenta una vez son estimulados con LPS o PMA. De acuerdo con lo observado en humanos, en líneas monocíticas de ratón y macrófagos derivados de peritoneo la expresión también aumenta cuando son estimulados, tanto con bacteria como en presencia de LPS o PMA.

Conclusión. Estos resultados indican que la expresión de SLAMF8 varía en función del estado de activación o reposo del macrófago, y sugiere por tanto que este receptor tiene una función relevante en las funciones inmunitarias de los macrófagos, tanto en células humanas como de ratón.

P-084

MOUSE S5D-SRCRB, A NEW MULTIFUNCTIONAL RECEPTOR INTERACTING WITH MICROBIAL AND ENDOGENOUS STRUCTURES. C. Miró Julià¹, S. Roselló², D.F. Rosenbek Finkfink³, C. Escoda Ferran¹, C. Vázquez-Echeverría⁴, C. Pujades⁴, A. García-Pardo⁵, C. Serra-Pagès², U. Holmskov³, J. Yélamos⁶, F. Lozano². ¹Fundació Clínic per a la Recerca Biomèdica, cardedeu. ²Hospital clínic de Barcelona, Spain. ³Institute of Molecular Medicine, Denmark. ⁴Departament de Ciències Experimentals i de la Salut. ⁵Centro de Investigaciones Biológicas (CIB-CSIC). ⁶Hospital del Mar, Barcelona.

The members of the Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily (SRCR-SF) are transmembrane and/or secreted proteins exhibiting one or several repeats of a well-defined and conserved cysteine-rich protein module of ~100-110 aa, named SRCR. Two types of SRCR domains (A or B) have been reported, which exhibit similar core structure but differ in the number of exons coding for each domain and the number of intradomain cysteines. Although no unifying function has been reported for the SRCR-SF members, recognition of pathogen-associated molecular patterns has been recently shown for some of them. A new member of the group B of SRCR-SF, mouse S5D-SRCRB (soluble 5 domains of SRCR type B), has been structural and functional characterized. The gene encodes a mature protein with a predicted Mr of 144.6 kDa, and encompassing 5 group B SRCR domains (interspersed by Pro-Ser-Thr-rich sequences) and 1 Syndecan-like C-terminal region. Using an episomal mammalian expression system (pCEPPu/HEK293-EBNA), a N- and O-glycosylated soluble recombinant form of >200 kDa, was obtained and used as immunogen for the generation of specific rat mAbs. Subsequent immunohistochemical and real-time RT-PCR analyses showed significant S5D-SRCRB expression in genitourinary and digestive tract. Interestingly, s5d-srcrb mRNA was detected in placodes (a thickening structure in the embryonic epithelial layer where some organs or structure later develops) at 9 dpc (days post coitum). Additionally, S5D-SRCRB was found to bind to some extracellular matrix components (Fibronectin, Laminin) and Galectin-1, a lectin-type sugar-binding protein. On the other hand, S5D-SRCRB was also shown to bind to structural components on the surface of several fungi (β -glucans), and Gram-negative (LPS) and Gram-positive bacteria (peptidoglycan), and to induce fungal and bacterial aggregation as well. The binding abilities together with a restricted tissue expression pattern in adults and embryos suggest S5D-SRCRB might subserve different functions related to innate defence and homeostasis of epithelial surfaces, as well as differentiation and developmental processes.

P-085

ESTUDIO SECUENCIAL DE LOS MACRÓFAGOS PULMONARES EN LA IBR Y SU IMPLICACIÓN EN LA PATOGENIA DE LA ENFERMEDAD. M.Á. Risalde Moya¹, V. Molina Hernández¹, M. Pedreira Mazarro¹, P.J. Sánchez Cordón¹, A. Moreno Parra², J.C. Gómez Villamandos². ¹Universidad de Córdoba, Córdoba. ²Laboratorios HIPRA.

El herpesvirus bovino tipo-1.1 (HVB-1.1) es el agente causal de la rinotraqueitis infecciosa bovina (IBR), una de las enfermedades víricas de mayor incidencia a nivel mundial en el ganado bovino, ocasionando elevados costes de producción en esta especie. La infección con este virus afecta sobre todo al tracto respiratorio superior, siendo la implicación directa del HVB-1.1 en las lesiones pulmonares objeto de discrepancia. Así, el objetivo de este trabajo fue determinar los cambios cuantitativos y biosintéticos que se producen en los macrófagos pulmonares de animales inoculados experimentalmente con HVB-1.1.

Para ello, 8 terneros fueron inoculados intranasalmente con la cepa Iowa del HVB-1.1 y sacrificados en grupos de dos a los 2, 4, 7 y 14 días post-inoculación (dpi). Asimismo, 2 animales control se inocularon con medio estéril y se sacrificaron al final del experimento. Las muestras de pulmón fueron procesadas de forma rutinaria para su estudio histopatológico e inmunohistoquímico (MAC387, TNF α e IL-1 α).

Las lesiones histopatológicas observadas en el pulmón de los animales inoculados con HVB-1.1, se caracterizaron por la presencia de intensos cambios vasculares como congestión, edema o hemorragias, así como por el engrosamiento de los septos interalveolares y la aparición de un infiltrado de tipo mixto desde el inicio de la experiencia.

El estudio inmunohistoquímico reveló un incremento en el número de macrófagos pulmonares alveolares desde el inicio del proceso, población que actúa como primera línea de defensa frente a patógenos aerógenos. Este incremento se vio acompañado de una mayor expresión de IL-1 α por parte de las distintas poblaciones de macrófagos pulmonares, que podría tener un efecto sinérgico con la expresión de TNF α .

Así, los cambios inflamatorios observados en este órgano ocurrirían como resultado de la expresión de citoquinas proinflamatorias por los macrófagos pulmonares, dando lugar a un incremento de la permeabilidad vascular y adhesión de las células inflamatorias que migran por quimiotaxis al pulmón. Este hecho podría ser importante para la rápida instauración de una protección local en estadios tempranos de la infección, previniendo así la colonización de este órgano por el virus. Además, el papel que los niveles de citoquinas proinflamatorias expresadas localmente pueden jugar en la respuesta de fase aguda sistémica debe ser estudiado en trabajos posteriores.

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

P-086

EVALUATION OF ANTINUCLEAR RO/SS-A AND LA/SS-B ANTIBODIES BY MULTIPLEX TECHNOLOGY AT THE UNIVERSITY HOSPITAL "12 DE OCTUBRE" (MADRID-SPAIN). M. Talise Astier, V. Pérez Aradas, S. Lermo, M. Sevilla, E. Pérez Aradas, L. Borque, A. Serrano. Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Introduction. Autoantibodies to Ro/SS-A and La/SS-B ribonucleoproteins are found in autoimmune diseases such as primary Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis¹. Two types of anti-Ro/SSA antibodies have been described, anti-SSA-52 kDa and anti-SSA-60kDa, historically, these autoantibodies

were considered as a uniform autoantibody-system. However, recent studies provided evidence that Ro60 and Ro52 are not part of a stable macromolecular complex and that anti-Ro52 and anti-Ro60 (SS-A) antibodies have different clinical associations and each specific to different antigens², for this reason it is necessary to be able to individually identify these antibodies in the laboratory of autoimmunity and the automated system BioplexTM 2200 offers this advantage; we compare this technique with the immunofluorescence (IIF) and Athena Multi-lyte[®] ANA test system a multiplex fluorescent microsphere immunoassay for the semi-quantitative of Ig G class antibody to 9 separate analytes (DNA, SSA, SSB, Sm, RNP, Scl-70, Jo-1, Centromere B, and Histone).

Methodology. We studied sera from 600 patients randomly admitted to the autoimmunity section during May and June 2009. Antinuclear antibodies (ANA's) were determined by immunofluorescence (IIF) on HEp-2 cell, Athena-Luminex, a multiplex technique that detects 9 different antibodies simultaneously and BioPlexTM2200 (by Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) a fully automated Luminex-based system developed for analysis of 13 antibodies including anti-SSA-52 kDa and anti-SSA-60 kDa in a primary tube and SS-B, Sm, Sm/RNP, RNPA, RNP-68, Scl70, Centromere-B, dsDNA, chromatin, Jo1, ribosomal P.

Results. 33 sera were positive to anti-SSA-52; 42 anti-SSA-60, and 17 anti-La/SS-B by Bioplex 2200; 37 sera were positive to anti SS-A and 11 anti-La/SS-B by Athena-Luminex, with a global concordance of 96.5% and 98.33% respectively; by IIF we obtained 48 positive sera, 25 (52.08%) with coarse and fine speckled pattern, 18 (37.50%) homogeneous, 2 (4.20%) Centromere-B, 2 (4.20%) Nuclear dots. Finally, 80.70% of the patients had at least one diagnosis of autoimmune disease.

Conclusions. We conclude that BioPlex2200 offers a good percentage of concordance with other methods, and can be a good solution as a multiplex approach to diagnose autoimmune diseases like Sjögren's syndrome, systemic lupus erythematosus and rheumatoid arthritis because the separation of Ro / SSA 52 and 60 antigens conferred increased sensitivity.

SESIÓN 7: CÉLULAS DENDRÍTICAS

Moderadores: Alberto Varas (Madrid)
David Sancho (Madrid)

P-087

EFFECTO DE WNT5A SOBRE LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS CONVENCIONALES DERIVADAS DE PROGENITORES CD34+ DE SANGRE DE CORDÓN UMBILICAL. J. Valencia Mahón¹, V. García Martínez¹, L. Hidalgo Lumbreras¹, A. Entrena Martínez¹, A. González Zapata², C. Henández López¹, A. Vicente López¹, A. Varas Fajardo¹, R. Sacedón Ayuso¹. ¹Facultad de Medicina, UCM, Madrid. ²Facultad de Biología, UCM.

Objetivos. La familia de proteínas de secreción Wnt ha sido implicada en diversos fenómenos biológicos relacionados con el desarrollo y la diferenciación, tales como la determinación de los diferentes destinos celulares, la proliferación de células progenitoras, el establecimiento del eje dorsal y el control de la división celular asimétrica. Diferentes trabajos muestran como los ligandos Wnt participan en el mantenimiento de los precursores hematopoyéticos humanos regulando su diferenciación, expansión y supervivencia. En el presente estudio

dio analizamos el efecto de Wnt5a, ligando Wnt no-canónico, sobre la diferenciación de las células dendríticas convencionales (cDC) humanas producidas a partir de progenitores CD34+ procedentes de sangre de cordón umbilical (CBCD34+).

Material y métodos. Los progenitores CBCD34+ fueron obtenidos mediante selección positiva por separación inmunomagnética y utilizados para el establecimiento de cultivos en suspensión dirigidos a la producción de cDC (8 días en presencia de SCF, FLT3L y GM-CSF seguidos de un periodo de 4 días en presencia de GM-CSF e IL-4), a los que se adicionó o no la proteína Wnt5a. Los intermedios de diferenciación CD34-CD1a- CD14- y CD14+ CD1a- fueron aislados a partir de estos cultivos mediante sorting. El fenotipo y supervivencia de las células recuperadas fueron analizados por citometría de flujo.

Resultados y conclusiones. La adición de Wnt5a a los cultivos de progenitores CBCD34+ reduce significativamente el número de cDCs (CD14-CD1a+HLA-DR+CD11c+) recuperadas produciéndose, por el contrario, un número mayor de células CD14+CD1a- que, tras la adición de IL-4, no diferencian a células CD14-CD1a+. Es más, las cDCs recuperadas a partir de los cultivos tratados con Wnt5a muestran importantes cambios en los niveles de expresión de moléculas coestimuladoras, esenciales para la función de las cDCs. Estos resultados sugieren que Wnt5a ejerce un efecto negativo sobre la diferenciación de los progenitores CBCD34+ hacia cDCs.

P-088

EFFECTO DE LA COMBINACIÓN DE ÁCIDO RETINOICO Y VITAMINA D3 EN LA FUNCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DERIVADAS DE MONOCITOS. I. Luque Larena¹, R. Atencia Arruti¹, N. Maruri Machado¹, Á. Prada Iñurategi², A. Arrieta Gutiérrez¹, M. Riñón Martínez-Gallo¹, S. Larrucea Bilbao¹. ¹Hospital de Cruces, Barakaldo, Bilbao. ²Hospital Donostia, San Sebastian.

Objetivos. Obtener células dendríticas (DCs) inmaduras tolerogénicas a partir de monocitos de sangre periférica para aplicarlas al tratamiento de enfermedades autoinmunes y al rechazo de los trasplantes. Una de las estrategias para promover la tolerogenicidad de las células es el uso de fármacos que suprimen la maduración de las DCs. Hemos valorado el efecto potenciador del ácido 9-cis retinoico (9cRA), uno de los metabolitos activos de la vitamina A, cuando se combina con 1,25-dihidroxit vitamina D3 (1,25(OH)2-D3), el metabolito activo de la vitamina D3.

Metodología. Obtención de DCs: las células mononucleares de sangre periférica se obtuvieron mediante centrifugación en gradiente de Ficoll. Posteriormente se aislaron los monocitos mediante selección negativa y se derivaron a DCs en cultivo con interleucina 4 y factor estimulante de colonias de granulocitos y macrófagos durante 7 días en presencia o ausencia de las hormonas analizadas. Finalmente se indujo la maduración de las DCs con factor de necrosis tumoral, interleucina 1 beta, interleucina 6 y prostaglandina E2 durante 48 h.

Fagocitosis. Las DCs se incubaron con dextrano marcado con isotiocianato de fluoresceína y se analizaron por citometría de flujo.

Adhesión. Las células adheridas a placa se fotografiaron mediante un microscopio óptico invertido.

Cuantificación de IL-10. se realizó en los sobrenadantes de los cultivos de las células mediante ELISA.

Resultados. La capacidad fagocítica de las DCs tratadas con 1,25(OH)2-D3 se potencia por la adición de 9cRA. La combinación de ambas hormonas aumenta sinérgicamente la extensión y adhesión a placa de las DCs.

Se observa un aumento de la producción de interleucina 10 en las DCs tratadas con 1,25(OH)2-D3 y 9cRA con respecto a las células control.

Conclusiones. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran cómo el 9cRA potencia el efecto tolerogénico de 1,25(OH)2-D3 en las DCs derivadas de monocitos. Por lo tanto, el uso de estos fármacos inmunosupresores podrían modular la actividad de las DCs en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y mejorar el rechazo en los trasplantes.

SESIÓN 8: INMUNODEFICIENCIAS I

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

P-089

HLA-B35-CW4 AUMENTA TANTO LA TRANSMISIÓN VERTICAL DEL VIH COMO SU PROGRESIÓN. A. Arnaiz-Villena¹, J. Martínez-Laso², J.M. Martín-Villa², D. Rey¹, P. Gómez-Prieto¹, C. Parga-Lozano¹, N. Martínez-Quiles¹. ¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Centro de Transfusiones de la CAM, Madrid. ²Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

Objetivos. La transmisión madre-hijo durante el embarazo es un modelo único para el estudio de correlación entre el fenotipo HLA y la susceptibilidad a la infección por VIH. Se ha estudiado dicha relación en un grupo de parejas madre/hijo en la población española.

Material y métodos. Se han determinado las frecuencias de alelos HLA de clase I y clase II de 120 niños nacidos de madres infectadas por el VIH, y de 67 madres infectadas por métodos standard. Aunque se han encontrado diferencias en la frecuencia de HLA-B35 entre madres transmisoras y no transmisoras, el alelo fue también significativamente más frecuente en niños infectados que en no infectados. HLA-B35 ha sido considerado como un factor de riesgo para la progresión del SIDA en nacidos de madres VIH positivas. Además, se ha propuesto que si un determinado alelo puede conferir susceptibilidad hacia, o protección contra dicha progresión depende del patrón de herencia materna frente a la paterna, ya que el niño hereda un virus que refleja la historia de los encuentros de células T citotóxicas de la madre.

Resultados y conclusiones. Nuestros resultados en la transmisión vertical del HIV combinan por vez primera las teorías de “la desventaja HLA-B35” y “patrón de herencia” y además sitúan el factor de susceptibilidad HLA en el haplotipo B35-CW4-DR4 mas cerca del locus HLA-DRB1 que del locus HLA-C.

P-090

ESTUDIO GENÉTICO DE UNA FAMILIA CON AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X Y EXPRESIÓN POSITIVA DE BTK. APLICACIÓN AL DIAGNÓSTICO PRENATAL. C. Abad Molina¹, A.J. Álvarez Márquez¹, G. Pérez Pérez², M. Navarro², C. Guzmán Espinosa¹, J.M. Lara Ruiz¹, C. Morales Galán¹, A. Núñez Roldán¹, B. Sánchez Sánchez¹. ¹HHUU Virgen del Rocío, Sevilla. ²HU Virgen Macarena, Sevilla.

Introducción. La ausencia de expresión de btk suele ser la principal causa fenotípica de la agammaglobulinemia ligada al cromoso-

ma X, aunque en un número minoritario de casos encontramos expresión de btk no funcional. Es importante profundizar en el estudio de los pacientes con déficit de anticuerpos, ya que existe una base genética conocida para la enfermedad y se halla ligada al cromosoma X. En este sentido, se pueden identificar posibles portadoras, nuevos casos en las fases iniciales así como poder ofrecer un consejo genético.

Objetivo. Establecer las bases genéticas en un paciente con expresión positiva de btk, ausencia de células B y agammaglobulinemia, y estudiar a su familia.

Material y Métodos. Caso índice (P1): Se estudió a un varón de 23 años con cuadro clínico sugerente de enfermedad de Bruton desde que tenía un año de edad, que presentaba infecciones de repetición y niveles muy reducidos de inmunoglobulinas. Por citometría de flujo se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos y la expresión de btk, detectándose ausencia de linfocitos B y expresión positiva de btk. Se comenzó a secuenciar el gen btk. Posteriormente, un sobrino del caso índice (P2) de 2 años presentaba infecciones respiratorias de vías altas y bajas desde los primeros meses de vida. En su estudio presentó un fenotipo idéntico al del caso índice. Secuenciamos los 19 exones del gen btk, comenzando por aquellos con mutaciones descritas en la bibliografía que conllevan a la expresión de una btk no funcional.

Resultados. Encontramos en P1 y P2 una mutación descrita: R520Q en el exón 15 del gen btk, y establecimos el estatus de portadoras en la familia. Mediante el análisis por secuenciación de la mutación R520Q en el ADN extraído de las vellosidades coriónicas, encontramos dicha mutación en el feto varón de la madre de P2.

Conclusión. La identificación del caso genético subyacente en el síndrome de Bruton permite la confirmación diagnóstica en pacientes sin antecedentes familiares para dicha inmunodeficiencia, permite la detección del estado de portadora y descartar a las no portadoras, dato indispensable para realizar un consejo genético adecuado, y posibilita la realización de diagnóstico prenatal.

P-091

USO DOMICILIARIO DE GAMMAGLOBULINA INTRAVENOSA EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE ANTICUERPOS. J. Carbone Campoverde, N. Del Pozo Rodríguez, C. Chean Pacheco, J. Rodríguez Molina, J. Navarro Caspistegui, C. Esteban, E. Sarmiento Marchese. Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

El uso domiciliario de gammaglobulina intravenosa (GGIV) para la terapia sustitutiva de pacientes con deficiencias de anticuerpos es práctica habitual en distintos países europeos como Suecia e Inglaterra. En España no hay experiencia previa con la administración a domicilio de GGIV. Describimos datos inmunológicos y la prevalencia de reacciones adversas en una serie corta de pacientes con deficiencia de anticuerpos que reciben terapia con GGIV en el domicilio.

Pacientes y Métodos. 3 pacientes (2 con hipogammaglobulinemia IgG secundaria a LLC y neumonía recurrente y 1 con inmunodeficiencia variable común) pasaron de recibir la GGIV en el hospital a su administración en el domicilio a petición propia. La media de IgG en el momento del diagnóstico de deficiencia de anticuerpos fue de 161 (rango 35-300) mg/dl. El tiempo medio de administración de GGIV previa en el hospital fue de 62 (rango 3-180) meses. Ninguno de los pacientes había tenido reacciones adversas moderadas o graves previas. Preparado de GGIV: Concentración al 5%, líquida, pasteurizada,

no precisa mantener cadena de frío y puede almacenarse a temperatura ambiente. Velocidad de infusión: 0,01-0,04 ml/kg/min. Las infusiones fueron realizadas por personal de enfermería. No se utilizaron bombas de infusión. La prescripción y dispensación del hemoderivado así como los controles clínicos periódicos de los pacientes se hicieron en el hospital.

Resultados. El tiempo de seguimiento durante la administración domiciliar de GGIV ha sido de 26 (rango 7-61) meses. Durante el seguimiento ninguno de los pacientes experimentó reacciones adversas moderadas o graves. La media de concentración de IgG durante la fase domiciliar de tratamiento fue de 716 mg/dl. De un total de 126 infusiones realizadas, la prevalencia de reacción adversa fue de 1,59%: febrícula post-infusión (n=2). La periodicidad de las infusiones (cada 2-3 semanas) pudo ajustarse mejor que en el hospital al no depender de la disponibilidad de plazas en los hospitales de día. Los pacientes continúan recibiendo sus infusiones de GGIV en el domicilio. Se ha estimado un ahorro para el SNS de 12000 euros derivado de la no utilización del hospital de día para la administración de GGIV en estos pacientes.

Conclusión. La administración de GGIV en el domicilio fue una práctica segura en una serie corta de pacientes con deficiencia de anticuerpos.

SESIÓN 9: INMUNODEFICIENCIAS II

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

P-092

EL POLIMORFISMO C.657C>T EN EL EXÓN 3 DEL GEN CIAS1 NO SE ENCUENTRA ASOCIADO A NOMID (NEONATAL-ONSET MULTISYSTEM INFLAMMATORY DISEASE). J. Reiné Gutiérrez¹, A. Torrel², J.C. López-Robledillo², E. Martínez Busto¹, M. Muñoz-Ruiz¹, B. Garcillán¹, J.R. Regueiro¹, D. Gurbindo², M.J. Recio Hoyas². ¹Facultad de Medicina Universidad Complutense, Madrid. ²Hospital Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción. La enfermedad neonatal multisistémica inflamatoria (NOMID) se caracteriza fundamentalmente por exantemas cutáneos e inflamación articular que se manifiestan en la mayoría de los casos durante los primeros meses de vida. La mayor parte de las mutaciones identificadas se encuentran en el exón 3 del gen *CIAS1*, que codifica para el dominio central de la criopirina, implicado en la regulación de las vías proinflamatorias, caspasa-1/IL-1b y NK-κB. La desregulación de estas vías da lugar al desorden inflamatorio sistémico que presentan la mayoría de los pacientes diagnosticados.

Caso clínico. Presentamos un caso clínico de un paciente con 14 años de edad diagnosticado de un posible NOMID, con una historia clínica de lesiones lesiones máculo-papulosa y eritematosas, signos inflamatorios en articulaciones interfalángicas y numerosos episodios de poliartritis de grandes articulaciones (rodillas, manos y pies) en los primeros meses de vida. Analíticamente desde el comienzo del cuadro clínico ha presentado anemia hemolítica hipocrómica, leucocitosis y trombocitosis con reactantes de fase aguda elevados. El tratamiento con AINES y corticoides no ha dado buenos resultados.

Resultados. El análisis molecular realizado en el paciente, utilizando oligonucleótidos específicos del exón 3 del gen *CIAS1*, revela un cambio en heterocigosis de C>T en la posición 657 (c.657C>T), que no da lugar a cambio de aminoácido, éste no se encuentra presente en la madre ni el resto de controles estudiados. Por otro lado, el análisis de las subpoblaciones linfocitarias en el paciente, utilizando anticuerpos monoclonales específicos, muestra una leve linfopenia TCD8⁺.

Conclusiones. Los resultados obtenidos sugieren que aunque el polimorfismo c.657C>T encontrado en el exón 3 del gen *CIAS1* no es responsable de esta patología, no se puede descartar que existan mutaciones en el resto de exones no estudiados.

P-093

SÍNDROME DE GOOD: CASO CLÍNICO DE UN PACIENTE CON TIMOMA Y AUSENCIA DE LINFOCITOS B. N. Olivares Beobide¹, N. Maruri Machado¹, M. Riñón Martínez-Gallo¹, A. Pacho De Lucas¹, C. Martínez Bilbao², C. Esteban González², M.D. De Juan Echavarrri³, A. Arrieta Gutiérrez¹. ¹Hospital de Cruces, Bilbao. ²Hospital de Galdácano, Galdácano. ³Hospital Donostia, San Sebastián.

Objetivos. Presentar el caso de un paciente con hipogammaglobulinemia, pancitopenia y antecedentes de timoma intervenido, en el que se sospecha un síndrome linfoproliferativo y se diagnostica una inmunodeficiencia.

Caso clínico. Varón de 63 años, con antecedentes mórbidos de sinupatía crónica y bronquiectasias. Intervenido de timoma en enero de 2009. Controlado por neumólogo por reagudizaciones infecciosas que requieren ingreso hospitalario, el último por empiema con derrame pleural. Microbiología de líquido pleural y hemocultivos positivos para *Morganella Morganii*. La analítica objetivó anemia y leucopenia. El proteinograma mostró hipoalbuminemia e hipogammaglobulinemia. Serología para VHB, VHC y VIH negativa. Tras resolución del cuadro agudo se realizó estudio inmunológico para descartar un síndrome linfoproliferativo.

Material y métodos. Se ha realizado el inmunofenotipo de sangre periférica (SP) y médula ósea (MO) al diagnóstico, y SP tras tratamiento sustitutivo con gammaglobulina, caracterizando las subpoblaciones linfocitarias, incluida la exclusión de cadena ligera de los linfocitos B. Otros estudios inmunológicos: reordenamientos JH y TCR por PCR-SSP para estudio de clonalidad B y T; recuento absoluto de leucocitos y linfocitos; cuantificación de inmunoglobulinas y subclases; valoración de autoanticuerpos; pruebas funcionales: test de transformación linfoblástica y cuantificación de anticuerpos frente a *Haemophilus*, neumococo y tétanos.

Resultados. Al diagnóstico, en la muestra de SP se constató una leucopenia y una ausencia de linfocitos B, así como una relación CD4/CD8 invertida en linfocitos T. En muestra de MO el porcentaje de linfocitos B CD19⁺ fue un 0,05% respecto al total de linfocitos (18%), con cadena ligera de superficie de carácter policlonal.

Conclusiones. El inmunofenotipo por CF es útil para la detección y monitorización de la inmunodeficiencia y el posible desarrollo de un linfoma no Hodgkin en pacientes con timoma.

Los parámetros prácticos para el diagnóstico y manejo de las inmunodeficiencias primarias de 2005 definen el síndrome de Good como un subtipo de inmunodeficiencia variable común.

El bajo porcentaje de linfocitos B e incluso su ausencia en pacientes adultos con antecedentes de timoma sugieren el diagnóstico de síndrome de Good.

P-094

NUEVA MUTACIÓN COMPLEJA DEL GEN WAS EN PACIENTE CON SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH. V. Daza Cajigal¹, N. Martínez-Pomar¹, S. Torres², K. Vega², A. Iglesias¹, M.R. Juliá¹, J.A. Salinas¹, I. Molina¹, D. Heine-Suñer¹, J. Rosell¹, N. Matamoros¹. ¹Hospital Universitario Son Dureta, Palma De Mallorca. ²Universidad De Granada, Granada.

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X, que se caracteriza por la presencia de trombocitopenia, eccema y diferentes grados de inmunodeficiencia. Se origina por mutaciones en el gen WAS, ubicado en la región Xp11.22-23, que codifica la proteína WASp implicada en los procesos de formación y reorganización del citoesqueleto de las células hematopoyéticas. Existe una correlación genotipo-fenotipo que relaciona la severidad de las manifestaciones clínicas con la ausencia de expresión de la proteína WASp.

Materiales y métodos. Extracción de ADN genómico de sangre periférica y análisis mutacional de los exones del gen WAS con primers específicos por secuenciación directa del DNA. Estudios de expresión de RNA mediante RT-PCR. Estudio de expresión proteica de WASp mediante técnica de Western blot.

Resultados. Se presenta el primer caso de un paciente afecto de Síndrome de Wiskott-Aldrich debido a una mutación compleja de novo, con probable traslocación de un segmento de 5.121 pb del gen WAS que origina la pérdida de los exones 2-11. Se realiza estudio de secuenciación con primers flanqueantes para los diferentes exones, con imposibilidad de amplificar el exón 11 y amplificación normal del resto de exones. Mediante secuenciación del gen se localiza a nivel genómico el punto de corte con pérdida de los exones 2-11. Los estudios de expresión mediante RT-PCR no detectaron el transcrito correspondiente, posiblemente debido a la inestabilidad del fragmento. Así mismo, los estudios proteicos revelaron ausencia de expresión de WASp, que se correlaciona con el fenotipo severo del paciente.

Conclusión. En vista de los hallazgos encontrados, evidenciando que la presencia de una traslocación puede posibilitar la secuenciación independientemente de exones, consideramos de gran importancia la realización del análisis de expresión proteica como complemento del estudio molecular. Estudios futuros mediante *Primer in Situ DNA Synthesis* (PRINS) Technique podrán confirmar y localizar la ubicación de dicha traslocación.

P-095

SÍNDROME DE GOOD: EVALUACIÓN INMUNOLÓGICA. M.G. Salgado-Cecilia¹, R. López-Hernández¹, M. Gil Ortega², A. Bernal Ramos¹, M.V. Martínez-Sánchez¹, E. Santos Medina³, P. De La Morena Barrios², J. Torres Lanzas¹, J.A. Campillo Marquina¹, M.R. Alvarez-López¹, A.M. García-Alonso¹. ¹Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. ²Hospital Universitario J. M. Morales Meseguer, Murcia. ³Residencia San Basilio. Rey D^o Pedro, Murcia.

Las inmunodeficiencias primarias más frecuentes son las humorales cuyo defecto predominante es el déficit de anticuerpos, entre ellas, el Síndrome de Good, que es una hipogammaglobulinemia asociada a timoma, es una entidad poco frecuente, de etiología desconocida y que normalmente se presenta en la cuarta o quinta década de vida. Los tumores tímicos son normalmente benignos pero alrededor de un 6-11% de pacientes con timoma desarrollan una inmunodeficiencia.

Se presenta el caso de una mujer de 73 años que en 2003 padeció una infección pulmonar de evolución tórpida, en cuya radiografía se apreciaba la presencia de una masa mediastínica anterior de 9 cm de diámetro, ligeramente heterogénea. Cinco años antes la paciente había sufrido astenia, pérdida de peso, tos con mucosidad y expectoración abundante. Fue timectomizada en el 2004 y varios meses después ingresó con un shock séptico secundario a un cuadro de mediastinitis purulenta y dehiscencia de sutura esternal donde se coleccionó 400 c.c. de pus denso. La paciente no mejoraba su estado clínico y continuó padeciendo infecciones respiratorias. Tras el diagnóstico de un déficit de anticuerpos en sangre periférica fue remitida a nuestro Hospital para una evaluación inmunológica por sospecha de Síndrome de Good.

Los resultados de laboratorio mostraban una hipogammaglobulinemia severa: IgG <7,67 mg/dL, IgA 2,09 mg/dL e IgM < 0,88 mg/dL. El recuento de leucocitos de sangre periférica era de 11.000 céls/μl y el número de linfocitos de 3.900 céls/μl con sólo 1,7% de céls B mayoritariamente CD19⁺5⁺, NK (137 céls/μl) y una inversión del cociente CD4⁺/CD8⁺ (0,24) por incremento del número de céls T CD3⁺CD8⁺CD57⁺CD11b-TCRαβ (1775 céls/μl) y bajo número de células T naïve. No se encontraron otras alteraciones inmunológicas.

Tras la instauración de un tratamiento con inmunoglobulinas intravenosas mensual la paciente mejoró significativamente y actualmente sigue asintomática. Dado el porcentaje de pacientes con timoma que pueden desarrollar inmunodeficiencia, sería recomendable someter a estos pacientes a seguimiento con objeto de detectar tempranamente las alteraciones inmunológicas y poder iniciar el tratamiento adecuado para mejorar su calidad de vida y evitar posibles complicaciones que puedan poner en riesgo su vida.

SESIÓN 10: INMUNOGENÉTICA

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

P-096

IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO ALELO HLA-A*80 (A*8002) CON TRES SUSTITUCIONES AMINOACÍDICAS RELEVANTES EN EL DOMINIO ALFA-1. *A. Teniente, P. Caro, J. Gil, E. Campos, S. Mantecón, C. Ambrós, L. Mongay, R. Pujol-Borrell, M.J. Herrero, E. Palou. LIRAD-BST, Mataró.*

Introducción. Hasta el momento sólo ha sido descrito un alelo en el grupo HLA-A*80, el A*8001. Este alelo se encuentra predominantemente en las poblaciones africanas, pero también se observa, con una frecuencia mucho menor en los individuos españoles.

Objetivos. Caracterizar un nuevo alelo HLA-A*80 a partir de una unidad de sangre de cordón umbilical de origen caucásico del Banco de Sangre de Cordón Umbilical de Cataluña.

Material y métodos: Al llevar a cabo la tipificación de HLA mediante PCR-SSO se detectó un patrón anómalo, lo que llevó a su clonación y secuenciación de nucleótidos, de los exones 2, 3 y 4.

Resultados. El nuevo alelo se diferencia de A*8001 por tres cambios de nucleótidos en las posiciones 292 (A → G), 299 (C → T) y 301 (A → G), dando lugar a tres cambios de aminoácido en el codón 74 (AAC

→ GAC) de asparagina en ácido aspártico, en el codón 76 (GCG → GTG) de alanina por valina, y en el codón 77 (AAC → GAC) de asparagina en ácido aspártico, respectivamente.

El nuevo alelo fue designado oficialmente como HLA-A*8002 por el Comité de Nomenclatura de la OMS en Enero de 2010.

Las tres posiciones con cambios de aminoácidos (74, 76 y 77) se encuentran en una de las alfa-hélices que forman las paredes del surco peptídico, formando parte de algunos de los bolsillos del sitio de unión del péptido.

Los tres cambios de nucleótidos se encuentran en la mayoría de los alelos HLA-A*03 y HLA-A*11, pero no en los alelos HLA-A*01, que constituyen en conjunto la familia HLA-A1/3/11/80.

Conclusiones. Caracterización de un nuevo alelo HLA-A*80 (A*8002) cuyos cambios de nucleótidos podrían indicar que ha surgido de una conversión génica interalélica entre un alelo A*03/11 y el A*8001.

P-097

EVALUACION DEL TIPAJE HLA CLASE II ALTA RESOLUCION MEDIANTE PCR SSO LUMINEX®. EXPERIENCIA EN EL BANCO DE CORDÓN UMBILICAL DE MALAGA. *F.D.P. Sánchez Gordo, J. Jaen García, A.M. Carrasco Hidalgo, E. Christensen Pedersen, I. Prat Arrojo. Centro de Transfusión de Málaga y Banco de Cordón de Andalucía, Málaga.*

Introducción. Los requerimientos del tipaje HLA en sangre de cordón para trasplante son de compatibilidad en baja resolución para HLA-A y -B y alta para DRB1. Dado el número de muestras y el volumen de éstas, el tipaje HLA por técnicas de biología molecular requiere la utilización de un método rápido, económicamente asequible, y de resultados fiables. Una vez validado en nuestro laboratorio, en este trabajo estudiamos el tipaje HLA clase II por PCR SSO Luminex® de alta resolución.

Material y métodos. Analizamos los tipajes realizados en 1000 muestras de sangre de cordón umbilical tipadas entre el 17 de Noviembre de 2009 y el 24 de Febrero de 2010 mediante el kit RSSOH2B1 lote 05 (One Lambda, PCR SSO Luminex®). Las muestras de DNA se extrajeron mediante sistema automático Magtraction® MagaZorb® Kit, y se evaluó el rendimiento mediante espectrofotometría (Eppendorf).

Resultados. Se alcanzó un nivel de resolución de 4 dígitos en el 76% de las muestras. (240 muestras no alcanzan los cuatro dígitos, de ellas 172 por imposibilidad de discriminación del método, y 168 por sondas complejas de alelos raros con reacciones peri-cutoff). Se muestran las frecuencias encontradas de los diferentes alelos y el nivel de discriminación. Limitaciones encontradas, fueron la no discriminación entre DRB1*1401/54; *1201/06/10/17; (en ambos casos la secuencia del exón 2 es idéntica) *0403/52; *0404/23; *0405/08; ambigüedad *0102 *1104 vs *0120 *1106; siendo la principal limitación a la alta resolución la dificultad de establecer el adecuado cutoff en beds que diferencian *0301/16/18/28 (especialmente en muestra 0301 homocigotas) y el *0701/16.

Conclusiones. Empleado como técnica inicial única, se alcanza el nivel de resolución de cuatro dígitos en el 76% de las muestras, si tenemos en cuenta las exigencias de la EFI (exón 2), el porcentaje se eleva al 86%. Y alcanzaría el 91% en caso de normalización en los "beds" complejos (múltiples sondas) que diferencian 0301 de 0316 y 0701 de 0716 en muestras homocigotas. Como conclusión se trata de una técnica fiable y con adecuada relación calidad/precio.

P-098

DIFERENCIAS GENÉTICAS DE HLA ENTRE AMERINDIOS, NADENE, ESKIMO Y ALEUTIANOS AMERICANOS. A. Arnaiz-Villena, P. Gomez-Prieto, C. Parga-Lozano, C. Areces, D. Rey, P. Peñaranda, L. Barbolla. Departamento de Inmunología, Facultad de medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de transfusiones de la CAM, Madrid.

Objetivos. Se hipotetiza que los Amerindios fueron los primeros habitantes de Norte y Sudamérica. Se ha postulado que alcanzaron el continente americano entre hace 30.000 y 12.000 años. Sin embargo, han sido encontrados asentamientos humanos más antiguos en el sur de Sudamérica. Actualmente, muchas de sus lenguas parecen no estar relacionadas y algunos autores dudan de que hayan surgido de un único grupo poblacional. Se cree que los hablantes de lenguas Na Dene (Atabascos de Canadá, Navajo, Apache) alcanzaron América hace unos 8.000 años antes del presente, y que los Eskimo-Aleutianos lo hicieron hace unos 6.000 años antes del presente. Este modelo de poblamiento de América basado en la antropología física y la lingüística es demasiado general y deja sin explicar algunos puntos clave.

En este trabajo, nuestro *objetivo* ha sido estudiar tanto la genealogía como la comparación de distancias de frecuencia alélicas de HLA entre estos tres grupos pioneros con el fin de contrastar la robustez de este modelo de poblamiento de América y establecer las relaciones genéticas de estos grupos.

Material y métodos. Se han utilizado los haplotipos HLA extendidos para trazar genealogías entre poblaciones y las matrices de distancias genéticas DA de las frecuencias alélicas de HLA para construir los dendrogramas. También ha sido calculada la variación de frecuencias alélicas de HLA mediante análisis de correspondencia. Se han empleado los programas Arlequin, GNDist y Vista, una vez obtenidas las frecuencias alélicas de HLA por metodología estandarizada.

Resultados y conclusiones. 1) los Aleutianos parecen tener una mayor relación con el grupo de Siberianos y Saami (Laponés, Escandinavia); parecen no estar tan relacionados con Esquimales, siendo menos claro el momento de su llegada al continente americano; 2) Atabascos y Esquimales parecen tener una mayor relación con Siberianos y otros orientales y, 3) los Amerindios parecen estar alejados de sus vecinos y del resto de poblaciones mundiales al usar únicamente comparación de frecuencias. Sin embargo, la existencia de un alelo HLA totalmente específico de Amerindios no se ha encontrado. De todos modos, se han hallado haplotipos que son específicos de poblaciones amerindias aisladas. El aspecto más específico de haplotipos HLA en comparación con los alelos se discutido. Se exponen las causas del particular perfil HLA de Amerindios.

P-099

LA VARIABILIDAD DE LOS INTRONES DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN AVES CANTORAS SALVAJES (PASSERINES) SUGIEREN QUE EL ALELISMO ES GENERADO POR CONVERSIÓN GÉNICA. A. Arnaiz-Villena¹, D. Rey¹, P. Gomez-Prieto¹, S. Abd El Fatah Khalil², P. Peñaranda², C. Areces¹, C. Parga-Lozano¹. ¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de transfusiones de la CAM, Madrid. ²Centro de transfusiones de la CAM, Madrid.

Objetivos. Estudiar el mecanismo de generación de alelos MHC en un modelo de aves silvestres.

Material y métodos. Se han obtenido muestras de DNA de aves de canto salvajes de todo el mundo. Se ha extraído DNA y determinado sus genes de histocompatibilidad por métodos Standard automáticos de extracción y secuenciación.

Resultados y conclusiones. Se supone que los intrones no siguen un "reloj molecular" de cambio de bases del ADN. Esto hace que no sean de utilidad para establecer filogenias. Sin embargo, el estudio de cambios intrónicos en grupos de modelos ya definidos filogenéticamente por genes que sí siguen un "reloj molecular" como ciertas aves de canto de los géneros: Carduelis, Serinus, y la tribu Carduelini, pueden darnos respuestas a preguntas evolutivas específicas. En este artículo, se ha analizado el intrón 2 del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) de clase I con el fin de estudiar la evolución de los genes MHC de estas aves de canto salvajes. Se han analizado indels, distancias genéticas, y el promedio de variabilidad (variabilidad media). No se ha encontrado en estas aves de canto salvajes la conservación esperada del intrón 2, al contrario se ha registrado una amplia variabilidad. A pesar de que hay una tendencia de los grupos de aves cantoras filogenéticamente definidos a preservar un intrón 2 similar, se ha observado una gran variabilidad. Esto concuerda que la mayoría de la variabilidad alélicas de MHC se ha efectuado por conversión génica (por participación de intrones) y no por mutaciones puntuales.

P-100

EVOLUCIÓN DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD -C, -G Y DE RECEPTORES "NATURAL KILLER" EN PRIMATES. A. Arnaiz-Villena¹, D. Rey¹, P. Gomez-Prieto¹, S. Abd El Fatah Khalil², P. Peñaranda², C. Areces¹, C. Parga-Lozano¹. ¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de Transfusiones de la CAM, Madrid. ²Centro de Transfusiones de la CAM, Madrid.

Objetivos. Estudiar la evolución en primates de MHC-G y -C.

Material y métodos. Se obtuvieron líneas celulares de los primates a estudiar. Se extrajo ADN y se tipificaron los alelos MHC métodos estándar de secuenciación automática.

Resultados y conclusiones. Las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) -C, y -G son ligandos de receptores de inmunoglobulinas de las células NK (KIR). La evolución de MHC-G en primates presenta importantes anomalías: 1) en simios del Nuevo Mundo, las moléculas MHC-G muestran un elevado polimorfismo y lo más probable es que sean presentadores de antígenos clásicos, también se agrupan como si fuesen moléculas MHC-E en dendrograma de emparentamiento molecular. Además, sus genes carecen de la delección del intrón 2, la cual es típica de otros primates en lo que respecta a MHC-G; 2) los primates Euroasiáticos-Africanos de mediano tamaño, muestran un codon stop (de terminación) en el exón 3: únicamente son posibles las isoformas de MHC-G sin exón 3; 3) los grandes primates, orangután, gorila, y chimpancé, así como el hombre, muestran un limitado polimorfismo de MHC-G. Por otra parte no se han encontrado genes MHC-C en simios Euroasiáticos-Africanos de mediano tamaño, sin embargo nosotros encontramos secuencias de ADN de MHC-C en los simios del Nuevo Mundo, que son más antiguas en la escala evolutiva. Teniendo en cuenta que en el hombre las moléculas MHC-C (HLA) dominan la señal de los receptores inhibidores KIR, nuestros hallazgos sugieren que tanto las moléculas MHC-C y sus ligandos en los linfocitos "natural killer" KIR también existen en los primates más antiguos: los simios del Nuevo Mundo estaban presentes en la Tierra antes de hace 40 millones de años. Asimismo esto concuerda con que los receptores KIR se han encontrado en primates del Nuevo Mundo.

P-101

LOS PRIMEROS HABITANTES DE AMÉRICA (AMERINDIOS) TIENEN GENES HLA COMUNES CON ABORIGENES AUSTRALIANOS, POBLACIONES DE LAS ISLAS DEL PACÍFICO Y CON OTRAS POBLACIONES ASIÁTICAS. A. Arnaiz-Villena¹, P. Gomez-Prieto¹, D. Rey¹, C. Areces¹, L. Barbolla², P. Peñaranda³, C. Parga-Lozano⁴. ¹Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de transfusiones de la CAM., Madrid. ²Centro de transfusiones de la CAM. ³Centro de transfusiones de la CAM. ⁴Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Centro de transfusiones de la CAM, Madrid.

Objetivos. Estudiar el origen de los Amerindios mediante genes HLA.

Material y métodos. Se han utilizado los haplotipos HLA extendidos para trazar genealogías entre poblaciones y las matrices de distancias genéticas DA de las frecuencias alélicas de HLA para construir los dendrogramas. También ha sido calculada la variación de frecuencias alélicas de HLA mediante análisis de correspondencia. Se han empleado los programas Arlequin, GNKdist y Vista, una vez obtenidas las frecuencias alélicas de HLA por metodología estandarizada.

Resultados y conclusiones. El problema del origen de los Amerindios no ha sido todavía resuelto. Mientras que el ADN mitocondrial, el cromosoma Y, HLA y otros marcadores muestran que los primeros habitantes americanos na-dene y esquimales tienen muchas características genéticas comunes con orientales, en particular con siberianos, los Amerindios más antiguos muestran un perfil HLA completamente diferente a orientales y siberianos, y presentan alelos HLA "propios" que no han sido detectados en otras poblaciones del mundo. En este trabajo, no se ha comparado solamente las frecuencias de alelos HLA de la población amerindia con las frecuencias de alelos de otras poblaciones, sino que también se ha llevado a cabo una comparación genealógica de los alelos HLA amerindios relevantes, entre las poblaciones. Las relaciones genéticas HLA de Amerindios han sido comparadas con los otros primeros habitantes de América (na-dene y esquimales), asiáticos, australianos, poblaciones de las islas del Pacífico y otras poblaciones del mundo a través de los programas Arlequin, GNKdist y Vista. Nuestros resultados muestran que algunos alelos raros amerindios también se encuentran en poblaciones del este de Australia, de las islas del Pacífico, en siberianos y otras poblaciones de Asia. En particular, los resultados en Atabascos NaDene (que viven en el norte de Canadá, próximos a Beringia) muestran que: 1) el paso a través de Beringia no ha sido la única vía de entrada para el poblamiento de América, 2) no se puede descartar una migración inversa (de América hacia Asia) en diferentes épocas, 3) nuestros resultados no concuerdan con el modelo clásico de "tres oleadas" para el poblamiento de las Américas a través de Beringia. En resumen, son posibles otros modelos en el que la entrada fuera también a través de la costa pacífica de América del norte y del sur.

P-102

DIMORFISMO MOLECULAR MICA-129 VAL/MET (DÉBIL/FUERTE LIGADOR DEL RECEPTOR NKG2D) Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. R. López-Hernández, D. Lucas, J.A. Campillo, G. Salgado, F. Boix, A. Bosch, A. Minguela, M. Miras, R. Alvarez, F. Carballo, M. Muro. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Este trabajo fue subvencionado por el proyecto 05748/PI/07 de la Fundación Séneca de la Región de Murcia y CIBERehd (FIS). CIBERehd

es subvencionado por el Instituto de Salud Carlos III. Ministerio de Sanidad y Consumo.

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) son desórdenes crónicos multifactoriales que comprenden principalmente a Enfermedad de Crohn (EC) y Colitis Ulcerosa (CU). Estudios genómicos han mostrado una consistente evidencia de ligamiento a IBD3 (6p21.1-23), un área que comprende el complejo HLA. En este sentido, MICA esta localizado a 46 kb centromérico al locus HLA-B, es altamente polimórfico e interacciona con NKG2D, su receptor en la superficie de los linfocitos NK, T $\gamma\delta$ y T CD8. Una variación en la posición aminoacídica 129 del dominio $\alpha 2$ de la cadena pesada parece categorizar a los alelos MICA en fuertes o débiles ligadores del receptor NKG2D y, por tanto, influye en las funciones de las células efectoras.

Objetivos. El propósito de este trabajo fue estudiar el polimorfismo alélico del gen MICA y el dimorfismo funcionalmente relevante (129 val/met) del gen MICA en pacientes EII en nuestra población.

Materiales y métodos. El DNA fue obtenido de pacientes EII y controles sanos no relacionados (CG) y utilizados para el genotipaje de MICA por PCR-SSOP por tecnología luminex mediante amplificación y detección del polimorfismo de exones 2, 3 y 4 (OL, CA).

Resultados. En el grupo CG, MICA*008 fue el alelo más frecuente, seguido por MICA*002, MICA*004, MICA*001, MICA*009 y MICA*016, similarmente a otras poblaciones Caucásicas. No encontramos diferencias estadísticas en la distribución de alelos MICA entre los grupos EII y CG. Sin embargo, encontramos mas alta frecuencia del genotipo MICA-129met/met y más baja frecuencia de MICA-129 val/met en EII (principalmente en CU) que en CG (Pc= 0,02).

Puede ser hipotetizado que la presencia de MICA-129 met/met y MICA-129 val/met puede modificar la activación de células NK, T $\gamma\delta$ y T CD8 y permitir una exacerbada respuesta inmune en el microambiente intestinal con un fuerte componente inflamatorio. Podemos también especular que la producción de sMICA podría estar relacionada a MICA-129, con los genotipos MICA-129 met/met y MICA-129 val/met ejerciendo posiblemente su efecto en susceptibilidad a través de la disminución regulada de la expresión de sMICA.

Conclusión. Estos datos preliminares podrían sugerir un papel relevante del SNP MICA-129-val/met (débil/fuerte ligador del receptor NKG2D) en la patogénesis de la EII.

P-103

ALELOS DQB1*, HLA CLASE II, EN LA POBLACION DE CASTILLA Y LEON. V. Leon Moya¹, A. Leon Arroyo², J.L. Cacho Gutierrez¹. ¹Hospital Universitario de Salamanca, Galindo y Perahuy. ²Internacional Institute of Infection and Immunity. Division of Immunology. Shantou University. Guangdong. R P China.

Los estudios de alelos HLA en poblaciones localizadas tienen un gran interés a fin de disponer de datos basales de poblaciones concretas, aplicable a una gran diversidad de estudios, desde los simplemente poblacionales a servir de base comparativa en los estudios de ciertas enfermedades, sobre todo las que presentan un componente autoinmune.

Material y Métodos. Hemos estudiado la distribución de polimorfismos del gen DPQB1* en nuestra población (n= 128) de Castilla y León.

Muestras de sangre de 50 a 200 mcl, fueron depositadas en un papel Whatman 3MM secadas a almacenadas a temperatura ambiente hasta su utilización. El ADN fue extraído con el kit DNA Direct II de Dynal,

obteniendo de 1- 4 mcg de ADN. El locus DQB1* fué estudiado con el kit Dynal SSP allset DQB1*. Hemos cambiado las condiciones generales de la PCR a fin de adaptarla a nuestras cantidades de ADN, 2-4 ng y 0,1 U de Taq Polymerasa, por tubo (en vez de 100 ng de ADN y 0,4 U de Taq del protocolo original).

Las condiciones de la PCR fueron: 1) 94°C, 2 min., 1 ciclo. 2) 94°C 10 sec., 65°C 60 sec. 10 ciclos. 3) 94°C 10 sec., 61°C 50 sec., 72°C 30 sec. 30 ciclos. 4) 72°C 3 min. Los productos PCR fueron visualizados por electroforesis en agarosa al 2%.

Resultados. Las frecuencias de los alelos DQB1* halladas fueron: HLA DQB1*02, 29,7%; DQB1*03, 27,3; DQB1*04, 1,5; DQB1*05, 19,4; y DQB1*06, 21,8.

No se hallaron diferencias significativas con otros estudios efectuados en poblaciones españolas y portuguesas.

P-104

POSIBLE ASOCIACION ENTRE EL GEN CYP46 Y LA ENFERMEDAD DE ESCLEROSIS MULTIPLE. V. Leon Moya, J. Arcaya, D. Cembrero Fuciños, A. Hernández Villalon. Hospital Universitario de Salamanca.

La Enfermedad de Esclerosis Múltiple, EM, es un desorden complejo con multitud de factores genéticos implicados en su desarrollo y patología clínica. Cada vez existen más evidencias que implican al transporte transmembrana celular del colesterol en con la EM. El gen CYP 46 codifica la enzima 24 colesterol hidrolasa juega un papel importante en la salida al exterior celular del colesterol citoplasmático.

Recientemente se ha comenzado a asociar un polimorfismo del Intron 2 del gen CYP 46 corre el riesgo de adquirir la EM. En el presente estudio, examinamos la posible asociación del polimorfismo del gen CYP 46 EM.

Material y Métodos. El presente estudio se efectuó en 38 pacientes de EM, de acuerdo con los criterios de POSER, y 48 sujetos control.

El gen CYP 46 fue estudiado mediante una PCR empleando los primers For 5'-TGA AAA CGA GTT TCC CGT CC-3' y Rev 5'-GTG TGA CCA GGT AAC AGT CA-3', las condiciones de la PCR fueron: 95 durante 5 min, 1 ciclo; 95° 30 s, 53° 30 s, 72° 30s 34 ciclos, y finalmente 72° 10 min. El amplicon de 285 bp fué digerido con la enzima de restricción *MspI*, el alelo CYP C presenta dos fragmentos de 209 y 76 bp.

Resultados. La distribución del polimorfismo en EM es: 47,7% TT, 48,3% TC, 4,0 % CC, en el grupo control: 42,8 TT, 46,9 TC 10,2 CC Existen diferencia significativa ente el grupo control y los grupos de enfermos (Chi-cuadrado test $P < 0,001$).

P-105

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO SER326CYS DEL GEN HOGG1 EN ENFERMOS DE ALZHEIMER. V. Leon Moya¹, M.D. Sevillano¹, E. Polo-Hernández². ¹Hospital Universitario de Salamanca. ²Instituto Neurociencias Castilla y Leon Universidad de Salamanca.

La acumulación de daños en el ADN de las células cerebrales a lo largo del tiempo, parece jugar un importante papel en la patogénesis del de Enfermedad de Alzheimer, EA. El tipo de daño al ADN que más influye en la degeneración neuronal es el daño oxidativo, estas alteraciones se van acumulando con el tiempo en el ADN neuronal siendo reparado mediante la escisión de bases oxidadas. Se ha sugerido

que el cerebro en EA el incremento de bases oxidadas puede deberse a un doble mecanismo, bien al incremento del stress oxidativo ó a deficiencias en la reparación de los mecanismos responsables de la eliminación de las bases oxidadas. Hay evidencias que apuntan a que el polimorfismo Ser326Cys del gen de la 8 oxoguanina DNA glicosidasa 1, h OGG1, esta asociado con la reparación del ADN reducido, en el presente estudio pretendemos ver la posible asociación de este polimorfismo con la EA.

Material y métodos. 36 pacientes diagnosticados de Probable EA según criterios NINCDS-ADRDA y 66 controles fueron el objeto de nuestro estudio. El ADN fue extraído mediante el kit DNA direct II (Dynal) fundamentado en una resina con núcleo metálico que permite separar el complejo ADN-resina mediante un imán. El gen hOGG1 fue estudiado mediante PCR utilizando los primers: For 5'-CCC AAC CCC AgT ggA TTC TCA TTG C -3' y Reverse 5'-TTg gAA CCC TTT CTg CgC TT-3'. Las condiciones de la PCR fueron: 95° durante 5 min, 1 ciclo; 95° 30 s, 53° 30 s, 72° 30s 34 ciclos, y finalmente 72° 10 min. El amplicon de 234 bp fué digerido con el enzima de restricción *Fnu4HI*, el alelo salvaje Ser326 presenta dos fragmentos de 213 y 21 bp, y el alelo mutante Cys326 tres fragmentos 164, 49 y 21 bp. Los fragmentos son puestos de manifiesto mediante electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo bromuro de etidio.

Resultados. La distribución del polimorfismo en EA es: 62,3% SS, 33% SC 4,7 % CC, en el grupo control: 66,4 SS, 30,4 SC 3,2 CC. No Existen diferencias significativas entre el grupo control y los grupo EA (Chi-cuadrado test $P < 0,05$).

P-106

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL PRION P M129V EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE. V. Leon Moya, S. Gomez-Castro, M.L. Rivera Reigada, J. Barón Sánchez. Hospital Universitario de Salamanca.

La Artritis Reumatoide, AR, es un desorden inmuno degenerativo que ha sido asociado con la presencia de depósitos de proteínas anormales, en los cuales pueden influir de la Proteína PrP^C (Prion^C) en sus formas insolubles PrP^{Sc}. Los Priones están localizados en la membrana citoplasmática. Presentan radicales a los que se ligan moléculas de Cobre, y juegan un papel esencial en el transporte transmembrana del cobre y en el mecanismo antioxidante celular. los heterocigotos del PrNP al polimorfismo Met 129 Val presentan un efecto protector ó al menos un mayor periodo de incubación de ciertas enfermedades con componente autoinmune. El propósito del presente estudio es relacionar la presencia de este polimorfismo en enfermos de AR.

Material y Métodos. Nuestro estudio se efectuó sobre 56 pacientes de AR, de y 86 sujetos control. Un fragmento de 775 bp del gen PrNP fué amplificado empleando los primers (for: 5'-GTG GCC ACA TGG AGT GAC CTG GGC CTC -3'; rev: 5'-GTG AAA CAG GAA GAC C -3'). La PCR fue efectuada utilizando 10 ng de ADN genómico en 20 mcl de mezcla de reacción. Las condiciones de la PCR fueron: 95° durante 5 min, 1 ciclo; 95° 30 seg, 30° 30 seg, 72° 60 seg 34 ciclos, y 72° 10 min. El producto de la PCR fué digerido con el enzima de restricción *NspI* y revelado en geles de agarosa al 2%.

Resultados. La distribución alélicas en el grupo control fue: 42% M/M, 45% M/V, 13% V/V. En pacientes de AR: 44% M/M, 44% M/V, 12% V/V. No hemos encontrado diferencias entre el grupo control y enfermos de EM (El test Chi-cuadrado, $p < 0,05$).

P-107

ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN CD24 Y SU ASOCIACIÓN CON LA DISFUNCIÓN NEUROLÓGICA EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. M.D.C. Chima Galán¹, C.S. Rodríguez Mandujano¹, J.J.M. Zaragoza Saavedra², L. García Ortiz¹, J.C. Pérez Razo¹, J. Gutiérrez Salinas¹, V. Dircio Delgado¹, N. Plascencia Álvarez¹, L. Núñez Orozco¹, D. Soto Candia¹, M.E. Vargas Camaño¹.

¹Centro Médico Nacional 20 de Noviembre - ISSSTE, Ciudad de México, México. ²Instituto Nacional de Cancerología, México.

Objetivos. Determinar si los polimorfismos CD24^v y P1527del se asocian con la presencia de esclerosis múltiple en un grupo de pacientes mexicanos, en comparación con población sana. Evaluar si los polimorfismos del gen CD24 se encuentran relacionados con el grado de disfunción neurológica en el grupo de pacientes.

Introducción. La esclerosis múltiple (EM) es un padecimiento desmielinizante del sistema nervioso central (SNC), de etiología multifactorial. Es la segunda causa de discapacidad en adultos jóvenes, en México tiene una prevalencia de 13 por 100,000 habitantes y es más frecuente en mujeres con una relación 2:1¹. La EM resulta de una respuesta autoinmune a antígenos propios, donde las células T específicas de la mielina son activadas y migran al SNC, los mediadores inmunes inician una respuesta inflamatoria que destruye la mielina causando degeneración axonal². Se ha demostrado la asociación de genes que participan en la respuesta inmune, con la presencia de EM. La proteína de superficie CD24 promueve la activación y migración de las células T al SNC³. En población estadounidense, española e iraní, el polimorfismo CD24^v se ha asociado con una progresión más rápida^{4,5,6}. Mientras que P1527del se ha considerado como un marcador de protección para el desarrollo de enfermedades autoinmunes como la EM⁷.

Material y métodos. Se llevó a cabo un estudio de casos y controles, de tipo observacional, transversal, prospectivo, comparativo y abierto. Se estudiaron 102 pacientes atendidos en la Clínica de esclerosis múltiple del Centro Médico Nacional "20 de Noviembre" - ISSSTE, de 18 a 65 años de edad, diagnosticados con EM de acuerdo a los criterios de McDonald⁸, variedad remitente-recurrente; en quienes se determinó el grado de disfunción neurológica, de acuerdo con los parámetros de Expanded Disability Status Scale (EDSS)⁹. El grupo control estuvo constituido por 259 personas sanas, pareadas por sexo y sin antecedentes de enfermedades autoinmunes ni neurológicas. Previo consentimiento informado se tomó una muestra de sangre periférica a cada uno de los participantes para extraer DNA, por medio de un método de precipitación salina diferencial¹⁰. Para identificar los polimorfismos CD24^v (T226C, de la región codificante del exón 2) y P1527del (1527delTG, en la región no traducida 3' del gen) se realizó la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), análisis de fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP's) y secuenciación confirmatoria. Se utilizó la prueba de ji cuadrada y Odds Ratio para identificar diferencias estadísticamente significativas de las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos entre los grupos de estudio, una ANOVA y la prueba de diferencia mínima significativa (DMS), para determinar la correlación de los alelos y genotipos con la disfunción neurológica.

Resultados. Existe diferencia estadísticamente significativa de la distribución del polimorfismo CD24^v entre casos y controles ($X^2=13.33$, $gl=2$, $\alpha=0.5$, $P=0.01$). No así en la distribución alélica ni genotípica de P1527del entre los grupos estudiados ($X^2=0.16$, $gl=2$, $\alpha=0.05$ y $X^2=0.14$, $gl=1$, $\alpha=0.05$). Con respecto a la relación de los polimorfismos de CD24 con la disfunción neurológica (EDSS>6) se obtuvo DMS=8.28 ($p=0.058$).

Conclusión. Se demostró asociación de los polimorfismos CD24^v y P1527del con la disfunción neurológica de los pacientes con esclerosis múltiple estudiados. Así como, una asociación de los genotipos y alelos de CD24^v

con la EM, tal como se ha reportado en otras poblaciones estudiadas, lo que apoya que este polimorfismo participa en la susceptibilidad a EM.

Bibliografía

1. Porras B, et al. Esclerosis Múltiple. Rev Mex Neuroci 2007;8 (1): 58-66.
2. Farreras Rozman. Enfermedades desmielinizantes en Medicina Interna. Edit. Hartcourt, 14^a. ed. 2002. Cap. 12.
3. Hahne M, et al. The heat stable antigen can alter very late antigen can alter very late antigen 4 mediated adhesion. J Exp Med 1994. 179, 1391-95.
4. Zhou Q, et al. CD24 is a genetic modifier for risk and progresión of multiple sclerosis. PNAS 2003;25 (100): 15041-46.
5. Otaegui D, et al. CD24 V/V is an allele associated with the risk of developing multiple sclerosis in the Spanish population. Mult Scler 2006;12(4): 511-4.
6. Ronaghi Mohammad, et al. CD24 gene polymorphism is associated with the disease progresión and susceptibility to multiple sclerosis in the Iranian population. Psychiatry Research 2009;170:271-272.
7. Wang L, et al. A dinucleotide deletion in CD24 confers protection against autoimmune diseases. PLOS GENETICS 2007;4(3):508-17.
8. McDonald WI. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis. Guidelines from the international panel on the diagnosis on multiple sclerosis. Ann Neurol 2001;50:121-7.
9. Kurtzke JF. Rating neurological impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). Neurology 1983;33:1444-1452.
10. Sambrook J, et al. Molecular Cloning a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA, 1989.

P-108

DETECCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO ALELO HLA-B, B*07:77. D. Planelles¹, A. Balas², G.F. Sanz³, P. Solves¹, F. García-Sánchez², N. Puig¹, R.J. Roig¹, J.L. Vicario². ¹Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Valencia. ²Centro de Transfusión de Madrid, Madrid. ³Hospital Universitario La Fe, Valencia.

En este estudio se describe cómo una combinación de técnicas moleculares llevaron a la identificación de un nuevo alelo HLA-B*07 durante el genotipaje de rutina para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El nuevo alelo identificado se compara con otros relacionados de secuencia conocida.

El estudio HLA de un paciente rumano con indicación de búsqueda de donante para TPH se realizó inicialmente por resolución intermedia mediante PCR-rSSO (LABType® SSO-Luminex®) dando como resultado HLA-A*01:DEKY, 26:EBHE; B*07:07, 44:AXJM; C*04:DG VY, 07:DG VZ. El subtipaje alélico posterior mediante PCR-SSP (Olerup SSP) fue A*01:01, 26:01; B*07:07, 44:03; y C*04:01, pero la definición del grupo C*07 mostró resultados inconcluyentes caracterizados por la presencia de amplificaciones extra (C*07:02+B*40:60; C*07:38+B*40:60; C*07:15+B*40:60). El tipaje por PCR-rSSO con reactivos LifeMatch® resultó B*07:ZYC, 44:ARJA; C*04:CZAB, 07:CZAC. Para determinar de forma exacta el tipaje HLA-B y -C, se realizó secuenciación por amplificación genómica completa y secuenciación subsiguiente de los exones 2, 3 y 4 con oligonucleótidos de intrón.

El tipaje HLA-C y -B por secuenciación dio como resultado C*04:01:01:01, 07:02:01:03; B*44:03:01 y un nuevo subtipo HLA-B*07, oficialmente reconocido como B*07:77, que presentaba una sustitución 99Y>99S respecto a su alelo más próximo B*07:07. El análisis de segregación familiar definió el haplotipo que lo incluye como A*01:01, B*07:77, C*07:02:01, DRB1*15:01:01, DQB1*06:02:01. B*07:07 muestra también asociación haplotípica con A*01 y C*07. La alineación del dominio α -2 HLA-B denota la presencia de un residuo 99S en unas pocas moléculas HLA-B, principalmente en alelos B*37 y otros muy poco frecuentes como B*40:60, B*53:07, B*39:09 y B*18:18. El aminoácido en posición 99 está localizado en la cadena β S1, contribuyendo a sus propiedades de unión, especificidad de la molécula HLA y probablemente de relevancia en el

TPH. La presencia del residuo 99S en el alelo B*40:60 podría explicar las reacciones extra de amplificación específicas de B*40:60 observadas en el subtipaje HLA-C*07 mediante *Olerup*-SSP.

En conclusión, aunque la técnica PCR-SSP sugirió la presencia de un nuevo alelo HLA de clase I, el hecho de que ni ésta ni la PCR-rSSO lo detectaran confirma que el tipaje basado en la secuenciación es el más resolutivo para el estudio de histocompatibilidad en TPH.

P-109

POLIMORFISMO EN LA 3'UTR -1188 A/C DEL GEN DE LA INTERLEUKINA-12P40 (IL-12B) SE ASOCIA CON COLITIS ULCEROSA Y ENFERMEDAD DE CROHN. F. Boix Giner, R. López-Hernández, H. Salama, G. Salgado, J.A. Campillo, D. Lucas, A. Minguella, M. Miras, M.R. Álvarez-López, F. Carballo, M. Muro. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Interleukin (IL)-12p40, a subunit of IL-12p70 and IL-23, has previously been shown to inhibit IL-12p70 activity and IFN-gamma production. IL-12p40 is induced in excess over the other subunits of IL-12 and IL-23 and can exist in a monomeric or homodimeric form. Its most widely appreciated function is to provide a negative feedback loop by competitively binding to the IL-12 receptor. However, IL-12p40 acts as a chemoattractant for macrophages and promotes the migration of bacterially stimulated dendritic cells. IL-12 plays a key role in promoting Th1 responses and is associated with several pathogenic inflammatory responses. Several SNPs have been identified in the IL-12 gene such as 3'UTR 1188 A/C polymorphism (rs3212227), which is associated with different diseases. The variant C allele of the 1188A/C polymorphism has been associated with enhanced IL-12 production. However, the relationship of this polymorphism with the immune response in inflammatory bowel disease (IBD) patients has not been explored. In this case-control study, we evaluated patients with IBD and healthy subjects. We aimed to determine the relationship between 3'UTR -1188 A/C polymorphism of IL-12 p40 and the differential IBD pathologies, Crohn's disease (CD) and ulcerative colitis (UC). Genotype frequencies were 50,9% A/A, 43,8% A/C, and 5,2% C/C in CD patients, and 81,5% A/A, 14,8% A/C, and 3,7% C/C in UC ($p = 0,017$; OR = 4,49). Allele frequencies were 72,8% -1188A and 27,2% -1188C in CD patients, and 88,9% A and 11,1% C in UC ($p = 0,03$. OR = 4,62). Thus, the -1188A allele was increased in UC patients and the -1188C allele (high IL-12p40 production) was increased in CD patients. These data are in concordance with the fact of that CD has been shown to be associated with a Th1 T-cell mediated inflammation and high IL-12/IFN-gamma production at histologically affected sites. These data suggest that the IL-12 p40 3'UTR -1188 A/C polymorphism seems to be associated with a differential IBD development.

P-110

ANÁLISIS Y MODELADO DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA DEL INMUNOPROTEASOMA Y DEL PROTEASOMA CONSTITUTIVO. C.M. Díez Rivero, E.M. Lafuente, P.A. Reche. Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Objetivos. El proteasoma tiene un papel fundamental en el procesamiento de antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHCI). Es el responsable de la degradación proteolítica de las proteínas citoplasmáticas, generando el extremo C-terminal de los epítomos de células T CD8 y en general de los péptidos res-

tringidos por las moléculas MHCI (residuo P1 del sitio de corte). Existen dos tipos distintos de proteasomas, la forma constitutiva, expresada en la mayoría de los tipos celulares, y el inmunoproteasoma, que se expresa de manera constitutiva en las células dendríticas. Los epítomos de células T CD8 protectivos son aquellos generados tanto por el inmunoproteasoma como por el proteasoma constitutivo, y por ello, aquí hemos modelado y analizado la actividad catalítica de estas dos proteasas. Además, hemos combinado las predicciones de unión de péptidos a moléculas MHCI y las de corte por el proteasoma y/o inmunoproteasoma intentando mejorar los resultados de predicción de epítomos de células T CD8.

Material y métodos. La actividad proteolítica del inmunoproteasoma y del proteasoma se modelaron a partir de dos conjuntos de datos distintos no solapantes, uno formado por 553 epítomos de células T CD8 -procesados naturalmente y restringidos por moléculas MHCI humanas-, y otro compuesto por 382 péptidos eluidos de moléculas MHCI humanas, respectivamente, usando *N-grams*. Los modelos de corte se generaron considerando fragmentos de los epítomos y de los péptidos eluidos de moléculas MHCI de distinto tamaño con el mismo número de residuos a cada lado del C-terminal, y se evaluaron usando una validación cruzada de orden 5.

Resultados. A juzgar por el índice de correlación de Matthews (MCC), los modelos óptimos para el proteasoma ($MCC = 0,43 \pm 0,07$) y el inmunoproteasoma ($MCC = 0,36 \pm 0,06$) se obtienen a partir de fragmentos de 12 residuos. Cuando estos modelos se evalúan usando un test independiente los modelos de corte del inmunoproteasoma y del proteasoma alcanzan valores de 0,30 y 0,18, respectivamente, que son comparativamente mejores que los valores alcanzados por otros métodos relacionados. Mediante un análisis ROC, hemos demostrado que la combinación de las predicciones de unión de péptidos a moléculas MHCI junto con las predicciones de corte por el inmunoproteasoma y/o el proteasoma incrementan de manera significativa la tasa de descubrimiento de epítomos de células T CD8 restringidos por distintas moléculas MHCI, como A*0201, A*0301, A*2403, B*0702, B*2705.

Conclusiones. Hemos desarrollado dos modelos diferentes para predecir los sitios de corte por el proteasoma y el inmunoproteasoma, que sin duda serán instrumentales para identificar epítomos de células T CD8 protectivos. La predicción de sitios de corte por el inmunoproteasoma y el proteasoma usando nuestros modelos está disponible para uso público en <http://imed.med.ucm.es/Tools/PCPS/>.

P-111

IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DEL GEN HAVCR1 ASOCIADOS CON LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNM Y SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDADES AUTOINMUNES. A.M. Escalera Cardenas, J.R. García Lozano, C. Abad Molina, B. Torres, O. Fernández, A. García, J. Sánchez, A. Nuñez Roldan, J. Martín, M.F. González Escribano. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción. El gen *HAVCR1* se encuentra localizado en 5q33.2, una región asociada a alergia y enfermedades autoinmunes.

Objetivos. 1) Definir haplotipos en el gen *HAVCR1* teniendo en cuenta tanto los haplotipos de SNPs disponibles en el Proyecto HapMap como las variantes estructurales descritas en el exón 4. 2) Investigar la posible relación entre estos haplotipos y los niveles de expresión de ARNm. 3) Valorar la posible asociación entre el gen *HAVCR1* y la susceptibilidad a artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES).

Material y métodos. Las 3 variantes ins/del del exón 4 del gen *HAVCR1* fueron genotipadas mediante análisis de longitud de frag-

mentos. Los genotipos de 5 "tagSNPs" en este locus y los niveles de ARNm fueron determinados usando ensayos TaqMan. Las variables cualitativas se compararon mediante χ^2 y las cuantitativas mediante Kruskal-Wallis seguida del test de Dunn para comparaciones múltiples.

Resultados. Definimos 4 haplotipos mayoritarios en nuestra población, los dos más frecuentes (haplotipos A y B) llevan las mismas variantes estructurales en el exón 4 y cada uno de ellos presenta una de las dos combinaciones de tagSNPs más comunes en población CEU. El análisis de cuantificación reveló que el genotipo B/B presentaba la mayor mediana de nivel de expresión de ARNm (1.870, 0,430-6.110, vs. BX+XX $p < 0,0001$). Además, la frecuencia del genotipo BB fue significativamente más alta en pacientes con AR que en controles (12,3% vs. 5,9% en controles, $p = 0,046$, $pc = 0,014$, $OR = 2,23$ 95% CI 1,23-4,10).

Conclusiones. Nuestros resultados sostienen una relación entre los haplotipos de *HAVCR1* y los niveles de expresión de ARNm y sugieren asociación de este gen con enfermedades autoinmunes.

P-112

MARCADORES DE RIESGO PARA ENFERMEDADES AUTOINMUNES EN LA RUTA CD40/NF-KB Y NIVELES DE EXPRESIÓN DE ARNM DE TNFAIP3, TRAF1, C5 Y CD40. A.M. Escalera Cardenas, J.R. García Lozano, C. Abad Molina, J.M. Lucena, A. Nuñez Roldan, M.F. González Escribano. Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción. La ruta de señalización CD40/NF- κ B ha sido involucrada en la patogénesis de enfermedades autoinmunes. Entre los loci relevantes de esta ruta se encuentran: *TNFAIP3*, *TRAF1*-C5 y *CD40*.

Objetivos. Valorar el posible efecto regulador de 4 alelos de susceptibilidad para artritis reumatoide (RA) y/o lupus eritematoso sistémico (LES) sobre los niveles de expresión de ARNm de genes implicados en la ruta de señalización de CD40/NF- κ B.

Material y métodos. Para este estudio de expresión, se seleccionaron 120 de un total de 384 muestras de donantes de sangre genotipadas para 4 SNPs confirmados como de riesgo para AR y/o LES. Estos SNPs marcan las regiones donde se encuentran: *TNFAIP3* (rs6920220 y rs5029939), *TRAF1* y *C5* (rs3761847) y *CD40* (rs4810485). El genotipado se realizó utilizando sondas TaqMan. Las 120 muestras se seleccionaron de manera que los genotipos de los 4 SNPs estuvieran homogénea y suficientemente representados. Para el estudio de expresión la cuantificación relativa de ARNm se realizó con ensayos TaqMan diseñados específicamente para los transcritos de *TNFAIP3*, *TRAF1*-C5 y *CD40*. Se compararon los niveles de expresión de cada transcrito para los diferentes genotipos de los SNPs descritos como de riesgo en cada región utilizando el test de Kruskal-Wallis.

Resultados. No se observaron diferencias estadísticamente significativas para los diferentes SNPs de riesgo en la expresión de los diferentes transcritos estudiados.

Conclusiones. Los alelos de susceptibilidad estudiados no afectan a la expresión de los genes *TNFAIP3*, *TRAF1*, *C5* y *CD40*.

P-113

DETECCION Y CARACTERIZACION DE DOCE NUEVOS ALELOS HLA. A. Balas Pérez, F. García Sánchez, J.L. Vicario Moreno. Centro de Transfusión de Madrid, Madrid.

Doce nuevos alelos HLA fueron detectados y posteriormente caracterizados mediante secuenciación: A*32:19N, B*39:50, B*49:07, Cw*02:23,

Cw*04:42, Cw*05:25, Cw*07:04:03, Cw*07:57, Cw*08:25, Cw*17:05, DRB1*16:15 y DQA1*05:10.

La detección de nuevas variantes alélicas se realizó en el tipaje de intermedia resolución mediante PCR-SSO y tecnología Luminex, debido a patrones anómalos de hibridación así como en el tipaje mediante secuenciación de los exones 2/3/4 para genes de clase I y exones 2/3 para clase II. La detección del alelo A*32:19N fue motivada por discrepancias entre el tipaje serológico y molecular.

Todos los nuevos alelos HLA de clase I presentaron cambios en los exones 2 o 3, produciendo cambios aminoacídicos con la excepción de Cw*07:04:03. La secuenciación completa, exon 1 a exon 8, no supuso cambios adicionales. En la tabla se detallan los cambios encontrados respecto al alelo más homólogo en cada caso, así como los haplotipos deducidos que incluyen a cada una de las nuevas variantes HLA.

Nuevo Alelo	A. homólogo	Codon/S.nucleot./S. Amino	Haplotipo
A*31:19N	A*32:01:01	167 TGG>TGA W>Stop	A*32:19N-B*14:01-Cw*08:02
B*39:50	B*39:06:02	163 ACG>GAG T>E	B*39:50-Cw*07:02:01:01
B*49:07	B*49:01:01	163 CTG>GAG L>E	A*23-B*49:07-Cw*07:01
Cw*02:23	Cw*02:02:02	113 TAT>CAT Y>H	B*27:05:02-Cw*02:23
		116 TCC>TAC S>Y	
		177 GAG>GAC E>D	
		178 ACG>AAG T>K	
		180 CAG>GAG Q>E	
Cw*04:42	Cw*04:16	9 TAC>GAC Y>D	A*24:02-Cw*04:42-B*35:02
		11 GCT>GCC	
		21 CAC>CGC H>R	
Cw*05:25	Cw*05:01	90 GCC>GAC A>D	B*18:01:01-Cw*05:25
Cw*07:04:03	Cw*07:04:01	99 TAT>TAC Y>Y	A*68:01:02-Cw*07:04:03-B*15:18
Cw*07:57	Cw*07:01:05	182 GCG>ACG A>T	B*41:01-Cw*07:57
Cw*08:25	Cw*08:05	35 CAG>CGG Q>R	B*35:03:01-Cw*08:25
Cw*17:05	Cw*17:01	35 CGG>CAG R>Q	B*41-Cw*17:05
DRB1*16:15	DRB1*16:01:01	86 GGT>TGG G>V	DRB1*16:15-DQB1*05:02:01
DQA1*05:10	DQA1*05:05	76 ATT>GTT I>V	DRB1*11-DQA1*05:10-
DQB1*03			

P-114

ESTUDIO DEL HLA Y LA INSULINA, GENES CLÁSICOS DE SUSCEPTIBILIDAD A DIABETES TIPO 1, EN UNA POBLACIÓN CON DEBUT PEDIÁTRICO Y ADULTO DE LA ENFERMEDAD. L. Espino Paisán¹, M.Á. Figueredo¹, H. De La Calle², J.L. Santiago¹. ¹Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Hospital General Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos. La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la destrucción de las células beta del páncreas. Los dos primeros factores genéticos asociados a la enfermedad fueron el HLA de clase II y un VNTR cercano al gen de la insulina que influye en los niveles de expresión del gen.

La edad de debut de la DT1 tiene una distribución bimodal, con un pico alrededor de los 10-12 años y otro pico en la treintena, pero tradicionalmente se ha puesto poco énfasis en las posibles diferencias genéticas entre el debut temprano y tardío de la enfermedad.

El objetivo de este estudio es comprobar si existen diferencias en la susceptibilidad a DT1 conferida por dos loci clásicos, el HLA y la insulina, en función de la edad de debut.

Métodos. Se han estudiado 417 enfermos de DT1 del área de Madrid, diagnosticados según los criterios de la *American Diabetes Association* (ADA) y 737 controles sanos provenientes de donantes de sangre (edad 18-60 años). Se dispone de la edad de debut para 410 pacientes de DT1 (1 a 65 años, media=18,43 \pm 11,04, mediana=16 años).

El tipaje de HLA se realizó mediante inmunoblot y tecnología Luminex. El SNP rs689, en desequilibrio de ligamiento con el VNTR originalmente descrito en el gen de la insulina, se genotipó mediante tecnología TaqMan. El análisis estadístico se realizó mediante el test de Chi-cuadrado y test de Mann-Whitney para el análisis de la edad como variable continua.

Resultados. En el estudio del HLA, la presencia de DR3 y/o DR4, DR3 homocigoto, DR4 homocigoto, DQ8 o el haplotipo de protección DR2 no mostraron diferencias significativas en función de la edad de debut.

Replicamos el efecto protector del alelo minoritario del polimorfismo rs689 de la insulina (OR= 0,54 [0,43-0,67]; $p=8,3 \times 10^{-9}$). El análisis por edad no muestra diferencias significativas ($p=0,43$).

Conclusiones. Los alelos de susceptibilidad y protección presentes en el HLA y en la insulina están asociados a la DT1 en la población estudiada independientemente de la edad de debut.

P-115

EL FENOTIPO HLA INFLUYE EN EL RIESGO Y PRESENTACION DE DAÑO HEPATICO INDUCIDO POR AMOXICILLIN-CLAVULAMICO. F. Ruiz-Cabello Osuna¹, C. Stephens², M. Crespo³, A. Moreno⁴, R. Andrade⁴, E. Ulzurrun², M. Romero-Gomez², Y. Borraz², M. Lucena⁵, M. López-Nevo¹. ¹Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ²Hospital Universitario Virgen De La Victoria. ³Universidad de Granada. ⁴Centro de Investigación Biomédica en Red: Ciberehd. ⁵Facultad de Medicina, Universidad De Málaga; CIBERehd.

La mayoría de las reacciones adversas hepáticas atribuibles a medicamentos son hepatitis de naturaleza idiosincrásica. Aunque el mecanismo patogénico de esta forma de reacción adversa es escasamente comprendido. El daño hepático (DILI) por Amoxicillin-clavulanate (AC-DILI) tiene principalmente una manifestación colestatica/mixta (Chol/Mix) en población Norte-Europea. Sin embargo hasta un 30% de población española presentan daño hepatocelular (HC). El AC-DILI, puede por tanto tener una base genética.

Objetivos. Investigar la posible asociación entre los alelos HLA y la susceptibilidad a desarrollar AC-DILI y a su asociación al fenotipo clínico.

Material y métodos. Se ha realizado genotipado de alta resolución de los locus de HLA clase I (A, B y C) y clase II (DRB1, DQB1) mediante PCR y SBT en 57 pacientes españoles diagnosticados de AC-DILI y 400 controles Caucásicos sanos.

Resultados. El alelo HLA B*1801 fue encontrado significativamente incrementado en pacientes con DILI y daño de tipo HC (10/17, 59%; $P=0,00005$) si se comparan con el grupo control. B*1801 apareció también en pacientes más jóvenes (55 vs 66 years), que requirieron hospitalización (76% vs 46%) y en general de peor pronóstico de DILI (1 fallecido, 2 transplantados vs 0). En contraste pacientes portadores de los alelos HLA de clase II DRB1*1501-DQB1*0602, predominó el daño Chol/Mix (12/13, 92%; $P=0,009$). El alelo HLA-A*0101 y el haplotipo DRB1*0701-DQB1*0202 pareció estar menos frecuentemente representado en los pacientes con AC-DILI (23,5% vs 7%; $P=0,006$ y 30% vs 15%; $P=0,03$, respectivamente).

Conclusiones. En conclusión, el alelo HLA B*1801 parece predisponer a AC-DILI de tipo HC con peor pronóstico, mientras que el haplotipo DRB1*1501-DQB1*0602 parece jugar un papel en el daño Chol/Mix. Diferencias étnicas entre las distintas poblaciones en el alelo B*1801 podría explicar las variaciones del daño hepatocelular en AC-DILI.

P116

INTERACCIÓN ENTRE IL23R Y TLR9 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE CROHN. L.M. Medrano De Dios, B. Demajiménez, J.L. Mendoza, M.C. Núñez Pardo De Vera. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Objetivos. La enfermedad de Crohn es una enfermedad inflamatoria intestinal de etiología desconocida. Se conoce la implicación de IL23R en la enfermedad, y se ha postulado una interacción entre polimorfismos de este gen y de TLR9. Dado el papel de ambos en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, nuestro estudio se centró en la búsqueda de interacciones entre polimorfismos de ambos genes.

Material y métodos. Se llevó a cabo un estudio caso-control, incluyendo 416 individuos con enfermedad de Crohn y 495 individuos sanos empleados como control. Todas las muestras correspondían a individuos blancos de origen español y fueron recogidas en la comunidad de Madrid (Hospital Clínico San Carlos). Se estudiaron 6 polimorfismos de un único nucleótido (SNPs): rs10004819, rs7517847 y rs11209026, pertenecientes al gen IL23R; y rs352162, rs187084 y rs5743836, pertenecientes al gen TLR9. El genotipado se llevó a cabo mediante tecnología TaqMan.

La comparación de las frecuencias génicas en el caso-control se realizó mediante el test chi-cuadrado o test exacto de Fisher. Las interacciones se evaluaron en primer lugar en el grupo de enfermos, mediante tablas estratificadas considerando los distintos polimorfismos estudiados en IL23R respecto a los analizados en TLR9. La detección de una interacción en este grupo, conllevó su posterior análisis en el grupo de controles y la comparación caso-control.

Resultados. El estudio caso-control para el gen TLR9 no mostró ningún resultado significativo, aunque la frecuencia del alelo minoritario del polimorfismo rs352164 se encontraba ligeramente aumentada en enfermos ($p=0,09$).

Al estudiar la interacción génica previamente descrita, se observó una interacción entre los polimorfismos IL23R_rs10004819 y TLR9_rs5717847. Sin embargo, el efecto no era similar al publicado. La interacción estaba presente en el grupo de enfermos ($p=0,0098$) y no en los controles ($p=0,77$), pero el estudio caso-control no llegaba a ser significativo ($p=0,08$; OR= 1,48 I.C. 95%= 0,93-2,36 para la presencia del alelo TLR9_rs5743836_C en individuos IL23R_rs10004819_CC). Adicionalmente, se obtuvo un resultado significativo al analizar los SNPs IL23R_rs7517847 y TLR9_rs352162, observándose un efecto protector en individuos portadores del alelo minoritario en este polimorfismo de IL23R sólo si además presentaban el genotipo CC en TLR9_rs352162 ($p=0,0003$, OR= 0,43 I.C. 95% = 0,26-0,70).

Conclusiones. El efecto protector del alelo minoritario del polimorfismo IL23R_rs7517847 parece afectar sólo al subgrupo de pacientes caracterizados por poseer el genotipo CC en TLR9_rs352162.

P-117

ANÁLISIS DE CARACTERÍSTICAS INMUNOGÉNICAS EN EPÍTOPOS DE LINFOCITOS T. D. De Pereda, C.M. Díez Rivero, P.A. Reche Gallardo. Facultad de Medicina - Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

Objetivos. La respuesta inmune de las células T está mediada por el reconocimiento a través de su receptor (TCR) de los antígenos presentados por moléculas del complejo principal de histocompatibilidad de clase I (MHCI). Aquí, hemos estudiado si existen características intrínsecas en los péptidos inmunogénicos que les hagan más fácilmente reconocibles por el TCR.

Material y Métodos. El análisis de los péptidos inmunogénicos se ha realizado a partir de dos conjuntos distintos no solapantes de péptidos de 9 aminoácidos con alta afinidad de unión a moléculas MHC I obtenidos de las bases de datos EPIMHC, NHCBN y MHCPEP. Uno de los conjuntos está compuesto por 101 péptidos inmunogénicos (HH), mientras que el otro está formado por 470 péptidos no-inmunogénicos (HN).

Hemos analizado la frecuencia de cada aminoácido en cada posición del péptido para cada conjunto. Para ello, hemos utilizado los 101 péptidos HH y 101 péptidos del conjunto HN –elegidos aleatoriamente–, para analizar la misma cantidad de péptidos de cada conjunto.

También hemos analizado las propiedades físico-químicas de los aminoácidos que conforman los péptidos de ambos conjuntos. El estudio ha sido realizado con 101 péptidos HH y 101 HN. El análisis se ha repetido 100 veces utilizando 100 conjuntos de 101 péptidos HN diferentes seleccionados al azar.

Por último, el modelado de la diferencia entre estos dos conjuntos de péptidos se ha abordado como un problema de clasificación, utilizando algoritmos de inteligencia artificial en el entorno WEKA y empleando diversas codificaciones de secuencias distintas, así como combinación de las mismas: binaria, Blosum, propiedades de secuencia, composición de aminoácidos, composición de dipéptidos y propiedades globales. Estos análisis se han realizado tanto considerando los 9 residuos del péptido, como únicamente aquellos residuos relevantes por su interacción con el TCR (P1, P4, P7 y P8). Los resultados de las clasificaciones han sido evaluados en experimentos de validación cruzada determinando la sensibilidad (SE), la especificidad (SP), la exactitud (ACC) y el coeficiente de correlación de Matthews (MCC).

Resultados. Hemos obtenido diferencias en las frecuencias de aminoácidos para cada posición de los péptidos de ambos conjuntos. De igual manera, las propiedades físico-químicas de los aminoácidos de cada posición difieren entre un conjunto y otro. En ambos casos estas diferencias denotan cierta tendencia, pero no podemos extraer ninguna norma clara de ellas.

Los modelos óptimos de clasificación se obtienen al utilizar algoritmos SMO (“Sequential Minimal Optimization”) con una codificación basada en las propiedades físico-químicas de los aminoácidos. Tomando un umbral tal que la sensibilidad y la especificidad sean iguales ($SE = SP = 0,67$), obtenemos un valor de $ACC = 0,67$ y $MCC = 0,24$. Considerando únicamente las posiciones de contacto con el TCR los resultados obtenidos son significativamente peores.

Conclusiones. El análisis de los péptidos inmunogénicos y no-inmunogénicos demuestra que, basándonos en la abundancia de aminoácidos o en sus propiedades físico-químicas, ambos conjuntos no son claramente distinguibles. Sin embargo, los modelos de clasificación desarrollados sí son capaces de diferenciar entre ambos conjuntos. Si las propiedades inmunogénicas de los péptidos dependieran de la restricción por una molécula MHC específica, nuestros modelos de clasificación podrían mejorar si fueran entrenados únicamente con péptidos restringidos por los mismos alelos MHC.

P-118

ESTUDIO DE EPISTASIS GENÉTICAS EN PACIENTES ESPAÑOLES DE ARTRITIS REUMATOIDE. M.N. *Perdigones Borderías*¹, B. *Fernández-Gutiérrez*², D. *Pascual-Salcedo*², M.Á. *Figueredo Delgado*¹.

¹Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Hospital Universitario La Paz, Madrid

Objetivos. A pesar de los grandes avances obtenidos en los últimos años en el conocimiento de la base genética de la artritis reumatoide (AR),

restan por descubrir el 50% de los factores hereditarios asociados a esta enfermedad. Por ello, tras la era de estudios de barrido genómico completo (GWAS), cada vez más trabajos se centran en el análisis de interacciones genéticas implicadas en la susceptibilidad a esta enfermedad. Distintos estudios han propuesto la existencia de epistasis entre polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) localizados en los genes *IL1-SELS*, *RTN4-GLIS3*, *MIF-TRAF1* y *MIF-CTLA4*, aunque no existen publicaciones que validen su implicación. Nuestro trabajo tiene como objetivo replicar estas interacciones genéticas en pacientes españoles de AR.

Materiales y métodos. Hemos analizado aproximadamente 900 pacientes de AR diagnosticados según los criterios del ACR (*American College of Rheumatology*) procedentes de dos hospitales madrileños (Hospital Clínico San Carlos y Hospital Universitario La Paz). El DNA se extrajo mediante una técnica estándar a partir de sangre periférica y el genotipado de los SNPs rs16944 (*IL1*), rs28665122 (*SELS*), rs17046477 (*RTN4*), rs7033413 (*GLIS3*), rs755622 (*MIF*), rs3761847 (*TRAF1*) y rs3087243 (*CTLA4*) fue realizado mediante tecnología Taqman. El estudio de interacciones se realizó mediante recuento directo y el análisis estadístico con el *software* EpiInfo v.6.02.

Resultados. En nuestro estudio de la interacción *IL1-SELS* no se observaron diferencias significativas en la distribución de portadores/no portadores del alelo A del rs28665122 (*SELS*) entre individuos homocigotos para el alelo minoritario del rs16944 (*IL1*) (38 de 123, 30,9%) y el resto de enfermos de AR (228 de 889, 25,6%; $p=0,215$; $OR=1,30$ (0,84-1,99)), a pesar de que la potencia para detectar ese efecto descrito inicialmente ($OR=2,26$) era de un 97%. El análisis de la interacción *RTN4-GLIS3* no detecta variaciones significativas de las frecuencias genotípicas del marcador rs17046477 (*RTN4*) al ser estratificado por los distintos genotipos del marcador rs7033413 (*GLIS3*). Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas de la distribución del rs755622 (*MIF*) al ser estratificado por los distintos genotipos de los SNPs rs3761847 (*TRAF1*) o rs3087243 (*CTLA4*) a pesar de que la potencia de nuestros estudios era suficiente.

Conclusiones. Las interacciones genéticas descritas entre SNPs localizados en los genes *IL1-SELS*, *RTN4-GLIS3*, *MIF-TRAF1* y *MIF-CTLA4* no se replican en pacientes españoles de AR.

P-119

UN MÉTODO SIMPLIFICADO PARA EL CRIBADO Y LA IDENTIFICACIÓN EXACTA DEL ALELO ASOCIADO A LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE HLA-DRB1*1501. E. *Cisneros*, M. *Moraru*, R. *De Pablo*, C. *Vilches*. Hospital Puerta De Hierro, Majadahonda.

La investigación en esclerosis múltiple requiere con frecuencia la detección de individuos portadores del alelo HLA-DRB1*15:01. Sin embargo, la complejidad del sistema HLA hace que esta labor pueda quedar restringida a laboratorios especializados en Histocompatibilidad. Para superar esta limitación, hemos desarrollado un método que permite la detección simple, robusta y altamente específica del alelo DRB1*15:01 a laboratorios no especializados en Histocompatibilidad. Nuestro método combina, en una sola reacción, las ventajas de dos técnicas de uso generalizado para la tipificación HLA: la simplicidad y la rapidez de la PCR-SSP y la alta resolución del SBT. Además, el método supera las complejidades técnicas asociadas a cada abordaje por separado. La realización de una única reacción de amplificación en un solo tubo permite hacer un cribado de los individuos DR2 positivos sin necesidad de realizar una tipificación HLA completa. El remanente de la reacción sirve para identificar el alelo DRB1*15:01 mediante

secuenciación directa con un único cebador; a diferencia del SBT convencional, los ADNs DR2-positivos no necesitan ser reamplificados. Finalmente, la secuencia de nucleótidos así obtenida se compara "on line" con las secuencias HLA oficiales depositadas en la base de datos pública IMGT/HLA (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/blast2/nucleotide.html?IMGTHLA>). En comparación con otros ensayos clásicos para la detección de alelos asociados a la esclerosis múltiple (PCR-SSP, PCR-SSOP y PCR en tiempo real), donde se requiere un número de cebadores o de sondas muy elevado para obtener una tipificación de alta resolución, nuestro método resulta menos complejo y permite asignar el alelo DRB1*15:01 sin ninguna ambigüedad.

En conclusión, nuestro abordaje permitiría facilitar y agilizar la investigación en esclerosis múltiple haciendo accesible la identificación específica del alelo DRB1*15:01 a los laboratorios de investigación en Neurociencias.

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

P-120

OLIGOMORFISMOS DE HLA-E Y VARIANTES EN LOS PÉPTIDOS DE UNIÓN DERIVADOS DE HLA-B EN EL SÍNDROME DE BEHÇET. A. Clemente Ximenis, A. Cambra Conejero, C. Crespi Bastard, N. Matamoros Florí, M.R. Julià Benique. Hospital Universitari Son Dureta, Palma de Mallorca.

Objetivos. El único ligando conocido de los receptores CD94/NKG2A, B o C es el complejo compuesto por la molécula HLA-E ligada al péptido que presenta. Dicho complejo colabora en la regulación de la respuesta citotóxica mediada por las células NK y otros linfocitos. HLA-E presenta específicamente péptidos derivados de la secuencia líder de moléculas HLA clásicas y HLA-G. Existen dos oligomorfismos principales de HLA-E y la funcionalidad del complejo HLA-E/péptido depende de cuál de ellos interviene y también de la segunda posición aminoacídica del péptido (P2), que puede ser Met o Thr. HLA-B*51 está fuertemente asociado al Síndrome de Behçet (SB) y la configuración de su secuencia líder (Thr en P2) apunta a una inhibición ineficiente de la respuesta citotóxica mediada por HLA-E. El objetivo del presente trabajo consiste en definir la distribución de oligomorfismos de HLA-E en pacientes con SB, evaluar su asociación con las variantes de HLA-B que presentan Thr en P2 y analizar su correlación con la clínica.

Métodos. Tipificación de HLA-E mediante PCR-SSP con cebadores específicos de secuencia, diseñados para discriminar los cambios de nucleótido en los codones 107 y 157. Tipificación de HLA-B mediante PCR-SSP comercial. Se estudian 44 pacientes diagnosticados de SB y 100 individuos sanos.

Resultados. Sólo se detectaron 2 alelos en ambos grupos, E*0101 y E*0103, con frecuencias alélicas similares a las descritas en población caucasoide. No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica de los alelos de HLA-E ni en la presencia de Thr o Met en la P2 de la secuencia líder de HLA-B entre pacientes y controles.

Conclusiones. Según nuestros resultados, en la predisposición genética a padecer el Síndrome de Behçet no son determinantes los alelos de HLA-E, contrariamente a otros estudios en los que se asocia un riesgo reducido a HLA-E*0101. Tampoco se observa asociación entre la distribución de los diferentes péptidos derivados de HLA-B y el riesgo de padecer la enfermedad. Son necesarios estudios funcionales para comprobar si en la regulación de los linfocitos citotóxicos de estos pacientes son determinantes las diferencias en los complejos HLA-E/péptido.

P-121

ANÁLISIS DE LOS MARCADORES CELIACOGÉNICOS HLA-DQA1 Y -DQB1 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. D. Planelles¹, M.M. Bosca², M. Minguez², M. Rodríguez-Cebria¹, J. Tosca², E. Alba¹, R. Granell¹, D. Jarque¹, E. Laguarda¹, A. Benages², R. Roig¹. ¹Centro de Transfusión de La Comunidad Valenciana, Valencia. ²Hospital Clínico Universitario, Valencia.

Se ha sugerido que la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y la enfermedad celíaca (EC) puedan tener alguna relación debido al hecho de que ambas son patologías inflamatorias crónicas que comprometen el intestino, desarrollan una respuesta inmune similar relacionada con un patrón Th1 de citocinas y se consideran enfermedades poligénicas complejas en cuya etiopatogenia interaccionan factores genéticos, inmunológicos y ambientales. Entre los genes de susceptibilidad al desarrollo de EC se ha identificado el haplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 como factor de riesgo primario. Sin embargo, los estudios de asociación de genes candidatos en la EII han resultado inconsistentes y heterogéneos. El objetivo de este estudio ha sido evaluar la prevalencia de los alelos celiacogénicos HLA-DQA1 y -DQB1 en pacientes con EII.

El estudio ha incluido una serie de 332 pacientes con EII en los que se ha realizado un análisis de frecuencias de los haplotipos marcadores clásicos de celiaquía (HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 y DQA1*03-DQB1*03:02) y no-clásicos (HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02). Los resultados obtenidos han sido comparados frente a un grupo control de 577 individuos sanos y con respecto a una serie de 185 pacientes celíacos, todos ellos de la misma región geográfica.

En la población de pacientes con EII la frecuencia del haplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 fue estadísticamente similar a la del grupo control (16,7% vs 20,6%) y significativamente diferente de la del grupo de pacientes celíacos (71,3%). Tampoco se observó variación significativa cuando se comparó la frecuencia del genotipo heterocigoto HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02 + DQA1*05:05-DQB1*03:01 entre pacientes con EII y controles (3,3% y 3,4%, respectivamente); por el contrario, sí se observó un incremento significativo de la frecuencia de este genotipo en los pacientes celíacos (21,6%). La frecuencia del haplotipo HLA-DQA1*03-DQB1*03:02, similar entre el grupo de pacientes con EII (12,5%) y la población control (18%), apareció significativamente disminuida en los pacientes con EC (5,4%).

En conclusión, mientras que en nuestra población el haplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 y el genotipo HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02 + DQA1*05:05-DQB1*03:01 se confirman como marcadores de alto riesgo de celiaquía, no parecen ser factores de predisposición para desarrollar EII, por lo que el mecanismo de la potencial asociación entre EII y EC no parece tener base en los genes HLA de clase II DQA1-DQB1.

P-122

¿EL GENOTIPO -1478 DEL/DEL EN EL GEN SOCS1 PROTEGE CONTRA EL DESARROLLO DE LA LEISHMANIASIS CUTÁNEA LOCALIZADA? K. Sánchez, M. Fernández-Mestre. IVIC, Dependencia Federal, Venezuela.

Objetivo. La *Leishmaniasis* es una enfermedad infecciosa causada por el parásito protozoario *Leishmania*. En Venezuela, específicamente en el Estado Miranda (Municipios Brion y Zamora) existen varias zonas agrícolas que son endémicas para la forma localizada de la *Leishmania*.

sis Cutánea (LCL). Sin embargo, en esas zonas existen individuos que no llegan a padecer la enfermedad, sugiriendo la existencia de algún factor que confiere protección al desarrollo de LCL. En virtud de ello, nos planteamos evaluar la distribución del polimorfismo -1478 CA/del en la región promotora del gen supresor de la señalización de citoquinas 1 (SOCS1) en individuos venezolanos sanos y con LCL, con la finalidad de determinar posibles asociaciones entre alelos y/o genotipos del gen evaluado con el desarrollo o expresión clínica de la enfermedad.

Materiales y Métodos. La sangre total fue colectada de 100 individuos con LCL, diagnosticados clínica, inmunológica y parasitológicamente y 71 individuos sanos, procedentes de la misma zona, con prueba de Montenegro negativa, sin cicatrices sospechosas de leishmaniasis, ni historia clínica de LCL. El polimorfismo -1478 CA/del se determinó mediante PCR-RFLP. Las frecuencias alélicas y genotípicas se determinaron por conteo directo, las diferencias entre grupos con la prueba de Ji-cuadrado y la intensidad de la asociación como OR.

Resultados. Se detectó la presencia de la eliminación en la posición -1478 del gen SOCS1. La distribución genotípica en el grupo de pacientes fue CA/CA: 0,77; CA/del: 0,22 y del/del: 0,01; y en el grupo control CA/CA: 0,78; CA/del: 0,14 y del/del: 0,8. Al establecer comparaciones, observamos una frecuencia significativamente disminuida del genotipo recesivo del/del en los pacientes LCL con respecto al grupo control ($p=0,021$; OR=0,13; IC95%=0,01-0,92).

Conclusión. Los resultados indican que el polimorfismo del gen estudiado puede ser relevante en la infección y desarrollo de la LCL. Sugiriendo que la presencia del genotipo del/del estaría confiriendo protección a al desarrollo de la infección por *Leishmania*.

P-125

FRECUENCIA DEL ALELO HLA-B*57:01 EN LA POBLACIÓN DE CANTABRIA INFECTADA POR HIV Y SU ASOCIACIÓN CON EL HAPLOTIPO ANCESTRAL B57.1. M.Á. Hoz, P. Sánchez-Velasco, M.C. Fariñas, S. Echevarría, D. García-Palomo, M. Gutiérrez-Cuadra, F. Ausín, F. Leyva-Cobián, J.G. Ocejo-Vinyals. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

Objetivos. Los objetivos de este estudio son: (i) estudiar la prevalencia del alelo HLA-B*57:01 en la población de Cantabria infectada con el HIV y atendida en la Unidad de Enfermedades Infecciosas de nuestro centro; (ii) determinar la frecuencia de HLA-A y HLA-Cw y (iii) estudiar la asociación con el haplotipo ancestral B57.1 (HLA-A*01, B*57:01, Cw*06, DRB1*07, y DQB1*03:03) en aquellos individuos portadores del B*57:01 y su asociación con polimorfismos de otros genes muy próximos en el cromosoma 6 (*Hsp70-Hom*, *HCP5*, *HLA-Cw** en la región 5' no traducida)

Material y métodos. Se analizaron 1000 muestras de sangre de individuos caucásicos infectados con HIV. El DNA genómico se extrajo mediante un método semiautomático. La determinación de HLA-I (A*, B*, Cw* y HLA-II (DRB1* y DQB1*) se realizó mediante SSO-xMAP en un Luminex. En las muestras que resultaron ser HLA-B*57 o DQB1*03 se determinaron los alelos mediante PCR-SSP. En el caso del polimorfismo de *Hsp70-Hom* se empleó la técnica de PCR-ARMS. Para los otros dos polimorfismos (*HCP5* y *HLA-Cw**), los genotipos se determinaron mediante secuenciación utilizando el kit MegaBACE sNuPe.

Resultados. Setenta y cuatro pacientes (7,4%) resultaron fueron HLA B*57, 67 (90,5%) de los cuales mostraron el alelo B*57:01. Veinticinco de estos 67 individuos con el alelo B*57:01 (37%), no presentaban el haplotipo ancestral DRB1*07, DQB1*03:03.

Veintiocho pacientes (41,8%) no presentaban el antígeno Cw*06. Ocho de los pacientes con HIV portando el alelo B*57:01 presentaban un genotipo *Hsp70-Hom* CC, siendo 8 TT y el resto CT. La frecuencia de los dos alelos C y T fue de un 50 % cada uno.

Conclusiones. La presencia del haplotipo ancestral 57,1, y en concreto, del haplotipo parcial DRB1*07, DQB1*03:03 y de Cw*06 en nuestra población fue menor que la descrita en otras poblaciones. Igualmente, las frecuencias de los alelos C y T del gen *Hsp70-Hom* son muy distintas a las comunicadas para individuos normales de raza caucásica. Se analizan estos y los resultados obtenidos de los polimorfismos en *HCP5* y *HLA Cw**.

Aunque la presencia del alelo B*57:01 junto con el haplotipo DRB1*07, DQB1*03:03 se ha asociado con un valor predictivo positivo del 100% y negativo del 97%, respectivamente, de hipersensibilidad frente al abacavir, la falta de estudios concluyentes hizo que en aquellos individuos que portaban el alelo B*57:01 pero con ausencia del haplotipo ancestral B57.1 se desaconsejase también el tratamiento con abacavir.

P-126

EL LOCUS IGH DEL PEZ TELEÓSTEO MEDAKA (ORYZIAS LATIPES). S. Magadán¹, C. Sánchez Espinel², F. Gambón Deza³. ¹Instituto Español de Oceanografía (IEO). Centro Oceanográfico de Vigo. ²Facultad de Biología, Universidad de Vigo. ³Hospital Meixoeiro, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo (CHUVI).

Introducción. Los peces óseos presentan un sistema inmunológico que ha evolucionado de forma independiente de los animales que pasaron a tierra desde hace 400 millones de años.

Objetivo. Estudio y análisis del locus IGH del pez teleosteo *Oryzias latipes*, uno de los peces más estudiados en laboratorio.

Métodos. Para llevar a cabo la búsqueda de los anticuerpos que pueden producirse buscamos en múltiples librerías EST que se han hecho de este animal y que están introducidas en el Genbank. Para el análisis informático se empleó software diverso como NTI-invirogene Vector program, FGNES y MEGA4 para el estudio filogenético.

Resultados. Hemos encontrado cinco zonas en una región del cromosoma ocho donde existen exones de tipo Cp y Cd.

Encontramos tres formas diferentes del anticuerpo de la clase IgM y no encontramos ninguna secuencia de la clase IgD. Dos de las IgM encontradas son de membrana. Una de ellas es una IgM transmembrana corta en la que faltan los dominios CH3 y CH4 siendo codificada por la zona 1 del locus. Las otras dos IgM encontradas son codificadas en la Zona 4 del locus siendo una transmembrana y la otra secretada. En la forma transmembrana el *splicing* con el exón transmembrana se realizan desde un lugar críptico dentro del exón Cp3. La IgM secretada está compuesta por los cuatro dominios clásicos de esta inmunoglobulina.

Interpuestos entre las zonas donde se encuentran los genes para las regiones constantes están las regiones VH. Hemos identificado 26 regiones que conforman cuatro familias.

Conclusiones. La disposición de lo exones, aparentemente desordenada, indica la presencia de recientes procesos de recombinación y duplicación que han barajado los genes. Esta disposición hace sugestivo de que muchos de ellos no formen parte de anticuerpos reales. El hecho de que se encuentren interpuestos exones de un anticuerpo u otro lo asevera. La expansión de las familias VH ha sido reciente y están relacionadas con las presentes en otros teleosteos.

P-127

FRECUENCIA DEL POLIMORFISMO FUNCIONAL MMP-9 -1562(C>T) EN MUJERES CON PREECLAMPSIA EN LA REGIÓN DE CANTABRIA. I.C. Vaquero Mejía, J.G. Ocejó-Vinyals, F.J. Llorca Díaz, J. De Miguel Sesmero, F. Leyva Cobian. Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander.

Objetivos. Los mecanismos implicados en el desarrollo de la preeclampsia son desconocidos. Aunque se conocen muchos de sus aspectos, otros permanecen sin ser esclarecidos. Múltiples factores genéticos y ambientales parecen intervenir en la fisiopatología de esta enfermedad. Las metaloproteinasas de la matriz extracelular (MMPs), familia de enzimas que descomponen el colágeno en diferentes partes del organismo incluida la decidua materna, especialmente la MMP-9, han sido previamente involucradas en preeclampsia. Se ha descrito un polimorfismo en el gen de la MMP-9, (C-1562T), que afecta la actividad de la enzima.

Nuestro objetivo ha sido determinar si el genotipo C-1562T MMP-9 puede tener alguna relación con un mayor riesgo de preeclampsia en mujeres embarazadas de la región de Cantabria.

Material y Métodos. Se estudiaron 110 mujeres con antecedente de preeclampsia diagnosticadas entre el 2004 y 2010 en el hospital universitario Marques de Valdecilla y 221 controles sanos. Se extrajo el DNA genómico de todas las muestras mediante un procedimiento semiautomático. Mediante técnica de PCR-RFLP se analizó el polimorfismo de MMP-9.

Se analizaron los diferentes alelos y genotipos y se realizó el estudio estadístico mediante el uso de Chi cuadrado o test exacto de Fisher.

Resultados. La presencia de los alelos C y T entre casos y controles mostró una diferencia estadísticamente significativa ($p=0,001$, OR 2,09). El genotipo homocigoto TT se encontró en un 12,7% de mujeres con preeclampsia y en un 2,7% de los controles ($p=0,0008$, OR 5,23).

Discusión. Nuestros datos se correlacionan con resultados obtenidos en la población brasileña y difieren de los reportados en otras poblaciones. Aunque el alelo T no está presente en un elevado porcentaje de pacientes con preeclampsia versus controles (21,8% vs 11,8%), de estos resultados, podría deducirse una asociación del mismo con desordenes hipertensivos del embarazo. Harían falta más estudios de este tipo para demostrar su papel en la fisiopatología de la preeclampsia.

P-128

ASOCIACION DEL POLIMORFISMO FUNCIONAL C677T DEL GEN MTHFR CON PREECLAMPSIA EN LA POBLACION DE CANTABRIA. I.C. Vaquero Mejía, J. Ocejó-Vinyals, F.J. Llorca Díaz, J. De Miguel Sesmero, F. Leyva Cobian. Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander.

Objetivos. El gen *MTHFR* localizado en el cromosoma 1(1p36.3) codifica para una proteína de 77 K Da, la enzima metiltetrahidrofolato reductasa. Esta proteína resulta clave en el metabolismo del folato y la homocisteína. Se ha descrito una variante polimórfica funcional C>T en la posición 677 (C677T) del gen, localizada en el exón 4, que determina la sustitución del aminoácido valina por alanina en su dominio catalítico. Esta sustitución da lugar a una variante termolábil de la enzima la cual presenta una actividad del 50%. Los individuos que presentan dicha variante en homocigosis, presentan niveles elevados de

homocisteína en sangre. El polimorfismo C677T se ha estudiado como factor de riesgo en mujeres con complicaciones durante el embarazo. Nuestro objetivo principal es valorar si la hiperhomocisteinemia derivada de este polimorfismo podría ser utilizada como marcador de riesgo para enfermedad vascular placentaria y / o preeclampsia.

Material y Métodos. Se estudiaron 110 mujeres con antecedente de preeclampsia y 221 controles sanos (mujeres con embarazo normal). Se extrajo el DNA genómico de todas las muestras mediante un procedimiento semiautomático. Mediante técnica de PCR-RFLP se analizó el polimorfismo de este gen. El estudio estadístico de la distribución de los diferentes genotipos se realizó mediante el test de Chi cuadrado o test exacto de Fisher.

Resultados. La distribución genotípica entre grupos mostró diferencias estadísticamente significativas, encontrando el genotipo homocigoto CC en un 39% de mujeres con preeclampsia vs 73% de los controles ($p<0,00001$, OR 0,23). El genotipo homocigoto TT estaba presente en el 16% de los casos vs el 1,35% de los controles ($p<0,00001$, OR 14,22); finalmente, el genotipo heterocigoto CT se encontró en un 44% de casos y en un 25% de los controles ($p=0,0006$, OR 2,37).

Conclusiones. La hiperhomocisteinemia determinada por la presencia del alelo T en homocigosis podría jugar un papel en la fisiopatología de la preeclampsia. En conclusión, en nuestra población, el genotipo TT del polimorfismo C677T del gen de la *MTHFR* parece estar asociado a una susceptibilidad de desarrollar preeclampsia durante el embarazo.

P-129

COEXISTENCIA EN UN MISMO PACIENTE DE 3 SINDROMES LINFOPROLIFERATIVOS. ESTUDIO FENOTIPICO Y DE CLONALIDAD PRE Y POST-TRATAMIENTO. P. Garrido, P. Jiménez, C. Sánchez, F. Valero, P. López, M. Almagro, J.M. De Pablos, P. Navarro, A. Cabrera, M. Jurado, F. Ruiz-Cabello. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Introducción. Se presenta el caso de un paciente de 63 años en que se diagnostican de forma simultánea 3 Síndromes Linfoproliferativos: Tricoleucemia, Linfocitosis B monoclonal con criterios de Leucemia Linfática Crónica (LLC-B) y Leucemia de Linfocitos Grandes Granulares (LGL). A destacar el predominio en sangre periférica (sp) tanto por mielograma como por Citometría de Flujo de linfocitos de LLC y LGL, mientras que en médula ósea (MO) la célula predominante era el tricoleucocito.

Material y métodos. El análisis por Citometría de Flujo se ha realizado mediante marcaje directo con Ac monoclonales en 3-5 colores (BD Biosciences) en un Citómetro FACSCanto empleando el FACS-Diva software (BD Biosciences) para su análisis. El estudio de clonalidad del receptor del linfocito B (BCR) y T (TCR) se obtuvo a partir de DNA extraído tanto en sangre periférica como en médula ósea siguiendo el protocolo BIOMED-2 descrito por Van Dongen.

Resultados. En la fase pre-tratamiento destaca el predominio por inmunofenotipo de sp de un 13% de células con fenotipo de LLC-B y un 4% de células con fenotipo de tricoleucocitos mientras que en MO la célula predominante era el tricoleucocito (21%). Tras la instauración de tratamiento disminuyó de forma considerable la población de tricoleucocitos en M.O. En el estudio de clonalidad basal destacaban 2 expansiones en FR2 en MO a 229 pb correspondiente a los tricoleucocitos y otra de menor intensidad a 264 pb de los linfocitos de LLC y 3 expansiones en FR3 a 106pb, 123 y 126 pb respectivamente. En sangre

periférica predominaba por el contrario la expansión en FR2 de 264pb (LLC-B). Tras el tratamiento han desaparecido en MO las expansiones en FR2 y FR3 y en sangre periférica sólo persiste una pequeña expansión en FR3 a 106pb (LLC-B). La población de LGL ha permanecido constante en todo momento.

Discusión. Se presenta el caso de un paciente con diagnóstico simultáneo de 3 Síndromes Linfoproliferativos en el que se ha instaurado tratamiento quimioterápico frente a la clona predominante. Como aportación de esta comunicación se documentan los estudios de clonalidad realizados tanto pre como post-tratamiento, mostrándose la evidencia molecular de la efectividad terapéutica.

SESIÓN 11: INMUNOTERAPIA

Moderadores: Luis AlvarezVallina (Madrid)
Francisco Lozano (Barcelona)

P-130

TECNOLOGÍA PUNTA EN LOS PROCESOS Y PLANTAS DE PRODUCCIÓN DE IGG. T. De Agustín De Oro, L. Höfferer, A. Nigsch. CSL Behring, Esplugues del Llobregat.

CSL Behring ha desarrollado una nueva tecnología punta en los procesos de producción de inmunoglobulinas, consiguiendo dos productos líquidos, uno al 20% para la administración subcutánea, IgPro20 y otro al 10% para administración intravenosa (IgPro10, Privigen®). Ambos están formulados con L- Prolina y concentrados para la obtención de una cantidad final de proteína de 200g/l o 100 g/l. Debido a los puntos en común de los procesos de producción, ambos se fabrican en las mismas plantas de producción. En Berna (Suiza), se construyeron dos plantas con tecnología punta, la M99 y la IgLAB, de acuerdo con los estándares tecnológicos actuales y altamente automatizadas. Todos los procesos y actividad se registran electrónicamente, incluyendo el registro de cada lote. Los procesos de producción se realizan bajo control medio ambiental (climatización automatizada, ventilación y sistemas de aire acondicionado). La planta IgLAB tiene una capacidad anual de 3 millones de litros de plasma. El primer paso en los procesos de producción de las IgPro10 / IgPro20 es la precipitación de la fracción de IgG del plasma para la creación de precipitado NA (fraccionamiento Kistler-Nitschmann) o precipitado II+III (precipitación en frío de Cohn). El precipitado sobrenadante NA o II+III se somete a fraccionamiento por ácido octanoico, eliminándose las proteínas de alto peso molecular y los lípidos. Después de una ultra/diafiltración, la solución se incuba a pH 4 (para la inactivación viral), seguido por una cromatografía de intercambio aniónico, mediante el cual las impurezas (sobre todo IgA e IgM) se unen a la resina. La solución resultante conteniendo IgG se somete a filtración DV20 (específica para eliminación viral) y finalmente el filtrado se concentra al 10 o 20%, y se estabiliza con 250mM de L-Prolina. El proceso dura unos 4 días, seguidos por 1 día adicional para el llenado en condiciones estériles. Debido al alto grado de automatización, solo se necesitan 15 personas para la producción de IgPro10 / IgPro20 en dos turnos diurnos.

Conclusión. El proceso de producción simple pero a la vez sofisticado, así como la tecnología punta y la automatización de las instalaciones, consigue productos con IgG altamente purificados cumpliendo con garantías los requerimientos de calidad.

P-131

EFFECTOS ANTIINFLAMATORIOS DE LAS INMUNOGLOBULINAS MEDIADOS POR LA INHIBICIÓN DEL COMPLEMENTO: MECANISMOS DE ACCIÓN CONOCIDOS Y PAPEL DE LOS ISOTIPOS DE INMUNOGLOBULINAS. T. De Agustín De Oro, R. Rieben, K. Matozan, S. Mischer, M. Spycher. CSL Behring, Esplugues del Llobregat.

Se sabe que el sistema del complemento juega un papel importante en la inflamación y que está involucrado en el daño celular y tisular en muchas enfermedades autoinmunes. La capacidad de inhibición del complemento que ejercen las inmunoglobulinas intravenosas (GGIV) se conoce desde hace al menos 20 años, y este mecanismo de acción antiinflamatorio de las GGIV se considera importante en el tratamiento de patologías como la dermatomiositis, la neuropatía multifocal motora y, potencialmente, en otras patologías autoinmunes. Se han descrito algunos de los mecanismos por los que las GGIV inhiben al complemento, incluyendo el "scavenging" del C3 y C4 activados, la unión competitiva de la molécula de Ig por el C1, el aumento de la inactivación fisiológica del C3b por factores I y H, y la neutralización de las anafilotoxinas C3a y C5a mediadas por Fab (Basta M. Mol Imm Rev 2008; 45:4073-9). Para el scavenging de fragmentos activados del complemento, se han descrito diferencias en la actividad basadas en las composiciones de las GGIV en isotipos (mayor actividad de IgM [Rieben R, et al. Blood 1999; 93:942-51]) y diferencias en los procesos de producción.

Mientras que la inhibición del complemento por las GGIV es un efecto antiinflamatorio deseado durante la infusión intravenosa, las inmunoglobulinas también pueden producir una activación perjudicial del sistema del complemento en el caso de que existan agregados en el preparado. Para poder identificar los lotes de GGIV que contienen agregados activados de Ig, se han realizado estudios *in vitro* durante el desarrollo de las inmunoglobulinas con uso intravenoso (hace al menos medio siglo), en los cuáles se midió el consumo del complemento inducido por activación. A pesar de ello, estos estudios no pueden diferenciar la inhibición beneficiosa del complemento de la perjudicial. Los estudios que incluyen la medición de los marcadores de activación del complemento (C5a y C3a) y los análisis indirectos del complemento-scavenging por GGIV pueden ofrecer un novedoso sistema de análisis para la evaluación de las GGIV *in vitro*.

P-132

ESCAPE INMUNOLÓGICO DE CÉLULAS CON ALTERACIONES IRREVERSIBLES EN EL GEN BETA 2-MICROGLOBULINA: ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN HLA DE CLASE I EN LESIONES METASTÁTICAS OBTENIDAS DE UN PACIENTE DE MELANOMA ANTES Y DESPUES DEL TRATAMIENTO CON DCS TRANSFECTADAS CON MRNA TUMORAL. A.B. Del Campo¹, J. Carretero Coca¹, R. Méndez², I. Maleno², J. Amund Kyte³, G. Gaudernak³, T. Cabrerá¹, N. Aptsiauri¹, F. Ruiz-Cabello¹, F. Garrido¹. ¹Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Universidad de Granada, Granada. ²Hospital Universitario Virgen de las Nieves. ³The Norwegian Radium Hospital, Oslo, Norway, , Norway.

Las células T citotóxicas (CTLs) juegan un papel central en la eliminación de células infectadas por virus y células tumorales, siendo necesario para ello la expresión de moléculas HLA de clase I. No obstante, la pérdida total de estas moléculas en la superficie celular es un

mecanismo frecuente empleado por el tumor para evadir la inmunovigilancia. Se han descrito tres mecanismos principales en células tumorales con pérdida total de clase I: mutaciones en beta-2-microglobulina (b2m), deficiencias en TAP, y baja afinidad en la unión de los elementos reguladores de estos genes.

Se han analizado las alteraciones en las moléculas HLA de clase I presentes en las muestras de tejido procedente de biopsias conservadas en parafina, así como una línea celular obtenida de un paciente con melanoma metastásico (Kyte et al, 2006). En el análisis mediante inmunohistoquímica con anticuerpos anti-cadena pesada HLA-ABC y anti-beta-2-microglobulina se encuentran biopsias positivas, muestras con áreas débilmente positivas, y muestras con zonas tumorales negativas para dichas moléculas.

El mRNA aislado de una de las lesiones metastásicas con un patrón inmunohistoquímica fundamentalmente negativo para beta-2-microglobulina, con una mutación puntual en un alelo del gen b2m, y una LOH en el cromosoma 15, fue usado para desarrollar una vacuna de células dendríticas, tras la cual, el paciente desarrolló una nueva lesión metastásica de la que se estableció una línea celular a partir de una citología. El análisis por FACS mostró una pérdida total de expresión en superficie de HLA de clase I, debida a una mutación en b2m, así como una LOH en los cromosomas 6 y 15.

La expresión normal de HLA de clase I en la línea celular fue recuperada mediante la transfección con el vector adenoviral AdCMVb2m (del Campo et al, 2009) confirmándose la actividad funcional del complejo HLA de clase I recuperado en superficie.

En este paciente, las células tumorales portan alteraciones en HLA de clase I (mutación en b2m, LOH en el cromosoma 15) y muestran una pérdida total de expresión de HLA de clase I tras la inmunoterapia. Esto sugiere que las variantes generadas HLA negativas son capaces de evadir el sistema inmune proporcionando a las células tumorales el escape al reconocimiento inmune por CTLs, lo que podría explicar la evolución clínica del paciente y el fallo de la inmunoterapia aplicada.

P-133

INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS EN ENFERMEDADES NEUROMUSCULARES AUTOINMUNES: ANALISIS COMPARATIVO DE REGIMEN DE 5 DÍAS VS 2 DÍAS. M. García Ormaechea, E. Moga Naranjo, E. Martínez, L.A. Querol Gutierrez, C. Juárez Rubio, I. Illa. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introducción. Las inmunoglobulinas endovenosas (IVIg) se utilizan como tratamiento inmunomodulador en numerosas enfermedades autoinmunes e inflamatorias. La dosis de 2g/kg se administra entre 1 y 5 días sin que haya evidencia de los beneficios de cada régimen. Nuestro objetivo es estudiar las posibles diferencias clínicas y biológicas entre las dos pautas de infusión, 5 días vs 2 días.

Métodos. Los pacientes (n=5) recibieron las dos pautas de infusión, 2 y 5 días. Se realizaron estudios en sangre periférica pre- y post-infusión (inmediatamente, a los 10 y 30 días). Se determinó la expresión de los receptores Fcγ (FcγRI, FcγRII and FcγRIII), HLA Clase I (A, B y C) y HLA Clase II (DR) en monocitos por citometría de flujo, y se analizaron los niveles de STAT1 y STAT3 fosforilados en monocitos tras estimulación con IFN-γ e IL-10 respectivamente. Se estudiaron las escalas clínicas INCAT y QMG antes y a los 10 y 30 días después de la infusión.

Resultados. No se han observado diferencias entre ambas pautas de administración en la expresión de los receptores Fcγ, HLA Clase I

y II, así como tampoco en la mejoría clínica y efectos adversos. Sin embargo, en la pauta de 2 días, había un descenso de los niveles de pSTAT1 ($88,67\% \pm 0,22\%$ vs $73,75\% \pm 0,75\%$, antes vs día 10 después de la infusión, respectivamente; $p=0,022$) y un aumento en los niveles de pSTAT3 ($35,35 \pm 5,3\%$ vs $54,34\% \pm 4,36\%$, antes vs día 30 después de la infusión, respectivamente; $p=0,031$), no observada en la pauta de 5 días.

Conclusión. Estas 2 pautas diferentes de infusión podrían estar alterando los niveles de activación de pSTAT1 y pSTAT3 sin diferencias en la evolución clínica de los pacientes. Sin embargo, se necesita un número elevado de pacientes para corroborar estos hallazgos.

P-134

EVALUATING THE ACTIVITY OF QUINTON SOLUTIONS ON THE IMMUNE SYSTEM. P. Maseres Javaloy, J.E. Martínez López, P. Martínez Peinado, M. García Irlas, J.M. Sempere Ortells. Universidad de Alicante, Alicante.

Objectives. We have recently described an *in vitro* modulating effect of QI (Quinton Isotonic® solution; ultrafiltrated cold processed seawater) on PBMNC from healthy controls. QI is able to emulate many of the results observed when using conventional culture media such as RPMI, in terms of cell-morphology, -viability, -proliferation and -aggregation. It also exerts a protective effect on erythrocytes avoiding spontaneous lysis.

Our aim is to amplify the *in vitro* study of QI on the immune system and to evaluate the *in vivo* effect of QH (Quinton Hypertonic® solution) after oral administration.

Methods. Isolated PBMNC from ten healthy volunteers were cultured under the following conditions: RPMI, QI and Saline solution (SS). Cell-activation was measured by flow cytometry according to the expression of membrane antigens and production of intracellular cytokines.

QH was orally administered to 5 healthy controls (2+2+2 ampoules in six hours) and leukocyte activation measured by flow cytometry according to the expression of membrane antigens and adhesion molecules vs. pre-administration values.

Results. QI but not SS increased the percentage of cultured lymphocytes coexpressing CD25, although in a lesser extent than RPMI. Cells cultured with QI vs. SS and RPMI also showed an increased intracellular expression of TNF-α, IL-2 and INF-γ.

QH was able to increase *in vivo* the lymphocyte expression of CD25, CD28 and CD45RO membrane antigens as well as the leukocyte expression of CD11a and CD11b.

Conclusion. QI seems to activate the immune system both *in vitro* and *in vivo*, by increasing the expression of some activation markers/adhesion molecules and by stimulating a Th1 cytokine profile.

P-135

ESTABILIDAD DE LA EXPRESIÓN DE CD90 EN HFA-MSCS SOME-TIDAS A CULTIVO INDEFINIDO. N. Fernandez Arcas¹, J.M. Miranda Sayago¹, C. Benito López¹, A. Reyes Engel², J. Carrera Rodríguez¹, A. Alonso Ortiz¹. ¹HUR Carlos Haya, Málaga. ²Universidad de Málaga.

Las células madre mesenquimales humanas (hMSCs) se han convertido en una de las principales promesas en la medicina regenerativa, debido a su capacidad para diferenciarse hacia diferentes linajes

de potencial uso en terapias celulares. Las hMSCs pueden ser aisladas desde diferentes tejidos mediante técnicas más o menos invasivas y son caracterizadas mediante un criterio mínimo internacional.

Junto a la capacidad de diferenciarse hacia poblaciones de interés, las MSCs han demostrado tener capacidades inmunomoduladoras. En la actualidad múltiples son las investigaciones que se están realizando con el fin de esclarecer cuáles son los mecanismos implicados en la inmunomodulación que ejercen estas células.

La médula ósea es la principal fuente para la obtención de poblaciones mesenquimales (BM-MSC), pero recientemente nuevas fuentes han surgido como contrapunto a las BM-MSCs. Una de estas nuevas fuentes es el líquido amniótico. El líquido amniótico es obtenido mediante técnicas mínimamente invasivas en los procedimientos de amniocentesis para diagnóstico prenatal y se ha demostrado como una importante fuente para el aislamiento de hMSCs.

Hoy por hoy se desconoce cuál es el comportamiento que presentan las células madre mesenquimales humanas derivadas del líquido amniótico (hAF-MSCs), y si poseen las mismas capacidades de inmunomodulación que las hBM-MSCs. Lo que sí está confirmado es que el líquido amniótico presenta capacidades inmunomoduladoras.

Campioni et al. proponen al marcador CD90, uno de los empleados para la caracterización de las hMSCs, como un indicador de las capacidades inmunomoduladoras. Observan que una disminución en los niveles de expresión de CD90 se asocian directamente con una disminución en las capacidades inmunomoduladoras de las hBM-MSCs conforme el cultivo progresa.

En el presente trabajo, se realiza una caracterización de las AF-MSCs en cultivo *in vitro* indefinido, centrándonos especialmente en las variaciones en los niveles de expresión de CD90.

SESIÓN 12: INMUNIDAD Y TRASPLANTE

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

P-136

VALOR PRONÓSTICO DE LA DETERMINACION DE IL-10 TRAS UN RECHAZO EN TRASPLANTE DE HIGADO. B. Manzaneres Martín, R. González Fernández, M. De La Mata García, S. Rufián Peña, L. Castro Orgaz, J. De La Torre Cisneros, J. Peña Martínez. Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Actualmente sigue resultando de gran interés definir diferentes marcadores que puedan determinarse de forma rutinaria y sirvan de ayuda para establecer una inmunosupresión individualizada en los enfermos trasplantados. En concreto, la IL-10 podría ser un buen candidato debido a su potente acción inmunosupresora y antiinflamatoria.

Objetivos. Establecer el valor pronóstico de los niveles de IL-10 tras un rechazo en trasplantados de hígado. Determinar el riesgo posterior de infección y rechazo.

Material y métodos. Se analizaron muestras de 25 pacientes trasplantados de hígado en nuestro hospital recogidas en el pretrasplante inmediato y postrasplante (días 1, 3, 5, 7, 15, 30 y posteriormente un control al mes hasta el año. Este control se intensificó durante los cuadros infecciosos o de rechazo. Para la determinación en suero de IL-10

se utilizó la técnica Quantikine de R&D Systems. El diagnóstico y grado de rechazo se hizo por criterios clínicos y anatomopatológicos según protocolos de seguimiento vigentes en este hospital. Los cuadros infecciosos fueron diagnosticados según los criterios establecidos en cada caso.

Resultados. La elevación de IL-10 en el periodo inmediato posterior a un rechazo se correlaciona con pronóstico favorable en cuanto se observa un bajo índice de rechazos e infecciones durante la evolución del paciente. Sin embargo la disminución de IL-10 en este mismo periodo se correlaciona con pronóstico desfavorable. La etiología de la infección observada parece no depender de los niveles de IL-10. En la evolución posterior, bajos valores de IL-10 en suero, o disminución respecto a valores anteriores, se relacionan con rechazo en pacientes trasplantados de hígado y al contrario si los valores de IL-10 están elevados. Se presentarán también los datos de cada paciente en los casos que sufrieron rechazo.

En **conclusión**, estos resultados podrían aconsejar la monitorización de IL-10 de los enfermos trasplantados de Hígado una vez hayan tenido un episodio de rechazo.

P-137

LA ELECCIÓN DE INMUNOSUPRESOR TIENE UN PAPEL FUNDAMENTAL EN EL DESARROLLO DE HEPATITIS INMUNE DE NOVO MEDIADA POR ANTICUERPOS ANTI-GLUTATION S-TRANSFERASA T1. I. Aguilera García¹, J.M. Sousa Martín², J.M. Praena³, M.A. Gómez Bravo², L. Barrera Pulido², A. Núñez Roldán¹. ¹Instituto de Biomedicina de Sevilla, H. U. Virgen del Rocío, Sevilla. ²H. U. Virgen del Rocío. ³Fundación Pública Andaluza para la investigación.

Objetivos. Analizar la influencia potencial que un grupo de factores puede tener sobre el proceso denominado hepatitis inmune *de novo*, complicación a largo plazo del trasplante hepático. Resultados experimentales de nuestro grupo demuestran que este proceso es una forma especial de rechazo debido a la incompatibilidad para el gen de la Glutacion S-transferasa T1 (GSTT1) entre donante (positivo) y receptor (nulo), con presencia de anticuerpos anti-GSTT1 donante-específicos. Sin embargo, no en todos los casos se desencadena la respuesta inmune.

Materiales y métodos. El estudio incluye 162 pacientes con un seguimiento medio de 32 meses (17-47). El genotipo GSTT1 se determinó mediante PCR. Los anticuerpos se detectaron por IFI y ELISA. Las variables estudiadas fueron las siguientes: causa del fallo hepático, edad y sexo de donante y receptor, terapia inmunosupresora, infección por citomegalovirus, episodios de rechazo agudo y crónico, gammapatía monoclonal, picos de IgG y presencia de otros anticuerpos. Los análisis estadísticos se realizaron mediante el sistema SPSS (2, test exacto de Fisher).

Resultados. 35 de los 162 pacientes (21,6%) conformaban el grupo de receptores GSTT1 nulos con donantes GSTT1 positivos. Con ellos se continuó el estudio, dado que es el único grupo donde pueden ocurrir los dos acontecimientos de interés: producción de anticuerpos anti-GSTT1 y desarrollo de hepatitis inmune *de novo*. 18 de los 35 (51,4%) produjeron anticuerpos y 9 de los 35 (25,7%) desarrollaron la enfermedad. La mayoría de las variables analizadas, no parecen tener efecto sobre los acontecimientos de interés, excepto la terapia inmunosupresora. Cuando comparamos el grupo que tomaba ciclosporina (CsA) con el grupo que tomaba tacrolimus (Tac)(en ambos casos podía estar combinado con MMF) vemos que la utilización de Tac tiene una cla-

ra influencia en que se evite la producción de anticuerpos y en la prevención de la hepatitis inmune *de novo*. El número de pacientes sin anticuerpos en el grupo de Tac fue significativamente mas alto que en el de CsA (94,1% vs 5,9%, $p=0,001$). Con respecto al desarrollo de la enfermedad se observó un efecto protector del Tac frente a CsA (80,8% vs 19,2%, $p=0,003$).

Conclusión. La elección de inhibidor de la calcineurina puede tener consecuencias en cuanto al desarrollo de la hepatitis inmune *de novo* post-trasplante hepático mediada por anticuerpos anti-GSTT1.

P-138

PLASMAPHERESIS/IVIG/ANTI-CD20 COMBINATION DOES NOT MODIFY PRA PERCENTAGE BY LUMINEX TECHNOLOGY BUT DECREASE THE DSA MFI LEVELS IN KIDNEY TRANSPLANT: IS THE PRA CONCEPT OBSOLETE? F. Boix Giner, S. Llorente, G. Salgado, J.M. Alemany, M. López, R. López, M.J. González, J.A. Campillo, A. Minguela, M.R. Álvarez-López, M. Muro. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Anti-donor specific HLA antibodies (DSA) have been recognized as a major cause of graft loss in the last few years. Particularly, in HLA class II antibody screening, newer serum screening methods, such as Luminex technology, have greatly enhanced specificity analysis of anti-HLA class II antibodies in sensitized patients. Con el analizador luminex, la fluorescencia de las microesferas expresada como intensidad media de fluorescencia (MFI) es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpo unido a las microesferas.

Objetivos. This work presents a very interesting clinical case with desensitization protocol with plasmapheresis/IVIG and anti-CD20 and as the values of MFI units indicate the successful treatment evolution, in opposite to PRA data outcome.

Clinical case. A Caucasian 70-year-old-woman was transplanted in our hospital with a deceased donor (71 years-old). The HLA matching between donor-recipient was zero (only matched age). Our patient was not sensitized to HLA antigens, with a PRA level approaching 0% by luminex and CDC techniques. Before transplantation, cross-matching (CM) by standard CDC assay was negative.

In the immediate post-transplant (PO) period, the patient had important instability in renal function. In the post-transplantation monitoring (15th PO), we detected anti-HLA class II antibodies (IgG) by Luminex (LabscreenMix, OneLambda, CA). Anti-HLA class I and anti-MICA antibodies screening was negative. Secondly, we detected anti-DRB1*04 and DQB1*0302 (donor's typing had these alleles) antibodies with MFI=5673 and PRA=36% (LabscreenPRA, OL). A week later (22th PO), the patient was more highly positive reaching MFI=7986 and PRA=34%. With these facts, nephrologists in our hospital indicated a renal biopsy which was compatible with humoral rejection, positive for C4d deposition. She was pulsed with corticosteroids, plasmapheresis and IVIG without functional improvement. The MFI data one week later was not different to the previous samples.

Thus, we added anti-CD20 (Rituxan) and the initial clinical response was highly favorable. Biopsies on 45th PO resulted in suggestive reversion of the rejection. Analysis of the serum on the 45th PO disclosed that the MFI of the anti-donor DR4 had fallen to 2.021 (PRA=35%) and seven days later to 1176 (PRA=34%). However, all samples in this study showed a similar PRA level of 34-36%.

Conclusion. The PRA concept with respect to humoral rejection evolution by luminex technology could be apparently obsolete and it could be more useful the MFI level quantification.

P-139

LAS CÉLULAS T REGULADORAS (CD25⁺CD127^{LOW}/CD4⁺FOXP3⁺) COMO MARCADOR DE ALTERACIONES DE LA GLUCOSA EN EL TRASPLANTE RENAL. A. Marín, B. Bayés, M. Granada, M.C. Pastor, A. Sánchez, R. Lauzurica, R. Romero, R. Pujol-Borrell, E. Martínez-Cáceres. Hospital Germans Trias i Pujol (LIRAD-BST), Badalona.

Estudios en la población general han demostrado el papel de las células T reguladoras y la inflamación en la aparición de diabetes mellitus (DM).

Objetivo. Determinar la incidencia de alteraciones de la glucosa (AG) en el post-trasplante renal. Determinar la relación entre las AG y el fenotipo linfocitario así como con los niveles de citocinas proinflamatorias/inmunomoduladoras.

Metodología. 55 pacientes no diabéticos sometidos a trasplante renal (TR). 66% hombres. Edad: 48±13 años. Inmunosupresión (IMS): basiliximab, prednisona, tacrolimus y micofenolato. A los 3 meses post-trasplante se realizó Test de tolerancia oral a la glucosa (TTOG)(75g glucosa) para clasificar las AG según criterios de la American Diabetes Association (ADA). El análisis de subpoblaciones linfocitarias CD3, CD4, CD8, DP γδ, Treg (CD25⁺127^{low}/CD4⁺Foxp3⁺), NK (CD16⁺/56⁺), NK CD56^{high}, iNKT, CD19⁺, LB transicionales (CD19⁺CD27⁺CD24⁺CD38⁺) se realizó por citometría de flujo en muestras de sangre fresca preTR, 1m-postTR y 3 m-postTR, junto a la determinación sérica de PCR, IL6, TNFγ, IL10, RIL2, TGFβ. También se determinaron los niveles de glucosa, insulina, hemoglobina glicosilada (HbA1c), triglicéridos y adiponectina.

Resultados. Tras el trasplante se observó un incremento de la HbA1c y triglicéridos y disminuyeron la adiponectina y los niveles de citocinas pro-inflamatorias ($p<0,05$). El fenotipo linfocitario se vio alterado por el tratamiento IMS en la mayoría de las subpoblaciones analizadas, de forma más acentuada a 1m post-TR. El % de Treg descendió al mes del TR y posteriormente se recupera sin llegar a alcanzar, a los 3m, las concentraciones basales.

Un 32% de los pacientes presentaron AG, siendo la intolerancia oral a la glucosa la AG más frecuente. PreTR no se observaron diferencias entre normoglicémicos (NG) y AG en: glicemia, HbA1c, triglicéridos, adiponectina y niveles de citocinas, aunque los pacientes con AHG presentaron a los 3 m postTR una menor concentración de TGFβ ($p=0,028$). En relación a las subpoblaciones celulares, el análisis estadístico mostró que existe una relación inversa entre Treg y glucemia ($r=-0,271$, $p=0,05$) e insulina ($r=-0,328$, $p=0,026$). El % de Treg respecto al total de CD4⁺Foxp3⁺ era menor en los pacientes que desarrollaron AG (preTR: NG 76 ± 8% vs AG 70 ± 9% $p=0,038$ y 3 m postTR: NG 72 ± 8% vs AG 65 ± 10% $p=0,018$) no observándose diferencias significativas en las otras subpoblaciones. La regresión logística de alteraciones de la glucosa a los 3 meses postTR frente a la edad, Treg preTR y adiponectina preTR puso de manifiesto que el porcentaje de Treg es un factor de riesgo independiente de AG en el postTR (Treg: $\beta=-1,94$, $\text{sig}=0,041$, Exp $\beta=0,143$).

Conclusiones. Las AG son frecuentes en el postTR. Los marcadores clásicos como las citocinas pro-inflamatorias y la adiponectina no permiten predecir qué paciente presentará AG. El porcentaje de Treg

es un predictor de AG, lo que sugiere que en la aparición de AG post-TR puede existir un componente inmunitario.

P-140

TRATAMIENTO DE DESENSIBILIZACIÓN CON UN INHIBIDOR DEL PROTEOSOMA EN UN PACIENTE HIPERINMUNIZADO. M. Vilches, T. García Álvarez, A. Mazuecos Blanca, A. Nieto. Hospital Puer-ta del Mar, Cádiz.

Muy recientemente, algunas series de casos han sugerido que el inhibidor del proteosoma bortezomib tiene efecto directo sobre las células plasmáticas secretoras de anticuerpos en pacientes con rechazo del injerto. Sin embargo, la capacidad de este agente para desensibilizar candidatos a trasplante, los cuales no reciben inmunosupresión, es actualmente desconocida.

En el presente trabajo, un paciente altamente sensibilizado (CDC PRA= 92%) en lista de espera tras un primer trasplante fue sometido a tratamiento de desensibilización con inmunoglobulinas iv a altas dosis (días 0 y 31) y Rituximab (días 7 y 22). Dado que no se observaron variaciones en los niveles de anticuerpos anti-HLA, se ensayó la administración de bortezomib, 1,3 mg/m² a días 1, 4, 8 y 11. Se tomaron muestras antes del inicio del tratamiento, y a los 10 y 28 días post-tratamiento. Se realizó monitorización de anticuerpos anti-HLA mediante microesferas de antígeno único clase I y clase II con suero puro y dilución 1/100. Asimismo, se procedió a determinación de PRA por CDC, y se midieron las concentraciones de inmunoglobulinas, de anticuerpos específicos frente a una batería de virus y de poblaciones linfocitarias.

Con los sueros puros se observó una discreta disminución progresiva en la intensidad de fluorescencia de los sueros postratamiento en todos y cada uno de los antígenos HLA positivos (32 de clase I y 27 de clase II). Esta disminución fue mucho más evidente en los sueros a dilución 1/100 (disminución media del 15,4% y 39,5% a los 10 y 28 días postratamiento respectivamente en antígenos de clase I, y del 38,1% y 56,6% en antígenos de clase II). Sin embargo, no se observó disminución en el PRA (93%).

En conclusión, un ciclo aislado de bortezomib puede tener un efecto insuficiente en pacientes con una concentración elevada de anticuerpos anti-HLA.

P-141

EL EMPLEO DE PCR EN TIEMPO REAL PROPORCIONA UN INCREMENTO EN LA CAPACIDAD DE PREDICCIÓN DE RECAÍDAS TUMORALES POST-TRASPLANTE ALOGENICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS. A. Balas Pérez, F. García Sánchez, J.L. Vicario Moreno. HICENTRO de Transfusión de Madrid, Madrid.

La recidiva tumoral es una de las causas más frecuentes de mortalidad post-trasplante de progenitores hematopoyéticos en pacientes con leucemia.

Tras el trasplante de progenitores, es de especial interés determinar si el nuevo sistema hematopoyético es de origen autólogo, pertenece al donante o existe una mezcla de ambos. En la actualidad este tipo de información se obtiene mediante estudios de quimerismo genético, utilizando como metodología básica el estudio de sistemas VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o STR (Short Tandem Repeats). Recientemente se han desarrollado estrategias basadas en el empleo de tec-

nología de PCR cuantitativa en tiempo real (qrt-PCR), empleando polimorfismos de un único nucleótido (SNP) o de inserción-delección (indels).

El objetivo del presente trabajo es la comparación de las tecnologías de STR y qrt-PCR en un estudio retrospectivo de pacientes sometidos a trasplante, con el fin de determinar correlación entre ambos sistemas así como su nivel de sensibilidad comparado. Asimismo, se analizó un grupo de pacientes que han sufrido recaída tumoral, con el fin de determinar cual de las dos metodologías permite una mayor predicción de recaída y en que grado.

El estudio de quimerismo mediante sistemas STR se llevo a cabo utilizando un panel de 10 sistemas genéticos (VWA, F13A1, LPL/LPS, TPOX, D16S539, D21S11, D22S689, Amelogenina, D7S820, D18S51) analizados en un secuenciador ABI 3130. Por otro lado, para el análisis mediante qrt-PCR se emplearon 34 indels englobados en el AlleleSEQR chimerism assay (Celera Corporation, Alameda,CA) empleando un equipo ABI 7500.

De la comparación de ambas metodologías se puede concluir que:

1. En el 100% de las parejas receptor/donante analizadas mediante qrt-PCR se han encontrado al menos un sistema informativo, obteniéndose una media de 4 y 7 sistemas informativos para donantes emparentados y no emparentados respectivamente.
2. La comparación de los resultados obtenidos mediante ambas metodologías sobre muestras control obtenidas por dilución límite del componente menor, demuestra una sensibilidad del 1% y 0,01% para PCR-STR y qrt-PCR respectivamente. La correlación entre ambos métodos se ha estimado en R²=0,988. Asimismo la correlación entre la dilución teórica y la obtenida por qrt-PCR es 0,989 para diluciones del 25% al 0,05%, siendo aún mayor, 0,999, para las diluciones en el rango 1%-0,05%. Para este rango de dilución, la correlación con el teórico para STR fue solo del 0,88%.
3. El análisis de recidivas mostró que en 11 de las 15 recaídas analizadas se detectó incremento de quimera mediante qrt-PCR y no mediante STR, obteniéndose una anticipación media en el diagnóstico de recaída de 75 días.

La metodología de qrt-PCR aplicada al estudio de quimerismo post-trasplante hematopoyético proporciona una mayor sensibilidad y aplicabilidad clínica que métodos basados en PCR convencional.

P-142

GSTT1, UNA NUEVA DIANA POTENCIAL PARA LA ENFERMEDAD INJERTO CONTRA HUÉSPED CON AFECTACIÓN HEPÁTICA TRAS EL TRASPLANTE ALOGÉNICO DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS. M.J. Martínez-Bravo¹, I. Tallón², I. Espigado², Á. Urbano-Ispizúa², A. Núñez-Roldán¹, I. Aguilera¹. ¹Hospital Universitario Virgen del Rocío-IBIS, Sevilla. ²Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción. La GSTT1 (Glutathion S-Transferasa T1) se ha descrito como sistema menor de histocompatibilidad en trasplante hepático y renal, debido a la presencia de un 20% de genotipo nulo en la población caucásica. En ambos trasplantes se observó un rechazo mediado por anticuerpos en pacientes GSTT1 negativos que recibieron un injerto de un donante GSTT1 positivo. El objetivo de este estudio es analizar el papel de los anticuerpos anti-GSTT1 en un paciente sometido a Trasplante Alogénico de Progenitores Hematopoyéticos (TAPH) afectado por Enfermedad Injerto Contra Huésped (EICH) hepática.

Materiales y métodos. La presencia de anticuerpos se realizó usando técnicas de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI) sobre tejido triple de rata. Se confirmó mediante ELISA, con la GSTT1 recombinante humana. El genotipo para la GSTT1 se realizó por PCR.

Resultados. Varón, de 33 años, fue sometido a un TAPH de sangre periférica de su hermana, HLA idéntica, de 31 años y múltipara. El día +30, el paciente tenía aumentados los niveles de enzimas hepáticas en sangre periférica (ALT 234 UI/L; AST 129 UI/L; γ -GTP 926 UI/L; ALP 1918 UI/L, Bilirrubina Total (BT) 9,78 mg/dL). Fue diagnosticado de EICH hepática aguda, sin afectación intestinal ni cutánea, tratándose con Prednisona (PDN) (1 mg/kg/d) a partir del día +35. La función hepática se normalizó el día +74, retirándosele la PDN. En el mes +5, el nivel de enzimas hepáticas volvió a aumentar reintroduciéndose la PDN. En este momento se sospechó una posible hepatitis autoinmune. El suero del paciente presentaba anticuerpos anti-nucleares y anti-GSTT1. Se analizó el ADN y se comprobó que el paciente era heterocigoto para la GSTT1, mientras que su donante era homocigota nula. La donante poseía un bajo título de anticuerpos anti-GSTT1 (1:40) en suero resultado de la exposición al antígeno que tuvo lugar durante tres embarazos de embriones GSTT1 positivos. El paciente fue sometido a un segundo TAPH en el mes +11, reactivándose la hepatitis causada por GSTT1 el día +61. Se trató con PDN y mejoró en el día +90. En el mes +8 ingresa con EICH crónica cutánea y hepática (BT 65 mg/dL) alcanzando el exitus por encefalopatía hepática un mes después.

Conclusión. Se propone que las células B memoria anti-GSTT1 presentes en el injerto, una vez activadas en el organismo huésped por las moléculas GSTT1 expresadas en el hígado del paciente, produjeron la síntesis de anticuerpos anti-GSTT1. El antígeno GSTT1 debe ser considerado una nueva diana para la EICH con afectación hepática.

P-143

CUANTIFICACIÓN DE CADENAS LIBRES LIGERAS (SCLL) SÉRICAS EN TRASPLANTE RENAL. IMPLICACIÓN EN LA MONITORIZACIÓN DE GAMMAPATÍAS MONOCLONALES (GMM) TRAS TRASPLANTE. M. Sánchez Castañón, M. Gago, G. Fernández-Fresnedo, C. Gomez, J. Ruiz-Criado, M. López-Hoyos, M. Arias. Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander.

Introducción. Las GMN son causa de patología renal. Recientemente se han introducido metodologías muy sensibles de cuantificación de sCLL. Se ha descrito variabilidad de estos métodos relacionada con la función renal y no se han estudiado en el trasplante renal. Hemos analizado la asociación entre los niveles de sCLL policlonales en trasplantados renales (TR) con diferente función renal.

Material y métodos. Se estudiaron 100 pacientes TR y 53 enfermos renales crónicos estratificados por función renal (K/DOQI). Ningún paciente tenía GMN. Los niveles de sCLL policlonales se cuantificaron mediante nefelometría (The Binding Site).

Resultados. La concentración de sCLL κ y λ aumentó con el estadio K/DOQI tanto en los trasplantados (9 veces superior en estadio 5 para κ y 5 para λ respecto a estadio 1) como en los no trasplantados (6 veces superior para κ y λ respecto a estadio 1). Dichos niveles se correlacionaron significativamente ($p < 0,001$) con creatinina sérica (0,532 y 0,513 en trasplantados y 0,783 y 0,849 en no trasplantados), cistatina sérica (0,648 y 0,614 en trasplantados y 0,800 y 0,837 en no trasplantados) y β_2 microglobulina (0,722 y 0,688 en trasplantados y 0,912 y 0,875 en no trasplantados). El ratio κ/λ no varió en ninguno de los dos grupos de estudio ni mostró correlación la función renal. Estos datos no se influyeron por la inmunosupresión empleada.

Conclusión. Los niveles séricos de CLL deben interpretarse con cautela por su clara asociación con la función renal. El trasplante renal no induce cambios diferentes de los derivados de la función renal.

P-144

ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO KIR EN TRASPLANTE HEPÁTICO. I. Legaz Pérez¹, J.A. Campillo Marquina¹, M.D.R. López-Álvarez¹, J.M. Bolarín Guillén¹, B. Las Heras Ferre¹, S. Soriano Díaz¹, N. Gómez-Lozano², C. Alonso Blanco³, M.D.R. Álvarez-López¹, C. Vilches Ruiz², A. Mingueta Puras¹. ¹Hospital Virgen de la Arrixaca y Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas (CIBEREHD). Murcia, Churra. ²Hospital Universitario Puerta Del Hierro. Madrid. ³Hospital Universitario Juan Canalejo, A Coruña.

El aloinjerto hepático es bien aceptado en ausencia de compatibilidad HLA, sin embargo recientemente se ha sugerido un papel del locus HLA-C en la evolución del mismo a corto y largo plazo. Previamente se ha propuesto la participación de las células NK en la alorespuesta contra injertos. Tanto las células NK como los linfocitos T pueden expresar receptores KIR (del inglés, *Killer Immunoglobulin-like receptors*), los cuales a través de la interacción con sus correspondientes ligandos HLA de clase I son capaces de regular la actividad citotóxica de dichas células. Se sabe que las células NK son importantes en el trasplante de células madre hematopoyéticas, en el que los receptores KIR pueden ejercer un papel modulador. Sin embargo hay pocos trabajos referidos al trasplante de órganos sólidos. El interés del presente trabajo fue analizar si los genes KIR ejercen algún papel en trasplante hepático.

Un total de 402 trasplantes hepáticos fueron incluidos en el estudio. Los trasplantes se clasificaron en dos grupos de acuerdo a la presencia o ausencia de episodios de rechazo agudo: RA (n=110) y NRA (n=292). El DNA genómico se extrajo usando QIAamp DNA Blood Midi Kit a partir de sangre periférica de pacientes y nódulos linfáticos o bazo de donantes y el genotipaje KIR de pacientes y donantes se realizó mediante PCR-SSP.

La frecuencia de genes y genotipos KIR observada en nuestro grupo de receptores hepáticos resultó similar a la de la población control, así como a la frecuencia previamente observada en otras poblaciones caucásicas, con la excepción del gen KIR2DS5 cuya frecuencia apareció significativamente aumentada en el grupo de pacientes con respecto al de donantes sanos (34% vs 25%; $P = 0,016$). Por otra parte el análisis de genes y genotipos KIR en los grupos de pacientes en RA y NRA tampoco mostraban diferencias significativas.

En conclusión, no se detectó una asociación entre el polimorfismo KIR y la aceptación o el rechazo agudo temprano de injertos hepáticos, pero consideramos que se requieren futuros estudios para analizar si los receptores KIR en combinación con sus correspondientes ligandos HLA-I pueden estar implicados en el desenlace de estos injertos.

P-145

SEGURIDAD DEL USO DE GAMMAGLOBULINA INTRAVENOSA EN PACIENTES CON HIPOGAMMAGLOBULINEMIA E INFECCIONES GRAVES POST TRASPLANTE CARDIACO: 14 AÑOS DE EXPERIENCIA. J. Carbone Campoverde, N. Del Pozo Rodríguez, J. Rodríguez Molina, J. Navarro Caspistegui, J. Fernandez-Yañez, J. Palomo, P. Muñoz, C. Rodríguez, M. Ruiz, E. Sarmiento Marchese. Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción. La hipogammaglobulinemia IgG y la deficiencia de anticuerpos específicos son factores de riesgo de infección en el trasplante cardíaco. Evaluamos la eficacia inmunológica y la seguridad de la terapia sustitutiva con gammaglobulina intravenosa (GGIV) en

pacientes con hipogammaglobulinemia IgG tras el trasplante asociada a infecciones graves.

Métodos. 55 receptores cardiacos tratados con GGIV (Grupo-GGIV) desde 1996. 55 pacientes trasplantados sin infecciones severas y que no recibieron GGIV fueron estudiados como controles (Grupo sin-GGIV). Definición de hipogammaglobulinemia IgG: IgG < 600 mg/dl (nefelometría). Definición de infección: toda infección grave que requirió tratamiento IV. Indicación de GGIV (uso pasivo): Terapia de reposición en trasplante cardiaco con hipogammaglobulinemia secundaria e infección grave. El 85% de las infecciones se produjeron durante los primeros 3 meses. Las infusiones de GGIV se iniciaron tras el diagnóstico de infección. Protocolo: GGIV al 5% pasteurizada; dosis de 300-400 mg/kg/mes. Objetivo: alcanzar concentraciones normales de IgG (>700 mg/dl). Velocidad de infusión: 0,01 a 0,04 ml/kg/min.

Resultados. Distribución de infecciones: Bacterianas, n=19; bacteriana+infección CMV, n=8; bacteriana+fúngica, n=4; bacteriana+clostridium difficile (CD), n=2; infección por CMV tratada con ganciclovir, n=15; infección CMV+CD, n=2; infección CMV+bacteriana+aspergilosis, n=4; nocardiosis pulmonar, n=1. En el grupo-GGIV se documentó una menor concentración de IgG sérica antes del trasplante (936 vs 1.235 mg/dl, p=0,012), a los 7d (577 vs 778, p<0,001), 1 m (553 vs 684, p=0,003) y cuando se detectó la infección [475 vs 684, p<0,001]. Tras el uso de GGIV, las concentraciones de IgG de los pacientes tratados fueron similares a las del grupo control sin-GGIV a los 3 m (681 vs 737, p=0,25) y 6 m (736 vs 769, p=0,46), mientras que la concentración de albumina fue menor en estos pacientes en ambos puntos. No hubieron pacientes con hipermetabolismo de IgG. Las infusiones de GGIV fueron bien toleradas. No se observaron reacciones adversas moderadas ni graves. No hubo complicaciones trombóticas. Las concentraciones post-tratamiento de urea, creatinina, GOT, GPT, GGT, bilirrubina, C3 y C4 al mes, 3 m, 6 m y 12 m post-trasplante fueron similares en ambos grupos.

Conclusión. La terapia con GGIV se asoció con reconstitución de niveles de IgG y fue bien tolerada en pacientes sometidos a trasplante cardiaco con hipogammaglobulinemia IgG e infecciones graves post-trasplante.

P-146

PRESENCIA DE ANTICUERPOS DONANTE ESPECÍFICOS FRENTE A DIVERSOS SISTEMAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD EN PACIENTES CON SIGNOS DE RECHAZO HUMORAL. J.L. Caro Oleas¹, A. Álvarez Márquez², M.J. Acevedo Calado¹, G. Bernal¹, R. Cabrera¹, M.Á. Gentil¹, I. Aguilera¹, A. Núñez Roldán¹. ¹Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. ²Coordinación Autonómica de trasplante.

Como continuación de un trabajo anterior (2009), mostramos 14 nuevos casos de pacientes trasplantados renales con sospecha de rechazo humoral y depósitos de C4d en biopsias. Objetivo: Estudiar la relevancia de ciertos sistemas de histocompatibilidad (GSTT1 y MICA), así como de los anticuerpos anti-HLA detectados por Luminex, en el rechazo.

Material y métodos. 14 pacientes trasplantados con una prueba cruzada por CDC negativa que desarrollan rechazo humoral, puesto de manifiesto por la detección de C4d en biopsias renales y el deterioro en la función renal. Estudiamos la presencia, en sueros previos y posteriores al trasplante de, anticuerpos anti-HLA clase I y clase II específicos del donante y de anticuerpos anti-MICA, todos ellos, mediante Luminex (Single Antigen y/o crossmatch Luminex). Además, estudiamos anticuerpos anti-GSTT1 mediante ELISA.

Resultados. En el suero pre-trasplante estudiamos retrospectivamente, la presencia de anticuerpos (anti-HLA, anti-MICA y anti-GSTT1). Detectamos anticuerpos anti-HLA clase I en 3 pacientes, anti-HLA clase II en 1 paciente, anti-HLA clase I+II en 1 paciente y anti-HLA clase II+MICA en un caso. En los 8 casos restantes no detectamos ningún anticuerpo en el suero pre-trasplante. En los sueros post-trasplante coincidentes con la biopsia C4d positiva, detectamos la producción de anticuerpos de novo, no detectados en el suero pre-trasplante en 4 casos. En total, hay un paciente con anti-HLA clase I, 2 con anti-HLA clase II, 1 con anti-GSTT1, y 3 con una mezcla de anticuerpos, clase HLA I+II=3 casos, HLA clase II+MICA=2 y HLA clase I+GSTT1=1. En otros 4 pacientes no detectamos ninguno de éstos anticuerpos. Respecto a la evolución clínica de los pacientes, 2 de ellos fallecieron con el órgano funcionante (1 sin anticuerpos detectables y el otro con anti-HLA clase I+II), 4 pacientes han vuelto a hemodiálisis (1 con HLA clase II+MICA, 1 con HLA clase I+GSTT1, 1 con GSTT1 y 1 con HLA clase I+II). Y los 8 restantes tienen una buena función renal a pesar de que en la mitad de ellos detectamos algún anticuerpo (4/8).

Conclusiones. Entre los pacientes con signos de rechazo humoral, encontramos un alto porcentaje que presentan anticuerpos anti-HLA donante específicos detectables por Luminex tanto previos como posteriores al trasplante, así como algunos otros con anticuerpos anti-GSTT1 y anti-MICA.

P-147

COMPARACIÓN DE DOS MÉTODOS BASADOS EN LA TECNOLOGÍA LUMINEX PARA EL ESTUDIO DE ANTICUERPOS DONANTE ESPECÍFICOS. J.L. Caro Oleas, M.F. González Escribano, S. Toro Llamas, M.J. Acevedo Calado, M.J. Martínez Bravo, I. Aguilera García, A. Núñez Roldán. Hospital Universitario Virgen del Rocío/ Servicio de Inmunología, Sevilla.

Al objeto de conocer si el rechazo de un órgano trasplantado es de naturaleza humoral, es preciso detectar la presencia de anticuerpos donante específicos en el suero del receptor (criterios de Banff). Para ello, se dispone de 2 métodos: 1) Single Antigen (SA), que emplea microesferas recubiertas con antígenos recombinantes y 2) crossmatch Luminex (Xm-DSA) que se realiza a partir de moléculas HLA aisladas de los propios donantes.

Objetivo. Comparar la sensibilidad entre ambos ensayos.

Material y métodos. 24 sueros de mujeres embarazadas, que reconocían por CDC distintas especificidades tanto de clase I (14 sueros) como de clase II (10 sueros). Estos sueros se estudiaron mediante SA y Xm-DSA netos y diluidos. En el Xm-DSA un mismo suero se enfrentó con diferentes lisados (total lisados: 42 y total Xm-DSA: 61, 42 para clase I y 19 para clase II). Analizamos diferencias de sensibilidad entre ambos ensayos evaluando la máxima dilución positiva (MDP). También analizamos la posible influencia de la dosis antigénica (DA), es decir, la coincidencia de más de 1 antígeno HLA reconocido por el suero en lisado o la presencia de homocigosis.

Resultados. En general, la máxima dilución positiva fue mayor en la técnica del SA (66,7% de los sueros anti HLA-A, 57% de los sueros anti HLA-B y 87% de los sueros anti HLA-DR). En el caso de los sueros anti-DQ, la técnica Xm-DSA fue incapaz de detectar anticuerpos en 2 de 4 casos. En los otros dos, el SA fue más sensible.

Dosis antigénica: se incluyeron 40 casos (18 con 1 DA y 22 con >1 DA). No observamos incremento en la sensibilidad de la técnica cuando teníamos más de 1 DA.

Conclusiones. En general, la sensibilidad del SA es mayor que la del Xm-DSA, sobre todo para los antígenos DQ, que se captan menos eficientemente. Las discrepancias entre ambos métodos no son atribuibles a la DA por lo que otros factores deben ser postulados.

P-148

DESARROLLO DE UNA LEUCEMIA AGUDA MONOCÍTICA (M5) EN UNA PACIENTE 17 AÑOS DESPUES DE UN TMO POR UNA LEUCEMIA AGUDA PROMIELOCÍTICA (M3). P. Jiménez Gámiz, J. Palacios, P. Garrido, A. Cabrera, A. Fernández, J.M. De Pablos, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Una mujer de 29 años fue diagnosticada en marzo de 1993 de Leucemia Aguda Promielocítica, M3 de la clasificación FAB. Como tratamiento se realizó un trasplante de médula ósea alogénico de una hermana HLA idéntica. Después de 17 años asintomática, en marzo de 2010 la paciente es ingresada nuevamente en el servicio de hematología y se le diagnostica una Leucemia Aguda Monocítica, M5 de la clasificación FAB. Puesto que el fenotipo de los blastos, determinado por citometría de flujo, difería de los detectados en el primer diagnóstico, investigamos el origen de la hematopoyesis mediante análisis de STRs, confirmando que el proceso leucémico tenía su origen en las células del donante.

El desarrollo de un proceso leucémico en las células del donante es una rara complicación del trasplante de médula ósea que puede aparecer tras un periodo de latencia de 4 a 164 meses. En la patogénesis de esta complicación se ha implicado a varios factores como la quimioterapia y la radioterapia utilizada en el tratamiento y en el acondicionamiento previo al trasplante, la existencia de una respuesta inmune deficiente en el huesped y el estrés originado por la respuesta alogénica del donante en el microambiente de la médula ósea del huesped, lo que conduce a la aparición de alteraciones genéticas en las células del huesped. No disponemos de datos sobre estudios genéticos de la primera leucemia. La segunda leucemia se estudió mediante FISH no detectándose la t(15;17), sin embargo detectamos una delección en el cromosoma 11q23. Otros autores han evidenciado anomalías en el cromosoma 11 (específicamente en 11q23) asociadas a la administración de inhibidores de la topoisomerasa II. Asimismo, las delecciones 5q y 7q se han asociado a los tratamientos con agentes alquilantes.

Creemos que es necesario realizar un estudio exhaustivo de los procesos leucémicos post-trasplante hematológico mediante la combinación de diversas técnicas (citometría de flujo, FISH y técnicas moleculares). El análisis profundo de estos procesos contribuirá a su correcto diagnóstico y al esclarecimiento de los mecanismos que intervienen en la génesis de las leucemias.

P-149

SEGUIMIENTO DE UN CASO DE MIELOMA MÚLTIPLE IGE. I. Toboso De Lamo, P. Herrera, M. Cuevas, R. Alenda, L.M. Villar, P. González. Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos. El Mieloma Múltiple IgE (MM IgE) está considerado como una patología de muy baja frecuencia, existen menos de 50 casos descritos en el mundo. El objetivo de nuestro estudio fue establecer la mejor herramienta para el seguimiento de este tipo de pacientes y estudiar su evolución. Hemos realizado el seguimiento del primer caso de Mieloma Múltiple IgE descrito en España, en una mujer de 62 años de

edad, diagnosticada de MM IgE estadio III-B en Marzo de 2009 en el hospital de Alcorcón y remitida a nuestro hospital para la realización de un trasplante autólogo de células hematopoyéticas (TMO).

Material y métodos. Se realizaron las siguientes pruebas:

- Estudio clínico del paciente.
- Espectro Electroforético de suero y orina.
- Inmunofijación (IF) y caracterización del pico monoclonal de IgE.
- Cuantificación de IgE en suero mediante InmunoCap.
- Valoración de proteinuria de Bence-Jones por Inmunofijación.
- Valoración de crioglobulinas.

Resultados. La paciente presentaba lesiones osteolíticas, anemia, hipogammaglobulinemia e hipercalcemia.

En el proteinograma y la IF previos al trasplante, se observa la presencia de un pico monoclonal IgE lambda en suero, que desapareció tras el TMO. También se detectó la presencia de cadenas ligeras lambda de aspecto monoclonal en orina (Bence-Jones Lambda) que igualmente se negativizaron tras el TMO.

Los valores de cadenas lambda libres en suero fueron 22,5 mg/L antes del trasplante y 0,05 mg/L 3 meses después del mismo.

La valoración de crioglobulinas resultó negativa.

Se realizaron dos cuantificaciones de IgE previas al trasplante: En la primera se detectaron unos niveles de IgE lambda de 680.000 KU/L (163,2 mg/dl) y en la segunda se detectaron unos niveles de IgE lambda de 1890000 KU/L (453,6 mg/dl). Destacar que estos valores son los más altos que se han encontrado en un mieloma múltiple IgE (Valores normales 0-30 KU/L).

La cuantificación post-trasplante fue de 175 KU/L (0,042 mg/dl) de IgE lambda.

Conclusión. Dada la baja incidencia de estos mielomas, es importante realizar la mejor caracterización posible de la patología y el establecimiento de los procedimientos de laboratorio que nos permitan su seguimiento. En este caso, concluimos que la cuantificación en suero de la IgE fue la determinación más sensible. Tras el TMO, el pico monoclonal desapareció de suero y orina en la IF y los valores de cadenas libres en suero se normalizaron, pero los niveles de IgE eran todavía superiores a los niveles de referencia. Además se constató que esta paciente mostraba una respuesta óptima inicial al TMO. Futuros estudios demostraran su evolución a largo plazo.

P-150

COMPLEMENTACIÓN DEL ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTI-HLA POR CITOMETRÍA Y EL ANÁLISIS ESTRUCTURAL DE EPI-TOPOS EN LA DEFINICIÓN DE LA RESPUESTA HUMORAL ALOGÉNICA. S. Mirete, N. Marín, A. De Andrés, J.L. Castañer. Hospital Ramon y Cajal, Madrid.

Objetivo. Estudio de la respuesta humoral alogénica en un caso de rechazo agudo acelerado.

Materiales y Métodos. La reactividad de los sueros pre- (incluida la muestra de la prueba cruzada) y post-trasplante se han estudiado mediante citometría de flujo (LABScan 100™): tanto mediante el screening para la presencia de anticuerpos anti-HLA-I, -II y MICA (LSMIX, One Lambda), como para la detección de especificidades de clase I (LS1SA, One Lambda). El análisis estructural de los epítomos implicados en dicha respuesta fue realizado con el algoritmo HLA-MatchMaker Versión 1.3.

Resultados. Varón de 43 años con IRC secundaria a GMN crónica en hemodiálisis desde agosto de 2001, tipaje HLA-A3, A24, B45, B53, DR1 sin

sensibilización alógena previa. Recibe un primer trasplante renal en enero de 2003 con incompatibilidades HLA A26, B35, B64, DR07, DR14, prueba cruzada negativa y función tardía del injerto. El día 14 postrasplante se realiza biopsia renal en la que se observan lesiones histopatológicas atribuibles a rechazo agudo III de la clasificación Banff 97. Vuelta a hemodiálisis en septiembre de 2004 y nefrectomía en 2005. Recibe un segundo injerto renal en enero de 2010 con incompatibilidades HLA-A23, A29; B27, B61, DR11, DR13 y prueba cruzada negativa. Injerto no funcionante que requiere transplantectomía el día 6 postrasplante. En la biopsia se identifica un intenso infiltrado inflamatorio mixto y signos de isquemia.

Tras la nefrectomía del primer injerto se detecta la presencia de anticuerpos anti-HLA de clase I y II. El análisis de las especificidades muestra la presencia de anticuerpos dirigidos frente a los antígenos HLA-A26+25+66+43 (> 1000 MFI) y HLA-A34+B08+B64 (500-1000 MFI), este espectro de especificidades se mantiene a lo largo del tiempo. Tras la pérdida del segundo injerto se detecta un espectro de especificidades más amplio (HLA-A26+29+25+66+43+34, >5000 MFI; anti-B64, > 2000 MFI; anti-B27+61, >1000 MFI y anti-B08, >500 MFI) así como anticuerpos frente a antígenos de los CREG 1C, 5C y 8C (>500 MFI) que se pueden explicar por una reactividad cruzada. La cinética de aparición de estos anticuerpos sugiere una respuesta secundaria. El análisis estructural de la respuesta sugiere la posible implicación de los epítomos a76n, a193Av, a207S, a246S, a253Q, presentes en A26, y b45Ee, b66qlc, b103VgP, en B64).

Conclusiones. El empleo de técnicas de detección y estudio de las especificidades anti-HLA de alta sensibilidad junto con el análisis estructural de la respuesta permite la identificación de combinaciones donante-receptor de alto riesgo.

P-151

ESTUDIO DEL POLIMORFISMO GENÉTICO DEL RECEPTOR DE LA INTERLEUKINA 1 (IL1RN 86-BP DUP) EN UNA COHORTE DE PACIENTES RECEPTORES DE TRASPLANTE CARDÍACO. D. Hernández Flórez, L. Valor, N. Del Pozo Rodríguez, C. Rodríguez-Sáinz, R. Teijeiro, E. Sarmiento Marchese, E. Fernández-Cruz, J. Carbone Campoverde. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Objetivo. El gen IL-1RN codifica el antagonista del Receptor de la IL-1, que inhibe la unión de las citocinas IL-1alfa e IL-1beta a sus receptores. Se ha descrito un polimorfismo en el intrón 2 del gen causado por un número variable de repeticiones en tándem (VTNR) de una secuencia de 86 pares de bases (IL-1RN 86-bp DUP) que puede influir en los niveles de expresión de la proteína. Los pacientes homocigotos para el alelo 2 de este polimorfismo (IL-1RN*2) muestran una tendencia a desarrollar respuestas proinflamatorias de mayor duración y severidad en comparación con el resto de pacientes. La presencia de IL-1RN*2 se ha asociado con enfermedades inflamatorias entre ellas la enfermedad arterial coronaria. Nuestro objetivo es analizar la prevalencia de los genotipos que contienen el alelo IL-1RN*2 en individuos trasplantados cardíacos.

Materiales y Métodos. Se evaluaron prospectivamente 59 pacientes receptores de trasplante cardíaco y de 208 controles sanos. Se purificó el DNA genómico a partir de la sangre periférica. Se amplificó mediante PCR la región polimórfica que contiene el VTNR de 86 pares de bases. De acuerdo al número de repeticiones (rp) del fragmento de 86pb se distinguen 6 alelos del 1 al 6. El alelo 1 (410 pb) tiene 4rp, el alelo 2 (240 pb) 2rp, el alelo 3 (500 pb) 5rp, el alelo 4 (325 pb) 3rp y el alelo 5 (595 pb) 6rp. Se determinó la frecuencia alélica y genotípica de este polimorfismo.

Resultados. El genotipo IL-1RN*2/ IL-1RN*2 mostró frecuencias muy similares en los individuos trasplantados y en los controles sanos (11,1% vs 11,1%). La frecuencia del genotipo IL-1RN*1/IL-1RN*2 se encontró ligeramente incrementada en los pacientes receptores de trasplante cardíaco en comparación con el grupo de controles sanos (50,8% vs 43,8%) sin que las diferencias tuvieran significación estadística ($p=0,206$).

Conclusión. Los resultados obtenidos no muestran diferencias en la distribución de los genotipos A2/ A2 y A1/ A2 comparando receptores cardíacos con controles sanos. Es necesario el aumento del tamaño muestral para determinar si existe relación entre este polimorfismo con la patología cardiovascular de base pre-trasplante y con comorbilidades y/o complicaciones en la fase post-trasplante.

P-152

ESTUDIO PRELIMINAR DE LA INMUNIDAD INNATA EN PACIENTES CON TRASPLANTE CARDÍACO: LECTINA LIGADORA DE MANOSA (MBL) E INFECCIONES BACTERIANAS. N. Del Pozo, E. Sarmiento, J. Navarro, J. Rodríguez Molina, P. Muñoz, J. Palomo, J. Fernández-Yañez, E. Fernández-Cruz, J. Carbone. Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción. La lectina ligadora de manosa (MBL) es una molécula importante del sistema inmune innato, participa en la defensa contra microorganismos activando la vía del complemento independientemente de anticuerpos. Se ha descrito que la deficiencia de MBL puede predisponer a infecciones en diversas poblaciones. La medición de MBL puede ser útil para identificar pacientes en riesgo de infecciones post-operatorias. La deficiencia de MBL se ha visto asociada a infecciones severas en post-trasplante renal.

Objetivo. Evaluación de concentración de MBL en una cohorte de TC con/sin complicaciones infecciosas bacterianas. Determinación de prevalencia de deficiencia de MBL en pacientes de TC con y sin infecciones.

Materiales y Métodos. Realizamos estudio descriptivo prospectivo en 36 pacientes con TC entre 2003 y 2009 (edad media= 52,61 años, rango: 24-69); Hombres= 25 (69,4%), Mujeres= 11 (30,6%). Terapia de inducción utilizada: Metilprednisolona y anticuerpos monoclonales anti-CD25. Terapia inmunosupresora de mantenimiento: Tacrolimus/Ciclosporina, Micofenolato mofetil y Prednisona. Profilaxis universal con ganciclovir. Estudio inmunológico realizado: Medición de concentración sérica de MBL mediante técnica de ELISA: pre-trasplante (basal), 7 y 30d post-TC. Las muestras pre/post trasplante fueron conservadas a -70°C hasta su estudio y evaluadas al mismo tiempo. Episodio Clínico: infección bacteriana que requirió terapia intravenosa durante el 1er año de seguimiento post-TC.

Resultados. En pacientes TC observamos una disminución significativa en niveles séricos de MBL al mes post-TC vs basales (1152 ± 1075 ng/mL vs 1088 ± 996 ng/mL $p=0,032$; prueba T-2 colas). Los niveles MBL pre-TC estaban disminuidos en relación a 40 controles sanos (1152 ± 1075 ng/mL vs. 2184 ± 1355 ng/mL, $p<0,01$; prueba T-2 colas). La prevalencia de deficiencia de MBL es variable según el nivel de referencia utilizado, siendo mayor en pacientes TC vs. controles sanos (MBL < 200 ng/mL: 25% vs 7,5%). No observamos diferencias entre niveles basales, 7 y 30 días post-TC entre grupos de pacientes con infecciones ($n=8$) vs. sin infecciones ($n=28$). Los microorganismos aislados en los pacientes infectados fueron: *Acinetobacter baumannii*, *Enterococcus faecalis*, *Legionella*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*.

Conclusiones. El componente de inmunidad innata, MBL, disminuye en suero en el contexto del seguimiento del trasplante cardiaco. La prevalencia de deficiencia de MBL en variable según el nivel de referencia utilizado.

SESIÓN 13: INMUNOLOGÍA TUMORAL

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

P-153

GAMMAPATIAS MONOCLONALES Y BICLONALES TRABAJO DE LABORATORIO. V.L. Pérez Mestre, D. Sánchez Costilla, S.M. Pollio. Fuerza Aerea Laboratorio DIBPFA, Capital Federal, Argentina.

La observación del aumento estadístico del requerimiento de dosis de inmunoglobulinas G, A y M y de las bandas monoclonales halladas por inmunofijación nos motivaron a la realización de este trabajo estadístico realizado durante 30 meses a partir del 01 enero 2001.

La llamada crisis del 2001 produjo en la población que recibe asistencia de nuestra obra social patologías que cada profesional de la salud observó según su particular lugar de trabajo y especialidad.

En mi caso, bioquímica que trabaja en la División Inmunoserología, me llamo la atención el aumento de la prescripción médica de Inmunofijación y sus correspondientes dosajes de inmunoglobulinas G, A, M en sangre y eventualmente en algunos en orina. Esto significó no sólo un aumento de trabajo técnico-científico sino también un cambio en los presupuestos habituales de consumo y provisión de reactivos.

Fue una ardua y enriquecedora tarea, pues me permitió acercarme a los pacientes y médicos, sortear obstáculos propios de nuestra especialidad Bioquímica y la respuesta inmunológica de cada paciente para llegar al diagnóstico correcto.

Permitió la comprobación de la existencia de cuadros que se agravaban con el desarrollo de una nueva banda monoclonal adicionada a la ya existente en los últimos estadios de la enfermedad, o bien el incremento desmedido la inmunoglobulina patológica que deterioraba mortalmente al paciente estudiado.

P-154

DIFERENCIAS EN LA EXPRESION DE MARCADORES DE DIFERENCIACION TH1 EN RELACION A LA RESOLUCION O RECIDIVA DE LESIONES ASOCIADAS A LA INFECCION POR VPH. A. Gonzalez, J. Canton, R. Carretero, P. Saenz-López, P. Jimenez, P. Jimenez, P. Jimenez, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello, L.M. Torres. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objetivos. Evidencias epidemiológicas y experimentales sostienen que el sistema inmunológico juega un papel relevante sobre el control y progresión de las lesiones inducidas por el virus del papiloma. De hecho, se observa una alta incidencia de infecciones persistentes de VPH y de lesiones displásicas en pacientes inmunosuprimidos. También en algunas pacientes en las que no se produce aclaración viral, el virus ocasiona un estado de inflamación crónica persistente que se asocia a su vez al desarrollo neoplásico. Hemos querido investigar si existen diferencias en la expresión de marcadores asociados a respuestas

TH1/TH2, activación y senescencia en pacientes que desarrollan lesiones inflamatorias SIL y también en pacientes que desarrollan lesiones recurrentes después de un tratamiento escisional (LEEP).

Material y métodos. Para este estudio se han comparado las subpoblaciones linfocitarias entre una cohorte de mujeres con displasia originada por VPH y en una población libre de enfermedad. Las diferentes poblaciones se estudiaron mediante marcaje con anticuerpos monoclonales contra marcadores específicos y lectura mediante citometría de flujo.

Resultados. Los análisis muestran cambios significativos en la proporción de células con expresión de marcadores efector/memoria CD4/CXCR3/CCR5/CD62 bajo (TH1); Treg (CD4/CD25brillantes) y de apoptosis (CD4/CD95) que son compatibles con un estado de infección crónica persistente, y de una diferenciación terminal (pérdida de CD27/CD28). Este fenotipo se asocia a disfunción de la población efectora CD4 y a una situación próxima a la apoptosis. El incremento de estas células fue significativo y se observó tanto al comparar el grupo de pacientes /control y sobre todo en pacientes con recidivas después del tratamiento escisional. Interesantemente el incremento en la proporción de células con expresión de CD95/CD4 se pudo relacionar con el grado y la evolución de las lesiones (CIN-I-III).

Conclusiones. Nuestros datos revelan que un estímulo crónico persistente puede favorecer la aparición de alteraciones funcionales de los linfocitos (senescencia replicativa), peomoviendo una situación de inmunosupresión que favorece el desarrollo tumoral, tal y como se ha visto en otros tipos de neoplasias.

P-155

EXPRESIÓN DE CD133, MARCADOR DE CÉLULAS MADRE, EN TUMORES CEREBRALES. L. Cillero, J. Subiza, H. Zimman. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Introducción. Recientes trabajos describen que la presencia de células madre tumorales (CSC) puede ayudar a explicar la heterogeneidad celular y la resistencia a la terapia, (Reya et al., 2001). La formación de neuroesferas es la característica propia de células madre neurales. El uso de factores de crecimiento en cultivos in-vitro ha permitido el mantenimiento del estado indiferenciado de estas células además de acelerar su proliferación. (Reynolds BA and Weiss, S, 1996). El gen CD133 ubicado en la posición 4p15.32 codifica una glicoproteína cinco-transmembrana (5-TM), marcador de superficie celular para identificar y aislar células madre del tumor cerebral (BCSCs), (Beier D, 2007).

Objetivo. Fue evaluar el número de células CD133 positivas en los tumores estudiados y su relación con la formación de tumoresesferas.

Materiales y Métodos. Se realizó cultivo primario de 11 muestras tumorales de pacientes diagnosticados de glioma de alto grado (OMS III y IV) en medio DMEM-F12 libre de suero conteniendo factores de crecimiento tales como: EGF, bFGF y LIF, para la selección de células madre tumorales y un posterior estudio de la expresión del fenotipo CD133 con el anticuerpo monoclonal CD133/2 marcado con ficoeritrina (Miltenyi Biotec) por citometría de flujo.

Resultados. En nuestra serie, ocho de los once tumores crecieron in-vitro como agregados celulares a los seis días de cultivo, además de presentar expresión de CD133+ fueron clasificados histológicamente como tumores astrocíticos y oligoastrocitarios. Aunque solamente se detectó un pequeño porcentaje de células altamente positivas para CD133. La ausencia de estos clones celulares se observó en tres tumores diagnosticados como oligodendrogiales.

Conclusiones. Se puede especular que hay por lo menos dos tipos de células madre cancerosas en el tumor cerebral que varían en su expresión de CD133, se pone de relieve la necesidad de más marcadores de superficie de CSC. Sugerimos que cultivos prolongados en presencia de oxígeno superior a la estimada en el cerebro (1-5%) podría estar dando lugar a una reducción en la expresión de CD133.

P-156

ERP5 Y GRP78 ESTÁN ASOCIADAS CON LA PRODUCCIÓN DE MICA SOLUBLE EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA. S.

Gonzalez Rodríguez¹, A. Gonzalez Rodríguez², J. Contesti³, A. Fernandez Guizan¹, A. Acebes Huerta¹, C. López Larrea², L. Huergo Zapico¹.

¹IUOPA Universidad de Oviedo, Oviedo. ²Hospital Central de Asturias, Oviedo. ³Hospital de Cabueñes, Oviedo.

El receptor activador NKG2D interacciona con una serie de ligandos inducidos en cáncer. La interacción de NKG2D con sus ligandos activa a las células NK promoviendo la respuesta inmune contra el cáncer. Muchos tumores avanzados contrarrestan esta actividad antitumoral mediante el corte proteolítico de MICA y su liberación en forma MICA soluble que inhibe la respuesta inmune citotóxica. Recientemente hemos demostrado que ERp5 y GRP78 interaccionan con MICA en la superficie de la célula tumoral y desempeñan un papel clave en la producción de MICA soluble. Aquí demostramos que los pacientes de leucemia linfática crónica (LLC) tienen una elevada resistencia a la citotoxicidad mediada por NKG2D. Esto se debe a que las células leucémicas no expresan o expresan pequeñas cantidades de los ligandos de NKG2D, MICA y ULBP1-3. Asociado a la baja expresión de MICA se observa una producción heterogénea de MICA soluble en los pacientes (entre 0 a 535,5 pg/ml). El 38% de los pacientes presentan cantidades significativas de MICA soluble. Además mostramos que ERp5 y GRP78 se expresan en la superficie de las células leucémicas y de los linfocitos B. En las células leucémicas, ERp5 y GRP78 se colocan en la superficie celular con MICA y están asociados funcionalmente con la producción de MICA soluble, lo que convierte a estas moléculas en interesantes dianas terapéuticas en la LLC. Además la expresión de ERp5 y GRP78 en la superficie de los linfocitos B sugiere una función desconocida de estas moléculas independiente de la regulación de la expresión de MICA.

P-157

LA EXPRESIÓN DE MICA ESTÁ REPRIMIDA EN TUMORES EPITELIALES POR LA DESACETILASA DE HISTONAS 3. S. Gonzalez Rodríguez¹, A. López Soto¹, R. Tejedor Vaquero¹, L. Huergo Zapico¹, A. Acebes Huerta¹, S. Rodríguez Rodero¹, C. López Larrea², A. Fernández Guizán².

¹IUOPA Universidad de Oviedo, Oviedo. ²Hospital Central de Asturias, Oviedo.

NKG2D es un receptor activador de las células NK que desempeña un papel clave en la respuesta inmune contra el cáncer. Los ligandos de NKG2D, MICA y las ULBPs, se inducen por el daño genotóxico, favoreciendo la eliminación de la célula tumoral por el sistema inmune. Los tumores avanzados contrarrestan el efecto antitumoral de NKG2D reprimiendo la expresión de los ligandos de NKG2D en la superficie de la célula tumoral. La expresión de MICA se encuentra reprimida en numerosos tumores epiteliales, en particular en tumores en estadios avanzados. En este trabajo estudiamos si la represión de la

expresión de MICA en tumores epiteliales puede estar mediada por mecanismos epigenéticos. Nuestros experimentos sugieren que la metilación del ADN no está implicado en la represión de la expresión de MICA en tumores epiteliales, sin embargo el tratamiento de líneas tumorales epiteliales con el inhibidor de las desacetilasas de histonas (HDACs) trichostatina A (TSA) incrementa notablemente la citotoxicidad mediada por NKG2D y este efecto está mediado en parte por la inducción de la expresión de MICA. Nuestros experimentos indican que el factor de transcripción NFY desempeña un papel crucial en este proceso. Además mediante el silenciamiento génico y la sobreexpresión de las HDAC1-3 demostramos que HDAC3 es un represor de la transcripción de MICA. HDAC3 está sobreexpresado en adenocarcinoma de colon lo que favorece la represión de la expresión de MICA favoreciendo la evasión tumoral de la respuesta inmune.

P-158

IMPORTANCIA PRONÓSTICA DE LOS LINFOCITOS T CD8 Y CD4 EN LA LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA. S. Gonzalez Rodríguez¹, J. Contesti¹, L. Huergo Zapico¹, A. Fernandez Guizan¹, A. Acebes Huerta¹, A.P. Gonzalez Rodríguez².

¹IUOPA Universidad de Oviedo, Oviedo. ²Hospital Central de Asturias, Oviedo.

El número absoluto de linfocitos es un factor pronóstico independiente para la supervivencia en diversas enfermedades hematológicas, pero todavía no ha sido determinado en la leucemia linfática crónica (LLC). Para analizar el papel pronóstico en la LLC, las células NK y T fueron cuantificadas en un grupo de 256 pacientes de LLC diagnosticados entre 1997 y 2007. Estos pacientes mostraron un número elevado de células NK y de linfocitos T CD4 y CD8 respecto a los individuos normales. La relación CD4/CD8 estaba invertida en un 39,7% de los casos. Además, los pacientes diagnosticados en los estadios tempranos de Rai mostraron un número relativo más alto de CD4 ($p=0,03$), CD8 ($p=0,02$) y células NK ($p=0,01$). El análisis multivariante Cox identificó el número relativo de linfocitos T CD8 (radio Hazard = 1.464; $p<0,006$) y linfocitos T CD4 (radio Hazard = 0,091; $p<0,01$) como marcadores independientes de supervivencia. No se observó correlación significativa entre las células NK y la supervivencia de los pacientes. Adicionalmente, los pacientes con un número relativo de CD8 > 0,074 o CD4 > 0,1 tenían mayor supervivencia global a los 10 años que aquellos que presentaban menor número de linfocitos T ($p=0,002$). En particular, pacientes con un número de CD8 > 0,074 tenían un tiempo medio de supervivencia significativamente mayor (149,33 vs. 82,06 meses). En resumen, este estudio muestra que las características cuantitativas del sistema inmune de los pacientes pueden modificar la progresión de la LLC, sugiriendo un papel del sistema inmune en la patogenia de esta enfermedad.

P-159

EL FENOTIPO DE INESTABILIDAD DE MICROSATELITES (MSI) DETERMINA EL PATRON DE INFILTRACION LEUCOCITARIA EN EL CANCER DE COLON. F. Ruiz-Cabello Osuma, M. Bernal, A. Concha, T. Cabrera, M.D. Galvez, A.I. Rodríguez, R. López, F. Garrido. Hospital Universitario Virgen De Las Nieves, Granada.

Objetivos. Los carcinomas colorectales (CCRs) con fenotipo MSI han sido descritos con anterioridad, como tumores muy inmunogénicos que escaparían de la acción del sistema inmunitario a través de la

pérdida de moléculas de HLA de clase I. Hemos estudiado la infiltración tumoral en tres grupos de CCRs clasificados en función del fenotipo MSI y de la expresión de moléculas HLA clase I.

Material y Métodos. El primer grupo tumoral: tumores MSI con pérdida total de HLA clase I (MSI+/HLA-) (n=8); segundo grupo: tumores con estabilidad de microsatélites y HLA clase I negativos en superficie (MSI-/HLA-) (n=8); y tercer grupo (Control): tumores sin alteraciones en genes HLA o en el gen β 2-m (MSI-/HLA+) (n=8). Las mutaciones en el gen de la β 2-m fueron estudiadas por secuenciación. En el estudio inmunohistoquímico sobre tejidos, se emplearon anticuerpos monoclonales dirigidos frente a CD45, CD3, CD4, CD8, CD56, CD64, CD163, CD206 y Hemo-Oxigenasa 1.

Resultados. Detectamos cuatro casos MSI+/HLA- con mutaciones que afectaban al gen de la β 2-microglobulina, y sólo un tumor MSI-/HLA- con alteraciones en dicho gen. Observamos que los tumores MSI+/HLA- se caracterizaban por una alta infiltración de células CD45+, con una destacable presencia de linfocitos T CD8+ que aparecían con localización intra y peri-tumoral. El grupo tumoral MSI-/HLA- tenía el grado de infiltración linfocitaria menos intenso de los tres grupos de estudio, con escasa o nula presencia de linfocitos CD8+, que aparecían con localización intersticial o estromal, nunca infiltraban el interior de la glándula tumoral. Los tumores Control MSI-/HLA+ se caracterizaban por tener una intensidad de infiltración intermedia, con baja cantidad de células CD8+, que aparecían con distribución estromal e intersticial, y una presencia intratumoral menos intensa que en los tumores MSI+/HLA-. No se encontraron diferencias en la infiltración por macrófagos tipo I (macrófagos clásicos) y tipo II (actividad inmunosupresora) entre los grupos tumorales.

Conclusiones. Los tumores MSI+/HLA- presentan una alta infiltración compatible con mayor inmunogenicidad. El escape a la inmunovigilancia no se explica, en todos los casos, por la inmunoselección de mutaciones de β 2-microglobulina. Los tumores MSI-/HLA- deben utilizar otros mecanismos que justifiquen el fenotipo HLA-, a parte del escape a CTLs, dada la menor infiltración linfocitaria, y en particular, la baja presencia de linfocitos T CD8+.

P-160

CARCINOMAS DE COLON CON INESTABILIDAD GENOMICA PRESENTAN PERFILES DE EXPRESION GENICA COMPATIBLES CON TUMORES MAS INMUNOGENICOS. F. Ruiz-Cabello Osuna, M. Bernal, T. Cabrera, A. Concha, A.I. Rodríguez, M.D. Galvez, F. Garrido. Hospital Universitario Virgen De Las Nieves, Granada.

Objetivos. La Inestabilidad de Microsatélites (MSI) es uno de los principales mecanismos moleculares implicados en el desarrollo del cáncer colorectal (CCR). Estos CCRs con fenotipo MSI han sido descritos con anterioridad, como tumores muy inmunogénicos, con una destacable presencia de CTLs. Hemos estudiado los perfiles de expresión génica de tres grupos de CCRs clasificados en función del fenotipo MSI y de la expresión de moléculas HLA clase I.

Material y Métodos. Primer grupo tumoral: tumores MSI con pérdida total de HLA clase I (MSI+/HLA-) (n=8); segundo grupo: tumores con estabilidad de microsatélites y HLA clase I negativos en superficie (MSI-/HLA-) (n=8); tercer grupo (Control): sin alteraciones en genes HLA o en el gen β 2-m (MSI-/HLA+) (n=8). El análisis de expresión génica fue realizado mediante la tecnología GeneChip de Affymetrix empleando el array HT_HG-U133_Plus 24, que puede procesar 24 muestras de forma simultánea.

Resultados. Como resultado inicial, obtuvimos clusters jerárquicos en los que observamos que los tumores MSI+/HLA- tendían a agruparse entre sí y a mostrar un perfil de expresión de secuencias génicas estadísticamente significativas ($p < 0,05$) que era muy diferente del de los otros dos grupos del estudio. Los casos MSI-/HLA- y los del grupo MSI-/HLA+ (Controles) también mostraban una tendencia a clusterizar, sin embargo ambos agrupaciones mostraban perfiles de expresión similares. En la comparación MSI+/HLA- vs MSI-/HLA+, obtuvimos 635 secuencias génicas significativas ($p < 0,05$) y cuando se comparaban los grupos MSI-/HLA- vs MSI-/HLA+, el número de genes estadísticamente significativos ($p < 0,05$) fue de 217. Los tumores MSI-/HLA- mostraban una mayor expresión de genes de la vía del TGF- β . Observamos, también, que los casos MSI+/HLA- expresaban genes relacionados con la respuesta inflamatoria (genes de quimioquinas (CCL3, CCL18, CXCL13...); genes relacionados con la vía del TLR (TLR2, TLR8, Ly96, PELI1, TICAM2...); genes marcadores de macrófagos (CD14, CD16, CD32, CD64...)) y con la actividad citotóxica (TCRalfa, cadena ζ del complejo CD3, perforinas, granulinas, factores de transcripción implicados en la activación de linfocitos T...).

Conclusiones. Estos resultados son consistentes con los datos obtenidos del estudio inmunohistoquímico de la infiltración leucocitaria tumoral, donde observamos que los casos MSI+/HLA- presentaban la mayor intensidad de infiltración por parte linfocitos T CD8+.

P-161

EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA DE CLASE I Y II EN LÍNEAS CELULARES Y TUMORES DE PROSTATA. J. Carretero¹, A.B. Del Campo², R. Méndez², S. Zichenko², S. Ward³, F. Ruiz-Cabello², T. Cabrera², N. Apstiauri², F. Garrido². ¹Universidad de Granada, Granada. ²Hospital Universitario Virgen de las Nieves. ³St George University of London, United Kingdom.

Objetivos. Conocer la frecuencia de alteraciones y mecanismos moleculares implicados en la expresión anómala de HLA de clase I en el cáncer de próstata, el segundo más frecuente en hombres y cuya información sobre estas alteraciones es limitada.

Material y métodos. Hemos analizado la expresión de HLA de clase I y II en trece líneas celulares humanas inmortalizadas, ocho de ellas establecidas a partir de tumores primarios y cinco a partir de tejido adyacente normal de próstata. Se han comparado los resultados con los patrones de expresión de líneas celulares tumorales de próstata no inmortalizadas obtenidas de ATCC: DU145, PC3 y LNCap. Se estudió la expresión de HLA en 46 muestras criopreservadas de tumores de próstata, de las cuales once se seleccionaron para ser microdisectadas y realizar en ellas un análisis de microsatélites para determinar la presencia de LOH. Para ello se llevaron a cabo diferentes técnicas entre las que se incluye inmunohistoquímica, microdissección laser, análisis de microsatélites y análisis por Citometría de flujo.

Resultados. La inmunohistoquímica reveló que un 90% de los tumores poseían algún tipo de alteración de la expresión de HLA de clase I en membrana. Además, hasta un 50% de los tumores microdisectados presentaban LOH en la región HLA-I. En una línea celular detectamos una pérdida total de expresión de HLA-I debido a una LOH y una delección en el gen de la beta-2-microglobulina (β 2m). La infección de estas células con un adenovirus portador del gen silvestre de la β 2m humana recuperó la expresión normal de HLA de clase I. En dos líneas celulares encontramos pérdida de haplotipo y pérdida de locus. En varias líneas celulares observamos baja regulación de

locus A y B. Ninguna de las líneas celulares expresaba HLA de clase II en condiciones basales, pero tras el tratamiento con IFN-gamma, nueve de las líneas celulares expresaron HLA-DR, y una expresó HLA-DP.

Conclusiones. Los resultados preliminares indican que las alteraciones (reversibles e irreversibles) de HLA de clase I en cáncer de próstata son comparables a las que encontramos en otros tipos de tumores.

P-162

DIFERENTES TRATAMIENTOS DE INMUNOTERAPIA INHIBEN METÁSTASIS ESPONTÁNEAS CON ALTERACIONES REVERSIBLES EN LA EXPRESIÓN DE MHC-I EN UN MODELO PRECLÍNICO MURINO. C. Garrido López¹, I. Romero García², I. Linares Dickler², E. Berruguilla Pérez², A. Collado Torres², I. Algarra López De Diego³, F. Garrido Torres-Puchol⁴, Á.M. García Lora². ¹Universidad de Granada, Granada. ²Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ³Universidad de Jaén, Jaén. ⁴Universidad de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La pérdida de expresión de moléculas MHC-I en células tumorales es un mecanismo de escape de la respuesta inmunológica, frecuente en los procesos de metastatización. En pacientes de melanoma, la administración de inmunoterapia produjo la regresión de aquellas metástasis con alteraciones reversibles en la expresión de HLA-I. En este ensayo analizamos la efectividad de diferentes tratamientos de inmunoterapia en un modelo preclínico, de fibrosarcoma murino con metástasis espontáneas que presentan alteraciones reversibles en la expresión MHC-I.

Se realizó un ensayo de metástasis espontáneas con la línea de fibrosarcoma GR9-A7 en ratones BALB/c. Estableciendo cinco grupos de 20 ratones, los cuales recibieron sus respectivos tratamientos durante 6 semanas tras la extirpación del tumor primario: Control, CpG+A7-100Gy, PKS, Docetaxel y PSK+Docetaxel. 6 ratones de cada grupo fueron sacrificados a mitad del tratamiento para estudiar la evolución del proceso metastático. Los 14 restantes se sacrificaron al finalizar los tratamientos. Los ratones fueron examinados, extirpando las metástasis encontradas, para adaptarlas a cultivo y analizar su fenotipo MHC-I. Subpoblaciones linfocitarias fueron analizadas en bazo y sangre periférica.

La línea GR9-A7 presenta expresión de K^d, D^d y L^d. En el grupo Control metastatizó en 18/20 ratones produciendo 17-58 metástasis pulmonares y 1-3 linfáticas. Al final de los tratamientos CpG+A7-100Gy, PSK y PSK+Docetaxel curaron las metástasis, mientras Docetaxel sólo redujo el número de metástasis. En los grupos CpG+A7-100Gy, PSK y Docetaxel se encontraron metástasis en los ratones sacrificados a mitad del tratamiento, pero en menor medida que en el grupo control. El análisis del fenotipo mostró que un 70% de las metástasis del grupo control tenían alteraciones en la expresión MHC-I reversibles con IFN-gamma. Un porcentaje similar se encontró en las metástasis del grupo Docetaxel. Los tratamientos de inmunoterapia indujeron una mayor inmunoselección, produciendo una pérdida de la expresión de MHC del 80% CpG+A7-100Gy y del 100% PSK. El estudio de las poblaciones linfocitarias demostró una inducción de la respuesta inmunológica, destacable por el aumento de linfocitos T CD8⁺ en CpG+A7-100Gy y de T y NK en PSK y PSK+Docetaxel.

Los tratamientos de CpG+A7-100Gy, PSK y PSK+Docetaxel produjeron una inducción en la respuesta inmunológica capaz de elimi-

nar las metástasis con alteraciones reversibles en la expresión de MHC-I, producidas por GR9-A7.

P-163

RELACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS EN GENES DE LA RESPUESTA INMUNOLÓGICA INNATA CON EL RIESGO Y PROGRESIÓN DEL CÁNCER VESICAL. M. Guirado, R. Carretero, E. Gills, P. Saenz-López, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello, J.M. Cozar. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objetivos. Existen estudios que muestran el papel de la respuesta inmunitaria innata en el control de los procesos tumorales. El objetivo de este estudio es analizar la relación de los polimorfismos en RIPK2, NOD2, Toll 2 y c13orf31, con el riesgo y las características clínicopatológicas del cáncer de vejiga.

Material y métodos. Se analizaron los polimorfismos (snp) en NOD2 (rs9302752), RIPK2 (rs42490), c13orf31 (rs3764147) y Toll2 (rs5743708), mediante PCR a tiempo real usando sondas Taqman frente a los distintos alelos. Se estudiaron 303 casos de pacientes con cáncer vesical y 384 casos control. C13orf31 es una proteína sin caracterizar que ha sido asociada a la respuesta innata frente a la lepra.

Resultados. De los estudios realizados se extraen los siguientes resultados: el polimorfismo c13orf31 se relaciona con el riesgo de sufrir cáncer. El genotipo cc predispone a padecer la enfermedad (p< 0,001 OR= 4.00 IC= 2,09-7,69). Al estudiar la relación de los polimorfismos indicados con las características clínicopatológicas de la enfermedad obtuvimos: C13orf31: su genotipo se relaciona con grado de diferenciación (G) (p< 0,001) y grado de infiltración del tumor (T) (p= 0,013) y muestra una tendencia con el desarrollo de metástasis (p= 0,092). Toll2 se relaciona con tamaño tumoral (p= 0,048), recidiva (p= 0,012) y progresión del tumor (p= 0,048). NOD2 se asocia con metástasis en ganglios (N) (p= 0,018) y en recidiva tras BCG (p= 0,045). RIPK2 está implicado en metástasis en ganglios (p= 0,047) y en grado de infiltración (p= 0,021).

Conclusiones. Nuestros análisis revelan que los polimorfismos estudiados, RIPK2, NOD2, Toll2 y c13orf31, influyen en el riesgo de padecer cáncer urotelial y en el desarrollo de la enfermedad. Estos datos apoyan la hipótesis de la influencia del sistema inmunitario innato y la enfermedad con el riesgo y progresión de cáncer vesical.

P-164

EL EXOPOLISACÁRIDO BACTERIANO B100 SULFATADO INDUCE APOPTOSIS POR LA VÍA MITOCONDRIAL EN CÉLULAS T LEUCÉMICAS. C. Ruiz-Ruiz, D. Carranza, G. Srivastava, I. Llamas, E. Quesada, I.J. Molina. Universidad de Granada, Armilla.

Objetivos. Los exopolisacáridos bacterianos (EPS) son polímeros heterogéneos formados por diferentes monosacáridos y otros sustituyentes no sacarídicos, como pueden ser grupos sulfatos. Dichos grupos parecen contribuir a las propiedades biológicas atribuidas a estos EPS: antivirales, antitumorales e inmunomoduladoras, entre otras. El objetivo de este trabajo es estudiar la actividad antitumoral del EPS obtenido de bacterias halófilas, B100, en estado nativo y sulfatado.

Material y métodos. Linfocitos T primarios: Se obtuvieron a partir de muestras de sangre de donantes sanos y de pacientes con leuce-

mia de células T. Fueron mantenidos en RPMI 1640 completo en un incubador a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 o 48h.

Líneas celulares: Jurkat, HEL, CEM, MOLT-4, HPB-ALL, Raji, DAU-DI, NAMALWA, HL-60, K562, U937, SKBr3, EVSA-T y HSV fueron mantenidas en el mismo medio de cultivo y condiciones que los linfocitos T primarios.

Las células apoptóticas y la caída de potencial de membrana mitocondrial fueron analizadas en un citómetro FACScan tras tinción con yoduro de propidio (IP) y DiOC6, respectivamente.

La detección de proteínas se realizó mediante inmunoblot.

Resultados. La forma sulfatada del EPS B100 es capaz de inhibir totalmente el crecimiento de diferentes líneas celulares como Jurkat y HEL. La forma nativa de B100 y las formas nativa y sulfatada del EPS N12 (estrechamente relacionado con B100) también lo hacen aunque con menor eficacia. Sin embargo, solo B100S induce apoptosis de forma dosis-dependiente en las líneas leucémicas T MOLT-4 y Jurkat. Este efecto proapoptótico se observa de manera restringida en el linaje hematopoyético, dentro del cual existe un gradiente de sensibilidad. Las líneas leucémicas T son las más sensibles. B100S también induce una moderada apoptosis en leucemias T primarias pero no en linfocitos T normales. La apoptosis inducida por B100S va acompañada de una caída del potencial de membrana mitocondrial y es dependiente de caspasas, siendo la primera en activarse la caspasa-9. Estos datos indican que dicha inducción de apoptosis tiene lugar a través de la ruta intrínseca o mitocondrial.

Conclusiones. B100S es el primer exopolisacárido bacteriano descrito capaz de inducir apoptosis de manera potente y selectiva en células T leucémicas, lo que sugiere su uso potencial en el tratamiento de este tipo de tumores.

P-165

ALTERACIONES SUCESIVAS EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA-I ORIGINAN INMUNOESCAPE Y CÉLULAS DE MELANOMA DIRECTAMENTE MÁS ONCOGÉNICAS. C. Garrido López¹, E. Berruguilla Pérez², I. Linares Dickler², I. Romero García², A. Collado Torres², I. Algarra López De Diego³, F. Garrido Torres-Puchol⁴, Á.M. García Lora². ¹Universidad de Granada, Granada. ²Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ³Universidad de Jaén, Jaén. ⁴Universidad de Granada, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La línea tumoral Ando-2 procede de una metástasis de un paciente de melanoma, la cual presenta la pérdida de un haplotipo HLA. Se estableció una línea transfectada con el alelo A2, Ando-TA2. Tras el crecimiento *in vivo* de Ando-2 en ratones BALB/c-nude se obtuvo la línea Ando-nude, que perdió completamente la expresión HLA-I. En este estudio analizamos el comportamiento oncogénico de estas tres líneas que presentan diferente expresión de moléculas HLA-I.

Se analizó la presencia de precursores de CTLs en la sangre del paciente. El crecimiento local *in vivo* fue analizado mediante inyección de diferentes dosis de células en ratones inmunodeficientes. La tasa de proliferación *in vitro* se analizó por ensayos con Alamar blue y MTT, y los resultados se correlacionaron con la expresión de genes del ciclo celular (RT-PCR). La capacidad metastásica se estudió mediante ensayos *in vitro* de invasión y migración.

Ando-2, tiene expresión superficial de moléculas HLA-I, con la pérdida de un haplotipo. Ando-TA2, recupera la expresión superficial del alelo A2. La línea Ando-nude no expresa moléculas HLA debido a

la down-regulación de la APM. En la sangre del paciente fueron encontrados CTLs específicos contra Ando-TA2. En crecimiento *in vivo* Ando-2-nude crece en todas las concentraciones inyectadas, mientras que Ando-2 sólo crece al inyectar 5,10⁶ de células, y la transfectante no crece a ninguna concentración. Estos resultados se correlacionan con el mayor rango de proliferación *in vitro* de Ando-nude, seguida de Ando-2 y Ando-TA2. En el estudio de los genes del ciclo celular la transfectante presenta expresión muy alta de ciclinaA1 y Mdm2. Ando-nude tiene una mayor expresión de Cdk2, Cdc25A y E2F1. Los ensayos de invasión y de migración, Ando-nude mostró un mayor potencial, seguida por Ando-2 y finalmente por Ando-TA2.

La línea Ando-2 es el resultado de la fase de inmunoselección en el paciente, en la que se seleccionan aquellas células tumorales con alteraciones en la expresión HLA-I. Una segunda pérdida de HLA-I en estas células originó células más oncogénicas *per se* y con mayor capacidad migratoria e invasiva.

P-166

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA: BUSCANDO MARCADORES DE CÉLULAS INICIADORAS Y DE PRONÓSTICO. M. Caballero-Baños, J. Milà, R. Vilella. Hospital Clínic, Barcelona.

La teoría de las "Cancer Stem Cells" (CSCs) nos propone que toda la masa tumoral estaría formada a partir de poblaciones minoritarias con características similares a las "Stem Cells" convencionales; es decir, en el estadio final de la masa tumoral, podríamos encontrar una gran proporción de células tumorales diferenciadas, y una pequeña proporción de células con capacidad tumorigénica (CSCs). Una posible explicación de los pobres resultados observados en la terapia del melanoma metastático, sería que los tratamientos empleados atacarían la población diferenciada de la masa tumoral, dejando intacta la población de "Melanoma Stem Cells", la cual respondiendo posteriormente a diferentes y desconocidos estímulos microambientales, sería capaz de regenerar la masa tumoral.

Objetivo. Definir algún marcador de superficie que nos permita identificar a las células iniciadoras de melanoma así como algún marcador o grupo de marcadores que nos permitan definir subtipos de melanoma de valor pronóstico.

Metodología. Cultivamos líneas de melanoma establecidas *in vitro* con dos medios diferentes: DMEM y Knockout-DMEM (específico para células embrionarias, cultivo teóricamente enriquecido en Cancer Stem Cells). Realizamos un fenotipado de superficie con 59 monoclonales que determinan la expresión de 56 moléculas de superficie.

Resultados. Obtenemos el nivel de expresión de 56 moléculas de superficie en dos condiciones diferentes (medio DMEM y Knockout-DMEM), de 13 líneas de melanoma criopreservadas. A partir de estos resultados, calculamos la expresión diferencial de los diferentes marcadores en cada línea en concreto, observando marcadores que aumentan su expresión en cultivo con medio Knockout-DMEM, así como otros que disminuyen.

Conclusiones. 6 marcadores de superficie aumentan su expresión cuando las líneas son cultivadas en medio específico para células embrionarias (teóricamente, podrían considerarse marcadores de células iniciadoras de melanoma). Así mismo encontramos 13 marcadores que se expresan de forma heterogénea en ambas condiciones (posibles marcadores de subtipos de melanoma de valor pronóstico).

Tabla 1. Marcadores que aumentan su exposición en medio Knockout-DMEM

Marcador	Aumento en medio Knockout DMEM (%)
CD1 (2)	3,92
CD11a	4,54
CD26	6,00
CD31	2,92
CD36	2,77
CD84	2,46

Tabla 2. Marcadores de expresión heterogénea en líneas de melanoma

DMEM			Knockout DMEM		
β2-micro	CD16	CD54	W6/32	CD26	CD58
Locus A	CD26	CD55	β2-micro	CD38	CD74
DE	CD38	CD57	Locus A	CD45RO	CD81
CD1	CD45	CD58	DR	CD46	
CD4	CD45RO	CD71	CD1	CD55	
CD13	CD46	CD146	CD13	CD57	

P-167

IDENTIFICACIÓN DE GENES PROANGIOGÉNICOS Y ANTIOXIDATIVOS EN MONOCITOS PRIMARIOS HUMANOS SOMETIDOS A HIPOXIA. I. Guijarro Muñoz, A. Cuesta Martínez, L. Alvarez Vallina, L. Sanz Alcobér. Hospital Puerta de Hierro, Madrid.

Objetivos. Los monocitos son reclutados por los tumores y se acumulan en áreas hipóxicas, contribuyendo a la angiogénesis tumoral. En este trabajo, estudiamos la influencia de un microambiente hipóxico sobre el perfil de expresión génica de monocitos primarios para

identificar la modulación selectiva de genes que puedan jugar un papel en dicho proceso.

Métodos. Para caracterizar cómo los monocitos se adaptan al microambiente hipóxico, estudiamos el patrón de expresión génica de monocitos humanos expuestos 24h a 1% O₂ con respecto a los cultivados en condiciones de normoxia usando el microarray GeneChip Gene 1.0 ST (Affymetrix). Como control de respuesta a hipoxia, el incremento en la expresión de VEGFA se comprobó en cada experimento. Los resultados se analizaron usando la base de datos de ontología génica DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery).

Resultados. De los 28.869 genes analizados en el microarray (correspondientes a 19.734 transcritos primarios), un total de 379 fueron modulados al menos dos veces con respecto a los controles normóxicos. Además de VEGF, demostramos la sobreexpresión de más de 50 genes relacionados con angiogénesis (incluyendo FLT-1, ANG y MMP-19), componentes de la matriz o reguladores de la misma (como ADAM8, SPP1, TFP1 and TSN1), respuesta inmune (CD16, CD32, CD300, y COLEC12) y el metabolismo glicolítico y no glicolítico que habían sido previamente identificados como inducibles por hipoxia.

De especial interés fue la identificación de un cluster de genes implicados en la unión a metales y a la prevención del daño oxidativo, no descritos previamente. Su asociación con hipoxia no es extraña, ya que el flujo sanguíneo en los tumores es irregular, causando periodos de hipoxia seguidos de reperfusión. Las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas durante la reperfusión son causa de estrés oxidativo.

Conclusiones. Estos resultados apoyan el papel protector frente al estrés oxidativo atribuido a una familia de genes antioxidantes y sugieren que su expresión puede suponer una ventaja adaptativa de los monocitos al cambiante entorno tumoral.