



## XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología

Pamplona, 8-11 de junio de 2011

### COMUNICACIONES ORALES

#### AUTOINMUNIDAD

**Moderadores:** Marcos López Hoyos (Santander) y Alfonso Sánchez Ibarrola (Pamplona)

#### O-001. VALOR DEL FENOTIPAJE DE LOS LINFOCITOS INTRA-EPITELIALES (LIES) EN LA CELÍACA DEL ADULTO SERONEGATIVO

A. de Andrés Martín, I. Toboso del Amo, C. Camareo Salces y G. Roy Ariño

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

**Objetivos:** El diagnóstico de la enfermedad celíaca (EC) del adulto se complica por una menor sensibilidad/especificidad de los marcadores serológicos y una expresión menos intensa de la lesión histopatológica intestinal. Estudio y caracterización de los pacientes que en sus biopsias presentan un fenotipo de linfocitos intra-epiteliales (LIES) sugerente de enfermedad celíaca con serología negativa: anticuerpos anti-endomisio y/o anti-transglutamisasa.

**Material y métodos:** Análisis prospectivo de nuestra base de datos considerando pacientes que actualmente tienen un diagnóstico de EC sin marcadores serológicos positivos y con niveles normales de IgA ( $> 70 \text{ mg/dl}$ ).

**Resultados:** 12% de los pacientes celíacos adultos de nuestra serie (15 de 123 celíacos adultos) fueron sero-negativos con fenotipo de LIES sugerente de enteropatía celíaca y diagnóstico actual de EC. En el estudio anatomo-patológico, 5 pacientes presentaron Marsh 3, 9 únicamente una ligera atrofia y 1 paciente no presentó atrofia.

**Conclusiones:** 1. Se confirma la baja eficacia de los marcadores serológicos en el screening de la EC del adulto. 2. Cuestionamos la necesidad de realizar el estudio serológico en la población adulta ya que no supone un beneficio a la hora de decidir la realización de una endoscopia, incluso su valor negativo no puede

condicionar la realización o no de la misma. 3. El estudio fenotípico de los LIES permitió la identificación precoz de EC potencial, cuyo diagnóstico fue pospuesto hasta biopsias posteriores con mayor grado de lesión duodenal, con el consiguiente retraso en el establecimiento del tratamiento e incremento del coste personal y económico.

#### O-002. PAPEL DE P27KIP1 EN EL CONTROL DE LA ACTIVIDAD SUPRESORA DE LOS LINFOCITOS CD4+CD25+ REGULADORES EN RATONES TRANSGÉNICOS PARA BCL-2 EN LINFOCITOS T

M. Iglesias Lozano, J. González, J. Postigo, I. Santiuste, E. Tamayo, L. Buelta, J. Merino y R. Merino

Departamento de Biología Molecular-IFIMAV, Universidad de Cantabria, Santander. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, Santander. Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona.

Resultados previos de nuestro grupo muestran que ratones transgénicos (Tg) que sobre-expresan Bcl-2 humano (hBcl-2) en linfocitos T (hBcl-2-TgT) están protegidos contra el desarrollo de patologías autoinmunes. Dicha protección está mediada por linfocitos T CD4+CD25+ reguladores (Treg) a través de la producción de TGFβ. En este trabajo pretendemos profundizar en el conocimiento de los mecanismos moleculares implicados de este efecto protector. En primer lugar, se demuestra que la sobre-expresión de Bcl-2 en linfocitos Treg incrementa considerablemente (4-5 veces) su actividad funcional in vitro. Además de su capacidad de inhibir apoptosis, la sobre-expresión de Bcl-2 retrasa la entrada de los linfocitos T en el ciclo celular tras ser estimulados. Entre los posibles candidatos a mediar este fenómeno se encuentra p27kip1, un regulador negativo del ciclo celular de la familia Cip/Kip. Nuestro interés en esta molécula se sustenta en dos observaciones: (1) Bcl-2 incrementa la expresión de p27kip1; y (2) p27kip1 participa en la inducción de anergia clonal en linfocitos T. En base a ello hemos analizado el papel de p27kip1 en la funcionalidad de los linfocitos Tregs de los ratones hBcl-2-TgT. Mediante Western Blot y citometría de flujo observamos que el incremento en la actividad supresora de los linfocitos Tregs de los ratones hBcl-2-TgT se correlaciona con un aumento de la expresión de p27kip1. Además, la ausencia de p27kip1 reduce la actividad supresora

in vitro de los linfocitos Tregs procedentes tanto de ratones p27kip1-/- no Tg como de ratones p27kip1-/-hBcl-2-TgT. Por último, el tratamiento in vivo con trombina, que disminuye la expresión de p27kip1 en linfocitos T sin afectar su supervivencia, interfiere con el mencionado efecto protector y los ratones (DBA/1x C57BL/6)F1-hBcl-2-TgT, inmunizados con colágeno bovino de tipo II, desarrollan una artritis autoinmune similar a la de los ratones no-Tg. En conjunto nuestros resultados ponen en evidencia el papel de p27 kip1 en la funcionalidad de los linfocitos Tregs in vitro e in vivo.

#### O-003. BLYS EXPRESSION BY SUBSETS OF PERIPHERAL BLOOD CELLS IN SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS PATIENTS

P. López Suárez, C. Gordon y D. Scheel-Toellner

Rheumatology Research Group, MRC Centre for Immune Regulation, Institute for Biomedical Research, School of Immunity and Infection, College of Medical and Dental Sciences, University of Birmingham, UK. Department of Functional Biology, Immunology Area, Faculty of Medicine, University of Oviedo.

**Objectives:** Circulating levels of B-lymphocyte stimulator (BLyS) are elevated in SLE patients. However, few studies have analyzed the cellular populations responsible of its over-expression in lupus. Here, we systematically assessed intracellular and membrane bound BLyS expression in five blood cell subsets from SLE patients and healthy donors.

**Material and methods:** Both surface and intracellular expression of BLyS by plasmacytoid dendritic cells (pDCs), myeloid dendritic cells (mDCs), B cells, neutrophils and monocytes were determined in whole blood samples from 23 SLE patients and 16 healthy donors by flow cytometry. For this purpose, expression of the subset-specific surface markers BDCA-2 (CD303), CD123, BDCA-1 (CD1c), CD14 and CD19 was used to identify cell populations. Disease activity was assessed using classic BILAG index.

**Results:** In SLE patients, increased expression of BLyS was detected in several peripheral blood cell subsets, including B cells both on their surface (0.23 vs 0.05;  $p = 0.0067$ ) and intracellularly (11.36 vs 7.68;  $p = 0.0259$ ), as well as intracellularly in mDCs (9.57 vs 7.45;  $p = 0.0466$ ) and pDCs (10.11 vs 6.27;  $p = 0.0237$ ). When SLE patients were grouped by disease activity, we observed increased surface levels of BLyS in patients with active disease in mDCs ( $p = 0.0416$ ) and monocytes ( $p = 0.0354$ ), in addition of a reduced level of intracellular BLyS expression in the same cell types compared with minimal or non-active patients.

**Conclusions:** Increased BLyS levels in SLE patients are produced by several cell subsets. BLyS levels of mDCs and monocytes are elevated on the surface from active patients as well as intracellularly in minimal or non-active patients, suggesting the mobilization of BLyS from intra to extracellular compartment during active disease.

#### O-004. P-SELECTIN GLYCOPROTEIN LIGAND-1 MODULATES IMMUNE INFLAMMATORY RESPONSES IN THE ENTERIC LAMINA PROPRIA

N.A. Núñez Andrade, A. Lamana, D. Sancho, J. Gisbert, R. Gonzales Amaro, F. Sánchez Madrid y A. Urzainqui

Centro Nacional de Investigación Cardiovascular (CNIC), Instituto de Investigación Sanitaria. Hospital de la Princesa, Madrid.

P-Selectin Glycoprotein Ligand-1 (PSGL-1), a leukocyte adhesion receptor that interacts with selectins, induces a tolero-

genic program in bone marrow-derived dendritic cells (DCs), which in turn promotes the generation of T regulatory (Treg) lymphocytes. In the present study, we have used a mouse model of dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis and studied the characteristics of the inflammatory cell infiltrate in the lamina propria (LP), mesenteric lymph nodes (mLN) and Peyer's patches (PP), to assess the possible role of PSGL-1 in the modulation of the enteric immune response. We have found that untreated PSGL-1-deficient mice showed an altered proportion of innate and adaptive immune cells in mLN and PP as well as an activated phenotype of macrophages and DC in the colonic LP that mainly produced pro-inflammatory cytokines. Administration of an anti-PSGL-1 antibody also reduced the total numbers of macrophages, DC and B cells in the colonic LP, and induced a lower expression of MHC-II by DC and macrophages. After DSS treatment, PSGL-1-/- mice developed colitis earlier and with higher severity than WT mice. Accordingly, the colonic LP of these animals showed an enhanced number of Th1 and Th17 lymphocytes, with enhanced synthesis of IL-1 $\alpha$ , IL-6 and IL-22, and increased activation of lamina propria macrophages. Together, our data indicate that PSGL-1 has a relevant homeostatic role in the gut-associated lymphoid tissue under steady state conditions, and that this adhesion receptor is able to down regulate the inflammatory phenomenon in DSS-induced colitis.

#### O-005. INFLUENCIA DEL DESARROLLO DE ANTICUERPOS FREnte A UN PRIMER ANTI-TNF EN LA RESPUESTA CLÍNICA TRAS EL CAMBIO A UN SEGUNDO ANTI-TNF EN LA ARTRITIS REUMATOIDE

D. Pascual-Salcedo Pascual, C. Plasencia Rodríguez, A. Balsa Criado, G. Bonilla Hernán, P. Nozal Aranda, F. Arribas Arribas, R. Moral Hernando y E. Martín Mola

Unidad de Inmunología y Servicio de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

**Introducción:** El tratamiento con inhibidores del TNF es ampliamente utilizado en pacientes con artritis reumatoide (AR). Algunos pacientes no responden al tratamiento, o desarrollan ineficacia secundaria, necesitando cambio a un segundo anti-TNF.

**Objetivos:** Analizar si el desarrollo de anticuerpos contra el primer anti-TNF influye en la respuesta al tratamiento con un segundo anti-TNF.

**Métodos:** 25 pacientes con AR tratados por primera vez con terapia anti-TNF (20 con infliximab, 5 con adalimumab), recibieron un segundo anti-TNF ante la ineficacia del primero. Se midió la actividad clínica mediante el DAS28 y los anticuerpos contra el fármaco en la basal y a los 6 meses de tratamiento del primer y segundo anti-TNF.

**Resultados:** El 64% de los pacientes tenían anticuerpos contra el fármaco (14 anti-infliximab y 2 anti-adalimumab) a los 6 meses de tratamiento. A los 6 meses del cambio al 2º anti-TNF, pacientes con anticuerpos mostraron una tendencia a menor actividad clínica que pacientes sin anticuerpos ( $3.1 \pm 1.2$  frente a  $4.1 \pm 0.9$   $p = 0.035$ ). En este mismo tiempo, 5/16 (31,3%) los pacientes con anticuerpos se encontraban en remisión y el resto (11/16, 68,7%) tenían una actividad clínica baja o moderada. Los pacientes sin anticuerpos mostraron una actividad moderada-alta (6/9, 66,6%) y ningún paciente de este grupo alcanzó la remisión clínica a los seis meses del cambio al segundo anti-TNF ( $p = 0.01$ ).

**Conclusiones:** Pacientes con anticuerpos contra un primer anti-TNF alcanzan una actividad clínica inferior al recibir tratamiento con un segundo anti-TNF que pacientes sin anticuerpos que no responden al primer anti-TNF.

## O-006. LA AUSENCIA DE CD38 ATENÚA LA SEVERIDAD DE LA ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO DE TIPO II (CIA) EN RATONES

J. Postigo Fernández, R. Merino, M. Iglesias, A. Rosal-Vela, S. García, E. Zumaquero, M. Zubiaur, J. Sancho y J. Merino

Departamento de Biología Molecular-IFIMAV, Universidad de Cantabria, Santander. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC-Universidad de Cantabria-SODERCAN, Santander. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neira, CSIC, Granada.

CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II con una amplia distribución en células del sistema inmune tales como linfocitos T y B, células natural killer, monocitos, macrófagos y células dendríticas. Funcionalmente, CD38 es un ectoenzima que, a partir de los sustratos NAD<sup>+</sup> y NADP<sup>+</sup>, cataliza la formación de segundos mensajeros implicados en la regulación de los niveles de Ca<sup>2+</sup> intracelular. Así mismo, esta molécula es un receptor que participa en procesos de activación celular y modulación de la producción de citocinas. Previamente se ha demostrado un incremento en la expresión de CD38 en linfocitos T de pacientes con enfermedades autoinmunes, como el lupus eritematoso sistémico. En el presente trabajo hemos analizado el papel de CD38 en la patogenia de la artritis inducida en ratones C57BL/6 (B6) inmunizados con colágeno de tipo II de pollo. El seguimiento clínico complementado con técnicas radiológicas y anatopatológicas muestra que la incidencia de CIA en los ratones B6 deficientes en CD38 (B6.CD38<sup>-/-</sup>) fue similar a la de los B6 controles silvestres. Por el contrario, la severidad clínica fue netamente inferior en los animales CD38<sup>-/-</sup>. Así mismo, hemos observado que en la 6<sup>ta</sup> semana tras la inducción de CIA los niveles de anticuerpos anti-col II circulantes de tipo IgG1 e IgG2a en los ratones B6.CD38<sup>-/-</sup> se encontraban, respectivamente, aumentados o reducidos en comparación con los B6 controles. En correlación con este perfil de anticuerpos anti-col II, el porcentaje de linfocitos Th1 (CD4+IFN $\gamma$ + ) en los ganglios linfáticos regionales de los ratones B6.CD38<sup>-/-</sup> a la 4<sup>ta</sup> semana tras inmunización es inferior al observado en los B6 controles inmunizados. No se observaron diferencias entre grupos en el porcentaje de linfocitos Th17 (CD4+IL-17+). En conclusión, nuestros resultados muestran que CD38 es una molécula implicada en la patogenia de la artritis autoinmune posiblemente modulando la diferenciación funcional de los linfocitos T CD4+.

## O-007. CÉLULAS PROGENITORAS ENDOTELIALES EN AUTOINMUNIDAD Y SU RELACIÓN CON CÉLULAS T REGULADORAS

J. Rodríguez Carrio, C. Prado Cueto, B. de Paz Cazón, J. Gómez Arbesú, F.J. Ballina García, M. Alperi López, P. López Suárez y A. Suárez Díaz

Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. Servicio de Inmunología; Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

**Objetivos:** Se ha sugerido que las células progenitoras endoteliales (EPC) circulantes indican la capacidad de reparación vascular y por tanto tienen un papel en el desarrollo de la disfunción endotelial en autoinmunidad, por lo que nos propusimos estudiar estas células en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y artritis reumatoide (AR) y su relación con parámetros clínicos e inmunológicos.

**Material y métodos:** Se cuantificaron mediante citometría de flujo diferentes poblaciones de EPC presentes en sangre periférica de 27 controles, 68 pacientes de LES y 81 de AR según su expresión de CD34, CD133 y VEGFR2, así como la frecuencia de células Treg (CD4+CD25highFOXP3). Estos datos se relacionaron con parámetros clínicos e inmunológicos.

**Resultados:** En pacientes de AR se observa una reducción significativa de células progenitoras CD34+ y CD133. No hay diferencias en los niveles de EPC (CD34+VEGFR2+CD133+), si bien disminuyen con la duración de la enfermedad. Los pacientes de LES, por el contrario, muestran un aumento significativo de EPC tanto en número absoluto como respecto a progenitores CD34+CD133, sin diferencias en las células progenitoras totales. Además, esta población se correlaciona positivamente con los niveles séricos de IFN $\alpha$  y con algunas variables clínicas. Esta citocina se asocia en ambas patologías con las EPC maduras (CD34+ VEGFR2+ CD133-). Finalmente, las células Treg se correlacionan positivamente con las EPC en pacientes de LES, pero no en AR ni en controles.

**Conclusiones:** A pesar de la disfunción endotelial presente en LES y AR, las distintas poblaciones de EPC y células progenitoras totales presentan comportamientos distintos en ambas patologías.

## O-008. SÍNDROME VARIABLE COMÚN DE INMUNODEFICIENCIA (SVCID) Y AUTOINMUNIDAD

J.M. Torres Canizales, M. Alba Domínguez, P. Nozal Aranda, M.C. García Rodríguez, E. López Granados, A. Ferreira Cerdán y R. Álvarez Doorno

Unidad de Inmunología, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid.

**Objetivos:** Estudio retrospectivo-descriptivo de la prevalencia de autoinmunidad dentro del grupo de pacientes diagnosticados de SVCID entre 1972-2010 en nuestro hospital.

**Material y métodos:** El diagnóstico de SVCID fue determinado por características clínicas y estudio inmunológico de acuerdo a los criterios existentes en su momento y corroborados según la definición actual. Se realiza la recogida de datos de 155 pacientes que asistieron a la consulta de Inmunología Clínica del Hospital La Paz. El seguimiento medio fue de al menos 5 años. Los datos se analizaron mediante análisis estadísticos.

**Resultados:** Del total de 155 pacientes diagnosticados de SVCID, la edad media de diagnóstico fue de 26,2 años. Se encontraron Enfermedades y manifestaciones autoinmunes en 60 pacientes (39%), mayoritariamente en mujeres, y de tipo órgano específico. La presencia de autoinmunidad se asoció significativamente con un peor pronóstico  $p = 0,04$ . Se diagnosticaron neoplasias en al menos 17 pacientes (11%), la más prevalente de tipo Linfoma. De este grupo de pacientes con neoplasia 11 presentaron autoinmunidad (64,7%), encontrándose una asociación significativa con el desarrollo de tumores sólidos  $p = 0,009$ . Durante el seguimiento 24 pacientes fallecieron, de los cuales 14 habían presentado algún tipo de manifestación autoinmune (56%), de este grupo, 6 pacientes presentaron neoplasia (42,8%), siendo más frecuente el cáncer gástrico (83,3%).

**Conclusiones:** En nuestra serie de pacientes con SVCID la presencia de autoinmunidad se asocia con un peor pronóstico. El tipo de neoplasias varía en la serie de pacientes con autoinmunidad, presentándose mayoritariamente tumores sólidos, principalmente cáncer gástrico. Estos datos reafirman la importancia de la sospecha diagnóstica de neoplasia especialmente en pacientes con autoinmunidad.

## CÉLULAS B E HIPERSENSIBILIDAD

**Moderadores:** José A. Brieva Romero (Cádiz) y Marta Ferrer Puga (Pamplona)

### O-009. ROLE OF MIR217 IN B CELL FUNCTION

N. Bartolomé Izquierdo, V.G. de Yébenes y A.R. Ramiro  
CNIO, Madrid.

Upon antigen encounter mature B cells engage in the germinal center reaction, a complex differentiation program that involves class switch recombination and somatic hypermutation, and it is of critical importance for the diversification of the antibody repertoire and the efficiency of the immune response. However, the germinal center reaction can generate bystander DNA damage, being particularly prone to lymphomagenic transformation. For this reason, understanding the mechanisms that regulate germinal center reaction is crucial. microRNAs are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally. In the last years microRNAs have emerge as fine tune modulators of many important cellular processes, including oncogenic transformation (oncomiRs). To identify new microRNAs involved in the regulation of germinal centers, we performed a microRNA microarray comparing resting B cells with LPS and IL4 activated B cells. miR217 is one of the only three specifically upregulated miRNAs in the activated B cells. To investigate the role of miR217 in vivo, we have developed mouse models for miR217 overexpression in B cells (miR217TG). We have found that miR217TG have increased response to immunization. To assess whether these enhanced germinal center reaction could have a prolymphomagenic effect, the miR217 transgenic and KI mice were bred into a tumour prone background. Preliminary results indicate that miR217 overexpressing mice present an early development of splenomegaly and increased B cell lymphoma generation. Our current research is focused now in the characterization of the generated lymphomas and in finding the mRNA targets of miR217 that could be responsible for the observed phenotype.

### O-010. ASOCIACIÓN DE PLA A1 Y PLA A2 EN LA ALERGIA ALIMENTARIA A PRU P3

M. Caballero Baños<sup>1</sup>, M. Pascal<sup>1</sup>, R. Vilella<sup>1</sup>, L. Millán<sup>1</sup>, J. Milà<sup>1</sup>, R.M. Muñoz Cano<sup>2</sup>, J. Sánchez López<sup>2</sup>, A. Valero<sup>2</sup> y J. Bartra<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Inmunología, CDB; <sup>2</sup>Unidad de Alergia, Servicio de Neumología y Alergia Respiratoria, ICT, Hospital Clínic, Barcelona.

**Introducción:** La alergia alimentaria a melocotón por sensibilización a proteína de transferencia de lípidos (LTP) Pru p3 puede conllevar alergia a LTP homólogas de otros alimentos vegetales como es la de avellana (Cor a8) dando lugar al "síndrome de LTP". La polinosis por Platanus y Artemisia se asocia a un mayor riesgo de sensibilización a Pru p3 al ser la LTP uno de sus alérgenos (Pla a3 y Art v3 respectivamente).

**Objetivos:** Asociación de sensibilización a Pla a1 y/o Pla a2 (alérgenos mayoritarios de Platanus) y alergia alimentaria a Pru p3 y/o Cor a8.

**Material y métodos:** Se seleccionaron pacientes alérgicos a LTP de melocotón y/o polen de Platanus. A todos ellos se realizó una determinación de IgE sérica específica a Pru p3, Pla a1, Pla a2, Cor a8 y Art v3 mediante microarray (ISAC® Phadia).

**Resultados:** 1. Pacientes Pru p3 positivos: 60% son Platanus positivos; > 55% son Cor a8 positivos (estos también son Platanus

y/o Art v3 positivos); < 26% son Cor a8 negativos, siendo Platanus y/o Art v3 positivos 2. Pacientes Platanus positivos: 66% son Pru p3 positivos (> 65% de estos son Cor a8 positivos).

**Conclusiones:** La sensibilización a Pla a1 y Pla a2 es un marcador de riesgo para presentar alergia a Pru p3. La sensibilización a Pla a1 y/o Pla a2 y Art v3 es un factor altamente predictivo del síndrome de LTP.

### O-011. DINÁMICA CELULAR DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS B, CD19+CD45RLO PRESENTE EN EL BAZO DE RATONES ADULTOS

B. de Andrés Muguruza, B. Palacios, N. Serrano, I. Cortegano, C. Ruiz, F. Martínez, M. Prado, M. Alia, M. Marcos y M. Gaspar

*Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda. CBMSO, Cantoblanco, Madrid.*

Los linfocitos B CD19+CD45Rlo, han sido previamente definidos como una población esplénica (de localización preferentemente perifolicular en los folículos primarios), dirigida a la producción espontánea de IgG e IgA, que presenta un importante recambio celular en comparación a otras poblaciones de linfocitos B maduros tales como los linfocitos B foliculares o de zona marginal. Nos planteamos analizar su dinámica celular en condiciones homeostáticas y tras su activación, con objeto de estudiar su papel funcional. La población CD19+CD45Rlo aparece desde los primeros días de desarrollo neonatal en el bazo, en sangre periférica y placas de Peyer, pero no se detecta en el timo ni en los ganglios linfoides. En condiciones *in vitro*, las células CD19+CD45Rlo, purificadas por sorting y marcadas con el trazador CFSE, son capaces de proliferar y diferenciar en respuesta a LPS y BAFF+IL4 hacia plasmablastos (CD138+) secretando IgM, IgG1 e IgA así como IL10. Sin embargo, la activación a través del BCR en los linfocitos CD19+CD45Rlo, no es capaz de inducir señales de proliferación y/o diferenciación. Utilizando modelos *in vivo* de respuestas T-dependientes y T-independientes (tipo I y tipo II), hemos determinado que las células CD19+CD45Rlo se encuentran involucradas en respuestas policoniales de tipo I, donde proliferan de forma acusada como plasmablastos. En conclusión, las células CD19+CD45Rlo representan un nuevo componente innato del sistema inmune adaptativo, capaz de ejecutar rápidas respuestas humorales frente a antígenos comunes bacterianos o virales, que puede ser relevante en momentos tempranos de la vida del individuo.

### O-012. CHARACTERIZATION OF NORMAL B-CELL SUBSETS FROM HUMAN SECONDARY LYMPHOID TISSUES: FIVE SUBSETS WITH CONVERGENT GENE EXPRESSION PROFILES AND PHENOTYPE

M. Pérez Andrés, M. Krag Kjeldsen, A. Schmitz, J. Almeida Parra, P. Johansen, K. Fogh, M. Boegsted, M. Nyegaard, A. Orfao, H.E. Johnsen y K. Dybkaer

*Service of Cytometry & Department of Medicine, CICancer, University of Salamanca. Department of Haematology, Medical Center and Aalborg Hospital Science and Innovation Center (AHSIC), Aarhus University Hospital, Aalborg, Denmark. Department of Pathology, Aalborg Hospital, Aalborg, Denmark.*

**Introduction:** Although normal B-cell hierarchy has been clearly established in human bone marrow and peripheral blood, B cell maturation in secondary lymphoid tissues is recognized as very complex. Identification and characterization of the maturation B subsets in secondary lymphoid tissues will enable the study of normal and malignant B-cell hierarchy.

**Methods:** We hypothesise that B-cell subpopulations have distinct phenotypic profiles reflecting their global functions. From homogenized human tonsil tissue, cells are subjected to 8-colours flow cytometry using combinations of 38 maturation markers, to identify and isolate distinct B-cell subpopulations. Morphological inspection, global and single gene expression profiling confirmed the maturation step of each subset identified by FC.

**Results:** 5 B-cell subsets from human tonsil (N = 20), namely naïve, centroblast, centrocyte, memory, and plasmablast have been identified based on their immunophenotype. These subsets were also identified in lymph nodes (N = 3). The cellular identity of the subpopulations was verified at the gene expression level using microarray and qRT-PCR gene expression profiling based on the used discrimination CD markers as well as transcription factors KI-67 (proliferation) and (BACH2, BCL6, PAX5, IRF4, PRDM1, XBP1 (B-cell differentiation markers). Finally, an 8-colour single-tube was defined that allows the sorting of all these subsets simultaneously using: CD3, CD20, CD27, CD38, CD44, CD45, and CXCR4.

**Conclusions:** With a combination of surface marker expressed antigens and gene expression analysis of B cell subsets a strong methodology is provided to generate improved insights into the B-cell biology and thereby also development of B-cell malignancies.

### O-013. PRECURSORES DE CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS HUMANAS PUEDEN SER DIFERENCIADOS EN OTROS LINAJES MESENQUIMALES

A. Prados Martín, R. Muñoz Fernández, E. Leno Durán, D. García Morales, P.J. Martínez González y E. García Olivares

Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra (CSIC), Madrid.

**Objetivos:** Las células foliculares dendríticas (FDC, Follicular Dendritic Cells) son células estromales no hematopoyéticas, localizadas en la zona B de los órganos linfoides secundarios. Nuestro grupo ha sido capaz de obtener y mantener en cultivo precursores de FDC, demostrando que estas células se encuentran estrechamente relacionadas con las células madre mesenquimales (MSC, Mesenchymal Stromal Cells). El objetivo de este trabajo consistió en diferenciar dichas líneas en otros linajes mesenquimales (adipocitos, condrocitos y osteocitos) e intentar completar la diferenciación de los precursores en FDC maduras.

**Material y métodos:** Se obtuvieron líneas de FDC humanas de amígdalas, obtenidas de pacientes de entre 3 y 10 años con amigdalitis crónica, las cuales fueron diferenciadas utilizando medios condicionados específicos para cada linaje. La diferenciación fue confirmada mediante tinciones histoquímicas, RT-PCR y citometría de flujo.

**Resultados:** Las líneas obtenidas mostraron un fenotipo característico de FDC y fueron capaces de rescatar de la apoptosis a linfocitos B de amígdalas. El tratamiento con Linfotoxina y TNF $\alpha$  (citoquinas implicadas en la diferenciación de las FDC) determinaron un incremento de la expresión de ICAM-1 y VCAM-1, y una pequeña población comenzó a expresar CD35 (marcador de FDC maduras). Este efecto se vió potenciado por el ácido retinoico, factor que inicia la diferenciación de las células estromales linfoides in vivo. Las líneas, finalmente, mostraron potencial de diferenciación adipogénico, condrogénico y osteogénico bajo las condiciones apropiadas.

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que las células foliculares dendríticas se encuentran estrechamente relacionadas con las células madre mesenquimales.

### O-014. IL-21 ACTÚA DIRECTAMENTE SOBRE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS (CP) HUMANAS DE ÓRGANOS LINFOIDES SECUNDARIOS PERO NO SOBRE CP MÁS MADURAS: PAPEL DE LOS LINFOCITOS TFH (FOLLICULAR HELPER)

B. Rodríguez Bayona, A.B. Ramos Amaya y J.A. Brieva Romero

Unidad de Investigación y Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

**Objetivos:** Valorar el efecto de la citoquina IL-21, producida principalmente por linfocitos T CD4+CXCR5+ (Tfh), sobre las CP a lo largo del eje de maduración: órgano de inducción (amígdala, ganglio)- sangre periférica (SP)- médula ósea (MO).

**Material y métodos:** Se obtuvieron muestras para diagnóstico de aspirados de MO, amígdalas de sujetos sometidos a amigdalectomía y SP de voluntarios sanos previamente inmunizados con una dosis de recuerdo frente a toxoide tetánico/diftérico. Se trabajó con células mononucleares (CM) y con células purificadas mediante FAC-sorting. Se realizaron cultivos celulares a diferentes tiempos y la producción de inmunoglobulinas se testó en los sobrenadantes mediante ELISA. La identificación de las poblaciones celulares, la expresión de IL-21R y de STATs y el análisis de la apoptosis (anexina-V) se determinaron mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Las CP de amígdala, a diferencia de las de SP y MO, expresaban IL-21R. IL-21 inducía un aumento de producción de inmunoglobulinas en cultivos de CM de amígdala no observado en CM de SP y MO. Este efecto también se reproducía en cultivos de CP purificadas indicando una acción directa sobre las CP. El co-cultivo de CP con linfocitos Tfh inducía un aumento de producción de inmunoglobulinas que se inhibía en presencia del bloqueante Fc-IL21R. IL-21 daba lugar a la activación temprana y transitoria de STAT-3 en CP y aumentaba moderadamente su supervivencia.

**Conclusiones:** Las CP procedentes de órganos inductivos, consideradas como CP con un menor grado de maduración, responden a la estimulación con IL-21 derivada de linfocitos Tfh.

### O-015. CXCL13/CXCR5 AUMENTA LA ACTIVACIÓN POR ANTÍGENO DE LAS CÉLULAS B MEDIANTE LA MODULACIÓN DE LA DINÁMICA CELULAR

J. Sáez de Guinoa Corral, L. Barrio Cano, M. Mellado y Y.R. Carrasco

B cell Dynamics Group, Department of Immunology and Oncology, Centro Nacional de Biotecnología (CNB/CSIC, Madrid).

Las células B migran activamente en el folículo primario en busca de antígeno específico; este comportamiento o dinámica celular está en gran parte mediado por la quimioquina CXCL13 y su receptor CXCR5. El reconocimiento de antígeno específico a través del receptor de antígeno de las células B (B cell receptor, BCR) promueve la parada celular y formación de la sinapsis inmunológica (SI). Poco se sabe acerca de la interrelación entre estos dos receptores, CXCR5 y BCR, y cómo esta afecta a la dinámica y activación de la célula B. Para abordar este aspecto, hemos establecido un modelo bidimensional de membranas artificiales que permite el seguimiento de la migración y reconocimiento de antígeno de células B primarias en tiempo real. Nuestros datos indican que la señalización a través del BCR modula la migración en respuesta a CXCL13; este efecto depende de la abundancia de antígeno y la afinidad del BCR por el mismo. CXCL13/CXCR5 no afecta significativamente a la formación de la SI; es más, la presencia de CXCL13 en el contexto molecular de reconocimiento de antígeno aumenta la activación de

las células B mediada por BCR al menos de dos formas distintas. Por un lado, CXCL13/CXCR5 favorece el encuentro de antígeno en la cercanía de la SI al promover la emisión de membraneruffles y contactos LFA-1/ICAM-1; por otro lado, permite el encuentro de antígeno e integración de las señales a través del BCR en células B en movimiento, mediante el establecimiento de una plataforma migratoria denominada kinapsis que implica interacciones LFA-1/ICAM-1.

#### O-016. ELEVADA PROPORCIÓN DE LINFOCITOS T-CD4+ PRODUCTORES DE IL-4 Y TGF-β Y DE CÉLULAS TREG EN PACIENTES CON ALERGIA A PÓLENES

J.M. Urra Ardanaz<sup>1</sup>, P. Carrasco Salas<sup>1</sup>, F. Feo Brito<sup>2</sup>, R. Melero Valencia<sup>1</sup>, A. Ortega<sup>2</sup>, M.J. Muñoz<sup>2</sup> e I. Rodenas Garrido<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Inmunología; <sup>2</sup>Alergia, Hospital General de Ciudad Real.

**Introducción:** El balance entre la actividad de linfocitos efectores Th2 y la de células supresoras (Treg) es determinante en la sensibilización frente a alergenos y el posterior desarrollo de alergia.

**Objetivos:** Analizar las diferencias en linfocitos Th2 y células Treg entre pacientes alérgicos al polen de gramíneas y/u olivo y controles no atópicos, tras estimulación *in vitro* con extractos de pólvenes.

**Métodos:** Se estimularon células mononucleadas de 31 pacientes y 16 controles con 10 µg/mL de extractos de polen durante 48 h. Se analizaron por citometría de flujo las células Treg por su expresión de CD4+ Foxp3+ y las células CD4 productoras de citokinas por la expresión intracitoplasmática de IL-4, IL-10, INF-γ y TGF-β.

**Resultados:** Los pacientes alérgicos presentaron un porcentaje mayor de células Treg que los controles sanos (28,0 vs 15,7;  $p = 0,02$ ). Con respecto a los linfocitos CD4 productores de citokinas, se encontraron en los pacientes alérgicos un mayor porcentaje de células CD4 con producción de IL-4 (25,2 vs 9,7;  $p < 0,0001$ ), TGF-β (8,9 vs 2,9;  $p < 0,0001$ ) e INF-γ (7,9 vs 4,2;  $p = 0,03$ ). Para la producción de IL-10 no se observaron diferencias (3,2 vs 4,0).

**Conclusiones:** Tras exposición a extractos de pólvenes los pacientes con alergia presentan una mayor proporción de células supresoras Treg (CD4+Foxp3+), y un perfil diferente de células CD4 productoras de interleukinas, con una tendencia hacia una mayor producción de IL-4 y TGF-β.

#### O-017. APRIL RESTORES LPS ANTIBODY RESPONSE IN BTK-DEFICIENT MICE

M. Zonca Colleoni, D. Florindo Pinheiro, L. Fernández Zabalegui, S. Mañes Brotón, M. Hahne y L. Planelles Carazo

Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. Institute de Génétique Moléculaire de Montpellier, Montpellier, Francia.

APRIL is a TNF family protein with important functions in B cell survival and activity. It has been previously reported that APRIL-Tg mice show an expanded peritoneal B-1 B cell population, elevated natural antibody levels as well as enhanced TI humoral responses (Planelles et al, *Cancer Cell*. 2004). Lack of Bruton's tyrosine kinase (Btk) causes the X-linked immune defect (Xid) in mice due to the fact that Btk is critical for B cell development. In addition, peripheral Xid B cells have a high spontaneous apoptosis rate and are hyporesponsive to various mitogenic stimuli, partially due to defects in expression of anti-apoptotic molecules (Bcl-2, Bcl-xL) and of cytokines (IL-10, TNF). Xid mice

also fail to respond to T cell-independent antigens and have low levels of natural IgM antibodies. We asked if APRIL could restore the deficiencies caused by the absence of Btk and if Btk is implicated in APRIL signaling. We have generated in our group Xid/APRIL-Tg mice and have characterized the B cell compartment and function by means of both *in vitro* and *in vivo* experiments. We have seen that APRIL overexpression enhances natural antibody levels and restores the LPS antibody response (IgM) in mice lacking Btk, indicating that APRIL can promote TI (type I) antibody production in a Btk-independent manner. Moreover, APRIL overexpression increases B cell survival and B-cell Bcl-2 expression in Xid mice. We are currently investigating whether antibody secretion and migration are also affected and the molecular mechanisms involved in the Xid/APRIL-Tg mice phenotype.

#### CÉLULAS DENDRÍTICAS E INMUNIDAD INNATA

**Moderadores:** Rafael Solana (Córdoba) y Pablo Sarobe Ugarriza (Pamplona)

#### O-018. DENDRITIC CELLS TAKE-UP AND PRESENT ANTIGENS FROM VIABLE AND APOPTOTIC POLYMORPHONUCLEAR LEUKOCYTES

C. Alfaro Alegria, N. Suárez Fuentetaja, J.L. Pérez Gracia, I. Martínez Forero, S. Hervás Stubbs, E. Bolaños Mateo, A. Palazón García, A. Morales Kastresana, A. González Hernández e I. Melero Bermejo

CIMA, CUN, Pamplona.

Dendritic cells (DC) are endowed with the ability to cross-present antigens from other cell types to cognate T cells. DC are poised to meet polymorphonuclear leukocytes (PMNs) as a result of being co-attracted by interleukin-8 (IL-8), for instance as abundantly produced by tumor cells. Human and mouse DC can readily internalize viable or UV-irradiated PMNs. Internalization was abrogated at 4 °C and was partly inhibited by anti-CD18 mAb. In mice, DC which had internalised PMNs containing electroporated ovalbumin (OVA) were able to cross-present the antigen to CD8 (OT.1) and CD4 (OT.2) TCR transgenic T cells. Moreover, in humans, tumor cell debris is internalized by PMNs and the tumor-cell material can be subsequently taken from the immunomagnetically re-isolated PMNs by DC. Using CT26 (H-2d) mouse tumor cells, it was observed that if tumor cells are intracellularly loaded with OVA and UV-irradiated, they become phagocytic prey of H-2d PMNs. If such PMNs, that cannot present antigens to OT1 T cells, are immunomagnetically re-isolated and phagocytosed by H-2b DC, such DC productively cross-present OVA to OT1 T cells. As a whole our results indicate that antigens phagocytosed by short-lived PMNs can be in turn internalized and cross-presented by DC.

### O-019. GALECTIN 1 AND 3 INTERACT WITH SELECTED GROUP B MEMBERS OF THE SCAVENGER RECEPTOR CYSTEINE-RICH SUPERFAMILY

C. Escoda Ferran<sup>1</sup>, V. Martínez<sup>1</sup>, C. Miró-Julíà<sup>1</sup>, H. Leffler<sup>2</sup>, F. Liu<sup>3</sup> y F. Lozano-Soto<sup>1,4,5</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centre Esther Koplowitz, Barcelona. <sup>2</sup>Section MIG (Microbiology, Immunology, Glycobiology), Inst. Laboratory Medicine, Lund University, Suecia. <sup>3</sup>Department of Dermatology, UC Davis School of Medicine, Sacramento, California, EEUU.

<sup>4</sup>Servei d'Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona. <sup>5</sup>Departament de Biología Cel·lular, Immunologia i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Throughout evolution, interactions between microorganisms and their hosts have taken place through both direct cell-cell contacts and the sensing of soluble products. Microbial and eukaryotic cell surfaces display carbohydrates and it is widely believed that they have a role in cell-to-cell and soluble protein-to-cell interactions. Galectins are a family of small soluble mammalian proteins defined by the presence of conserved  $\beta$ -galactoside carbohydrate recognition domains (CRDs). They are known to bind to glycosylated structures from either exogenous (Pathogen-associated Molecular Patterns, PAMPs) or endogenous (Damage-associated molecular patterns; DAMPs) origin. Among the reported endogenous ligands of galectins, there are some members of the Scavenger Receptors Cysteine-Rich Superfamily (SRCR-SF) such as Mac2BP or Hensin. We wondered then whether other members of the SRCR-SF could also bind to galectins. With this aim we explored the possible interaction of galectins 1 and 3 with group B members of the SRCR-SF of either lymphoid (CD5, CD6) and non-lymphoid origin (Spa/AIM, S5D-SRCRB) in which our group is especially interested. The results demonstrate that soluble human CD6 and mouse S5D-SRCRB, but not human CD5 or Spa/AIM, interact with both galectin 1 and galectin 3 in a sugar-dependent way since it is inhibited in the presence of lactose but not sucrose. However, there were preferential binding of both CD6 and S5D-SRCRB for different galectins, which may reflect functional differences. Further studies specifically addressed to better characterize the interaction between CD6 and galectins showed that binding to galectins 1 and 3 is competed by mouse mAbs to human CD6 (161.8, MAEC-1.11, SPVL14.2), and that galectin 3 mutants defective in their sugar-recognition abilities do not bind to CD6. Interestingly, galectin 3 competed the previously reported bacterial binding and aggregation properties of soluble CD6. Altogether, our data report the specific interaction of galectins 1 and 3 with some but not all group B SRCR-SF members, likely contributing to the regulation of the functional capabilities of the latter.

### O-020. INFLAMMASOME ACTIVATION DURING EXACERBATIONS OF COPD

R. Faner Canet, P. Sobradillo Ecenarro, N. González, N. Soler, E. Ballester y A. Agustí García-Navarro

Fundación Caubet Cimera, Mallorca. Ciber en Enfermedades Respiratorias, Departamento de Neumología, Instituto del Tórax, Hospital Clínic, Barcelona.

**Introduction:** Chronic obstructive pulmonary disease (COPD) is characterized by an enhanced inflammatory response to cigarette smoke that is further amplified during exacerbations (ECOPD). The inflammasome is an intra-cellular sensing mechanism that leads to the activation of caspase-1 and the

processing of pro IL-1 $\beta$  and pro IL-18 into their mature forms.

**Objectives:** To investigate if the inflammasome pathway is activated during episodes of ECOPD patients.

**Methods:** We studied 10 ECOPD patients, 7 of whom were re-evaluated 3 months after discharge. As controls, we studied 13 patients stable COPD (SCOPD), 8 smokers with normal lung function and 11 non smokers. In all these individuals we determined: (1) in serum, the level of caspase-1, IL-1 $\beta$ , IL-18, IL-1RA, IL-6, IL-8 and TNF- $\alpha$ ; (2) in circulating monocytes the intracellular activity of caspase-1, both basally and after stimulation with a number of inflammasome ligands including ATP, nigericin and Cigarette Smoke Medium (CSM); and (3) in whole blood caspase-1 and NLRP3 mRNA.

**Results:** Compared to never smokers ECOPD patients had higher inflammasome activation characterized by: increased levels of extracellular caspase-1 (84.53 vs 185.43,  $p = 0.0102$ ), IL-1RA (378.63 vs 811.47  $p = 0.0028$ ), IL-18 (287.64 vs 398.39,  $p = 0.0124$ ) and decreased intracellular caspase-1 activity (201.82 vs 127.61,  $p = 0.0048$ ). After 3 months the decrease in caspase-1 activity observed was recovered. SCOPD had lower intracellular caspase-1 activity but similar levels of IL-1RA and IL-18. All groups responded similarly to the different inflammasome ligands. CSM did not activate the inflammasome pathway.

**Conclusions:** The inflammasome pathway participates in the inflammatory burst that characterizes ECOPD.

### O-021. LA PRODUCCIÓN AUTOCRINA DE BMP REGULA LA EXPRESIÓN DE PD-L1 Y PD-L2 EN LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

V.M. García Martínez, J. Valencia Mahón, L. Hidalgo Lumbreiras, A. Zapata González, C. Hernández López, A. Vicente López, R. Sacedón Ayuso y A. Varas Fajardo

Departamento de Biología Celular, Facultades de Medicina y Biología, Universidad Complutense de Madrid.

**Objetivos:** Las proteínas morfogenéticas óseas (BMPs) son factores de crecimiento multifuncionales que regulan procesos de diferenciación, proliferación y muerte celular en numerosos sistemas, incluyendo el sistema inmunitario. Previamente hemos descrito que la vía de señalización BMP es funcional en las células dendríticas (DCs), que expresan tanto los receptores para BMPs como las proteínas Smad necesarias para translucir la señal. En este trabajo analizamos la capacidad de las DCs para producir BMPs y la funcionalidad de esta producción autocrina durante su maduración.

**Material y métodos:** A partir de monocitos de sangre periférica se obtuvieron DCs inmaduras, cuya maduración se indujo con citocinas pro-inflamatorias. El inhibidor dorsomorfina, que bloquea la vía canónica de señalización BMP, se adicionó durante el proceso de maduración, y las propiedades fenotípicas y funcionales de las DCs resultantes fueron analizadas por FACS, ELISA y q-PCR.

**Resultados:** Si bien las iDCs son capaces de secretar bajos niveles de BMP-4, su producción se incrementó durante el proceso de maduración. Las DCs maduradas en presencia del inhibidor dorsomorfina presentaron una expresión disminuida de marcadores de maduración, principalmente PD-L1 y PD-L2, mientras que la producción de citocinas no fue afectada. Las DCs resultantes mostraron una mayor capacidad para estimular linfocitos T, así como células NK. Finalmente, fueron detectados niveles más bajos de IRF1, factor de transcripción que regula positivamente la expresión de PD-L1 y PD-L2.

**Conclusions:** Este estudio demuestra que la vía de señalización BMP regula la expresión de PD-L1 y PD-L2 durante el proceso de maduración de las DCs, vía IRF-1.

## O-022. SWINE, AVIAN AND HUMAN INFLUENZA A 2009 VIRUS ARE DIFFERENTIALLY SENSED BY CONVENTIONAL PORCINE DENDRITIC CELLS IN VITRO

T.N. Ibrahim Mussá, M. Pujol, C. Rodríguez-Cariño, E. Silva, L. Córdoba, E. Crisci, M.P. Lecours, J. Hernández, J. Domínguez, L. Fraile y M. Montoya

Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Campus de la Universitat Autònoma de Barcelona.

Departament de Medicina i Sanitat Animals, Universitat Autònoma de Barcelona. Cátedra de Patología, Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela.

Maracay, Venezuela. Laboratorio de Inmunología, CIAD A.C. Hermosillo, Sonora, México. Faculté de Médecine Vétérinaire, GREMIP-CRIP, Université de Montréal, St-Hyacinthe, Québec, Canadá. Hipra, Amer, Girona. Universitat de Lleida.

Departamento de Biotecnología, INIA, Madrid. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria (IRTA), Barcelona.

**Objectives:** To characterize the response of porcine bone marrow derived dendritic cells (poBMDC) or conventional DC, after infection with swine, avian or human influenza virus in vitro.

**Materials and methods:** Porcine BMDC were generated as previously described. Morphology and virus infection was evaluated by transmission electron microscopy (TEM). Porcine-BMDC were infected with A/swine/Spain/SF32071/2007(H3N2), Highly pathogenic A/chicken/Italy/13474/99(H7N1), Low pathogenic A/Anas platyrhynchos/Spain/1877/2009(H7N2), and pandemic A/Catalonia/63/2009(H1N1) viruses or stimulated with TLR agonists (Poly:IC, LPS or R837). Additionally, 16h post infection (hpi) with H3N2, cells were further stimulated with Poly:IC or LPS for 24h. DC phenotype was analysed by flow cytometry at 24h, whereas IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-12, IL-18 secretion by ELISA 2 and IL-10 and TGF- $\beta$  by RT-qPCR at 4, 8, 16 and 24hpi.

**Results:** Infected-poBMDC presented different phenotype by means of SLAI, SLAI and CD80/86 up-regulation. Different cytokine kinetic profile of IFN- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ , IL-18 and IL-12 were observed depending on the virus used. Stimulation with TLR agonists induced upregulation of SLAI, SLAI and CD80/86 and different kinetic profile in secreted cytokines, being high responders to Poly:IC and LPS. Stimulation with Poly:IC o LPS after H influenza virus did not change the profile of secreted cytokines neither the profile of activation markers compared to their controls. No induction of IL-10 and TGF- $\beta$  mRNA was detected in infected cells.

**Conclusions:** The different responses observed in poBMDC infected with influenza virus or stimulated with TLR agonists pave the way for understanding the interaction between

## O-023. FUNCIÓN DIFERENCIAL DE LOS LIGANDOS DE NOTCH DLL1 Y JAG1 EN LA INDUCCIÓN DEL PROGRAMA GENÉTICO DE MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INTRATÍMICAS PLASMACITOIDES Y CONVENCIONALES

E. Martín Gayo, M.J. García León, B. de Andrés, M.L. Gaspar y M.L. Toribio

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Los linfocitos T se generan el timo a partir de precursores linfomieloides (TLMPs) que activan la vía de Notch por reconoci-

miento de ligandos específicos. Aquellos TLMPs que escapan a la señalización por Notch pierden el potencial pro-T y se diferencian en progenitores alternativos de fenotipo mieloide (pM) que generan células dendríticas plasmacitoideas (pDCs) y convencionales (cDCs) y células NK. En el timo se expresan dos familias de ligandos de Notch, Delta-like (DLL1 y DLL4) y Jagged (JAG1 y JAG2). Nuestros datos previos indican que estos ligandos tienen efectos opuestos en la generación del pM, así como en la diferenciación de pDCs, siendo DLL1 inhibitorio pero JAG1 permisivo, lo que sugiere una función diferencial en la inducción del programa madurativo de pDCs y cDCs. Para analizar esta posibilidad, hemos realizado análisis genéticos de los patrones de expresión de factores de transcripción (TF) implicados en la especificación de estos linajes celulares. Se han analizado comparativamente pDCs y cDCs intratímicas y sus progenitores pM, así como células pro-T. Además, hemos utilizado un sistema in vitro de activación de la vía de Notch en precursores TLMP y pM por ligandos DLL1 o JAG1, que nos ha permitido analizar el impacto diferencial de ambos ligandos en la inducción del programa madurativo de estos progenitores. Nuestros resultados demuestran que la activación de Notch inducida en pM por JAG1, pero no por DLL1, promueve la transcripción de TF como AIOLOS y SPIB que se transcriben activamente en pDCs. Apoyando la relevancia funcional de la señalización inducida por JAG1 en la generación de pDCs, nuestros estudios inmunohistoquímicos demuestran la localización selectiva de las pDCs en áreas intratímicas medulares enriquecidas en células JAG1+.

## O-024. NOTCH SIGNALING IS INVOLVED IN HUMAN CDC/PDC CROSS-TALK

B. Pérez Cabezas, M. Naranjo-Gómez, P. Bastos-Amador, M. Bofill, G. Requena-Fernández, F. Carmona, F. Núñez, R. Pujol-Borrell y F.E. Borràs-Serres

Lirad-bst, Instituto de Investigación Germans Trias i Pujol IGTP, Badalona, Barcelona. Institució Catalana de Recerca i Estudis Avançats ICREA, Fundació Irsi Caixa, Badalona, Barcelona. Departamento de Estadística de la Universidad de Barcelona. Unidad de Soporte Científico-Técnico UCTS, Instituto de Investigación Vall d'Hebron, Barcelona.

**Introduction:** Bidirectional cross-talk between conventional (cDC) and plasmacytoid (pDC) dendritic cells (DCs) depends on soluble factors and cell-cell contacts. In mice, DC cross-talk is dependent on CD40-CD40L interactions and IL-15 secretion, but in humans no mechanism has been described so far.

**Objectives:** To investigate the events and mechanisms of "conditioning" of pDCs by activated cDCs.

**Methods:** Dendritic cell subsets (cDCs and pDCs) were sorted from healthy donors. Conventional DCs were stimulated or not with LPS (cDCCTRL, cDCLPS), whereas pDCs were CFSE-labeled and maintained in IL3. Then, CFSE labeled-pDCs were cocultured (conditioned) with cDCCTRL or cDCLPS. Following this conditioning, CFSE-pDCs were sorted again and further analyzed at RNA (microarrays, real time RT-PCR) and protein level (flow cytometry, Luminex assays).

**Results:** Conditioned pDCs showed a state of moderate activation as indicated by a partial phenotypic maturation and moderate increase in allostimulatory capacity. Microarray, RT-PCR and protein secretion analyses showed the induction of several genes in conditioned pDCs, including proinflammatory cytokines and chemokines. Of particular interest was the up-regulation of the Notch target genes BATF,

HEY1 and IL7R. As Notch signaling is involved in multiple cellular processes and recent data also supports their prominent role in the regulation of the immune response, we then analyzed the expression and function of Notch receptors and ligands separately on both, human blood cDCs and pDCs. The expression of Notch molecules and their modulation upon TLR activation partially differed between cDCs and pDCs. Beyond the induction of Notch target genes and modulation of maturation markers, the study of Notch ligation in human blood DCs also revealed a differential role in the secretion of some specific cytokines/chemokines. In addition, when the Notch specific inhibitor DAPT was present in the co-cultures experiments, the communication between human cDCs and pDCs was partially disrupted, thus directly affecting the expression/production of important molecules such as CD25, CCL19 and IL18RAP.

**Conclusions:** The data obtained revealed that Notch signaling pathway is involved in the communication between human DC subsets, which may ultimately contribute to define the local milieu promoted by these cells under the particular conditions of the immune.

#### O-025. NEURONAL APOPTOSIS INHIBITORY PROTEIN NAIP COLOCALIZES WITH EEA1 AND RAB5 IN LATEX BEAD PHAGOSOMES

D.I. Rojas Barros, M. Alemán, L. Calvache, D. Porcel, A. MacKenzie, A. Abadía-Molina y F. Abadía-Molina

Centro de Investigación Biomédica; Centro de Instrumentación Científica; Departamento de Biología Celular, Universidad de Granada. Apoptosis Research Centre, CHEO Research Institute, University of Ottawa, Canadá.

Nucleotide-binding oligomerization (NOD)-like receptors (NLRs) participate in the innate cellular recognition of PAMPs. The neuronal apoptosis inhibitory protein NAIP, was the first human inhibitor of apoptosis (IAP) identified. NAIP possesses a NOD domain and a C-terminal leucine-rich repeat (LRR) domain. The latter motif confers to NAIP the ability to sense *L. pneumophila* and *S. typhimurium* derived flagellin. These characteristics localize NAIP at the cellular crossroads of apoptosis and innate immunology. The involvement of NAIP in the effective elimination of bacteria in human and murine macrophages suggests a possible role for the protein during the phagocytic process. In a NAIP defective context *Legionella* survives intracellularly by creating a replicative organelle that evades fusion with lysosomes. We are investigating the possible role of NAIP in phagosome maturation by initially exploring NAIP colocalization, with the early/nascent phagosomes markers EEA1 and Rab5 in human and mouse macrophages. We are able to show, by means of confocal microscopy and using two previously characterized polyclonal anti-NAIP antibodies, the colocalization of NAIP in latex bead phagosomes with both EEA1 and Rab5 in mouse RAW 264.7 cells and in PMA differentiated human THP-1 cells. NAIP immuno-electron microscopy in TGC elicited peritoneal mouse macrophages showed colloidal gold localized to vesicle-like cytoplasmic compartments which mainly resemble components of the endocytic pathway. The co-localization of NAIP with phagosomes is central to our understanding of its role in legionnaire resistance; our preliminary data confirming this physical disposition will be useful in further dissecting its role.

#### O-026. THE CHEMOKINE CXCL12 REGULATES MONOCYTE-MACROPHAGE DIFFERENTIATION AND RUNX3 EXPRESSION

P. Sánchez-Mateos Rubio<sup>1</sup>, L. Sánchez-Martín<sup>3</sup>, A. Estecha<sup>1</sup>, R. Samaniego<sup>2</sup>, S. Sánchez-Ramón<sup>1</sup> y M.A. Vega<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Unidad de Microscopía Confocal, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. <sup>3</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Microbiología Molecular y Biología de las Infecciones. Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid.

Monocytes are versatile cells that can express different functional programs in response to microenvironmental signals. We show that primary blood monocytes secrete the CXCL12 chemokine, and express the CXCR4 and CXCR7 receptors, leading to an autocrine/paracrine loop that contribute to shape monocyte differentiation to a distinct type of macrophages, with an enhanced expression of CD4, CD14 and CD163 or dendritic cells (DC), with a reduced functional ability to stimulate antigen-specific T lymphocyte responses. The *in vivo* relevance of CXCL12 production by mononuclear phagocytes was studied in metastatic melanoma tissues by a thoroughly immunofluorescence phenotyping of CXCL12<sup>high</sup> expressing cells which were CD45+, co-expressed the macrophage antigens CD68, CD163 and CD209 and constituted the 60-90% of tumor-associated macrophages (TAM). Microarray analysis of primary monocytes revealed that the endothelial growth factor VEGF and the angiogenic chemokine CCL1 mRNA levels were up-regulated in response to CXCL12, leading to enhanced expression of both proteins. In addition, we found that CXCL12 autocrine/paracrine signalling down-regulates the expression of the transcription factor RUNX3 and contributes to maintain the long-term CD4 and CD14 expression in monocytes/macrophages. Together, these results suggest that autocrine CXCL12 production modulates differentiation of monocytes towards a distinct program with proangiogenic and immunosuppressive functions.

#### O-027. CD137 EXPRESSED ON LYMPHATIC ENDOTHELIAL CELLS UNDER INFLAMMATION DRIVES CCL21 GUIDED MIGRATION OF DENDRITIC CELLS

A. Teijeira Sánchez, S. Garasa Larraza, F.D. Palazón García, I. Martínez Forero, I. Melero Bermejo y A. Rouzaut Subirá  
CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona.

CD137/TNFR9/41BB was described as a T and NK cell activated molecule. However, its expression is broader among leukocytes and includes endothelial cells in blood vessels under hypoxia, inflammation and in atherosclerotic lesions. Lymphatic endothelial cells upregulate CD317 surface expression upon stimulation with TNFa, LPS and IL-1b from undetectable levels in resting monolayers. CD137 crosslinking with agonist mAb results in NFkB nuclear translocation and subsequent upregulation of VCAM and the CCL21 chemokine. As a consequence an increased adhesion via VLA-4 is observed and, more importantly, there is a marked increase of CCR7 dependent migration towards treated LEC conditioned medium. Such migration is readily observed also with primary dendritic cells. Using explanted human dermal tissue, it was observed that inflamed skin contains abundant CD137 positive lymphatic vessels and that "ex vivo" incubation for 24 h with TNFa increases

CD137 in lymphatic capillaries. Our results as a whole show that the inflammatory function of lymphatic vessels can be regulated by CD137.

## INMUNODEFICIENCIAS

**Moderadores:** Óscar de la Calle (Barcelona) y Eduardo López Granados (Madrid)

### O-028. EVALUACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LINFOCITOS T CD3+CD4- CD8- EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA DE CD8

I. Bernardo González, E. Mancebo Sierra, I. Aguiló, A. Anel, L. Allende, J.M. Guerra Vales, J. Ruiz Contreras, O. de la Calle, C. González Santesteban y E. Paz Artal

Servicio de Inmunología; Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación; Servicio de Medicina Interna; Servicio de Pediatría, Sección de Inmunodeficiencias, Hospital 12 de Octubre. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular y Celular, Universidad de Zaragoza. Servicio de Inmunología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

**Objetivos:** El objetivo de este trabajo fue determinar el fenotipo y función de los linfocitos T CD4-CD8- (DN) en dos pacientes (P1 y P2) con inmunodeficiencia de CD8 por mutación Gly111Ser en la cadena  $\alpha$ .

**Métodos:** La localización de CD8 $\alpha$  mutada se estudió por transfección de células 293T. En células DN aisladas magnéticamente, el fenotipo y repertorio V $\beta$  se analizaron por citometría de flujo, y por qPCR se cuantificaron los "T-cell receptor excision circles" (TRECS). La capacidad citotóxica se analizó tras generar CTLs aloespecíficas.

**Resultados:** La proteína CD8 $\alpha$  mutada es retenida en el citoplasma de las células transfectadas. La población DN en los pacientes está disminuida (P1 = 7-10%, P2 = 10-16%) frente a LT CD8 de controles (13-31%). Las células DN presentan un fenotipo efector (CD45RA+/-CD27low/-CD28-) en P1, y memoria-efector (CD27+CD45RA-CCR7-) en P2, mientras que los linfocitos T naïve (CD45RA+CD27+CD28+) están disminuidos (39,3  $\pm$  13,6 en controles, 8,5  $\pm$  0,7 en P1, p = 0,02 y 4,5  $\pm$  0,7 en P2, p = 0,015). Las células DN presentan una concentración de TRECs menor que la de LT CD8+ de controles (P1: indetectable, C1:130, P2: 60, C2: 960) y un repertorio TCRV $\beta$  sesgado. In vitro, las células DN presentan un leve defecto de la función citotóxica y capacidad proliferativa disminuida.

**Conclusiones:** Estos datos demuestran que el coreceptor CD8 en humanos no es indispensable para la capacidad citotóxica pero que su ausencia podría limitar la generación de precursores tímicos y/o los procesos de selección y proliferación en periferia.

Proyecto realizado mediante la ayuda FIS PI10/2199 a Estela Paz Artal.

### O-029. IL-21 EN SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO LIGADO A X (XLP1)

O. Estévez Cordero<sup>1</sup>, C. Ortega Gromaz<sup>2</sup>, S. Fernández Álvarez<sup>2</sup>, J. García Alonso<sup>2</sup>, R. Aguado<sup>1</sup>, J. Rumbao Aguirre<sup>3</sup>, J. Pérez Navero<sup>3</sup>, M. García Rodríguez<sup>4</sup> y M. Santamaría Ossorio<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología Clínica; <sup>2</sup>Unidad Clínica de Pediatría, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. <sup>3</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba.

<sup>4</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Paciente de 10 meses de edad que ingresa por fiebre prolongada (11 días) amigdalitis y hepatomegalia secundaria a infección por virus de Epstein Barr (EBV) (50.000 copias/ml). En 48 horas desarrolla neumonía que se trata con cefotaxima con buena respuesta. 72 horas después desarrolla hepatosplenomegalia, linfoproliferación (50,40/uL) y analitos bioquímicos y hematológicos sugerentes de cuadro hemofagocítico. 8 horas después presenta convulsiones tónico-clónicas generalizadas que precisan varios bolus de diazepam y fenitoína. TAC cerebral sin hallazgos significativos y normalización del status neurológico. Junto al cuadro neurológico presenta situación de hiperdinamia, taquicardia y oliguria sin respuesta al tratamiento. Dieciocho horas después presenta distrés respiratorio que requiere intubación y ventilación mecánica que es seguida de hipotensión, bradicardia, midriasis arreactiva y ausencia de respuesta neurológica frente a estímulos. Un segundo TAC mostro obliteración del cuarto ventrículo y cisternas perimesencefálicas e imagen hiperdensa en lóbulo frontal izquierdo que corresponde con sangrado venoso. Evoluciona a muerte cerebral y fallo multiorgánico. La secuenciación genómica de SH2D1A identificó una mutación R55X responsable de Síndrome linfoproliferativo ligado a X (XLP1). El estudio de producción de citoquinas por PBL, bazo, ganglios linfáticos y timo mostró una importante expresión intracelular de IL-21, presente en el 99% de linfocitos T periféricos, tanto CD4 como CD8. El infiltrado hepático y cerebral evidenció ambas subclases linfocitarias con producción de IL-21. En consecuencia, nuestros datos sugieren que IL-21 puede ser relevante en la patogenia de este síndrome pudiendo resultar en una diana terapéutica de interés en el curso agudo del síndrome XLP1.

### O-030. CARACTERIZACIÓN INMUNOGENÉTICA DE UN CASO ATÍPICO DE SÍNDROME HIPER-IGE AUTOSÓMICO DOMINANTE

S. Lermo Rojo, P. Talayero, E. Mancebo, M. Menchén, M.J. Díaz-Madroñero, L.I. González-Granado, D. Blázquez, R. Casado, J. Ruiz-Contreras, E. Paz-Artal y L.M. Allende

Servicio de Inmunología; Servicio de Pediatría, Hospital 12 de Octubre, Madrid. Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación I+12

**Objetivos:** Caracterización clínica, inmunológica y molecular de un caso de debut atípico de Síndrome de Hiper-IgE (HIES) autosómico dominante.

**Paciente y métodos:** Paciente varón de 3 años con abscesos cutáneos de repetición. A los 4 años presenta dolor severo en extremidades y aumento de CPK (35.000 UI/L) compatible con rabdomiolisis y glomerulonefritis. Hallazgos cutáneos de dermatomiositis, úlceras en axilas y perineo. Respuesta al tratamiento con antihipertensivos, metotrexato e IVIG. Clínicamente, el paciente se evalúa como posible HIES con los criterios del score del National Institutes of Health (NIH). Para caracterizar el

fenotipo inmunológico se cuantifican IgE sérica, subpoblaciones linfocitarias, células Th17 y B de memoria, producción de IL-17 en linfocitos estimulados con *Candida albicans*, producción de citoquinas inflamatorias en sobrenadantes de linfocitos estimulados y ensayo mediante citometría de flujo de fosforilación del residuo Y705 de STAT3 en respuesta a IL-6. Se realiza estudio molecular del gen STAT3.

**Resultados:** En los últimos 2 años se observa un incremento llamativo de los niveles séricos de IgE (323 UI/ml en 2009 a 6.325 UI/ml en 2011), aumentando el score NIH de 23 a 32 (dudoso). El paciente presenta niveles reducidos de células Th17 e IL-17, linfocitos B de memoria y ausencia de fosforilación de STAT3. Se detecta una nueva mutación en el dominio linker del gen STAT3, descartada como polimorfismo en 100 controles sanos. Los padres no resultan portadores del cambio.

**Conclusiones:** El diagnóstico de HIES mediante secuenciación de STAT3 es caro y laborioso, y no siempre podemos asegurar el carácter patológico del cambio encontrado. Por ello, es necesario buscar ensayos funcionales que apoyen el diagnóstico, como el ensayo de fosforilación de STAT3 y de producción de IL-17.

## O-031. INMUNODEFICIENCIA LIGADA AL X CAUSADA POR LA ASOCIACIÓN DE MUTACIONES HIPOMÓRFICAS EN XIAP Y CD40LG

E. López Granados<sup>1</sup>, S. Rigaud<sup>2</sup>, M. Stacey<sup>1</sup>, A. Durandy<sup>3</sup>,  
H. Chapel<sup>1</sup> y S. Latour<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Clinical Immunology, Nuffield Department of Medicine, University of Oxford, Inglaterra. <sup>2</sup>Laboratoire du Développement Normal et Pathologique du Système Immunitaire, Unité INSERM 768, Hôpital Necker Enfants-Malades; <sup>3</sup>Centre d'étude des Déficits Immunitaires, Paris, Francia

**Objetivos:** Estudiar en una familia una posible inmunodeficiencia ligada al X, al presentar varios varones distintos fenotipos clínicos e inmunológicos, incluyendo: infecciones recurrentes, hipogammaglobulinemia, linfoproliferación asociada a VEB, esplenomegalia, colitis y hepatopatía.

**Material y métodos:** Se secuenciaron genes localizados en el X. Mediante Western blot y citometría de flujo analizamos la repercusión en la expresión de proteína de dos genes con variaciones de secuencia. Comprobamos la repercusión de las proteínas mutadas en la supervivencia de la célula B y el cambio de isotípo.

**Resultados:** Los varones sintomáticos presentaban una mutación hipomórfica (G466X) no descrita en XIAP, el gen asociado a XLP-2, que cosegregaba con un polimorfismo infrecuente (G219R) en CD40LG, el gen responsable del X-HIM. XIAP-G466X presentaba una menor expresión y tamaño, al eliminarse el dominio C-terminal. CD40L-G219R se asocia a menor intensidad de tinción con un anticuerpo monoclonal y una discreta disminución de unión de un constructo de CD40, al estar localizado el cambio en una zona importante para la formación del trímero de CD40L y la unión a CD40. La presencia de una sola variación parece inducir solo leves alteraciones analíticas y defectos funcionales *in vitro*, pero no expresividad clínica, sugiriendo que la combinación es necesaria para la aparición de la enfermedad.

**Conclusiones:** La identificación de una IDP oligogénica reforzó la hipótesis de que estas no son solo causadas por un gen mutado con expresividad clínica restringida, sino que pueden resultar de una interacción entre diversos determinantes genéticos combinados para condicionar varios fenotipos clínicos.

O-032. PAPEL DE LA VARIANTE POLIMÓRFICA  
C.512C > G DEL GEN ARTEMIS EN UNA PACIENTE  
CON SÍNDROME DE OMENN

E. Mancebo Sierra, M.J. Recio, E. Martínez Busto, L.I. González Granado, P. Rojo, E. Fernández Díaz, M.J. Díaz-Madroñero, M. Menchén, J. Ruiz Contreras, E. Paz Artal y L.M. Allende

Servicio de Inmunología; Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación; Servicio de Pediatría, Hospital 12 de Octubre; Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

El síndrome de Omenn se caracteriza, en la mayoría de los casos, por la presencia de inmunodeficiencia combinada severa (IDCS) asociada con eritrodermia, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y alopecia. En este trabajo presentamos el caso de una niña de origen chino con sospecha de síndrome de Omenn. Tras la exclusión de defectos génicos en RAG1 y RAG2 y la presencia de un repertorio del TCR restringido, irradiamos *in vitro* los linfocitos T de la paciente y detectamos un defecto en la reparación del DNA en fase G-1. Artemis participa en el proceso de recombinación VDJ y en la reparación de DNA de doble cadena inducida por radiación. Los pacientes con defectos en Artemis presentan IDCS con radiosensibilidad, también se han publicado defectos de Artemis en pacientes con síndrome de Omenn. Tras la secuenciación del DNA genómico del gen Artemis encontramos una variante alélica en heterocigosis (c.512C > G: p.171P > R), cuya prevalencia mundial es del 15%. Sin embargo en la secuenciación del RNAm encontramos únicamente secuencias con la variante polimórfica, indicando una expresión génica monoalélica. Estos resultados, junto con la publicación reciente que demuestra que esta misma variante polimórfica reduce la actividad de Artemis y confiere radiosensibilidad celular, sugieren que cambios aparentemente sutiles en Artemis pueden provocar inmunodeficiencia severa de inicio temprano.

## O-033. INMUNODEFICIENCIA IVA DE LINFOCITOS TAB TAB- ΓΔ+B+NK+ CAUSADA POR UNA MUTACIÓN EN EL GEN CD3D

E. Martínez Busto, G. Hurtado, J. Couso, B. Garcillán, A. Mencia, M.A. Moreno-Pelayo, J.R. Regueiro y M.J. Recio  
Inmunología, Facultad de Medicina, UCM, Madrid. Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

**Introducción:** La ausencia completa de CD38 en humanos se asocia a SCID temprana y con inmunofenotipo  $\text{T}\alpha\beta\text{-T}\gamma\delta\text{-B+NK+}$ . Estamos analizando el caso de dos pacientes de origen ecuatoriano con SCID e inmunofenotipo  $\text{T}\alpha\beta\text{-T}\gamma\delta\text{-B+NK+}$ .

**Métodos y resultados:** El análisis molecular realizado en ambos pacientes, 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 los pacientes y en heterocigosis en los padres. Ninguno de los 70 controles españoles y ecuatorianos sanos analizados, utilizando el análisis de restricción con la enzima BsaI, presenta el cambio descrito, lo que lo excluye como un posible polimorfismo. Los estudios de transfección realizados en células 293T muestran que esta proteína CD3δ sin exón 2, pero no sin exón 3, es estable in vitro. Sin embargo, en los individuos portadores de la mutación IVS2+5G > A en CD3D no se detecta la isoforma CD3δsinEx2 mediante Western-blot. Los estudios qPCR realizados para conocer la eficacia del mecanismo de splicing revelaron que ambos pacientes presentaban un 10% de transcripto normal (CD3δwt), lo que explicaría la expresión, aunque disminuida, de la proteína.

nuida, del complejo TCR/CD3 en los linfocitos T de los pacientes así como la presencia de linfocitos T en periferia. El hecho de que exista una linfopenia  $\text{T}\alpha\beta$  selectiva refleja el papel diferencial de CD3 $\delta$  en la selección tímica de linfocitos T  $\alpha\beta$  vs  $\gamma\delta$ .

**Conclusiones:** Esta es la primera inmunodeficiencia de CD3 $\delta$  descrita asociada con una linfopenia  $\text{T}\alpha\beta$  selectiva ( $\text{T}\alpha\beta\text{-Ty}\delta\text{+B+NK+}$ ) y ayuda a establecer en el papel de CD3 $\delta$  en el desarrollo de los linfocitos  $\text{T}\alpha\beta$ , pero no en  $\gamma\delta$  en humanos.

#### O-034. NUEVAS MUTACIONES RESPONSABLES DE ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA EN PACIENTES ESPAÑOLES

L. Martínez Martínez, C. González Santesteban, M.V. Rubiales, I. Badell, R. López, M. García Bernal y O. de la Calle Martín

Immunología; Pediatría, Hospital Sant Pau-UAB, Barcelona. Hospital Universitario de Canarias, Tenerife. Pediatría, Hospital Universitario Mútua de Terrassa, Barcelona.

**Introducción:** Los pacientes con enfermedad granulomatosa crónica (CGD) sufren infecciones bacterianas y fúngicas, severas y recurrentes. La CGD está causada por un defecto en la respiración oxidativa catalizada por el complejo NADPH oxidasa.

**Objetivos:** Diagnosticar molecular y genéticamente pacientes con sospecha de CGD para establecer el defecto responsable y ampliar el estudio a familiares.

**Material y métodos:** Se estudiaron diversos pacientes con sospecha de CGD. La prueba funcional se realizó por detección de dihidrorodamina (DHR) oxidada. La determinación de proteínas se hizo por citometría e inmunoblot. Los análisis genéticos se realizaron por RT-PCR, PCR y digestión enzimática con SspBI.

**Resultados:** Siete pacientes fueron detectados en la prueba de oxidación de la DHR. En el caso 1 no encontramos gp91phox y el estudio genético mostró la mutación p.Cys59Arg en el gen CYBB. Tanto la madre (portadora) como un hermano suyo, fallecido previamente, tenían la alteración. Aunque en el caso 2 había consanguinidad, hayamos una mutación de novo en el gen CYBB no descrita (p.Lys247fsX7). Los casos 3 y 4 presentaron la recombinación homóloga entre NCF1 y su pseudogén, al igual que los dos hermanos del 4, que no habían presentado sintomatología. El caso 5 resultó ser un heterocigoto compuesto para NCF2: p.Lys161STOP (mutación no descrita) y una duplicación génica de los exones 9 y 10. Los casos 6 y 7 eran 2 hermanos homocigotos para la alteración p.Arg77STOP, también en NCF2 y no publicada.

**Conclusiones:** Hemos descrito 3 nuevas mutaciones responsables de CGD: p.Lys247fsX7 en CYBB y p.Lys161STOP y p.Arg77STOP en NCF2.

#### O-035. ACTUALIZACIÓN DE LOS DATOS DEL REGISTRO ESPAÑOL DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (REDIP) ONLINE ([HTTP://WEB.HSD.ES/REDIP](http://WEB.HSD.ES/REDIP)) 2005-2011

N. Martínez Pomar, V. Daza Cajigal, P. Carrasco Eade, N. Lanio Amador, J. Pons de Ves y N. Matamoros Flori

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca.

Hasta marzo de 2011 se han registrado 1.553 inmunodeficiencias primarias (IDPs). En los últimos años se ha observado una variación substancial en el porcentaje de casos registrados por CCAA debido a la mayor participación de algunas y la incorporación de nuevas. Los datos actuales son: Madrid (39%), Andalucía (21%), Cataluña (20%), Islas Baleares (7%), Murcia y Cantabria (3%), Extremadura y Aragón (2%), Galicia, Comunidad Valenciana

y País Vasco (1%). La distribución por grandes grupos de diagnóstico es superponible a los registros frances (CEREDIH) y europeo (ESID): deficiencias predominantemente de anticuerpos (67%), deficiencias del sistema del complemento (17%), síndromes de inmunodeficiencia bien definidos (6%), defectos genéticos del número o función del sistema fagocitario (2%), inmunodeficiencias combinadas TB (2%), enfermedades con disregulación inmunológica (2%) y otras inmunodeficiencias primarias (2%). El elevado porcentaje de deficiencias del Complemento, se explica por la incorporación del Registro Nacional de pacientes con deficiencia de C1inh. Los diagnósticos con mayor número de casos registrados son: Deficiencia selectiva de IgA (540) incluye asintomáticos, Inmunodeficiencia variable común (320), Deficiencia de C1 inhibidor (233), Deficiencia de subclases IgG (67), agammaglobulinemia ligada al X (44), anomalía de DiGeorge (33). Periódicamente el REDIP transmite los datos al Registro europeo de la ESID: actualmente son 1.075 los pacientes registrados. El REDIP online favorece la difusión del conocimiento de las IDPs y ofrece tanto información básica para el público como información específica para los usuarios registrados. Estimula la comunicación entre Centros y la realización de trabajos colaborativos. El incremento, en los últimos años, del número de facultativos y CCAA participantes en el REDIP, ha contribuido a la consolidación del Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias.

#### O-036. DESCRIPCIÓN DE UN NUEVO CASO DE SÍNDROME DE HIPERIGM ASOCIADO CON DEFECTOS EN LA VÍA DE RESPUESTA DE DAÑO EN EL DNA

M.J. Recio Hoyas, E. Martínez Busto, R. Siles, E. Mancebo, I. González-Granado, J. Ruiz-Contreras, E. Paz-Artal, J.R. Regueiro y L.M. Allende

Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. Departamento de Inmunología; Unidad de Inmunodeficiencias, Pediatría, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

**Introducción:** El síndrome de hiperIgM constituye un grupo heterogéneo de inmunodeficiencias primarias caracterizadas por niveles elevados en suero de IgM, generalmente asociados con niveles disminuidos o ausentes de otros isótipos (IgG, -A y -E). Desde un punto de vista clínico la mayoría de estos pacientes sufren infecciones bacterianas recurrentes desde la infancia. Se han descrito varios defectos genéticos asociados con estas patologías. Además de los síndromes asociados con defectos en la vía de activación CD40-CD40L y los causados por defectos en las enzimas AID y UNG, existen varios pacientes que presentan una nueva forma de hiperIgM (CD40L+CD40+) en los que aún no se ha identificado el gen responsable.

**Caso clínico:** Varón de 7 años de edad que acude al hospital debido a un episodio de PTI (púrpura trombocitopénica idiopática) aguda, a los 12 años presenta PTI crónica, se le realiza esplenectomía a los 15 años de edad. A los tres años post-esplenectomía tiene un episodio de sepsis meningocócica que se repite 1 año después. Se realiza TAC abdominal donde se observan adenopatías retroperitoneales. Actualmente tiene 22 años y está en tratamiento sustitutivo con gammaglobulina subcutánea y profilaxis antibiótica. Los análisis inmunológicos muestran niveles incrementados de IgM y disminuidos de C3 y C4. Además, el paciente presenta linfocitosis (9.000 linfocitos/ul) con un aumento del porcentaje y número absoluto de linfocitos T (CD3+, HLA-DR+). Los linfocitos B se encuentran dentro del rango normal, pero existe una disminución importante de los linfocitos B de memoria. Inmunización ausente frente al polisacárido de Neumococo y Haemophilus. Los estudios de secuenciación han descartado CD40L, AID, UNG, NEMO como genes responsables de la

patología. Los análisis de reparación realizados en fibroblastos irradiados (g-IR) obtenidos a partir de biopsia de piel indican que las células son radiosensibles y presentan un defecto de reparación en la fase G2 del ciclo celular.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren que el defecto molecular responsable de este nuevo fenotipo, caracterizado por defectos en el cambio de isótipo, deficiencia funcional de linfocitos B, radiosensibilidad celular y defectos en la fase G2 del ciclo.

#### O-037. DIMORFISMO SEXUAL EN LINFOCITOS T REGULADORES EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN

M. Tejera Alhambra, B. Alonso, R. Teijeiro, J. Gil, E. Fernández-Cruz y S. Sánchez-Ramón

Servicio de Inmunología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

**Introducción:** La inmunodeficiencia variable común (IDVC) es la inmunodeficiencia primaria con más prevalencia. La presencia y función de los linfocitos T reguladores en la IDVC es desconocida.

**Objetivos:** Estudiar la presencia y expresión de perforina en linfocitos Treg CD4+ y CD8+, como posible mecanismo inmunosupresor de estas células; en la sangre periférica (SP) de pacientes con IDVC frente a controles sanos.

**Material y métodos:** Se estudiaron mediante citometría de flujo multiparamétrica muestras de SP de pacientes con IDVC (n = 21, 8 varones y 13 mujeres) y controles (n = 29, 17 varones y 12 mujeres).

**Resultados:** Los porcentajes de linfocitos Treg CD4+ y CD8+ fueron inferiores en los pacientes respecto a los controles estudiados: CD4+CD25+FOXP3+ ( $p = 0,001$ ), CD4+CD25+high ( $p = 0,001$ ) y CD8+CD25+FOXP3+ ( $p = 0,04$ ). Sin embargo la intensidad media de fluorescencia (MFI) de la expresión de perforina fue superior en los linfocitos CD4+Treg de los pacientes: CD4+CD25+FOXP3+, CD4+CD25+high; ambos  $p = 0,03$ . Los pacientes varones presentaron mayores proporciones de linfocitos CD4+CD25+high que las mujeres ( $p = 0,008$ ). Sin embargo, en el grupo control el porcentaje de linfocitos CD4+CD25+high era más elevado en mujeres que en hombres ( $p = 0,004$ ). Los pacientes con complicaciones autoinmunes presentaban mayor porcentaje de Treg CD4+ que aquellos sin autoinmunidad ( $p = 0,01$ ).

**Conclusiones:** En nuestra cohorte de pacientes con IDVC se observa una disminución en la frecuencia de linfocitos T reguladores CD4 y CD8 frente a controles sanos, pero con un aumento significativo de la expresión de perforina en estos linfocitos. Existe una inversión del dimorfismo sexual de estas células en la IDVC respecto a controles que podría influir en la presentación de complicaciones autoinmunes de esta enfermedad.

#### O-038. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA Y MOLECULAR DE 5 PACIENTES CON DEFICIENCIA COMBINADA GRAVE (IDCG) POR ANOMALÍAS EN EL GEN DE CADENA A DEL R-IL7

J.M. Torres Canizales, A. Ferreira Cerdán<sup>1</sup>, J. Leal de la Rosa<sup>2</sup>, F. Alonso Falcón<sup>2</sup>, E. López Granados<sup>2</sup> y M.C. García Rodríguez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología; <sup>2</sup>Servicio de Pediatría General, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

**Objetivos:** Llevar a cabo el estudio molecular en cinco pacientes con un cuadro clínico y analítico compatible con IDCG debida a anomalías en cadena α del R-IL7.

**Material y métodos:** Estudio de subpoblaciones, ensayo de proliferación de linfocitos y detección de mutaciones en dicho gen mediante técnicas de PCR. Los productos amplificados fueron secuenciados automáticamente.

**Resultados:** La secuenciación de DNA reveló la presencia de las siguientes mutaciones: Paciente 1 tiene en exón 3 la mutación C118Y de origen materno y en el otro alelo, IVS1-2a/t de origen paterno. Paciente 2, heterocigoto para las mutaciones W178X y S105R. Paciente 3 tiene en heterocigosis IVS1-1g/a y C118Y. Paciente 4 encontramos dos mutaciones intrónicas IVS2 -1g/t de origen materno y IVS1 -1g/a paterna. La familia 5 tenía historia familiar de fallecidos con IDCG con herencia sugestiva ligada al X por lo que se descartaron anomalías en el gen de cadena γ común del R-IL2, pero la consanguinidad en la familia sugería que podía tratarse de una forma autosómica recesiva y en el DNA de los padres se comprobó que ambos eran heterocigotos para la mutación S105R.

**Conclusiones:** En nuestra experiencia las anomalías en el gen de cadena α del R-IL7 es la tercera causa de IDCG, menos frecuente que las debidas a mutaciones en la cadena γ común del R-IL2 y aquellas que presentan mutaciones en RAG1-2. Nos parece importante conocer las mutaciones para llevar a cabo un diagnóstico seguro y basado en ellas, poder hacer el diagnóstico prenatal en posteriores embarazos.

#### INMUNOGENÉTICA, HLA Y TRASPLANTE

**Moderadores:** Cristina Moreno Parado (Pamplona) y Manuel Muro Amador (Murcia)

#### O-039. EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL EN LA SENSIBILIZACIÓN Y TOLERANCIA AL POLEN DE OLIVO: ANÁLISIS DE MICROARRAYS

M. Aguerri Moreno, B. Cárdaba, C. Lahoz, J. Dopazo, S. Gallardo, J. López-Cacho, M. Mata, D. Montaner, F. Florido y D. Calzada

Departamento de Inmunología, IIS-Fundación Jiménez Díaz-CIBERES, Madrid. Departamento de Alergia, Hospital Universitario San Cecilio, Granada. Departamento de Bioinformática, Unidad de Genómica Funcional, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia. Departamento de Genómica Fundación de Investigación, Hospital General Universitario, Valencia.

**Objetivos:** Buscar mecanismos moleculares diferenciales en la respuesta alérgica (con un modelo de sensibilización/tolerancia al polen de olivo) utilizando la tecnología de microarrays, con el fin de identificar nuevos genes y rutas útiles para mejorar el conocimiento sobre estas enfermedades.

**Métodos:** Se estudiaron 5 grupos clínicos: No alérgicos, Asintomáticos, Alérgicos pero no al olivo, Alérgicos al polen de olivo sin tratamiento y Alérgicos al polen de olivo con immunoterapia es-

pecífica. El ARN se obtuvo a partir de PBMC (durante y fuera del periodo de polinización) de 9 sujetos de cada grupo y la diferencia de expresión génica fue analizada mediante HuGe U133 plus 2.0 GeneChip Affymetrix (38500 genes). La calidad de los datos fue analizada con programas específicos de microarrays antes de obtener la expresión génica diferencial según las condiciones experimentales. Los análisis funcionales se llevaron a cabo con KEGG para rutas y con Gene-Ontology para los procesos biológicos. La relevancia se definió por significación estadística ( $p < 0,05$ ).

**Resultados:** Encontramos genes y rutas diferenciales (relacionados y no relacionados con la respuesta inmuno-alérgica) entre los 5 grupos. Las mayores diferencias se encontraron entre los grupos alérgicos y los controles (tanto no alérgicos como asintomáticos). Los sujetos alérgicos al olivo con inmunoterapia mostraron menos diferencias con los no alérgicos que con los alérgicos no tratados.

**Conclusiones:** Nuestros datos aportan nueva información relacionada con los diferentes tipos de respuestas frente al polen de olivo que podría ser útil para mejorar el diagnóstico y tratamiento de esta y otras sensibilizaciones alergénicas.

#### O-040. RELEVANCIA CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-HLA DONANTE ESPECÍFICOS PREFORMADOS Y DETECTADOS POR LUMINEX EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE RENAL

J.L. Caro Oleas, M.F. González Escrivano, M.J. Acevedo Calado, F.M. González Roncero, R. Cabrera Pérez, M.A. Gentil Govantes y A. Núñez Roldán

*Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS). Servicio de Inmunología; Servicio de Nefrología; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.*

**Objetivo:** Analizar la influencia del crossmatch virtual pretrasplante en la pérdida del injerto y desarrollo de rechazo humorral (RMA) en trasplantados renales.

**Material y métodos:** Estudio retrospectivo (1993-2010) en 892 adultos trasplantados de donante cadáver con CDC negativa. Determinación de presencia de anticuerpos clase I y/o clase II y especificidad en sueros pretrasplante mediante Luminex: screening y single antigen respectivamente. En 376 pacientes (2005-2010) diagnosticamos el RMA, diagnosticado por depósitos de C4d en las biopsias. Estudiamos supervivencia del injerto mediante curvas Kaplan-Meier. Las comparaciones entre grupos se realizó mediante el test log Rank.

**Resultados:** La supervivencia del injerto fue peor en los pacientes con anticuerpos anti-HLA-DSA (tanto clase I como clase II) que en los pacientes sin anticuerpos ( $p < 0,001$ ) o con anticuerpos no DSA ( $p = 0,001$ ). No observamos diferencias en la supervivencia del injerto entre los pacientes con anti-HLA no DSA y sin anticuerpos ( $p = 0,595$ ). No encontramos diferencias en la supervivencia del injerto de acuerdo a los niveles de fluorescencia dentro del grupo de los DSA positivos ( $p > 0,05$ ). Los pacientes con RMA tienen una supervivencia del injerto inferior a los pacientes sin RMA ( $p < 0,0001$ ). El porcentaje de RMA dentro del grupo con DSA fue del 34% mientras que en el grupo no DSA fue del 5% ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusiones:** La detección de DSA pretrasplante por Luminex, con CDCXM negativo, influye negativamente en la supervivencia del injerto. Esta peor evolución se debe a la mayor frecuencia de episodios de RMA en este grupo. La detección de anti-HLA no DSA no influye en la evolución del injerto. La supervivencia del injerto dentro del grupo DSA positivo no está influenciada por los niveles de fluorescencia.

#### O-041. LA GRAVEDAD DE LA RECIDIVA DEL VHC TRAS EL TRASPLANTE HEPÁTICO SE ASOCIA CON EL POLIMORFISMO RS12979860 DEL GEN IL28B DEL RECEPTOR

E. Cisneros Leralta, I. Baños, M.J. Cidores, M. Cañizares, V. Cuervas-Mons y C. Vilches

*Laboratorio de Inmunogenética-HLA, Unidad de Trasplante Hepático y Laboratorio de Medicina Interna, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda, Madrid.*

Polimorfismos cercanos al gen IL28B se asocian con el aclaramiento espontáneo del VHC y la respuesta a la terapia antiviral (interferón pegilado/ribavirina). Tras el trasplante hepático, estos polimorfismos podrían modificar el curso de la infección por el VHC y la respuesta al tratamiento antiviral. Para investigar si el polimorfismo rs12979860 (C > T) influye en la gravedad de la recidiva del VHC, analizamos retrospectivamente 91 pacientes con trasplante hepático por cirrosis inducida por VHC, 41 de los cuales (45%) habían sufrido recurrencia grave. El genotipado de rs12979860 mediante PCR en tiempo real mostró que solo el 36,3% de los receptores (30/81) eran homocigóticos para el alelo protector (CC), siendo esta proporción menor que la descrita en población caucásica sana. Entre los pacientes con recurrencia grave, el genotipo protector rs12979860-CC resultó todavía menos frecuente: 17,1% (7/41), frente al 46% (23/50) en pacientes sin recurrencia grave ( $p = 0,0035$ ; OR = 0,24; IC95%: 0,08-0,71). Además, el análisis de los genotipos CC, CT y TT por separado apunta a una influencia de la dosis del alelo C sobre su efecto protector (tendencia lineal,  $p = 0,0073$ ). El genotipo rs12979860 de los 48 donantes de los que se disponía de DNA no ejerció una influencia similar sobre la gravedad de la recidiva. En resumen, el polimorfismo rs12979860 asociado al gen IL28B influye en el curso de la infección del VHC tras el trasplante hepático y ayuda a predecir la gravedad de la recidiva del VHC.

#### O-042. MAPEO DE GENES TIM-3 Y TIM-4 EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES

A.M. Escalera Cárdenas, C. Abad Molina, J.R. García Lozano, A. García López, M.J. Castillo Palma, N. Ortego Centeno, E. Raya Álvarez, A. Núñez Roldán, J. Martín Ibáñez y M.F. González Escrivano

*Servicio de Inmunología, Unidad de Reumatología y Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla. Servicio de Medicina Interna y Servicio de Reumatología, Hospital Clínico San Cecilio, Granada. Instituto de Parasitología y Biomedicina, Granada.*

**Objetivos:** Mapear la región 5q33.2 donde se localizan los genes TIM3 y TIM4 para determinar la existencia de posibles regiones de susceptibilidad en RA y lupus eritematoso sistémico (SLE) y analizar la relación entre los genotipos y los niveles de mRNA.

**Material y métodos:** Para el mapeo se seleccionaron 4 tagSNPs para cada región génica. Se incluyeron 466 pacientes con RA y 459 con SLE que cumplían los criterios de la ACR y 479 individuos sanos. Para la cuantificación relativa de mRNA se seleccionaron 30 muestras de controles sanos. Para el genotipado y la cuantificación de mRNA se utilizaron sondas TaqMan. El análisis estadístico de variables cualitativas se realizó mediante chi<sup>2</sup> y el de variables cuantitativas mediante test de Kruskal Wallis de comparación de medianas.

**Resultados:** Tres de los SNPs seleccionados para TIM3 resultaron asociados a una o ambas patologías ajustándose el patrón de herencia a un modelo recesivo. Se detectó un haplotipo aso-

ciado a las dos enfermedades ( $p = 0,0175$  AR vs controles, OR = 1,26;  $p = 0,006$  SLE vs controles, OR = 1,30). En cuanto a los niveles de expresión de mRNA, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos. En cuanto al mapeo de TIM4, no se encontró asociación con ninguno de los SNPs considerados individualmente, sin embargo, al considerarlos en bloque se observó asociación de uno de los haplotipos con SLE ( $p = 0,009$ , OR = 0,69).

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren asociación entre TIM3 y TIM4 y susceptibilidad a padecer RA y SLE.

#### O-043. POLIMORFISMOS EN LA REGIÓN 12Q13 Y SU INFLUENCIA EN LA EDAD DE DEBUT DE LA DIABETES TIPO 1

L. Espino Paisán, H. de la Calle, M.A. Figueiredo y J.L. Santiago

Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.  
Endocrinología, Hospital General Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

**Objetivos:** La región 12q13 se ha descrito asociada a diabetes tipo 1 (DT1) en el estudio del Wellcome-Trust Case-Control Consortium. Posteriormente, dos estudios en población caucásica analizaron la influencia de esta región en la edad de debut de DT1, encontrando resultados contradictorios. Nos proponemos replicar tres de los polimorfismos más asociados en un grupo de pacientes con debut pediátrico y adulto.

**Material y métodos:** Se genotiparon los polimorfismos rs773107, rs2292239 y rs10876864 en 444 pacientes de DT1 (edad de debut 0-65 años) y 861 controles. La influencia en la edad de debut se estudió mediante análisis estratificado y continuo.

**Resultados:** rs773107 y rs2292239 se asocian significativamente a DT1. En rs10876864 encontramos una tendencia a la asociación. En el análisis estratificado por la edad de debut, los pacientes con debut pediátrico difieren de los controles ( $p < 0,006$ ), mientras que los pacientes adultos no presentan diferencias. En el análisis continuo, la edad de debut de DT1 es significativamente diferente entre los genotipos ( $p \leq 0,002$ , alelos ( $p \leq 0,013$ ) y homocigotos del alelo de riesgo ( $p \leq 4 \times 10^{-4}$ ) de los polimorfismos rs773107 y rs2292239. En el polimorfismo rs10876864, la edad de debut presenta una tendencia a la diferencia en alelos ( $p = 0,051$ ) y homocigotos para el alelo de riesgo ( $p = 0,056$ ). Los pacientes con genotipos de riesgo presentan un comienzo de DT1 entre 2 y 5 años antes que los portadores de los alelos de protección.

**Conclusiones:** Replicamos dos asociaciones previamente descritas en 12q13 y aportamos nuevas pruebas de la influencia de esta región en la edad de debut de DT1.

#### O-044. EL GENOTIPO H/H131 DEL GEN FCGR2A ESTÁ ASOCIADO CON LA BACTERIEMIA EN LA NEUMONÍA NEUMOCÓCICA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD

E. Herrera Ramos, A.R. Domínguez Acosta, Y. Florido Ortega, F. Rodríguez de Castro, J. Solé Violán, N. González Quevedo, J. Noda Mayor, J.A. Marcos Ramos, M.I. García Laorden y J.C. Rodríguez Gallego

Servicio de Inmunología, Neumología y UCI, Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria. UCI, Hospital Dr. José Molina Orosa, Lanzarote. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria.

*Streptococcus pneumoniae* es el principal microorganismo en la neumonía adquirida en la comunidad (NAC). La opsonización

por anticuerpos y complemento son cruciales en la defensa contra neumococo. En ratones, la opsonización con proteína C reactiva humana (PCR) también es necesaria. Fc-γRIIa (FCGR2A) H131 es el único FcγR que une IgG2, pero es incapaz de unirse a la PCR. La variante FCGR2A-131R une PCR pero no IgG2. En niños, la IgG2 frente a neumococo es mayoritaria, mientras que en adultos es minoritaria. Es un estudio multicéntrico y prospectivo. Evaluamos la asociación FCGR2A-H131R (rs1801274) con la susceptibilidad y la gravedad de la NAC en 1263 pacientes adultos con NAC y 1224 controles. 319 pacientes padecieron NAC neumocócica (NAC-N) y 85 NAC-N bacteriémica (NAC-NB). No se encontraron diferencias entre las frecuencias genotípicas o alélicas entre pacientes con NAC o N-NAC y controles. Los pacientes con NAC-NB presentaron mayores frecuencias del genotipo FCGR2A-H/H131 que los pacientes con NAC-N sin bacteriemia ( $p = 0,00016$ , OR = 2,9, IC95% 1,58-5,3. Análisis multivariante:  $p = 0,0012$ , OR = 2,83, IC95% 1,51-5,32). La NAC-NB se asoció a mayor gravedad de la enfermedad, evaluada como gravedad en sepsis ( $p = 0,00006$ , OR = 4,40, IC95% 2,31-8,39), síndrome de disfunción multiorgánica (0,0005, OR = 3,29, IC95% 1,69-6,41), admisión en UMI, fallo renal agudo, y síndrome de distrés respiratorio agudo. FCGR2A-H131R no se asoció con la susceptibilidad a NAC o a NAC-N. Sin embargo, la homocigosis para FCGR2A-H131 (el alelo que no une PCR) predispone a NAC-NB, la cual está relacionada con más gravedad.

#### O-045. PATRÓN DE EXPRESIÓN DE MICRORNAS EN CÉLULAS CD19 DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

R. Martínez Ramos, J.M. Lucena Soto, A.M. Escalera Cárdenas, C. Abad Molina, M.J. Castillo Palma, J. Sánchez Román, A. Núñez Roldán, J.R. García Lozano y M.F. González Escribano

Servicio de Inmunología y Unidad de Colagenosis, Servicio de Medicina Interna. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío/ Instituto Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla.

**Objetivo:** Determinar el patrón de expresión de microRNA en células B CD19+ de sangre periférica en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES).

**Material y métodos:** Se incluyeron 12 muestras: 7 de pacientes con LES asintomáticos y 5 de controles sanos. Las células B CD19+ se aislaron a partir de sangre periférica mediante micropartículas magnéticas conjugadas con anti-CD19. El RNA se obtuvo con el miRNeasy Mini Kit separándolo en dos fracciones: una que contiene el RNAm y otra con los RNA de menos de 200 nucleótidos que incluye los microRNA. El cDNA se sintetizó con sistema Multiplex RT y el análisis de expresión se realizó mediante Real-Time PCR con las tarjetas microfluídicas TaqMan® Low Density Array A Human MicroRNA Panel v2.0 que incluyen 384 microRNA. El análisis estadístico se realizó con el programa StatMiner. Como controles internos se utilizaron RNU44 y U6.

**Resultados:** Se observaron diferencias significativas en la expresión de los microRNAs miR-345, miR-346, miR-501-3p, miR-10a y miR-31 entre pacientes con LES y controles sanos.

**Conclusiones:** La población de células CD19+ de pacientes con lupus eritematoso sistémico muestra un patrón de expresión de microRNAs particular. Estos patrones de expresión de microRNAs pueden ayudar a comprender la etiopatogenia de esta enfermedad.

#### O-046. ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD ALÉLICA DE LILRA3 EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE RECURRENTE

D. Ordóñez del Valle, A.J. Sánchez López, J.E. Martínez Rodríguez, E. Ramil, N. Gómez Lozano, A. Muntasell, E. Munteis, M. López Botet, J. Roquer, A. García Merino y C. Vilches Ruiz

*Laboratorio de Inmunogenética HLA y Unidad de Neuroinmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Majadahonda. Servicio de Neurología y Unidad de Immunopatología Molecular, Hospital del Mar, Institut Municipal d'Investigació Mèdica (IMIM), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona.*

El receptor soluble LILRA3, detectable en suero y líquido sinovial, está codificado en el Leukocyte Receptor Complex (LRC, 19q13.4) dentro de una familia de receptores que reconocen moléculas HLA de clase I. Un 22% de la población sana presenta, al menos en un cromosoma, una delección de toda su secuencia codificante, frecuencia incrementada significativamente en pacientes con esclerosis múltiple recurrente (EM-R). Existen otros polimorfismos funcionales de LILRA3 que incluyen cambios de aminoácido y formas aberrantes de significado fisiológico posiblemente idéntico a la delección. Por ello, queremos determinar si la variabilidad genética de LILRA3 predispone a desarrollar EM-R, comparando la distribución de sus alelos en pacientes y controles sanos. En 64 pacientes con EM-R y 61 controles sanos que poseían una sola copia de LILRA3, amplificamos el gen completo ( $\chi$ asi5 Kb) y determinamos toda su secuencia codificante. En ambas series, los alelos predominantes fueron LILRA3\*003 > \*001 > \*008. En los pacientes observamos una mayor variabilidad genética por la presencia de: i) otros alelos funcionales (LILRA3\*006 y \*009); ii) un alelo nulo con una mutación puntual que altera el splicing y genera un codón de parada prematuro (LILRA3\*011N) y iii) un nuevo polimorfismo en el exón 5 que se traduce en el cambio 296Thr > Arg (LILRA3\*013). Basándonos en los polimorfismos observados mediante secuenciación, estamos desarrollando una PCR-SSP multiplex para determinar las frecuencias alélicas de LILRA3 en 152 pacientes con EM-R y 257 controles sanos que conservan el gen en ambos cromosomas.

Este trabajo ha sido financiado por la Fundación LAIR.

#### O-047. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE LINFOCITOS T CD4+NKG2D+ EN PACIENTES TRASPLANTADOS. IMPLICACIONES EN LA EVOLUCIÓN DEL TRASPLANTE

B. Suárez Álvarez<sup>1</sup>, A. Fernández Sánchez<sup>1</sup>, R. Carvajal Palao<sup>1</sup>, S. García Melendreras<sup>2</sup>, E. Gómez Huertas<sup>2</sup>, F. Ortega Suárez<sup>2</sup> y C. López Larrea<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Histocompatibilidad y Trasplante, Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

**Objetivo:** El receptor activador NKG2D se expresa en células NKs y linfocitos T  $\gamma$ δ y  $\alpha$ β CD8+, pero en infecciones, enfermedades autoinmunes o tumores puede expresarse en linfocitos T CD4+. En este trabajo hemos caracterizado la población de linfocitos T CD4+ NKG2D+ en pacientes trasplantados y su implicación en la evolución del trasplante.

**Métodos:** La expresión de NKG2D en linfocitos T CD4+ fue analizada en 320 pacientes trasplantados (220 renales, 47 cardíacos y 58 hepáticos) y 70 controles mediante citometría de flujo. Esta población fue caracterizada fenotípica y funcionalmente utilizando arrays de expresión de genoma completo, citometría de flujo y la tecnología Tc-Landscape.

**Resultados:** El 41 y 27,6% de los pacientes trasplantados renales y hepáticos presentan una inusual población de linfocitos T CD4+ NKG2D+. Esta población presenta un fenotipo de células diferenciadas, con ausencia de moléculas co-estimuladoras y alta expresión de marcadores de células NKs, y con un repertorio TCR muy restringido. Tiene una reducida expresión de genes relacionados con la apoptosis, procesos catabólicos y la transcripción mientras que sobreexpresa genes modificadores de la cromatina y quimiocinas. La expresión anómala de NKG2D es debida a modificaciones epigenéticas tales como la metilación del ADN o las modificaciones de histonas.

**Conclusiones:** La presencia de linfocitos T CD4+ NKG2D+ en pacientes trasplantados supone una población diferenciada con menor capacidad de respuesta antigenica resultando favorable para la evolución del trasplante pero comprometiendo la respuesta inmune frente a infecciones. Esta población podría ser utilizada como un marcador predictivo de la respuesta inmuno-lógica en pacientes trasplantados.

#### O-048. LAS CÉLULAS NK-LIKE SON LA POBLACIÓN LINFOCITARIA PREDOMINANTE EN EL EPITELIO DEL INJERTO INTESTINAL EN PACIENTES TRASPLANTADOS

P. Talayero Giménez de Azcárate, I. Bernardo, E. Mancebo, S. Rodríguez-Muñoz, L.M. Allende, D.M. Valero-Hervás, J. Calvo, J.C. Meneu, E. Moreno y E. Paz-Artal

*Servicio de Inmunología; Servicio de Medicina del Aparato Digestivo; Servicio de Cirugía Digestiva y Trasplante de Órganos Abdominales, Hospital 12 de Octubre, Madrid. Grupo de Immunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación I+12, Madrid.*

**Objetivos:** Estudio longitudinal de la evolución de las poblaciones de linfocitos intraepiteliales (LIE) en la mucosa de pacientes sometidos a trasplante intestinal y correlación con eventos anatomo-patológicos.

**Pacientes y métodos:** Se incluyeron 11 pacientes trasplantados de intestino delgado evaluados desde 4 hasta 1.368 días post-trasplante, y 11 controles sanos. Los LIE se obtuvieron a partir de biopsias de mucosa intestinal de ileón tomadas al azar o en lesiones de rechazo. Mediante citometría de flujo se determinó la infiltración (población CD45+CD103+), linfocitos NK-like (CD45+CD103+CD3-) y linfocitos T (CD45+CD103+CD3+) con sus subpoblaciones (CD4+CD8-, CD4+CD8+, CD4-CD8- y CD4-CD8+). Se recogieron los datos anatomo-patológicos correspondientes a biopsias pareadas.

**Resultados:** La infiltración linfocitaria se mantiene estable a lo largo del tiempo y similar a la de los controles. La población LIE predominante hasta el tercer mes son los linfocitos T, diferiendo de los controles de forma significativa (pacientes = 93%, controles = 75%; p = 0,017). A partir del tercer mes se observa un descenso de esta población (pacientes = 44%, controles = 75%; p = 0,009), acompañado de un aumento de linfocitos NK-like (pacientes = 56%, controles = 25%; p = 0,009). A partir del 2º año post-trasplante se observa una tendencia hacia la normalización, reflejada en una disminución de la significación (linfocitos T: pacientes = 54%, controles = 75%; p = 0,030/NK-like: pacientes = 42%, controles = 25%; p = 0,032). No se observa correlación entre poblaciones LIE y patrones anatomo-patológicos.

**Conclusiones:** Las células NK-like son la población LIE predominante en el injerto intestinal en pacientes trasplantados hasta el 2º año post-trasplante. Los cambios en las subpoblaciones LIE siguen un patrón común en todos los trasplantados, independientemente de eventos de rechazo.

## INMUNOLOGÍA E INFECCIONES

**Moderadores:** Gloria González Aseguinolaza (Pamplona) y Margarita del Val Latorre (Madrid)

### O-049. INMUNOPATOGÉNESIS DE LA GRIPE PANDÉMICA DE 2009

J.F. Bermejo Martín, R. Almansa Mora, A. Antón, Martín Lloches, P. Ramírez, T. Pumarola, G. López Campos, D. Andaluz, P. Merino y R. Ortiz de Lejarazu Leonardo

IECSCYL, Hospital Clínico Universitario de Valladolid. Hospital Clínic de Barcelona. Hospital Universitario Joan XXIII, Tarragona. Hospital La Fe. Valencia. Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid. SEMICYUC.

**Objetivos:** Estudiar factores víricos y del huésped en la enfermedad grave y leve causada por el virus pandémico H1N1.

**Material y métodos:** Estudio observacional prospectivo. Se reclutaron 23 pacientes críticos con neumonía viral primaria por A/H1N1nv. Se recogió una muestra de frotis nasofaríngeo para diagnóstico y cuantificación de la carga viral por RT-PCR y para evaluar la resistencia al oseltamivir mediante secuenciación de la mutación H275Y; muestras de suero, para inhibición de la hemaglutinación y plasma para cuantificar 27 mediadores inmunológicos (Bio-Plex Cytokine 27-plex); sangre en tubos Paxgene, para estudios de expresión génica por microarrays (Illumina).

**Resultados:** Los pacientes se clasificaron en función de su situación respiratoria. Se definió una fase de respuesta innata (antes de la producción de anticuerpos) y una fase adaptativa. Desde el ingreso, los pacientes más graves mostraron una mayor carga viral y mayor secreción de IL-6, IL-12p70, IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , GM-CSF, VEGF e IL-1ra. Los niveles de estos mediadores correlacionaron de forma directa tanto con carga viral como entre ellos. En la fase adaptativa, se observó persistencia de la secreción de citocinas y virus en los pacientes más graves, los cuales mostraron expresión disminuida de genes de presentación antigénica.

**Conclusiones:** La gripe pandémica grave se caracteriza por un pobre control del virus por parte del sistema inmune y por una respuesta de citocinas exacerbada. Además se encontraron evidencias de una respuesta adaptativa deficiente frente al virus. Todo ello generaría un círculo de replicación vírica, inflamación, fallo de la respuesta celular y escape del virus.

### O-050. SAFETY AND IMMUNOGENICITY OF A MODIFIED POX VECTOR-BASED VACCINE CANDIDATE EXPRESSING ENV, GAG, POL, AND NEF PROTEINS OF HIV-1 SUBTYPE B (MVA-B) IN HIV-1-NEGATIVE HEALTHY VOLUNTEERS: RESULTS OF THE RISVAC02 TRIAL

A. Crespo Guardo, J.C. López Bernaldo de Quirós, F. García Alcaide, M. Estéban, J.L. Jiménez, I. Pérez, M.A. Muñoz Fernández, J. Weber, P. Liljeström, J.M. Gatell y M. Plana Prades

Hospital Gregorio Marañón, Madrid. Hospital Clínica-IDIBAPS, Barcelona. Centro Nacional de Biotecnología, CSIC, Madrid. Karolinska Institutet, Stockholm, Suecia. St. Mary's Hospital, Imperial College, London, RU.

**Introduction:** To investigate the safety and immunogenicity of a modified vaccinia Ankara vector expressing the HIV-1 Bx08gp120

and IIIB gag-pol-nef from clade B (MVA-B), we conducted a phase-I, doubled blind placebo-controlled trial in healthy volunteers.

**Methods:** 30 non-HIV-infected volunteers at low risk of HIV-1 infection were included in 2 Spanish Clinical Centers. The volunteers were randomly allocated to receive 3 intramuscular (i.m.) injections ( $1 \times 10^8$  pfu/dose) of MVA-B ( $n = 24$ ) or placebo ( $n = 6$ ) at weeks 0, 4 and 16. All volunteers were followed until week 48. T cell responses at week 6/8 and at any point following immunisations were evaluated by an IFN- $\gamma$  ELISpot assay using pools of 50 to 61 peptides encompassing the gag-pol-nef, and env regions from clade B included in the virus vector.

**Results:** A total of 169 AE were reported during follow-up; 164 of grade 1-2, and 5 of grade 3-4. Fifty two of grade 1-2 AE were considered as definitely related to vaccination, and most of them were injection site reactions. Preliminary immunogenicity studies showed that positive Elispot responses were detected in 14/24 (58%) and 16/24 (67%) of vaccinees, at weeks 6 and 8, respectively. The magnitude of the total responses induced was mainly against env pools. Vaccine-specific responses were maintained until week 48 in 15/22 (68%) individuals.

**Conclusions:** MVA-B vaccine was safe and well tolerated. Most AE were grade 1-2 and related to the injection site. Preliminary immunogenicity data suggest that the MVA-B vaccine was immunogenic eliciting responses in the 75% of vaccinated healthy individuals.

### O-051. ACTIVACIÓN DE KINASAS INDUCIDA POR EL VIRUS DE LA PESTE PORCINA AFRICANA PARA REGULAR LA MAQUINARIA DE SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA CÉLULA INFECTADA

E. García Sánchez, A. Quintas Gorozarri, M. Nogal Paris, S. Barroso Fernández y Y. Revilla Novella

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.

**Introducción:** La infección del virus de la peste porcina africana (VPPA) se caracteriza por la ausencia de una respuesta inmune neutralizante, lo que hasta ahora ha obstaculizado el desarrollo de una vacuna convencional. VPPA utiliza diferentes mecanismos para evadir la defensa del huésped. Aquí describimos las rutas de señalización de kinasas reguladas por la infección viral, y la interferencia con la síntesis de proteínas celulares. Así, la activación de la ruta PI3K-Akt-mTOR inducida por el virus culmina en la fosforilación de 4EBP y en la subsecuente activación del factor de iniciación de la traducción eIF4E, el cual es secuestrado en la factoría viral donde es utilizado para la síntesis de proteínas del virus.

**Objetivos:** Estudio de la ruta de señalización celular PI3K-Akt-mTOR y de la función del factor 4E durante la infección del VPPA.

**Material y métodos:** Análisis del estado de fosforilación de las kinasas PI3K-Akt-mTOR-p70S6K y del factor 4EBP. Análisis de la síntesis de proteínas celulares durante la infección. Expresión de proteínas virales en presencia o no del inhibidor farmacológico de PI3K LY294002. Localización de eIF4E en células Vero infectadas. Silenciamiento del eIF4E y efecto sobre la producción viral.

**Resultados y conclusiones:** La activación de PI3K es un evento temprano y necesario para la infección del VPPA, ya que el LY294002 inhibe tanto la síntesis de proteínas virales como la producción viral. Además, PI3K activada fosforila Akt, mTOR y 4EBP, el cual libera a eIF4E permitiendo que este sea reclutado a la factoría viral, donde es crítico para la síntesis de las proteínas virales.

## O-052. ROL DE LOS DERIVADOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO EN LA INFECCIÓN POR *TRYPANOSOMA CRUZI*

N.A. Guerrero Gutiérrez, H. Cuervo Grajal, S. Carbajosa González, N. Gironeés Pujol y M. Fresno Escudero

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Universidad Autónoma de Madrid.

Durante la fase aguda de la infección por *Trypanosoma cruzi* se produce una activación del sistema inmunológico en la que la respuesta Th1 tiene un papel protector. Sin embargo, una respuesta excesiva puede tener efectos negativos. Los derivados del ácido araquidónico productos de la vía de las ciclooxygenasas (COX-1 y COX-2), como prostaglandinas y tromboxanos, así como leucotrienos y lipoxinas derivados de la vía de las lipoxigenasas (LO) tienen un papel en la regulación del sistema inmunológico. Profundizaremos en el posible rol de estos derivados y sus enzimas productoras en la fase aguda de la infección. Se utilizó el modelo murino de la infección por *T. cruzi*. Se inocularon diferentes cepas de ratón: BALB/c (susceptible), C57BL/6 (resistente), Ptgds2 -/- (deficiente en la expresión de la proteína COX-2). Se tomaron muestras de tejidos (corazón, sangre, bazo) y células del peritoneo para analizar la expresión de proteínas, ARNm, ensayos de proliferación y actividad enzimática. Los ratones deficientes en COX-2 no presentaron grandes cambios durante a la infección, salvo un ligero aumento en la proliferación de esplenocitos. En los otros modelos observamos una expresión diferencial de la enzima 12/15 LO. Disminuyendo su expresión en el exudado peritoneal y aumentando en corazón. Los resultados indican que COX-2 tiene un papel supresor de la proliferación, pero la ausencia de su expresión se ve compensada por un aumento en la expresión de COX-1 en nuestro modelo. La expresión diferencial la enzima 12/15 LO parece implicar el reclutamiento de diferentes tipos celulares en los distintos tejidos estudiados.

## O-053. PROPHYLACTIC AND THERAPEUTIC USE OF SOLUBLE HUMAN CD6 IN MOUSE EXPERIMENTAL MODELS OF GRAM-POSITIVE SEPTIC SHOCK

M. Martínez Florensa<sup>1</sup>, A. Farrán Díaz-Cano<sup>2</sup>, O. Cañadas<sup>3</sup>, L. Armiger Borrás<sup>2</sup>, L. Bonet Roselló<sup>2</sup>, C. Casals<sup>3</sup>, J. Vila<sup>2</sup> y F. Lozano<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Immunnovative Developments, Barcelona. <sup>2</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centre Esther Koplovitz (CEK), Barcelona. <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid. <sup>4</sup>Servei de Microbiología, Hospital Clínic Universitari de Barcelona. <sup>5</sup>Servei d'Immunología, Hospital Clínic Universitari de Barcelona. <sup>6</sup>Departament de Biología Celular, Immunología i Neurociències, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Sepsis is a still unmet clinical need representing the most important cause of mortality in Intensive Care Units. It is considered an infection-induced systemic inflammatory response syndrome leading to multiple organ failure and death. Gram-positive bacteria still remain the main causative agents responsible for sepsis. Recently, we have reported that human CD6, in either soluble or membrane-bound form, binds and aggregate Gram-negative and Gram-positive bacteria through recognition of conserved constituents of their cell surfaces, namely lipopolysaccharide (LPS) as well as peptidoglycan (PGN) and lipotheic acid (LTA), respectively. Moreover, infusion of a recombinant soluble human CD6 (rshCD6) form showed prophylactic and therapeutic effects on LPS-induced mouse

model of septic shock. Thus, we wondered whether rshCD6 infusion could also be beneficial in mouse models of gram-positive sepsis. With this aim, we first and measured the relative affinity (Kd) of the rshCD6/PGN and rshCD6/LTA interactions, which resulted to be  $1.1 \pm 0.1$  nM and  $0.17 \pm 0.02$  mM respectively. This independently confirmed our previous observation on the interaction of CD6 with PGN and LTA, and demonstrated that its Kd is similar to that reported for CD14, which is considered one of the main (if not the best) PGN and LTA receptors in myeloid mammalian cells. The in vivo efficacy of rshCD6 in Gram-positive induced sepsis was tested by using two experimental mouse models: i.p. infusion of alive *Staphylococcus aureus* ( $3 \times 10^8$  c.f.u.) or i.v. infusion of PGN (30 mg/kg) plus LTA (9 mg/kg) in C57Bl/6 mice. In both cases, i.p. infusion of a single dose of rshCD6 induced significant improvement of mouse survival in a dose- and time-dependent fashion. Concomitantly, significant reduction of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  and IL-6 cytokine plasma levels, but increase of IL-10, were observed. Taken together, the results further support the broad bacterial binding spectrum of rshCD6 and its potential prophylactic and therapeutic use in Gram-negative and Gram-positive induced septic shock.

## O-054. VIRUS DE LA GRIPE H1N1 PANDÉMICO: ESTUDIO PATOGENICO CON AISLADOS VIRALES DE PACIENTES CON DIFERENTE GRADO DE ENFERMEDAD

P. Martínez Orellana<sup>1</sup>, A. Falcón<sup>2</sup>, A. Rodríguez<sup>2,3</sup>, J. Martorell<sup>4</sup>, I. Casas<sup>5</sup>, F. Pozo<sup>5</sup>, L. García Migura<sup>1</sup>, J. Martínez<sup>1,6</sup>, B. García Barreno<sup>5</sup>, M. Montoya<sup>1,7</sup> y A. Nieto<sup>2,3</sup>

<sup>1</sup>Centre de Recerca en Sanitat Animal (CReSA), UAB-IRTA, Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>2</sup>Centro Nacional de Biotecnología, CSIC. Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid.

<sup>3</sup>CIBER, Enfermedades Respiratorias, Mallorca, Illes Balears.

<sup>4</sup>Departament de Medicina i Cirurgia Animals; <sup>5</sup>Departament de Sanitat i d'Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona. <sup>6</sup>Centro Nacional de Microbiología, ISCIII, Majadahonda, Madrid. <sup>7</sup>Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentàries (IRTA), Barcelona.

**Objetivos:** Estudiar las diferencias patogénicas en virus de la gripe H1N1 pandémico aislados de casos graves, leves y de pacientes fallecidos sin patología preexistente y observar si dentro de la diversidad de virus pandémicos circulantes, existen cepas que podrían tener una virulencia más alta de lo normal.

**Material y métodos:** Se aislaron virus procedentes de pacientes de casos graves o leves y de fallecidos, sin patologías preexistentes. Estos virus se crecieron en cultivo celular y se analizaron in vitro e in vivo por si poseen marcadores de virulencia especiales. Se determinó la secuencia completa de sus genomas mediante ultrasecuenciación, también se midió replicación viral y los niveles de expresión de diversas citoquinas en células epiteliales de pulmón humano. Se analizó su virulencia y tropismo en modelos animales de ratón y hurón inoculados vía intranasal o intratraqueal, respectivamente. Se estudiaron signos clínicos y supervivencia, así como replicación viral en diferentes órganos y estudios histopatológicos en tejidos de las vías respiratorias.

**Resultados:** Tras el análisis de las secuencias, se han encontrado mutaciones puntuales compartidas entre los diferentes aislados y mutaciones puntuales específicas de aislado en algunos de los segmentos genómicos. Los ensayos de replicación han mostrado diferencias en el inicio del ciclo de replicación viral. Las lesiones histopatológicas en hurón no mostraron relación con el tipo de virus usado como inóculo. En ambos modelos animales se han detectado diferentes niveles de carga viral en órganos y diferencias en la progresión de los signos clínicos de los animales infectados con los diferentes aislados.

## O-055. S4D-SRCRB, A SOLUBLE GROUP B MEMBER OF THE SCAVENGER RECEPTOR CYSTEINE-RICH SUPERFAMILY, RECOGNIZING MICROBIAL AND ENDOGENOUS COMPONENTS

C. Miró Julià<sup>1</sup>, S. Roselló<sup>1</sup>, O. Padilla<sup>1</sup>, A. García Pardo<sup>2</sup>, C. Serra Pagès<sup>3</sup>, J. Yélamos<sup>4</sup>, J. Vila<sup>5</sup> y F. Lozano<sup>1,2,3</sup>

<sup>1</sup>Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centre Esther Koplovitz, Barcelona. <sup>2</sup>Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Madrid. <sup>3</sup>Servei d'Immunologia i Microbiologia; <sup>5</sup>Microbiología, Hospital Clínic de Barcelona. <sup>4</sup>Servei d'Immunologia, Hospital del Mar-IMIM, Barcelona.

Human S4D-SRCRB is a soluble member of the SRCR-SF (Scavenger Receptor Cysteine-Rich Superfamily), which is composed of four group B SRCR domains separated by Pro-, Ser- and Thr-rich polypeptides, and with a still poorly known tissue distribution and function. Northern blot analysis indicated that S4D-SRCRB is expressed as two major mRNA species: one of 2.8 kb, with a restricted tissue expression pattern (mainly kidney, placenta and HepG2 cell line), and another of 1.5 kb, with a broader distribution. To gain insight on this molecule, we produced recombinant forms (either full-length or truncated) fused to a HA tag (rhS4D-HA) by means of an episomal expression system (pCep-PU) in HEK 293-EBNA cells. Full-length rhS4D-HA was affinity purified from the culture supernatants by means of its HA tag and used to generate a rabbit polyclonal antiserum and 5 mouse monoclonal antibodies recognizing at least three different epitopes on S4D-SRCRB, based on its different reactivity to recombinant truncated forms. Similarly to some members of the SRCR-SF (namely SRA-I/II, MARCO, DMBT1, Spa, CD6, CD163, CD5, and S5D-SRCRB), rhS4D-HA also binds to conserved structural components from the cell surface of bacteria (either gram-positive or gram-negative) and fungi. Moreover, rhS4D-HA also showed to directly interact with some components of the extracellular matrix, such as laminin and fibronectin. These binding abilities, together with a restricted tissue expression pattern (placenta, digestive and genitourinary tracts), suggest that S4D-SRCRB might play a role in the innate defence and homeostasis of epithelial surfaces.

## O-056. TOLERANCIA Y REGULACIÓN DE LA INFECCIÓN VIRAL EN UN MODELO DE HEPATITIS B CRÓNICA

I. Otano Andrés, J. Dotor de las Herrerías, A. Benito Boillos, J. Crettaz, C. Olagüe Micheltorena, S. Menne, J. Prieto Valtuelña y G. González Aseguinolaza

Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Universidad de Navarra, DIGNA, Pamplona; Cornell University, EE.UU.

**Objetivos:** La respuesta inmune del huésped juega un papel esencial en el control y en la patogenia de la infección por HBV. Aquellos pacientes que eliminan la infección desarrollan una potente respuesta inmune multiespecífica y polyclonal. Sin embargo, en los pacientes infectados crónicamente, la respuesta inmune es insuficiente para eliminar la infección y es responsable del daño hepático continuado. La administración de un adenovirus de alta capacidad que expresa IL-12 (HC-Ad-IL-12m) en combinación con inhibidores de la acción de células T reguladoras en marmotas crónicamente infectadas, resultó en la activación transitoria de la respuesta inmune celular. Sin embargo, no generó ningún cambio significativo en la viremia. Por ello, nos planteamos analizar los posibles mecanismos implicados en la ausencia de respuesta al tratamiento.

**Métodos:** Se trataron 3 grupos de marmotas crónicamente infectadas por el WHV: 1) Administración del HC-Ad-IL-12m. 2) Administración del HC-Ad-IL-12m en combinación con el péptido inhibidor del TGF-β1, P17. 3) Administración del HC-Ad-IL-12m en combinación con dosis bajas de ciclofosfamida. Analizamos la carga viral, expresión de IL-12 y respuesta inmune frente a antígenos virales. Además se obtuvieron biopsias hepáticas antes, durante y después del tratamiento; donde se analizó la expresión de varios marcadores implicados en el control de la respuesta inmune.

**Resultados y conclusiones:** La administración de HC-Ad-IL-12m en combinación con P17 o ciclofosfamida en marmotas crónicamente infectadas resultó en una reducción transitoria del ambiente inmunosupresor del hígado, sin embargo, en todos los casos tras el tratamiento el ambiente inmunosupresor aumenta. En este trabajo demostramos cómo el sistema inmune en las enfermedades crónicas está altamente regulado favoreciendo la protección del huésped frente al daño que pueden producir linfocitos activados y al mismo tiempo favorecen la supervivencia del patógeno.

## O-057. TRATAMIENTO DE LA HEPATITIS B CRÓNICA MEDIANTE LA EXPRESIÓN DE IL-12 EN EL HÍGADO EN COMBINACIÓN CON TRATAMIENTOS INHIBIDORES DE LA ACCIÓN DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS

I. Otano Andrés, J. Dotor de las Herrerías, A. Benito Boillos, J. Crettaz, C. Olagüe Micheltorena, S. Menne, J. Prieto Valtuelña y G. González Aseguinolaza

Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Universidad de Navarra, DIGNA, Pamplona; Cornell University, EE.UU.

**Objetivos:** Uno de los objetivos principales de nuestro laboratorio es el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas para la hepatitis B crónica. Resultados anteriores nos mostraron que el efecto antiviral de la IL-12 dependía de la carga viral basal. Los animales con alta carga viral no responden al tratamiento y presentan niveles de expresión hepáticos significativamente elevados de factores inmunosupresores como IL-10, PD-1, PDL-1, TGF-β1 y FoxP3. Estos datos nos sugerían que la ausencia de respuesta podía ser debida a la acción inmunosupresora de las células T reguladoras. Por ello, decidimos combinar la terapia inmunoestimuladora de la IL-12, con la acción de un péptido inhibidor de TGF-β1 y la deplección de las células Tregs.

**Métodos:** Se trataron 3 grupos de marmotas crónicamente infectadas por el WHV con viremias superiores a 1.010 gv/ml: 1) Administración de un adenovirus de alta capacidad que expresa IL-12 (HC-Ad-IL-12m). 2) Administración del HC-Ad-IL-12m en combinación con el péptido inhibidor del TGF-β1, P17. 3) Administración del HC-Ad-IL-12m en combinación con bajas dosis de ciclofosfamida. Se extrajeron muestras de suero y sangre en diferentes puntos del tratamiento, para analizar la viremia, la concentración de IL-12m sérica y la respuesta inmune frente a los antígenos virales y la estimulación a IL-12m.

**Resultados y conclusiones:** La administración de HC-Ad-IL-12m en combinación con P17 o ciclofosfamida en marmotas crónicamente infectadas resultó en la activación transitoria de la respuesta celular de los linfocitos a la estimulación con IL-12m y frente a antígenos virales. Sin embargo, no generó ningún cambio significativo en la viremia. Por tanto, es necesaria la inducción de respuestas inmunes más potentes para conseguir la eliminación de los hepatocitos infectados.

### O-058. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA CANDIDIASIS EN PACIENTES CON DEFICIENCIA DE IL-12RBETA1

I. Sologuren Marrero, J. Noda Mayor, S. Boisson Dupuis, J. Bustamante, E. Herrera Ramos, L. de Beaucoudrey, N. González Quevedo, Y. Florido Ortega, J.L. Casanova y J.C. Rodríguez Gallego

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria. Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. Laboratory of Human Genetics of Infectious Diseases, The Rockefeller University, New York, EE.UU. Pediatric Immunology-Hematology Unit, Necker Hospital; University of Paris Descartes INSERM U550, Necker Medical School, Paris, Francia.

*Candida albicans* es un comensal exclusivamente de humanos. Sin embargo, en ocasiones puede causar enfermedad. La respuesta frente a *Candida* está anatómicamente compartimentalizada. Los defectos de linfocitos T predisponen a candidiasis mucocutánea (MC), pero no a la diseminada. La candidiasis sistémica es en su mayoría nosocomial, y la neutropenia se considera un factor de riesgo. Clásicamente se consideraba que la inmunidad Th1 era la responsable de la defensa frente candidiasis MC, sin embargo estudios recientes indican que los linfocitos Th17/Th22 serían los responsables, al menos en mucosa oral. Los datos en modelos murinos respecto a la inmunidad Th1 y TH17/Th22 y *Candida* son contradictorios, especialmente en las formas diseminadas y gástrica, y no está clara su aplicabilidad a humanos. Los pacientes con deficiencia de la cadena Beta 1 del receptor de la IL-12 (IL-12RB1) tienen un defecto de producción de IFN-gamma (inmunidad Th1). IL-12RB1 forma también parte del IL-23R, y estos pacientes presentan un defecto de Th17/Th22. Un 25% de los pacientes descritos con deficiencia de IL-12RB1 han padecido candidiasis. Hemos recogido la información clínica de los episodios de candidiasis en 25 de estos pacientes, procedentes de 8 países. Los resultados se comparan con pacientes con defectos selectivos de inmunidad mediada por IFN-gamma (IFN-gR1, IFN-gR2, STAT1) o por IL-17/IL-22 (APECED, AD-HIES, CMC). Se discute el papel de los linfocitos Th1 y Th17 en la susceptibilidad a la infección por *Candida* y salmonela, así como en la defensa frente a diferentes formas de candidiasis, mucosa, cutánea y diseminada.

## INMUNOLOGÍA TUMORAL

**Moderadores:** Pedro Berraondo López (Pamplona) y Cecilia Muñoz Calleja (Madrid)

### O-059. TREG CELLS, RATHER THAN TH17, SEEM TO PLAY A KEY ROLE IN GASTRIC CANCER PROGRESSION

A. Aguinaga Barrilero, A. Gutiérrez Calvo, I. Lasa, A. López y J. Martín Villa

Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Servicio de Cirugía General y Aparato Digestivo, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid.

**Introduction:** We wished to investigate the role of Treg and Th17 cells in tumor growth in patients with gastric adenocarcinoma.

**Methods:** T cells were achieved from blood or gastric tissue (tumor and tumor-free, TF) samples from 21 patients [14 with intestinal type and 7 with diffuse type disease, 6 with early (ES) and 15 with advanced disease-stage (AS)], and 23 healthy donors (HD). CD4, CD8, CD25, LAP (latency TGFβ-associated peptide), FOXP3, IL-17 and IFN-γ markers were measured.

**Results:** An increase in the percentage of CD4+CD25+ cells was found when comparing tumor with tumor-free gastric tissue in patients ( $9 \pm 5.7\%$  vs  $4 \pm 3\%$ ;  $p = 0.014$ ). Likewise, intestinal type tumor shows higher FoxP3 and CD4+CD25+FoxP3+ percentages ( $7.3 \pm 4.6\%$  and  $2.7 \pm 2.4\%$ , respectively) when compared to tumor-free tissue ( $4.5 \pm 4.8\%$  and  $1.6 \pm 2.6\%$ ;  $p = 0.036$  and  $p = 0.028$ , respectively). The FoxP3+/IL17+ ratio is higher in blood samples of patients ( $2.2 \pm 2.1$ ) than in control subjects ( $1.1 \pm 1.6$ ;  $p = 0.025$ ). No significant differences were found for CD4+ or CD8+ IL-17-producing cells. A novel CD8+LAP+ subpopulation is reported in humans. Its frequency is increased, especially in ES disease, either in blood (HD  $2.8 \pm 2.8$ ; ES  $7.1 \pm 9.7$ ; AS  $4.9 \pm 8.3$ ) or tumoral tissue (TF  $3 \pm 1$ ; ES  $6.6 \pm 4.5^*$ ; AS  $3.6 \pm 3.1^* p < 0.05$  vs TF). LAP+/CD8+LAP- ratio (a measure of the immunosuppression on CTLs) is also increased in patients (blood: HD  $0.14 \pm 0.14$ ; ES  $0.44 \pm 0.6$ ; AS  $0.24 \pm 0.4$ , tissue: TF  $0.23 \pm 0.2$ ; ES  $0.37 \pm 0.12^*$ , AS  $0.2 \pm 0.3^* p < 0.05$  vs AS).

**Conclusions:** Treg, and not Th17, cells seem to play a key role in tumor progression. LAP measurement may be useful to evaluate the immune status of cancer patients.

### O-060. LA DEFICIENCIA DE PARP-2 INDUCE ACUMULACIÓN DE DAÑO EN EL DNA EN TIMOCITOS Y ACELERA LA APARICIÓN DE LINFOMAS T EN UN FONDO GENÉTICO DEFICIENTE PARA P53

P. Aparicio Alonso, L. Nicolás Gomariz, C. Martínez Cáceres, M. Muñoz García, O. Fernández Rodríguez, C. Ampurdanes, J. Martín Caballero, G. Rubio Pedraza y J. Yélamos López

Institut Municipal d'Investigació Mèdica, Barcelona. Hospital Virgen de la Arrixaca, Universidad de Murcia.

La poli-ADP-ribosa polimerasa-2 (Parp-2) forma parte de una familia de enzimas que cataliza la poli-ADP-ribosilación de proteínas. La deficiencia de Parp-2 en ratón (Parp-2/-) da lugar a una reducción en el número de timocitos asociada a un incremento de la susceptibilidad a apoptosis, indicando que Parp-2 juega un importante papel en la supervivencia celular durante la timopoiesis. Para determinar si existe un vínculo entre Parp-2 y las rutas de apoptosis dependientes de p53 en respuesta al daño en el DNA, hemos generado ratones doble deficientes para Parp-2 y p53. Nuestros resultados muestran que la deficiencia de p53 restaura completamente el desarrollo de los timocitos Parp-2/- . Sin embargo, los timocitos deficientes en Parp-2 acumulan altos niveles de daño en el DNA, independientemente de p53, indicando una función de Parp-2 en la estabilidad genómica durante la diferenciación de timocitos. Aunque los ratones Parp-2/- no muestran susceptibilidad espontánea a tumores, la deficiencia de Parp-2 acelera el desarrollo de linfomas T en ratones deficientes en p53. Estos datos sugieren una interacción funcional y sinérgica entre Parp-2 y p53 en la supresión tumoral mediante el papel de Parp-2 en la respuesta al daño en el DNA e indica la importancia de analizar los tumores humanos para el estado de ambos genes.

### O-061. CARCINOMA-DERIVED INTERLEUKIN-8 DISORIENTS DENDRITIC CELL MIGRATION WITHOUT IMPAIRING T-CELL STIMULATION

C. Alfaro Alegria, N. Suárez Fuentetaja, I. Martínez Forero, A. Palazón García, E. Bolaños Mateo, J. Dubrot Armendáriz, S. Hervás Stubbs, J.L. Pérez Gracia e I. Melero Bermejo

CIMA, CUN, Pamplona.

**Introduction:** Interleukin-8 (IL-8, CXCL8) is readily produced by human malignant cells. Dendritic cells (DC) both produce IL-8 and express the IL-8 functional receptors CXCR1 and CXCR2. Most human colon carcinomas produce IL-8. IL-8 importance in malignancies has been ascribed to angiogenesis promotion.

**Methods and results:** IL-8 effects on human monocyte-derived DC biology were explored upon DC exposure to recombinant IL-8 and with the help of an IL-8 neutralizing mAb. In vivo experiments were performed in immunodeficient mice xenografted with IL-8-producing human colon carcinomas and comparatively with cell lines that do not produce IL-8. Allogenic T lymphocyte stimulation by DC was explored under the influence of IL-8. DC and neutrophil chemotaxis were measured by transwell-migration assays. Sera from tumor-xenografted mice contained increasing concentrations of IL-8 as the tumors progress. IL-8 production by carcinoma cells can be modulated by low doses of cyclophosphamide at the transcription level. If human DC are injected into HT29 or CaCo2 xenografted tumors, DC are retained intratumorally in an IL-8-dependent fashion. However, IL-8 did not modify the ability of DC to stimulate T cells. Interestingly, pre-exposure of DC to IL-8 desensitizes such cells for IL-8-mediated in vitro or in vivo chemoattraction. Thereby DC become disoriented to subsequently follow IL-8 chemotactic gradients towards malignant or inflamed tissue.

**Conclusions:** IL-8 as produced by carcinoma cells changes DC migration cues, without directly interfering with DC-mediated T-cell stimulation.

### O-062. ACTIVACIÓN DEL SISTEMA DEL COMPLEMENTO EN CÁNCER DE PULMÓN Y SU EFECTO EN EL DESARROLLO TUMORAL

L. Corrales Pecino, D. Ajona Martínez-Polo, J.J. Lasarte Sagastibelza, J.I. Riezu Boj, A. Rouzaut Subirá, L. Montuenga Badía y R. Pío Osés

CIMA-Universidad de Navarra, Pamplona.

**Objetivos:** La transformación neoplásica puede incrementar la capacidad de la célula maligna para activar el complemento. En este estudio hemos analizado la activación del complemento en células de cáncer de pulmón y sus consecuencias sobre el desarrollo tumoral.

**Métodos:** En primer lugar, comparamos la activación in vitro en líneas celulares de cáncer de pulmón y de epitelio bronquial normal. A continuación, utilizamos un modelo singénico murino de cáncer de pulmón para evaluar la importancia de la activación del complemento en el desarrollo tumoral.

**Resultados:** La activación del complemento en las células tumorales fue significativamente mayor que en las de epitelio normal. Sin embargo, los mecanismos de inhibición del complemento en las células malignas evitaron la citotoxicidad mediada por esta vía. En ratones knockout para C3, el crecimiento de células de carcinoma de pulmón de Lewis fue menor que en ratones wild-type, demostrando la importancia del sistema del complemento en el desarrollo tumoral. Al menos parte de este efecto estaría mediado por la anafilatoxina C5a, ya que el bloqueo farmacológico de C5aR-1 en ratones

wild-type también retrasó significativamente el crecimiento tumoral. El análisis de los posibles mecanismos involucrados en el efecto de C5a demostró su capacidad quimiotáctica sobre células endoteliales, su actividad sobre la movilidad de las células tumorales y su capacidad para inducir una respuesta inmunosupresora.

**Conclusiones:** las células de cáncer de pulmón activan el complemento, promoviendo la progresión tumoral. Un posible mediador de este efecto sería la anafilatoxina C5a, liberada tras la activación del complemento sobre la célula maligna.

### O-063. PAPEL DE LA PROTEÍNA DE UNIÓN A ACTINA, CORTACTINA, EN LA SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR CCR7 EN CÉLULAS DE ADENOCARCINOMA DE MAMA

C. Cuesta Mateos, B. Colom Fernández, B. Somovilla Crespo, M. Alfonso Pérez, A. Beltrán Núñez y C. Muñoz Calleja

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

**Introducción:** El receptor CCR7 y sus ligandos, las quimiocinas CCL19/CCL21, no solo juegan un papel fundamental en el sistema inmunológico, además participan en el crecimiento tumoral y metástasis, como ocurre en cáncer de mama. En este tipo de neoplasias, la proteína de unión a actina, Cortactina, está comúnmente sobreexpresada, y este aumento se ha asociado con mayor motilidad celular. Dado que ambas proteínas se encuentran sobreexpresadas en cáncer de mama, están implicadas en procesos de invasión tumoral y ambas se postulan como factores pronósticos en esta afección, decidimos estudiar si la cortactina juega un papel importante en la señalización mediada por CCR7.

**Métodos y resultados:** En la línea de adenocarcinoma de mama, MCF7, ensayos de inmunoblot demuestran que de manera dependiente de ERK la estimulación de CCR7 aumenta la fosforilación de cortactina en sus serinas 405 y 418 y la disminuye en la tirosina 421. Mediante microscopía de fluorescencia, se demuestra que la estimulación de CCR7 induce translocación transitoria de cortactina de compartimentos internos citoplasmáticos a la zona del cíortex celular, donde no colocaliza con CCR7, pero sí se ubica en formaciones tipo lamellipodia. Con ensayos de inmunoprecipitación condicional no se ve asociación CCR7-cortactina, pero sí ERK-cortactina, iniciando una señalización CCR7-cortactina indirecta.

**Conclusiones:** Estos datos, y otros no mostrados, señalan a la cortactina como un nuevo eslabón en las vías de señalización de CCR7, y parece jugar un papel importante en metástasis de esta línea celular mediando en diferentes procesos como son la formación de lamellipodia, invadopodia y quimiotaxis.

### O-064. DETECCIÓN NO INVASIVA DE CÉLULAS METASTÁTICAS IN VIVO EN ANIMALES PORTADORES DE XENOINJERTOS DE CÁNCER DE MAMA HUMANO

R. Fernández Periáñez, I. Molina Privado, I. Guijarro Muñoz, A.M. Cuesta, V. Alonso-Camino, L. Sanz y L. Álvarez-Vallina

Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid.

**Objetivos:** Desarrollar un modelo humanizado de metástasis, que permita una evaluación cuantitativa y en tiempo real del crecimiento del tumor primario y de la formación del foco metastásico.

**Material y métodos:** Modificación genética de células endoteliales (CE) humanas con el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis*

(Fluc), y modificación genética de células de cáncer de mama humanas (MDA-MB-231) con gen de la luciferasa de *Renilla reniformes* (Rluc). Implantación de mezclas celulares (CEFluc + células mesenquimales humanas) embebidas en Matrigel, en la pared abdominal de ratones inmunodeficientes, para la generación de organoides vasculares humanos (OVH), e implantación ortotópica de células tumorales MDA-MB-231Rluc en la zona mama axilar contralateral.

**Resultados:** La actividad luciferasa de las CEFluc implantadas en ratones atípicos se detectó durante más de 120 días, y se correlacionó, a nivel histológico, con la formación de una vascularización humana madura y estable. Mediante técnicas moleculares e imaging ex vivo se ha detectado la presencia de células MDA-MB-231Rluc en los OVH implantados en la pared abdominal, tanto tras la administración sistémica (inyección intracardiaca) de las células tumorales, como en un modelo de metástasis espontánea tras el implante ortotópico.

**Conclusiones:** Hemos demostrado que células tumorales humanas circulantes pueden anidar en un esbozo tisular con vasos humanos. La localización accesible de estos organoides así como la posibilidad de evaluar en tiempo real la formación del foco metastásico, permitirá estudiar las fases tempranas de la metástasis con un nivel de precisión sin precedentes.

#### O-065. IMPLICACIÓN FUNCIONAL DEL RECEPTOR DE IL-7 (IL-7R) EN LA PROLIFERACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE LA LEUCEMIA T-ALL

S. González García y M.L. Toribio García

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM,  
Departamento de Biología Celular e Inmunología,  
Universidad Autónoma de Madrid.

Las leucemias linfoblásticas agudas T (T-ALL) se originan por la transformación neoplásica de los progenitores intratímicos durante su desarrollo. Más del 65% de las T-ALL presentan mutaciones activadoras en NOTCH1, lo que implica una función esencial de este oncogén en el proceso neoplásico. Además, gran parte de las T-ALL expresan el receptor para la interleuquina 7 (IL-7R) y responden al estímulo proliferativo de esta citoquina in vitro, sugiriendo la participación del IL-7R en la fisiopatología de la T-ALL. Estudios recientes de nuestro grupo demostraron una interacción funcional de IL-7R y NOTCH durante el desarrollo intratímico humano. Además, NOTCH regula transcripcionalmente la expresión del IL7R en progenitores intratímicos y en leucemias T-ALL, lo que sugiere la interacción de ambas vías en el proceso oncogénico. Basados en estos antecedentes, nuestro objetivo ha sido analizar la relevancia funcional de la expresión y señalización vía IL-7R en las T-ALLs. Para ello, analizamos la activación constitutiva del IL-7R en T-ALLs, así como su dependencia de las vías de señalización JAK/STAT, PI3K y ERK. Además, analizamos la participación del IL-7R en la supervivencia y proliferación de las T-ALLs mediante silenciamiento con ARN de interferencia (ARNi). Nuestros resultados demuestran que el IL-7R señaliza constitutivamente en líneas T-ALLs IL-7R+ en ausencia de IL-7, lo que determina la supervivencia celular a través de JAK y PI3K y la proliferación mediada por PI3K y MEK/ERK. En consecuencia, la inhibición de la expresión de IL-7Rα en T-ALLs se traduce en la parada del ciclo celular y la inducción de apoptosis, siendo ERK la principal vía afectada. Por tanto, la expresión del IL-7R es crítica para la supervivencia de las T-ALLs, lo que sitúa al IL-7R como posible diana terapéutica.

#### O-066. LA TRANSICIÓN EPITELIO-MESENQUIMAL INDUCE LA RESPUESTA INMUNE ANTITUMORAL MEDIADA POR EL RECEPTOR NKG2D

S. González Rodríguez, L. Huergo Zapico, A. Astudillo, J.A. Galván, L. Rodrigo, A. García de Herreros y A. López Soto

Unidad de Inmunología Tumoral, Instituto Universitario Oncológico del Principado de Asturias, Universidad de Oviedo.

NKG2D es un receptor activador expresado por las células T y NK implicado en la inmunovigilancia del cáncer. MICA/B y las ULBPs son ligandos de NKG2D que favorecen la eliminación de los tumores en los estadios iniciales, aunque los tumores avanzados desarrollan numerosos mecanismos para evadir esta respuesta inmune. Esto sugiere que NKG2D puede desempeñar un papel clave en el control de la progresión tumoral. La transición epitelio-mesenquimal (TEM) es un proceso biológico que se caracteriza por la adquisición de las células epiteliales de características mesenquimales y de un fenotipo invasivo y metastásico. En este trabajo analizamos el papel de NKG2D durante la TEM. Demostramos que, junto a la pérdida de marcadores epiteliales, la TEM causada por diversos mecanismos como el tratamiento con TGF-β, mediante la sobre-expresión de Snail1 y mediante la inhibición farmacológica de GSK-3β en diversas líneas tumorales y no tumorales, induce significativamente la expresión de los ligandos de NKG2D y la citotoxicidad mediada por NKG2D de las células NK. Además, la expresión de MICA/B y diversos marcadores de TEM fueron analizados en 63 tumores colorrectales. MICA/B se expresa en células epiteliales y en tumores bien diferenciados que mantienen la expresión de E-caderina y β-catenina. Sin embargo, en tumores avanzados que han sufrido TEM, se pierde la expresión de MICA/B. Esto sugiere que TEM favorece la eliminación de las células tumorales por el sistema inmune y que solo aquellas células tumorales que han desarrollado mecanismos para evadir la respuesta inmune mediada por NKG2D pueden desarrollar este proceso.

#### O-067. LA ERRADICACIÓN DE TUMORES DE COLON TRAS TRATAMIENTO CON QUIMIO E INMUNOTERAPIA ESTÁ ASOCIADA CON UN PROFUNDO CAMBIO FENOTÍPICO EN LAS CÉLULAS MIELOIDES DEL MICROAMBIENTE TUMORAL

J. Medina-Echeverz, J. Fioravanti, M. Zabala, N. Ardaiz, J. Prieto y P. Berraondo

División de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Unidad de Hígado, Clínica Universidad de Navarra, CIBER-EHD, Pamplona. Institute for Stem Cell Biology and Regenerative Medicine, Stanford University, CA, EE.UU.

La interleuquina 12 (IL-12) es un potente inmunoestimulador, pero su utilización en clínica como terapia antitumoral es escasa, ya que la expansión de células T reguladoras (Treg) tras su administración podría limitar su eficacia. Por ello, en este trabajo se combinan dos drogas (ciclofosfamida y anti-CD25) utilizadas para deplecionar Treg con el fin de potenciar el efecto antitumoral de la terapia génica con IL-12. Como resultado, tanto anti-CD25 como ciclofosfamida combinados con IL-12 eliminan Treg y células mieloides supresoras (MDSC) presentes en el microambiente tumoral, pero solo la combinación de ciclofosfamida con IL-12 demuestra una eficacia antitumoral significativa en ratones con carcinoma de colon grande y establecido. Dicho efecto terapéutico coincide con la aparición en el tumor de una población heterogénea de células designada como células mieloides inflamatorias (IMC), compuesta de monocitos y neutrófilos inflamatorios. Por una parte, dichas IMC producen una serie de citoquinas/quemoquinas propias de una respuesta inflama-

atoria y, al contrario que las MDSC, no inducen la conversión de linfocitos T naïve CD4+ a Treg. Por otra parte, la aparición de IMC concuerda con una intensa infiltración del tumor por linfocitos T efectores, que desaparece tras la eliminación de IMC del tumor, que conlleva la pérdida de la eficacia antitumoral de la terapia combinada. En resumen, la combinación de ciclofosfamida e IL-12 elimina Treg y MDSC intratumorales mientras induce la aparición de IMC en el microambiente tumoral, siendo las IMC esenciales para facilitar la infiltración del tumor por células T efectoras y la subsiguiente eliminación del tumor.

#### O-068. INDUCTION OF TUMOR IMMUNITY BY TARGETED INHIBITION OF NONSENSE-MEDIATED mRNA DECAY

F. Pastor Rodríguez, S. Inogés Sancho, A. López Díaz de Cerio, H. Villanueva y M. Bendandi

*Laboratorio de Inmunoterapia, Centro de Investigación Médica Aplicada, Área de Terapia Celular y Servicio de Hematología, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona.*

Tumor vaccination is the main cancer immunotherapy strategy. It aims at stimulating a systemic immune response targeted to mostly weak antigens expressed in the disseminated tumor lesions. The main challenges in developing effective vaccination protocols are the identification of potent and broadly expressed tumor associated antigens, and effective adjuvants to stimulate a robust and durable immune response. The lack of potent tumor associated antigens in the vaccination strategies is a very important limiting factor in engendering a protective antitumor response. The quest for a clinically feasible approach to increase the potency of the antigens of the tumors remains one of the main challenges in cancer immunotherapy. We developed a fundamentally different approach in which the expression of new, and thereby potent, antigens is induced in tumor cells by inhibiting nonsense-mediated messenger RNA decay (NMD). Small interfering RNA (siRNA)-mediated inhibition of NMD in tumor cells led to the expression of new antigens and their immune-mediated rejection. Tumor-targeted delivery of NMD factor-specific siRNAs conjugated to oligo-nucleotide aptamer ligands led to eradication of tumor growth, superior to conventional tumor vaccination strategies. Tumor-targeted NMD inhibition forms the basis of a simple, broadly useful, and clinically feasible approach to enhance the antigenicity of disseminated tumors leading to their immune recognition and rejection and the cell-free chemically synthesized oligonucleotide backbone of aptamer-siRNAs reduces the risk of immunogenicity and enhances the feasibility of generating reagents suitable for clinical use.

#### O-069. ALTERACIONES FENOTÍPICAS EN LAS CÉLULAS NK DE PACIENTES DIAGNOSTICADOS DE LEUCEMIA MIÉLOIDE AGUDA, POSIBLES MECANISMOS IMPLICADOS E INCIDENCIA EN LA SUPERVIVENCIA

B. Sánchez Correa, I. Gayoso, J.M. Bergua, J.G. Casado, S. Morgado, H. Bañas, M.J. Arcos, J. Prieto, M. Bengoechea, R. Solana y R. Tarazona

*Unidad de Inmunología, Departamento de Fisiología, Universidad de Extremadura, Cáceres. Unidad de Inmunología, Instituto Maimónides para la Investigación Biomédica de Córdoba, Universidad de Córdoba. Hospital Reina Sofía, Córdoba. Departamento de Hematología, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres.*

Los pacientes de LMA presentan alteraciones en la expresión de algunos receptores activadores de la citotoxicidad que podrían

estar relacionadas con una respuesta deficiente de las células NK y por tanto con la resistencia de las células leucémicas a la lisis. El objetivo del estudio fue analizar las anomalías presentes en las células NK de pacientes de LMA así como los posibles mecanismos responsables. Las muestras incluidas en el estudio se obtuvieron de sangre periférica de 47 individuos control sanos y de 50 pacientes diagnosticados de LMA en el Hospital San Pedro de Alcántara tras obtener el consentimiento informado. Los resultados obtenidos mostraron que: los pacientes de LMA menores de 65 años presentaban un descenso significativo en la expresión de DNAM-1, NKp46 y NKp30 en la superficie de las células NK al compararlos con los individuos control del mismo rango de edad. Los blastos de los pacientes de LMA expresaban los ligandos de DNAM-1. La expresión de DNAM-1 y de su ligando CD112 presentaban una correlación inversa en los pacientes menores de 65 años. La expresión de DNAM-1, en la superficie de las células NK de individuos control descendió significativamente tras el co-cultivo con blastos de leucemia que expresaban ligandos para dicho receptor. NKp46 y NKp30 descendieron significativamente en la superficie de células NK de individuos control tras el co-cultivo con blastos de pacientes que presentaban una baja expresión de estos receptores en la superficie en el momento del diagnóstico. Una baja expresión de NKp46 en la superficie de las células NK afecta negativamente a la supervivencia de los pacientes de LMA. Estos resultados sugieren que las células leucémicas son capaces alterar la expresión en superficie de los receptores activadores expresados en las células NK. Algunas de estas alteraciones están asociadas con la supervivencia de los pacientes pudiendo por tanto emplearse como nuevo marcador pronóstico.

### INMUNOTERAPIA

**Moderadores:** Paloma Sánchez Mateos (Madrid) y Rubén Hernández Alcoceba (Pamplona)

#### O-070. AN IMMUNOTHERAPY STRATEGY BASED ON TYPE-1 DENDRITIC CELLS INCREASES CIRCULATING INTERLEUKIN-12 AND NK ACTIVITY WHILE DECREASING CIRCULATING ENDOTHELIAL CELLS

C. Alfaro Alegria, J.L. Pérez Gracia, N. Suárez Fuentetaja, M. Fernández de Sanmamed, B. Sangro Gómez-Acebo, A. Calvo González, A. González Hernández, E. Bolaños Mateo, S. Hervás Stubbs, I. Martínez Forero e I. Melero Bermejo

*CIMA, CUN, Pamplona.*

**Objectives:** This study assesses the biological effects and safety of dendritic cell (DC) immunizations combined with GM-CSF, Peginterferon and cyclophosphamide pre-treatment in patients with solid tumors.

**Patients and methods:** Twenty-four patients with metastatic cancer received two cycles of four daily immunizations with monocyte-derived DC. DC were incubated with autologous tumor lysate, IFN $\alpha$ , TNF $\alpha$  and poly I:C. One dose was delivered intranodally, under ultrasound control, and the rest intradermally. Cyclophosphamide (day -7), GM-CSF (days 1-4) and Peginterfer-

on (days 1 and 8) completed each cycle. Extensive immunological and imaging studies were performed to reveal the biological effects of the treatment.

**Results:** Pre-treatment with cyclophosphamide decreased regulatory T cells to levels observed in healthy subjects. Treatment induced sustained elevations of Interleukin-12 in serum and increased NK activity in peripheral blood. Circulating endothelial cells (CEC) decreased in 17/18 patients and circulating tumor cells (CTC) markedly dropped in 6/19 cases. IFN $\gamma$ -ELISPOT responses to DC+tumor lysate were observed in 4/11 cases. Tracing DC migration with 111In-scintigraphy showed that intranodal injections reached deeper lymphatic chains in 61% of patients, while intradermal injections almost constantly showed arrival of a small fraction of DC to draining inguinal lymph nodes. Five patients experienced disease stabilization. One patient with completely resected disease before treatment have not relapsed after 12+ months.

**Conclusions:** This combinatorial immunotherapy strategy is feasible and suggests potential activity in patients with minimal residual disease. A randomized trial exploring this hypothesis is currently ongoing.

#### O-071. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES TRIMÉRICOS MEDIANTE EL USO DE LA REGIÓN DE TRIMERIZACIÓN DEL DOMINIO NC1 DEL COLÁGENO XV HUMANO

A.M. Cuesta Martínez<sup>1</sup>, K. Enciso-Álvarez<sup>2</sup>  
y L. Álvarez-Vallina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología Molecular; <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid.

**Objetivos:** Generar anticuerpos recombinantes multivalentes mediante la fusión de anticuerpos monocadena Fv (scFv) con la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XV (scFv-NC1XV). Caracterización de las moléculas generadas, comparando sus parámetros estructurales y funcionales con anticuerpos recombinantes multivalentes generados mediante la fusión con la región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XVIII (scFv-NC1XVIII).

**Material y métodos:** Se han generado varios anticuerpos recombinantes multivalentes (scFv-NC1XV y scFv-NC1XVIII) que se purificaron a partir de medio condicionado de células HEK-293 modificadas genéticamente. Las determinaciones estructurales se realizaron mediante velocidad de sedimentación y equilibrio de sedimentación. Los estudios de estabilidad para valorar su integridad funcional y estructural, tras la incubación con una batería de proteasas y suero (murino y humano), se realizaron mediante ELISA y SDS-PAGE, respectivamente.

**Resultados:** Los scFv-NC1XV son secretados en forma funcionalmente activa y de manera muy eficiente por HEK-293 modificadas genéticamente, y presentan una estructura terciaria trimérica con una masa molecular de 111,4 kDa, aproximadamente. En presencia de proteasas y suero los anticuerpos multivalentes en formato scFv-NC1XV muestran una estabilidad estructural y una actividad funcional significativamente mayor que los anticuerpos en formato scFv-NC1XVIII.

**Conclusiones:** La región de trimerización del dominio NC1 del colágeno XV humano permite la generación de moléculas triméricas funcionales con unos parámetros de estabilidad muy favorables. Esta característica es de extraordinaria importancia para el diseño de nuevos agentes con utilidad diagnóstica o terapéutica del cáncer humano.

#### O-072. EFECTO ANTITUMORAL DE LA EXPRESIÓN REGULADA DE MIL12 EN EL HÍGADO MEDIADA POR EL VECTOR RAAV8-PTETBIDI-PALB-MIL12

M. di Scala, L. Vanrell, L. Blanco, I. Otano, I. Gil-Fariña, A. Pañeda, P. Berraondo, A. Chtarto, L. Tenenbaum, J. Prieto y G. González-Aseguinolaza

Division of HepatologyGene Therapy, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Experimental Neurosurgery, Free University of Brussels, Bélgica. Liver UnitCIBERehd, Clínica Universitaria de Navarra, UNAV, Pamplona.

**Objetivos:** El éxito de un protocolo de terapia génica para enfermedades hepáticas hereditarias o adquiridas depende de la calidad del vector que se va a utilizar. La interleuquina 12 es una citoquina que actúa como mediador clave en la respuesta inmune de tipo celular. Esta citoquina ha sido explotada como agente anti-tumoral en modelos animales de cáncer. Los prometedores resultados obtenidos con la IL-12 recombinante en dichos modelos sirvieron de base para su aplicación clínica. Sin embargo, los ensayos clínicos con dicha citoquina revelaron una eficacia muy modesta y una severa toxicidad. Mediante aproximaciones de terapia génica es posible incrementar la expresión de la citoquina en el órgano diana, aumentando su eficacia y evitando su acumulación sistémica, lo que disminuye sus potenciales efectos secundarios. Para eso desarrollamos un vector que consigue expresar el transgén de forma controlada, a largo plazo, en el área peri-tumoral. Consiste en un vector adeno-associado inducible del tipo TetON, bidireccional y hepatoespecífico.

**Material y métodos:** En primer lugar hemos construido, producido y caracterizado un AAV portador de un sistema de expresión inducible por tetraciclina y hepatoespecífico. La actividad antitumoral de dicho vector armado con la citoquina IL-12 fue testado en un modelo murino de metástasis hepáticas de cáncer colorrectal.

**Resultados y conclusiones:** Los resultados del uso de dicho vector codificante para IL-12 en un modelo de cáncer hepático mostraron una alta eficacia anti-tumoral del vector, ausencia de eventos tóxicos, y el desarrollo de una respuesta celular de memoria eficiente frente a las células tumorales.

#### O-073. POLYUBIQUITIN K63-RELATED CD137 SIGNALING ENDOSOMES IN T CELLS STIMULATED WITH AGONIST ANTI-CD137 MONOCLONAL ANTIBODIES IN VIVO-IN VITRO

I. Martínez Forero, A. Azpilicueta Lusarreta, E. Bolaños Mateo, E. Nistal Villán, A. Palazón García, A. Teijeira, T. Aragón Armendáriz e I. Melero

Terapia Génica y Hepatología, CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona.

Agonist anti-CD137 monoclonal antibodies are employed to enhance CD8-mediated antitumor immunity both in mouse models and in clinical trials. A panel of agonist anti-human CD137 mAb was prepared recognizing three epitopes on the CD37 surface glycoprotein that costimulated T cell activation irrespective of interference with natural ligand binding. Interestingly, CD137 perturbation with agonist mAb results in internalization towards a vesicular compartment derived from the plasma membrane. Such internalization was observed on primary activated T cells from humans and mice. In vivo treatment with anti-CD137 mAb of immunodeficient mice harboring activated human or mouse T cells results in internalization to this vesicular compartment. CD137 is known to signal through TRAF2, an adaptor protein endowed with E3 ubiquitin ligase activity that synthesizes k63-polyubiquitin

chains. CD137 vesicles are decorated with k63-polyub and CD137 stimulation leads to the formation of k63-polyub containing complexes. CD137 stimulation under therapy like conditions leads to the assembly of an intracellular signaling compartment proposed as CD137 -signaling endosomes.

#### O-074. LIPOSOMAS DECORADOS CON APO2L/TRAIL COMO TRATAMIENTO DE LA ARTRITIS Y DEL CÁNCER

L. Martínez Lostao, D. de Miguel, G. Basáñez, M.J. Martínez Lorenzo, D. Sánchez, J. Pardo, I. Marzo, J. Naval, F. García Álvarez, L. Larrad y A. Anel

Universidad de Zaragoza. Hospital Clínico, Zaragoza.

Nuestro grupo ha optimizado un protocolo para la síntesis de unos liposomas de composición definida a cuya superficie se fija el ligando mortal Apo2L/TRAIL. Se ha demostrado que estos liposomas son un tratamiento eficaz en un modelo de artritis inducida por antígeno en conejos en ausencia de hepatotoxicidad (Martínez-Lostao et al. *Arthritis Rheum.* 2010;62:2272). Datos recientes indican además que estos liposomas son mucho más eficaces que la forma soluble de la proteína sobre diversos tipos de cánceres hematológicos y que son capaces de superar la resistencia de tumores que sobre-expresan proteínas anti-apoptóticas. Se discutirán los posibles mecanismos de aumento de la bioactividad de Apo2L/TRAIL, así como las posibles aplicaciones en terapia tumoral.

#### O-075. EL TRATAMIENTO CON INMUNOGLOBULINAS INTRAVENOSAS AUMENTA LA TASA DE RECIÉN NACIDOS VIVOS EN EMBARAZADAS CON FALLO GESTACIONAL RECURRENTE Y EXPANSIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS CD56+

M. Moraru, A. García Segovia, J. Carbone, D. Alecsandru, J. Gil Herrera, M. Rodríguez Mahou, B. Alonso, A. Aguarón, E. Fernández Cruz y S. Sánchez Ramón

Departamento de Inmunología; Departamento de Obstetricia y Ginecología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid. Clínica Tambre, Madrid.

La actividad citotóxica de las distintas subpoblaciones linfocitarias CD56+ ha sido implicada en el éxito reproductivo. Las Inmunoglobulinas Intravenosas (IGIV) se han utilizado en el tratamiento de los fallos gestacionales recurrentes (FGR) asociados a desregulaciones inmunitarias, tanto en el contexto de abortos recurrentes, como en los fallos de implantación tras fertilización in vitro (FIV). Se considera que los resultados beneficiosos obtenidos con IGIV podrían guardar relación con su capacidad de modular la actividad de las células NK. En este trabajo hemos estudiado el efecto del tratamiento con IGIV sobre el éxito reproductivo en 40 mujeres con FGR y expansión de células CD56+. Se han incluido solo mujeres sin causa conocida de aborto recurrente/fallo de implantación recurrente, sin enfermedades infecciosas o linfoproliferativas intercurrentes y con porcentajes de células NK circulantes (CD56+/CD16+CD3+) superiores al 12% y/o de células NKT-like (CD56+CD3+) superiores a 10% de los linfocitos totales. Todas las pacientes recibieron IGIV cada 3-4 semanas, desde la fecha de la confirmación del embarazo o de la transferencia del embrión hasta la semana 35 de gestación. Las tasas de embarazo, de aborto y de recién-nacidos vivos globalmente en nuestra serie han sido de 92,5%, 8,1% y 92% respectivamente. Tras 3 ciclos de IGIV, los porcentajes de las células NK circulantes disminuyeron significativamente ( $p < 0,0001$ ) y esta disminución se ha asociado a altas tasas de implantación y de recién-nacidos vivos. Por tanto, el tratamiento con

IGIV en mujeres con FGR asociado a expansión de células NK circulantes es una estrategia terapéutica segura y eficaz, que mejora significativamente las tasas de embarazo y de recién nacidos vivos.

#### O-076. IMMUNOLOGICAL EFFECTS OF GENE TRANSFER WITH A TRANS-PRESENTED CHIMERIC PROTEIN CONSISTING IN INTERLEUKIN-15 FUSED TO APOLIPOPROTEIN A I

M.D. Ochoa Nieto, J. Fioravanti, J. Medina, A. Palazón, C. Alfaro, A. Morales-Kastresana, S. Hervas-Stubbs, S. Bulfone-Paus, P. Berraondo e I. Melero

Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona. Department of Immunology Cell Biology, Research Center Borstel, Parkallee22, Borstel, Alemania.

Interleukin-15 (IL-15) has great potential as an anticancer agent but its application would benefit from more stable pharmacokinetics and more bioactive forms based on transpresentation of the cytokine by the IL-15R $\alpha$  moiety. Apolipoprotein A-I (Apo A-I) is a major component of high density lipoproteins (HDL) that circulate in plasma transporting cholesterol. We have constructed expression plasmids encoding chimeric molecules encompassing IL-15 and Apo A-I (pApo-hIL15). Such expression plasmids were tested by hydrodynamic injections to mice and co-administered with a plasmid which encodes for the sushi domain of IL-15R $\alpha$  (pSushi) in order to enhance trans-presentation and thereby bioactivity. pApo-hIL15 in combination with pSushi was more bioactive than pApo-hIL15. The half-life of the Apo A-I chimeric proteins was much longer than non-stabilized IL-15. Circulating HDL incorporated in part of the exogenous biomolecules that were biosynthesized in the gene-transduced liver. Hydrodynamic liver gene transfers of these constructs dramatically increased NK and memory CD8 lymphocyte numbers in peripheral blood, spleen and liver as a result of proliferation. In addition, NK lytic activity was enhanced. Moreover, the gene transfer procedure partly rescued the NK and memory T-cell deficiency of IL-15R $\alpha$ -/- mice. pApo-hIL15 + pSushi gene transfer to the liver showed therapeutic activity against transplanted MC38 colon carcinoma tumors, that was more evident when tumors were set up as liver metastasis. The strong biological activity of Apo-IL-15 fusion protein as trans-presented by the IL-15R $\alpha$  sushi domain suggests further development in combination with other immunotherapies.

#### O-077. AGONIST ANTI-CD137 MAB ACT ON TUMOR ENDOTHELIAL CELLS TO ENHANCE RECRUITMENT OF ACTIVATED T LYMPHOCYTES

A. Palazón García, A. Teijeira, I. Martínez-Forero, S. Hervas-Stubbs, J. Dubrot, A. Morales-Castresana, J. Pérez-Gracia, M. Ochoa, A. Rouzaut, M. Jure-Kunkel e I. Melero

Centro de Investigación Médica Aplicada, Universidad de Navarra, Pamplona.

Agonist monoclonal antibodies (mAb) to the immune costimulatory molecule CD137, also known as 4-1BB, are presently in clinical trials for cancer treatment on the basis of their costimulatory effects on primed T cells and perhaps other cells of the immune system. Here we provide evidence that CD137 is selectively expressed on the surface of tumor endothelial cells. Hypoxia upregulated CD137 on murine endothelial cells. Treatment of tumor-bearing immunocompromised mice with agonist CD137 mAb did not elicit any measurable antiangiogenic effects. In con-

trast, agonist mAb stimulated tumor endothelial cells, increasing cell surface expression of the adhesion molecules intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1, and E-selectin. When adoptively transferred into mice, activated T lymphocytes derived from CD137- deficient animals entered more avidly into tumor tissue after treatment with agonist mAb. This effect could be neutralized with anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 blocking antibodies. Thus, stimulation of CD137 not only enhanced T-cell activation but also augmented their trafficking into malignant tissue, through direct actions on the blood vessels that irrigate the tumor. Our findings identify an additional mechanism of action that can explain the immunotherapeutic effects of agonist CD137 antibodies.

#### O-078. INGENIERÍA CELULAR DE CÉLULAS MESENQUIMALES HUMANAS PARA EL TRATAMIENTO DEL CÁNCER MEDIANTE LA SECRECIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES BIESPECÍFICOS

N. Pescador Sánchez, N. Sainz Pastor, V. Alonso Camino, M. Compte y L. Álvarez Vallina

Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid.

**Objetivos:** En este trabajo nos planteamos modificar genéticamente células madre mesenquimales humanas, obtenidas de tejido adiposo (ASC), para estudiar su potencial como "factorías" de un anticuerpo recombinante biespecífico con formato (scFv)2/BiTE (*Bi-specific T cell engager*), con especificidad frente a la cadena ε del complejo TCR/CD3 humano y frente al antígeno carcinoembionario (CEA) humano (αCEA/αCD3).

**Material y métodos:** Generación de un vector lentiviral que codifica el (scFv)2/BiTE αCEA/αCD3 (pRRL-BiTE-IRES-EGFP). Transducción de ASC con el lentivirus pRRL-BiTE-IRES-EGFP (ASCBiTE); modificación genética de la línea celular derivada de carcinoma gástrico MKN45 con el gen de la luciferasa de *Photinus pyralis* (Fluc). Aislamiento de células mononucleares de sangre periférica (PBLs) de donantes sanos. Ensayos de activación específica in vitro y ensayos de actividad antitumoral in vivo.

**Resultados:** En ensayos in vitro, se observó que ASCBiTE secretaban niveles detectables de (scFv)2/BiTE αCEA/αCD3 funcional, y activaba PBLs en presencia de células tumorales CEA+ (MKN45) incluso a una relación efector:diana de 0,01. En ensayos in vivo, la coinyección de células tumorales MKN45Fluc, PBLs y ASCBiTE retrasó significativamente el crecimiento tumoral con respecto al grupo control (MKN45Fluc/PBLs/ ASC).

**Conclusiones:** Se plantea un nuevo sistema de inmunoterapia antitumoral, no descrita hasta el momento, que podría sentar las bases de una nueva modalidad terapéutica de amplia difusión en clínica humana.

#### O-079. SELECCIÓN DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS HUMANOS EN ANIMALES PORTADORES DE XENOINJERTOS DE CÁNCER DE PRÓSTATA HUMANO

D. Sánchez Martín<sup>1</sup>, I. Molina Privado<sup>1</sup>, T. Teesalu<sup>2</sup>, K.N. Sugahara<sup>2</sup>, E. Ruoslahti<sup>2</sup> y L. Álvarez Vallina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. <sup>2</sup>Vascular Mapping Center, Sanford-Burnham Medical Research Institute at University of California Santa Barbara, EE.UU.

**Objetivos:** El desarrollo de nuevas estrategias de selección in vivo y la identificación de anticuerpos frente nuevos antígenos asociados a tumor, incluyendo vasculatura.

**Material y métodos:** Como origen de la diversidad de anticuerpos -y como plataforma de selección- se han empleado dos repertorios de fagos filamentosos con anticuerpos expresados en su superficie de una diversidad estimada en  $\chi$ asi10<sup>9</sup>. Como modelo tumoral se han empleado tumores generados al implantar una línea de cáncer de próstata humana (PPC-1, PC-3) en ratones inmunodeficientes.

**Resultados:** Se han realizado sucesivas rondas de selección ex vivo e in vivo, obteniéndose un progresivo enriquecimiento que ha conducido a la identificación de unos anticuerpos recuperados preferentemente de tumores. La comparación in vivo entre estos clones y un anticuerpo irrelevante ha permitido cuantificar las diferencias de targeting entre tumor y órganos de referencia, así como la posterior evaluación mediante inmunofluorescencia de su localización intratumoral.

**Conclusiones:** es posible realizar selecciones in vivo de anticuerpos en un modelo experimental de cáncer humano empleando como plataforma de selección un repertorio de fagos filamentosos. Hemos identificado dos anticuerpos que reconocen estructuras propias del entorno tumoral y permiten una mayor acumulación de fago en el tumor.

#### INNOVACIÓN DOCENTE EN INMUNOLOGÍA

**Moderadores:** Enrique Aguado Vidal (Cádiz) y Francisco García Cázar (Cádiz)

#### O-080. PLANIFICACIÓN DE LA ENSEÑANZA EN INMUNOLOGÍA EN EL CONTEXTO DEL EEEES

E. Aguado Vidal, A. García Blesa, C. Fernández Ponce y F.J. García Cázar

Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz.

En el momento actual ya se han aprobado y se están impartiendo los planes de estudio adaptados al Espacio Europeo de Educación Superior (EEES). En este contexto, desde nuestro departamento ya estamos impartiendo la asignatura de Inmunología en el Grado de Medicina. El desafío que ello está suponiendo está relacionado con varios aspectos, entre los que se cuentan un aumento en el número de alumnos, la introducción de programas de evaluación, la disminución de las horas lectivas presenciales y la adaptación de la enseñanza a las nuevas tecnologías de la información y comunicación. Por todos estos motivos, nuestro grupo ha elaborado una planificación de la enseñanza de la Inmunología en el grado de Medicina que pretende establecer una programación más coherente, y que aproveche todas las sinergias posibles con otras áreas de conocimiento relacionadas. En este trabajo se discuten diversas medidas que se han puesto en marcha, tales como la introducción como herramienta de las Tecnologías de la Información y Comunicación, la coordinación de los contenidos prácticos con los teóricos, la planificación de contenidos semi-presenciales, así como el estímulo a la participación de los estudiantes en el proceso de planificación.

## O-081. UTILIDAD DEL MATERIAL DOCENTE EDITABLE EN TIEMPO REAL EN INMUNOLOGÍA

A. Alonso Ortiz, J.M. Miranda Sayago y N. Fernández Arcás

Servicio de Inmunología, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Málaga.

**Objetivos:** La inmunología es una ciencia compleja y su transmisión a los alumnos de la Universidad está en constante evolución. Nuestro mayor logro en la mejora de la docencia es que, por fin, comenzamos a preocuparnos por ella. En esta comunicación presentamos un modo particular de impartir docencia en inmunología que parece mejorar la atención del alumno y su rendimiento.

**Material y métodos:** Todas las imágenes empleadas en la docencia fueron realizadas con el programa vectorial Corel Draw. Estas imágenes están permanentemente editadas a lo largo de la exposición lo que permite modificaciones y desplazamientos de elementos en pantalla.

**Resultados:** Esta metodología ha permitido, de alguna manera, mostrar la inmunología en movimiento y desvelar, con solo pulsar una tecla, imágenes de temas impartidos hace mucho tiempo. El alumno atiende no solo al fondo de lo que se le explica sino también la forma en que se hace, manteniendo su interés a lo largo de la clase.

**Conclusiones:** El empleo de imágenes en tiempo real en modo edición es de gran utilidad en la docencia de la inmunología como dinamizador de las clases y como mantenedor del foco de atención del alumnado.

debe siempre de acompañarse de una evaluación individual de las capacidades y conocimientos adquiridos.

## O-083. INMUNOLOGÍA 2.0: EVOLUCIÓN DE TÉCNICAS DOCENTES Y NUEVAS PERSPECTIVAS EN LOS ROLES DEL PROFESOR Y ALUMNOS

A. Corell Almuzara, E. Arranz Sanz, J.A. Garrote Adrados, R. Blanco Salado, D. Pérez Torres y H. Martos Álvarez

Área de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.

Llevamos realizando un trabajo de más de 10 años en la renovación de la docencia de la Asignatura de Inmunología General (troncal de 2º de Medicina) de la Universidad de Valladolid. Los cambios introducidos, impulsados por los profesores del área, convergen con las nuevas tendencias al amparo del Espacio Europeo de Educación Superior. Se presentarán diferentes estrategias metodológicas para: la participación activa de los alumnos en la docencia, el desarrollo de competencias transversales y específicas de Inmunología, aproximar al alumnado al nuevo concepto de Educación cooperativa y la evaluación continua del trabajo de los alumnos. Para abordar todos estos cambios se han utilizado diferentes herramientas y procedimientos: cambios en el concepto del rol del profesor y alumno, cambios en el sistema de tutorías, introducción progresiva y actualizada de TICs, dinámicas de Grupo, aprendizaje basado en Problemas, cine fórum y formación permanente del profesorado. Finalmente se presentarán los logros y nivel de satisfacción de profesores y alumnos con todos los cambios introducidos en la docencia y evaluación de conocimientos de estos últimos años.

## O-082. EVALUACIÓN CONTINUADA EN LOS NUEVOS GRADOS ADAPTADOS AL EEEs

P. Aparicio Alonso y G. Rubio Pedraza

Universidad de Murcia.

**Objetivos:** En un entorno de evaluación continuada, conocer como se relaciona la calificación obtenida en un examen final con la evaluación de actividades grupales e individuales durante los cursos 08-09 y 09-10.

**Material y métodos:** Se ha analizado las calificaciones obtenidas por alumnos de segundo de medicina en las diferentes actividades grupales e individuales durante una evaluación continua comparándolas con las calificaciones obtenidas en un examen final. Las actividades evaluadas fueron: test periódicos (cada 3-4 semanas), problemas sobre las prácticas de laboratorio y la presentación de un trabajo académicamente dirigido (TAD). Las actividades realizadas en grupo se evaluaron también de forma individual. Se permitió la consulta bibliográfica en todos los exámenes y actividades.

**Resultados:** Las calificaciones obtenidas en actividades grupales (prácticas de laboratorio y TAD) tienen una baja discriminación y una correlación muy pobre con las calificaciones individuales realizadas tanto durante el curso como en el examen final. La evaluación individual de cada una de las actividades durante o a la finalización del curso tuvo, sin embargo, una alta correlación entre ellas. Así mismo la tuvieron con la calificación de selectividad.

**Conclusiones:** Incluso en situaciones en las que el grupo es académicamente homogéneo (nota de acceso alta), las calificaciones en selectividad tienen muy buena correlación con las calificaciones obtenidas en inmunología en segundo curso de medicina. La evaluación de los trabajos colectivos y cooperativos, partiendo del hecho de que tienen un alto valor formativo,

## O-084. PODER INVESTIGAR CON UNA GRAN CARGA DOCENTE: LA EXPERIENCIA GRANADINA

E. García Olivares

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada.

La Inmunología es un área de conocimiento en la universidad española con una alta intensidad investigadora. Esta actividad se refleja en la consecución de sexenios, y en la elevada proporción de acreditados por la ANECA. Los profesores de Inmunología debemos, no obstante, compartir la actividad investigadora con otras tareas muy demandantes en tiempo como la docencia y la gestión. El Plan Bolonia y los nuevos grados, por otra parte, están aumentando muy intensamente las obligaciones docentes del profesor universitario. La Universidad de Granada (UGR) es una de las universidades españolas con mayor desarrollo del área de Inmunología (7 firmas en 4 licenciaturas, 8 asignaturas en 5 grados, 1 máster y 1 programa de doctorado). Este aspecto, que podría considerarse como positivo, supone un gran esfuerzo docente para los profesores (6 numerarios, 2 asociados), lo que implicaría una menor dedicación a la investigación. Para compensar esta situación, en los últimos años hemos desarrollado un plan en el que manteniendo o incluso incrementando la calidad de la docencia, se adecua la dedicación docente de cada profesor a un nivel razonable que le permita continuar con la investigación. Este plan se basa en la incorporación de docentes cuya contratación no dependa de las necesidades docentes del área (Contratos Ramón y Cajal), incorporación al Plan Docente de becarios, así como de personal no ligado a la universidad (CSIC, Hospitales). Por otra parte, la UGR ha desarrollado un plan de compensaciones en los que la actividad investigadora

permite al profesor reducir hasta 11 créditos de la actividad docente.

#### **O-085. ACCESO A LA INMUNOLOGÍA HOSPITALARIA A TRAVÉS DE LOS PROGRAMAS UNIVERSITARIOS DE PRÁCTICAS DE EMPRESA**

J. Gil Herrera, M.J. Recio Hoyas y E. Fernández Cruz.

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.  
Universidad Complutense de Madrid.

**Introducción:** Las clases prácticas durante la formación de pregrado son generalmente colectivas y carecen de continuidad entre sesiones. La vinculación de los hospitales universitarios con la Universidad permite acoger alumnos de pregrado para la realización de programas de "Prácticas de empresa" (PrEm). A través de estos, los alumnos se acercan al hospital para aumentar su conocimiento de la asignatura de Inmunología en un entorno clínico, así como valorar sus posibilidades profesionales para el periodo de posgrado.

**Objetivos:** Difusión de los programas PrEm a partir de la experiencia en el Servicio de Inmunología del Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Experiencia: Una alumna de 4º curso Biología en la Universidad Complutense de Madrid (UCM), realizó 160 horas en el curso 2007/2008. Una alumna de 4º curso de Ciencias Químicas (Bioquímica) de la UCM está en curso (2010/2011). Solicitud de un alumno 5º curso Ciencias Químicas (Bioquímica) de la UCM para 2011/2012. Durante las prácticas (máximo 15 créditos), los alumnos se implican en la revisión bibliográfica, elaboración de la memoria de solicitud, realización de los contenidos de la propuesta en el laboratorio, y defensa de la memoria final.

**Resultados y conclusiones:** El diseño individualizado del programa de aprendizaje práctico supone gran motivación y satisfacción tanto para alumnos como para profesores. La duración y continuidad en el tiempo de los programas PrEm y el compromiso con un proyecto concreto contribuye a que los alumnos (1) profundicen en el conocimiento de la Inmunología (2) descubran sus capacidades y actitudes en el contexto hospitalario y (3) apliquen esta experiencia a la hora de enfocar su formación postgraduada.

#### **O-086. LA EXPERIENCIA DEL MÁSTER UNIVERSITARIO EN INMUNOLOGÍA (UB-UAB)**

J. Lloberas Cavero<sup>1</sup>, D. Jaraquemada Pérez de Guzmán<sup>2</sup>  
y Comisión del Máster

<sup>1</sup>Departamento de Fisiología e Inmunología, Facultad de Biología, Instituto de Investigación Biomédica (IRB), Universidad de Barcelona. <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, de Fisiología y de Inmunología, Facultad de Biociencias y Medicina, Instituto de Biotecnología y de Biomedicina, Universidad Autónoma de Barcelona.

En septiembre del año 2006 se inició el primer curso del Máster de Inmunología como una iniciativa conjunta entre las universidades de Barcelona y Autónoma de Barcelona. En aquel momento las dos principales universidades de Cataluña y en especial el profesorado de sus respectivas áreas de inmunología, cristalizaron un proyecto iniciado dos años antes intentando recabar las experiencias de másters similares del entorno europeo. El plan Bolonia se imponía claramente como vía de convergencia europea dentro de las estructuras universitarias y con esas premisas arrancó este proyecto docente. La experiencia de un programa de doctorado en inmunología común durante seis cursos (1999-2005) entre ambas universidades, que siempre

contó con la mención de excelencia, y con la vocación de generar un núcleo donde poder sumar a la práctica totalidad de la docencia en inmunología del área metropolitana de Barcelona, el máster de inmunología recibió un apoyo generalizado tanto desde el entorno puramente académico como del clínico. Han pasado 5 cursos y por el máster en inmunología han pasado 162 alumnos con un total de 332 preinscripciones, por tanto con una demanda muy superior a la oferta de plazas. La composición del alumnado ha presentado variaciones considerables, pero el perfil promedio ha sido un 60% de licenciados de Cataluña, un 15% del resto de España y un 25% correspondiente a licenciados de universidades extranjeras. El máster tiene un tamaño de 60 ECTS, de los cuales 36 son de carácter netamente prácticos en el itinerario de Inmunobiología e Investigación y 38 en los itinerarios de Inmunología Médica y Veterinaria. El desarrollo experimental de los trabajos de Máster por parte del alumnado, supone la implicación de la totalidad de los núcleos de investigación en inmunología, tanto clínica, básica como aplicada, del área metropolitana de Barcelona. El Máster en Inmunología en estos momentos supone un punto de referencia para los investigadores donde formar a sus alumnos de cara al desarrollo del doctorado, incluso en los últimos tres cursos, la mayoría de los MIR de la especialidad de Inmunología han cursado este máster en dos años y por acuerdo con las unidades docentes de los hospitales. Las expectativas para el próximo curso siguen siendo optimistas, el análisis de la web del máster permite predecir con bastante acierto la demanda futura del mismo. ([www.ub.edu/masteroficial/inmunologia](http://www.ub.edu/masteroficial/inmunologia)).

Comisión del Máster: A. Celada (UB), P. Martínez (UAB), C. Soler (UB), T. Stratmann (UB), R. Castaño (UAB), R. Pujol-Borrell (UAB) y M. Montoya (CRESA).

#### **O-087. INNOVACIÓN METODOLÓGICA APLICADA A LA ENSEÑANZA DE LA INMUNOLOGÍA**

R. Tarazona Lafarga, B. Sánchez Correa, J. García Casado, S. Morgado y R. Solana

Unidad de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres. Unidad de Inmunología, IMIBIC-Universidad de Córdoba/Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Las actividades de aprendizaje basadas en la resolución de problemas (ABPs) suponen una metodología docente de gran interés ya que permite, junto con el aprendizaje de la materia, la adquisición de competencias transversales y la integración de conocimientos de otras áreas. En los últimos cursos hemos ido introduciendo paulatinamente la realización de actividades de ABPs en la asignatura Inmunología adaptadas a las competencias de cada titulación. Los profesores planteaban los problemas, indicando los posibles abordajes y las fuentes que podían utilizar para resolverlo, todo ello disponible en el Aula Virtual. Los alumnos, en grupos pequeños (3-5), disponían de un tiempo estipulado para resolverlo y posteriormente se discutía en grupos de 15-20 estudiantes. Se han realizado dos tipos de actividades: Análisis de experimentos que han marcado el desarrollo de la Inmunología (p.ej. Experimentos de Zinkernagel y Doherty) y discusión de casos clínicos (p.ej. Aspectos inmunológicos tras la extirpación del bazo). En la evaluación de la actividad se tuvo en consideración tanto la resolución del problema como otros aspectos transversales como son la capacidad de análisis, oratoria, discusión, trabajo en grupo, etc. Tras cada actividad se realizó una encuesta a los estudiantes para que valoraran la actividad ABP indicando los problemas surgidos y propuestas de mejora. Estas actividades han sido muy bien aceptadas por los alumnos, pese a los recebos iniciales de que "la sobrecarga de trabajo" asociada a estas actividades "sirviera para algo", y la desconfianza inicial a que

rompiéramos con el modelo tradicional basado muy prioritariamente en la evaluación de conocimientos teóricos en exámenes finales.

## LINFOCITOS T

**Moderadores:** Dolores Jaraquemada Pérez de Guzmán (Barcelona) y Sandra Hervas-Stubbs (Pamplona)

### O-088. ANÁLISIS FUNCIONAL DE SNP PRESENTES EN LA REGIÓN CITOPLASMÁTICA DE LOS RECEPTORES LINFOCITARIOS CD5 Y CD6

L. Bonet Roselló, T. Bielig, M. López Cavanillas, M. Martínez Florensa y F. Lozano

Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer-Centro Esther Koplowitz, Barcelona. Departamento of Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ImmunNovative Developments, Barcelona. Departament de Biología Cel·lular, Immunología i Neurociències de la Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona.

Los receptores linfocitarios CD5 y CD6 son miembros altamente homólogos de la superfamilia SRCR (Scavenger Receptor Cysteine-Rich). Ambos comparten un patrón de expresión tisular muy similar (timocitos, linfocitos T y linfocitos B1a), así como la capacidad de transducir señales intracelulares que modulan los procesos de diferenciación y activación linfocitarios. El análisis *in silico* (Polyphen y SIFT) de sus respectivas regiones citoplasmáticas revela la existencia de polimorfismos de un único nucleótido (SNP) que introducen cambios aminoacídicos potencialmente deletéreos y susceptibles de afectar sus propiedades señalizadoras. En el presente trabajo se analiza la posible repercusión funcional de tres de estos SNP: uno localizado en el exón 10 de CD5 (rs2229177; V471A) y otros dos localizados en el exón 8 (rs1131368, E462stop; rs1131369, E462D) de CD6. Los estudios funcionales consistieron en el análisis de la activación de la vía de las MAPK, la liberación de citocinas, así como la proliferación celular post-estimulación con AcMOS anti-CD5/CD6 y  $\beta$ -glucanos en transfectantes COS 7 y HEK 293 que expresan cada una de las dos formas alélicas reportadas, así como de PBMC de individuos homocigotos para dichas variantes alélicas. La variante V471 de CD5 (rs2229177) mostró mayor activación de ERK, producción de IL8 y proliferación tras estímulo CD5 específico en comparación con la variante A471. En lo referente al SNP rs1131368 (variante 462stop) se obtuvo una sobreexpresión en membrana de la molécula CD6 y no hubo activación de ERK tras estímulo vía CD6. No se hallaron diferencias en los parámetros estudiados relacionados con las variantes E462 y D462 del SNP rs1131369. Se concluye que las variantes de los SNP rs2229177 y rs1131368, que inducen a la presencia de alanina o de un codón de parada en los sitios 471 y 462 de las moléculas CD5 y CD6 respectivamente, afectan la función de las moléculas en cuestión y, como consecuencia, pueden estar asociadas con determinadas patologías o mecanismos que condicionen la selección positiva de la variante Valina 471 en el caso del SNP analizado del CD5.

### O-089. CLATRINA ENDOSOMAL DIRIGE LA ACUMULACIÓN DE ACTINA EN LA SINAPSIS INMUNE

C. Calabia Linares, J. Robles Valero, H. de la Fuente, M. Pérez Martínez, N. Martín Cofreces, M. Alfonso Pérez, C.O. Sánchez Sorzano, F. Sánchez Madrid y E. Veiga Chacón

Servicio de Inmunología, Instituto de Investigación Sanitaria, Hospital de la Princesa, Unidad de Biocomputación, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid.

La interacción antígeno específica entre un linfocito T y una célula presentadora de antígeno APC tiene como resultado una serie de cambios estructurales y funcionales en las células T entre las que se incluye el reordenamiento del citoesqueleto de actina en la zona de sinapsis inmune (SI) que se forma en el área de contacto entre ambas células. En nuestro trabajo mostramos tanto en líneas celulares como en células primarias que una proteína ampliamente estudiada en procesos de endocitosis como es clatrina, dirige la acumulación de actina en la SI. Este reclutamiento tiene una cinética paralela a la de actina. La reducción de expresión de clatrina disminuye la acumulación de actina y las proteínas relacionadas con la polimerización, como dinamina-2, el complejo arp 2/3 y cd2ap en la SI. El reservorio del que proviene la clatrina que interviene en la acumulación de actina en la SI se relaciona con los cuerpos multivesiculares, que se polarizan hacia la zona de contacto entre células; y no otras fuentes de clatrina como el aparato de golgi o la membrana plasmática. Estos datos revelan el papel que tiene esta proteína como plataforma de reclutamiento de proteínas que promueven la polimerización de actina en la zona de contacto entre las células T y las APC.

### O-090. IDENTIFICACIÓN DE LAS SEÑALES IMPLICADAS EN LA INDUCCIÓN DE APOPTOSIS POR EL EXOPOLISACÁRIDO BACTERIANO B100S EN CÉLULAS T LEUCÉMICAS

D. Carranza Domínguez, M. Ruiz Ruiz, I. Llamas, E. Quesada e I.J. Molina

Centro de Investigación Biomédica, IBIMER, UGR, Granada.

**Objetivos:** Estudios anteriores de nuestro grupo han demostrado que el exopolisacárido bacteriano B100 sulfatado (B100S) induce apoptosis dependiente de caspasas de forma selectiva en células leucemias T humanas. El objetivo del presente trabajo es caracterizar la vía de señalización de apoptosis activada por B100S.

**Material y métodos:** Línea de células leucémicas T humanas Jurkat: se mantuvieron en medio RPMI 1640 completo en incubador a 37 °C con 5% de CO<sub>2</sub>. El porcentaje de células apoptóticas, la caída de potencial de membrana mitocondrial ( $\delta$ -Psim), la producción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> y la activación de Bak fueron analizadas en un citómetro FACScan tras tinción con ioduro de propidio (IP), DiOC<sub>6</sub>, hidroetidina (HE) y anti-Bak, respectivamente. La detección de proteínas se realizó mediante inmunoblot.

**Resultados:** Hemos analizado diferentes señales correspondientes a la ruta mitocondrial de apoptosis en células Jurkat en respuesta a B100S, observando activación de la proteína propapoptótica Bak, una alta producción de ROS y un descenso en los niveles de GSH intracelular. El pretratamiento con el antioxidante porfirina de manganeso, así como la sobreexpresión de las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o Bcl-xL, inhiben todos estos eventos mitocondriales y la inducción de apoptosis por B100S en células Jurkat. Por otro lado, la ciclosporina A, inhibidor del poro de permeabilidad transitoria mitocondrial (MPTPC), aumenta el porcentaje de células apoptóticas.

**Conclusiones:** B100S induce apoptosis en células T leucémicas a través de la vía mitocondrial, siendo la producción de ROS un evento imprescindible en dicho proceso de muerte celular. Por el contrario, el MPTPC no está implicado en la apoptosis inducida por B100S.

#### O-091. CÉLULAS TH17 PRODUCTORAS DE TGFB: PAPEL EN LA PATOGENIA DE ENFERMEDAD CELÍACA

S. Fernández Álvarez<sup>1</sup>, O. Estévez Cordero<sup>2</sup>,  
J.A. García Alonso<sup>1</sup>, I.J. Molina<sup>3</sup>, M. Santamaría<sup>1,2</sup>  
y C. Ortega Gromaz<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. <sup>2</sup>Unidad de Inmunología Clínica, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. <sup>3</sup>Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

La enfermedad celíaca (EC) ha sido considerada una respuesta sesgada de tipo Th1 frente a proteínas de cereales en individuos susceptibles. Sin embargo, la participación de células Th17 en su patogénesis es mal conocida. Investigamos la presencia de células Th17 gliadina-específicas en duodeno EC y sus implicaciones en la patogénesis de la enfermedad. Se aislaron células CD4+CCR6+ de duodeno de 15 pacientes no tratados y 11 controles. CD4+ gliadina-específicas productoras de IL-17A de EC presentan un fenotipo TCRαβ+, CD45RO+, CD161+ e IL-23R+. Las células Th17 de pacientes con EC, en respuesta a gliadina, expresan simultáneamente IL-17A, IFNγ, IL-21, IL-22 y TGFβ. La producción de IL-22 y TGFβ fue significativamente superior en EC (vs controles) indicando un papel dual de Th17 en la patogénesis de la enfermedad. El estudio de factores de transcripción muestra una expresión diferencial de IRF4 por células EC. En ambos casos expresaron RORC. Mostramos que el papel de TGFβ producido por Th17 de EC es la regulación autocrina y positiva de la producción de IL-17A, sugiriendo que IL-17A podría no estar únicamente relacionada con la destrucción de tejidos durante la respuesta autoinmune. En conclusión, las células Th17 gliadina-específicas están presentes en la mucosa de pacientes con EC y tienen un papel dual en la patogénesis de la enfermedad produciendo citoquinas proinflamatorias (como IL-17, IFNγ, e IL-21), así como IL-22, protectora de la mucosa, y TGFβ, que regula la producción de IL-17A por células Th17 de mucosa celíaca.

#### O-092. EFECTO REGULADOR DE LA PROTEÍNA CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C SOBRE LINFOCITOS CD8

C. Fernández Ponce, M. Domínguez Villar, E. Aguado Vidal  
y F. García Cázar

Hospital Universitario de Puerto Real, Universidad de Cádiz.

**Introducción:** Existe evidencia de la importancia de los linfocitos T reguladores (LTreg) en la patogénesis de la infección del virus de la hepatitis C (HCV). Estudios previos sugieren que la presencia de proteínas del HCV en los linfocitos T, son capaces de inducir señales inhibidoras en los mismos, siendo responsables al menos en parte de la elevadísima cronicidad observada en la infección por HCV.

**Objetivos:** Estudiar el efecto regulador de células que expresan la proteína core del HCV.

**Métodos:** Células JKT CD4+ fueron transducidos con un sistema lentiviral con el fin de inducir la expresión de la proteína core para posteriormente realizar ensayos de co-cultivo y analizar su efecto sobre la proliferación y la apoptosis de linfocitos CD8.

**Resultados y conclusiones:** Evidenciamos que las JKT transducidas con core (JKT Core+) no solo adquieren un fenotipo anárquico, si no también inducen el desarrollo de mecanismos reguladores

que influyen en la respuesta inmune de otras células. Las JKT Core+ muestran un aumento en la expresión de las moléculas reguladoras Foxp3, CTLA-4 y CD25; y en ensayos de co-cultivo con linfocitos T CD8+, demostramos que estas células son capaces de suprimir significativamente la proliferación de los LT CD8+ aunque no se evidenciaron alteraciones significativas en la apoptosis de estos linfocitos. Este trabajo provee una nueva perspectiva en la generación de novo de LTCD4+ reguladores en la periferia, inducida por la expresión de una única proteína viral.

#### O-093. ANÁLISIS DE LA INTERDEPENDENCIA DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN DE FAS Y DEL COMPLEJO TCR/CD3

A. García Blesa, C. López Osuna, M. Kossowicz,  
M. Martínez Florensa, B. Malissen, A. Miazek,  
F. García Cázar y E. Aguado

Departamento de Biomedicina, Biotecnología y Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad de Cádiz. Unidad de Investigación, Hospital Universitario de Puerto Real, Cádiz. Institute of Immunology and Experimental Therapy, Polish Academy of Sciences, Wrocław, Polonia. Centre d'Immunologie de Marseille-Luminy, Marsella, Francia.

La estimulación de las células T, tanto vía el complejo TCR/CD3, como a través del receptor Fas produce respuestas interdependientes en estas células. La proteína adaptadora LAT tiene una función fundamental en la transducción de señales a partir del TCR, que conducen en último término a la activación de la expresión de un numeroso grupo de genes. Al objeto de entender mejor cómo estaban relacionadas las vías de señalización gobernadas por el TCR y Fas, nuestro grupo ya había demostrado que la estimulación a través de Fas induce la rotura proteolítica del adaptador LAT, demostrando que ocurre a nivel de tres residuos de aspártico conservados. Ahora, se analiza funcionalmente la importancia de esos residuos de LAT, y se demuestra que su mutación no solo impide la rotura de LAT, sino que produce alteraciones en la ruta de las MAP kinasas y en la activación de PLC-gamma 1. Dado que se ha descrito que la estimulación a través de Fas bloquea las señales de activación vía TCR/CD3, nosotros hemos analizado esta interdependencia en células que expresan una forma mutante de LAT que no se rompe tras estimulación vía Fas, sin observar ninguna inhibición de las señales dependientes de TCR/CD3. Por último, puesto que los puntos de rotura de LAT están situados cerca de tirosinas que se fosforilan tras activación, hemos analizado la dependencia de la rotura de LAT con la fosforilación de esta molécula, encontrando una relación inversa entre su rotura y su fosforilación. En conclusión, nuestro trabajo demuestra que la rotura proteolítica de LAT puede constituir un importante mecanismo de regulación de la activación de células T.

#### O-094. N-RAS IS CRITICAL FOR MEMORY BUT DISPENSABLE FOR EFFECTOR CD8+ T-CELL DEVELOPMENT

S. Iborra Martín, M. Ramos, S. Lázaro, F. Aguilar, E. Santos, D. López, E. Fernández-Malavé y M. del Val

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL), Salamanca. Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid.

Signals emanating from the TCR that distinctively determine effector versus memory CD8+ T-lymphocyte differentiation are

poorly understood. By using mice deficient for the small GTPase N-ras, we show here that N-ras-deficient CD8+ T lymphocytes were activated and expanded normally during a primary antiviral response. In contrast, generation of fully functional and protective antiviral memory CD8+ T cells was severely compromised by the N-ras deficiency. The defect in memory generation correlated with impaired TCR-mediated induction of the memory-associated transcription factor eomesodermin. Inhibition of mTOR with rapamycin mostly rescued both defects, although early impairment of eomesodermin induction was insensitive to rapamycin and correlated instead with altered activation of the PI3K/AKT pathway in the absence of N-ras. Thus, our study identifies N-ras as a key regulator of signalling pathways downstream of the TCR that critically converge in mTOR for the differentiation of protective antiviral memory CD8+ T lymphocytes.

#### O-095. LA IL-15 POTENCIA LA CAPACIDAD FUNCIONAL Y LA RESPUESTA ANTÍGENO-ESPECÍFICA EN LOS LINFOCITOS T CD4+CD28NULL DE LOS INDIVIDUOS DE EDAD AVANZADA

M.A. Moro García, R. Alonso Arias, E. Serrano Pertíerra, F.M. Suárez García, J.J. Solano Jaurrieta y C. López Larrea

Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

**Introducción:** Como consecuencia del envejecimiento se observa un incremento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ que no expresan la molécula coestimuladora CD28. Recientemente se ha descrito la implicación de la citocina homeostática IL-15 en la generación y proliferación de los linfocitos T CD8+CD28null.

**Objetivos:** Analizar el efecto de la IL-15 sobre la subpoblación CD4+CD28null en un grupo de individuos de edad avanzada.

**Material y métodos:** Se obtuvieron muestras de sangre periférica de 30 individuos de edad avanzada ( $\geq 70$  años) y se estudió la frecuencia y capacidad funcional (proliferación, actividad citotóxica, producción de IFN- $\gamma$ ) de las células T CD4+CD28null por citometría de flujo.

**Resultados:** Encontramos un incremento significativo de células CD4+CD28null en presencia de IL-15 con respecto a células cultivadas en medio ( $15.8\% \pm 5.1\%$  vs  $8.6\% \pm 3.3\%$ ,  $p = 0.00006$ ), consecuencia de una mayor proliferación. El cultivo a tiempos cortos con IL-15 indujo en esta subpoblación celular un incremento significativo en la expresión, tanto a nivel de mRNA como de proteína, de granzima B y perforina. La degranulación inducida por anti-CD3 fue también significativamente incrementada en presencia de IL-15, así como la lisis redirigida frente a la línea celular P815 recubierta de anti-CD3. Finalmente, el precultivo de las células CD4+CD28null en presencia de esta citocina produjo un efecto sinérgico en la producción antígeno-específica de IFN- $\gamma$  inducida por CMV.

**Conclusiones:** La IL-15 parece ejercer un efecto activador sobre los linfocitos T CD4+CD28null en los individuos de edad avanzada, potenciando su capacidad efectora frente a sus antígenos específicos.

#### O-096. EFECTO DE LA HAPLOINSUFICIENCIA DE CD3 EN EL FENOTIPO, DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LOS LINFOCITOS TAB

M. Muñoz Ruiz, B. Garcillán Goyoaga, J. Gutiérrez Hernández, M. Delgado, E. Fernández Malave y J.R. Regueiro González-Barros

Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**Introducción:** Una manera de evaluar las funciones específicas de las cadenas CD3 es estudiar el efecto de la haploinsuficiencia

en CD3G ( $\gamma^{+/-}$ ), CD3D ( $\delta^{+/-}$ ) o CD3E ( $\epsilon^{+/-}$ ) en el desarrollo, el fenotipo y la función de los linfocitos Tab.

**Métodos:** Citometría de flujo comparativa, ELISA, Western-blot y ensayos funcionales.

**Resultados:** En periferia, observamos (con gradiente  $d^{+/-}$  y  $e^{+/-}$  40-50% de los controles), pero no en las T  $d^{+/-}$ . La disminución en la expresión se correlaciona con defectos en parámetros funcionales tardíos (proliferación inducida por anti-CD3, secreción de IL-2 y respuesta a infección polimicrobiana), pero no tempranos (inducción de CD69 y CD25) en células T  $g^{+/-}$ ,  $d^{+/-}$  o  $e^{+/-}$ . Por último, hemos observado defectos en la activación de Akt en células  $g^{+/-}$  pero no  $end^{+/-}$ .

**Conclusiones:** Las cadenas CD3 tienen algunas funciones dispares en la expresión y en las funciones tardías del complejo TCR/CD3, así como en el desarrollo de las células T, ya que en ratones haploinsuficientes 1) La expresión del TCRab y el desarrollo de las células T son más dependientes de CD3g y e que de CD3d; 2) CD3g, pero no CD3d, participa en la activación de Akt; y 3) CD3g y e, y menos CD3d, regulan la inducción de IL-2. Por tanto se puede establecer la jerarquía CD3d.

#### O-097. SIGNALING THROUGH C5A RECEPTOR AND C3A RECEPTOR MODULATES FUNCTION OF REGULATORY T CELLS

E. Paz Artal, W.H. Kwan y P. Heeger

Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Division of Nephrology Mount Sinai School of Medicine, EE.UU.

Based on previous work showing that signaling through T cell expressed C3aR and C5aR enhance effector T cell (Teff) expansion and survival, we tested how C5a/C5aR and C3a/C3aR interactions impact Treg. RT-PCR performed on flow sorted Tregs revealed C3aR and C5aR expression that was upregulated upon anti-CD3 stimulation. In vitro, C5aR and/or C3aR-KO Treg suppressed proliferation of anti-CD3 stimulated Teff 2-fold more than WT Treg ( $p < 0.05$ ). Addition of a C5aR-antagonist (C5aRA) and a C3aR-antagonist (C3aRA) had a similar effect. When we enhanced C5aR/C3aR signaling on the Treg by increasing local C3a/C5a production, we observed a partial abrogation of suppression ( $p < 0.05$ ). In comparison to WT Treg, C3aR/C5aR KO Treg more potently inhibited homeostatic proliferation of Teff cells (2-fold fewer T cells on d 6) and limited development of colitis after adoptive transfer into immunodeficient hosts ( $p < 0.05$ ). C5aR/C3aR blockade or deficiency prevented Treg AKT phosphorylation and upregulated expression of Foxp3 and CTLA4 without altering IL-10 or TGF $\beta$  production. We next transplanted B6 hearts into allogeneic Balb/c mice treated with a CTLA4Ig +/- C5aRA delivered by osmotic pump. While CTLA4Ig alone prolonged survival from 8d in untreated mice to 24 d ( $p < 0.05$ ), addition of the C5aRA resulted in > 50 d survival. C5aRA treatment led to significantly fewer donor reactive IFN $\gamma$  producers 2-3 weeks posttransplant and upregulation of CTLA4 in Foxp3+ Treg. In conclusion, during cognate T cell/APC interactions immune cell derived complement activates locally, yielding C3a and C5a which through binding to their receptors on Teff and Treg enhances Teff expansion while simultaneously inhibiting Treg function, in part through downregulating CTLA4 expression, and together resulting in an expanded Teff repertoire. These findings provide one explanation for how the immune system permits local T cell expansion while preserving systemic tolerance and suggests Treg C5aR/C3aR as therapy targets.

## PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA

**Moderadores:** José A. López de Castro (Madrid) y Noelia Casares Lagar (Pamplona)

### O-098. COMPARACIÓN DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS ASOCIADOS A HLA-DR EN BAZO Y EN TIMO HUMANO

J.A. Collado Miguens, L. Muixí Ponsà, M. Carrascal, G. Espinosa Carrasco, I. Álvarez Pérez y D. Jaraquemada

Instituto de Biotecnología y Biomedicina; CSIC-UAB Proteomics Facility, UAB, Barcelona.

**Introducción:** La tolerancia a lo propio es la ausencia de respuesta inmunitaria adaptativa frente a moléculas autólogas. Los linfocitos con receptores capaces de reconocer componentes propios se eliminan o se inactivan durante la maduración, en los órganos linfoides primarios. Aun así, pasan a periferia algunas células autoreactivas que normalmente no crean un cuadro patológico gracias a la regulación de dichas células autoreactivas a nivel periférico. Para que la tolerancia sea eficiente, es necesario que el repertorio peptídico que se presente en el timo, vía HLA-de clase I o clase II, sea representativo del total del organismo. Esto incluye no solo moléculas ubicuas o moléculas de alta expresión, sino también antígenos específicos de tejidos (TRA), que no se expresan regularmente en el timo.

**Objetivos:** Nuestro trabajo consiste en el análisis comparativo de los repertorios peptídicos presentados por HLA-DR en la periferia (bazo) y en el timo, para determinar diferencias específicas de timo que podrían relacionarse con la generación de tolerancia.

**Material y métodos:** Se partió de muestras de tejido (bazo y timo) congeladas ( $N = 2$  de cada tejido) procedentes de donantes HLA-DR idénticos. Mediante la técnica ya estandarizada en nuestro laboratorio, los péptidos asociados al HLA-DR se purificaron a partir de un inmunoprecipitado de los complejos HLA-peptido. Los péptidos se fraccionaron por SCX-HPLC, y las fracciones peptídicas se analizaron por espectrometría de masas en un LTQ acoplado "on line" a una RP-HPLC para una mejor resolución de los espectros de secuenciación.

**Resultados:** Se han secuenciado 393 péptidos correspondientes a 127 proteínas. Los datos han permitido el estudio de la procedencia de las proteínas parentales, la distribución de tamaño y la ruta de presentación de los péptidos asociados a HLA-DR. Los datos muestran solapamiento de los repertorios peptídicos, obteniéndose un 37% de péptidos de expresión diferencial entre los dos tejidos. Los péptidos exclusivos de cada tejido se han analizado para determinar posibles diferencias.

**Conclusiones:** Se presenta el estudio comparativo del repertorio peptídico fisiológico asociado a HLA-DR entre órganos linfoides primarios y secundarios. A pesar de que los resultados obtenidos no son todavía concluyentes, hemos obtenido información muy valiosa sobre las características de los repertorios presentados en ambos tejidos. Entre ellos, encontramos posibles péptidos provenientes de proteínas exclusivas de tejido periférico asociados a HLA-DR en el timo, que no se encuentran en el bazo.

### O-099. CASPASES IN VIRUS-INFECTED CELLS CONTRIBUTE TO RECOGNITION BY CD8+ T LYMPHOCYTES

M. del Vall Latorre, D. López, M. García-Calvo, G.L. Smith y M. del Val

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Merck Research Laboratories, Rahway, NJ, EE.UU. Imperial College London, RU. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid.

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. In this study, we report that processing and presentation of a short vaccinia virus-encoded Ag can take place also by a nonproteasomal pathway, which was blocked in infected cells with chemical inhibitors of caspases. By cleaving at noncanonical sites, at least two caspases generated antigenic peptides recognized 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, coexpression of the natural vaccinia virus protein B13, which is an inhibitor of caspases and apoptosis, impaired Ag presentation by the caspase pathway in infected cells. These data support the hypothesis that 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 (J Immunol. 2010;184:5193-9).

### O-100. PROTEASOME-INHIBITOR RESISTANT HLA CLASS I-BOUND PEPTIDOMES

N. García Medel, A.J. Sanz Bravo, E. Barnea, A. Amon y J.A. López de Castro Álvarez

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM), Madrid. Faculty of Biology, Technion Israel Institute of Technology, Haifa, Israel.

Some MHC class I molecules, including some with preference for peptides with C-terminal basic residues, present a significant fraction of their constitutive peptidomes in the presence of proteasome inhibitors. In this study, A\*68:01-bound peptides, and their parental proteins, were characterized through massive mass spectrometry sequencing, to refine its binding motif, including the nearly exclusive preference for C-terminal residues. Stable isotope tagging was used to distinguish inhibitor-sensitive and resistant A\*68:01 ligands. The latter accounted for about 20% of the peptidome and, like reported for HLA-B27, arose predominantly from small and basic proteins. However, under the conditions used for proteasome inhibition in vivo, epoxomicin showed incomplete inhibition of the hydrolysis of fluorogenic substrates specific for the tryptic-like proteasomal activity, and MG132 of both the tryptic and chymotryptic subspecificities. This incomplete inhibition was also reflected in the cleavage of synthetic peptide precursors of A\*68:01 ligands. In these cases, inhibition of the proteasome resulted in altered cleavage patterns. However these alterations did not upset the balance between cleavage at peptide bonds resulting in epitope destruction and those leading to their generation. The results indicate that the experimental conditions used to detect proteasome-independent MHC ligands result in incomplete inhibition of the proteasome and, probably, also in altered cleavage of indi-

vidual substrates. Thus, inhibitor-resistant MHC-I ligands are not necessarily produced by non-proteasomal pathways. However, their generation is not simply explained by decreased epitope destruction upon incomplete proteasomal inhibition and may require additional proteolytic steps acting on incompletely processed proteasomal products.

#### **O-101. MICROPARTÍCULAS DE SILICIO MESOPOROSO AUMENTAN LA PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA CRUZADA POR MHC DE CLASE I DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS**

M. Gómez del Moral Martín, B. Abós Gracia, J. López Relaño, V. Viana Huete, E. Matveyeva, E. Martínez Naves y A. Jiménez Periañez

Departamento de Biología Celular; Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina UCM, Madrid. E-M Silicon Nanotechnologies, Valencia.

**Objetivos:** Las micropartículas de silicio poroso (PSi) son capaces de ser internalizadas en células epiteliales y fagocíticas, mostrándose como excelentes vehículos para la liberación de moléculas en el interior celular. El objetivo de este trabajo es utilizar las micropartículas como vehículos para la internalización de antígenos en células presentadoras de forma que faciliten su captación, procesamiento y presentación por MHC de clase I para activación de linfocitos T CD8+ (CTLs).

**Material y métodos:** Como células presentadoras de antígeno se utilizaron células dendríticas derivadas de monocitos (MDDCs) tratadas con GM-CSF e IL-4. Se utilizó una combinación de péptidos virales (CTL-CEF) que son presentados por MHC de clase I a linfocitos T CD8. Se comparó el efecto del tratamiento de las MDDCs con péptidos virales libres y unidos a PSi. Se midieron cambios fenotípicos (CD80, CD86, MHC I y II) en las MDDCs. La activación de linfocitos T CD8 se analizó cuantificando la síntesis de IFN gamma por ELISpot.

**Resultados:** Las PSi, tanto solas como cargadas con CTL-CEF son internalizadas por las MDDCs induciendo su maduración. La incubación de PBMCs de donantes sanos con MDDCs singénicas maduradas en presencia de PSi cargadas con CTL-CEF activa linfocitos T CD8 con producción de INFgamma. Esta producción fue mucho más alta que cuando las MDDCs eran tratadas con péptidos virales libres.

**Conclusiones:** La vehiculización de antígenos en PSi favorece la internalización de antígenos e incrementa su presentación por MHC de clase I en MDDCs.

#### **O-102. MACROPHAGE SCAVENGER RECEPTOR A MEDIATES THE UPTAKE OF GOLD COLLOID IN VITRO**

A. González Fernández, A. França, P. Aggarwal, E. Barsov, S. Kozlov y M. Dobrovolskaia

Nanotechnology Characterization Laboratory, Advanced Technology Program; Basic Science Program; Center for Advanced Preclinical Research, Laboratory of Animal Science Program, SAIC-Frederick Inc., NCL-Frederick, EE.UU. Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Inmunología, Universidad de Vigo.

In the recent years many studies have reported the internalization of nanoparticles by macrophage, however, the uptake mechanisms involved are not completely understood. Thus, the objective of the present study was to identify important macrophage receptors involved in the uptake of untargeted anionic citrate-stabilized gold nanoparticles. In order to verify

if the uptake mechanisms are dependent of size of the nanoparticles or not, we used of 2 different sizes, namely: 30 and 150 nm. The experiments were performed with the macrophage cell line RAW 264.7 using different receptors inhibitors. The analysis of the uptake was performed with ImageJ software. Our results showed differences between both sizes of nanoparticles used regarding the receptors involved in the uptake. The 30 nm nanoparticles seem to use a broader range of receptors types such as SR-, caveolin- and clathrin-mediated pathways. Concerning the 150 nm nanoparticles, they seem to use, preferentially, the SR and, at lower levels, the caveolin-mediated pathway. In conclusion, irrespective of size, the citrate stabilized gold nanoparticles enter the macrophages via multiple routes including both pinocytosis and scavenger receptor mediated phagocytosis.

#### **O-103. TAP-INDEPENDENT CD8+ T LYMPHOCYTE RESPONSES AGAINST VACCINIA VIRUS MHC CLASS I LIGANDS SUFFICE TO PROVIDE ANTIVIRAL PROTECTION**

S. Lázaro García, S. Iborra, M. Ramos, D. López y M. del Val

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, (CSIC-UAM), Madrid. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

CD8+ T lymphocytes screen peptides displayed at the plasma membrane by MHC class I molecules. Most of these peptides result from cytosolic proteolysis and are transported into the endoplasmic reticulum by TAP transporters, where they meet nascent MHC class I molecules. TAP-independent antigen processing pathways have been described, but the extent to which they contribute to CD8+ T-cell responses to viruses is still unclear. In this report, we show that CD8+ T lymphocytes from VACV-infected TAP1-deficient mice recognized vaccinia virus (VACV) antigens presented by TAP-deficient infected dendritic cells to the same extent as by wild type infected cells. About 13% of the wild type response was directed against viral epitopes presented by MHC class I molecules independently of TAP. Analysis of 30 individual VACV epitopes revealed up to 12 epitopes that could be processed independently of TAP, and CD8+ T-lymphocyte lines mono-specific for most of these were established from TAP1-deficient animals. Half of these peptides derived from membrane viral proteins. Interestingly, the other half derived from cytosolic viral proteins, and yet gained access to vesicular or secretory antigen presentation pathways in the absence of TAP. Finally, CD8+ T lymphocytes primed by two of these peptides were sufficient to provide protection against viral infection in TAP-deficient mice. These findings underline the remarkable contribution of TAP-independent antigen processing pathways to CD8+ T-cell priming and protection from infection with VACV, a virus successfully used to eradicate smallpox and currently considered as a vaccine vector. SL and SI contributed equally to this work.

#### **O-104. REGULACIÓN DE VÍAS PROTEOLÍTICAS CELULARES IMPLICADAS EN PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO**

L. López Ferreras, S. Guil López, M. del Val Latorre y L.C. Antón Canto

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.

**Objetivos:** Caracterización de dianas de inhibidores que regulan el acceso de sustratos a vías de presentación de antígeno.

**Material y métodos:** El estudio se llevó a cabo comparando cultivos celulares tratados y sin tratar con el inhibidor AAF-cmk. Se utilizaron sondas covalentes de ubicuitín hidrolasas y de componentes de la vía de autofagia para la caracterización de las posibles dianas del inhibidor. La identificación de las dianas potenciales, así como de sus sustratos se llevó a cabo mediante técnicas de citometría, western blot, microscopía y espectrometría de masas.

**Resultados:** Se identificaron diferentes ubicuitín hidrolasas (USP7, USP10, USP14) como dianas potenciales del inhibidor AAF-cmk, siendo esta inhibición selectiva, ya que no todas las ubicuitín hidrolasas se inhiben. Por otro lado, se observa que el tratamiento con AAF-cmk induce alteraciones sobre la autofagia. A tiempos cortos causa una inducción de esta vía, mientras que a tiempos más largos estaríamos ante una inhibición. Estos resultados podrían explicarse por la inhibición de Atg4, proteasa equivalente funcional y estructuralmente a las ubicuitín hidrolasas en autofagia. Se ha comprobado que Atg4-B, uno de los homólogos de Atg4 de levadura, es otra diana de este inhibidor. Finalmente, el tratamiento con este inhibidor regula, positiva o negativamente, la degradación de varios sustratos de las dianas identificadas, como pueden ser: p53, p62, LC3, Ub-R-GFP o GFP-CL1 entre otros.

**Conclusiones:** Se pueden establecer mecanismos capaces de regular el procesamiento antigenético, tanto para MHC de clase I como de clase II, modulando farmacológicamente la degradación y la consiguiente presentación de epitopos.

#### O-105. NATURAL HLA-B\*2705 LIGANDS IN HUMAN RESPIRATORY SYNCYTIAL VIRUS-INFECTED CELLS

D. López Rodríguez, S. Infantes, E. Lorente, E. Barnea, I. Beer, R. García, F. Lasala, M. Jiménez y A. Admon

Unidad de Procesamiento Antigenético y Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Technion Israel Institute of Technology, Israel.

The presentation of short viral peptide antigens by human leukocyte antigen (HLA) class I molecules on cell surfaces is a key step in the activation of cytotoxic T lymphocytes, which mediate the killing of pathogen-infected cells or initiate autoimmune tissue damage. HLA-B27 is a well-known class I molecule that is used to study both facets of the cellular immune response. Using mass spectrometry analysis of complex HLA-bound peptide pools isolated from large amounts of both healthy cells and those infected by human respiratory syncytial virus (HRSV), we identified two hundred naturally processed HLA-B\*2705 ligands. The isolated peptides derive preferentially, but not fully, from proteins encoded by highly abundant mRNAs. Investigating the modulation of the HLA peptidome by HRSV our data have shown that a third of the total HLA-B\*2705 ligands were specifically regulated by HRSV infection with detection of cytokine-signaling-related proteins in the presence of HRSV. In addition, in 3% of HLA-B\*2705 ligands identified, a change in the P2 anchor motif was detected. B\*2705 class I molecules were able to bind these GlnP2 peptides, which showed significant homology to pathogenic bacterial sequences, with a broad range of affinities. One of these ligands was able to bind with distinct conformations to HLA-B27 subtypes differentially associated with ankylosing spondylitis. These data have implications for models of HLA class I peptide supply, for the study of viral modulation of protein profiling upon infection, and for the study of pathogenic role of HLA-

B27 in the triggering of ankylosing spondylitis autoimmune disease.

#### O-106. TAP-INDEPENDENT HLA-CW1 ANTIGEN PROCESSING OF AN HIV ENVELOPE PROTEIN CONSERVED PEPTIDE

D. López Rodríguez, E. Lorente, S. Infantes, E. Barnea, I. Beer, R. García, F. Lasala, M. Jiménez y A. Admon

Unidad de Procesamiento Antigenético y Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Technion Israel Institute of Technology, Israel.

Individuals with nonfunctional transporters associated with antigen processing (TAP) complexes are not particularly susceptible to viral infections or neoplasms. Therefore, their immune system must be reasonably efficient, and the present, though reduced, cytolytic CD8+  $\alpha\beta$  T subpopulation specific for TAP-independent antigens may be sufficient to establish an immune defense protecting against viral infections in these individuals. The objective of the present study was to identify TAP-independent ligands from HIV gp160 protein. An analysis and comparison of complex human histocompatibility complex (HLA)-bound peptide pools isolated from large quantities of healthy or HIV gp160-expressing human cells was performed using mass spectrometry and bioinformatics tools. A conserved TAP-independent HLA peptide ligand endogenously processed and presented in infected human cells was identified. This ligand originates from the envelope protein bound to the HLA-Cw1 class I molecule with high affinity. It was concluded that HLA class I peptides derived from a large fraction of the N-terminal HIV envelope protein could be presented even in the absence of the TAP complex.

#### O-107. UNUSUAL VIRAL LIGAND WITH NON-CANONICAL INTERACTIONS IS NATURALLY PRESENTED BOTH CLASSICAL AND NON CLASSICAL HLA CLASS I MOLECULES IN TAP-DEFICIENT VACCINIA VIRUS-INFECTED CELLS

D. López Rodríguez, E. Lorente, R. García, E. Barnea, I. Beer, F. Lasala, M. Jiménez y A. Admon

Unidad de Procesamiento Antigenético y Unidad de Proteómica, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Technion Israel Institute of Technology, Israel.

The transporters associated with antigen processing (TAP) deliver the products generated by the proteolytic activity of proteasomes in the cytosol to the rough endoplasmic reticulum lumen. This classical endogenous antigen processing pathway is the main source of pathogen HLA ligands that are later specifically recognized by cytotoxic T lymphocytes (CTL) on the surface of infected cells, but other TAP-independent pathways must be sensibly efficient because individuals with nonfunctional transporters associated with antigen processing (TAP) complexes are not particularly susceptible to viral infections or neoplasms. Using mass spectrometry analysis of complex HLA-bound peptide pools isolated from large amounts of TAPdeficient vaccinia virus-infected cells, we identified one vaccinia ligand naturally presented both classical and non-classical class I molecules in the same infected cells. This ligand originated from the D8L protein, bound to HLA-Cw1 and HLA-E class I molecules with high affinity and uses alternative interactions to the anchor motifs previously

described for its presenting class I molecules. These data have implications for the analysis of the CTL response, for the vaccine development, and for the study of effectiveness of early empirical vaccination with cowpoxvirus against smallpox disease.

#### **O-108. CONCERTED ANTIGEN PROCESSING OF A SHORT VIRAL ANTIGEN BY HUMAN CASPASES 5 AND 10**

D. López Rodríguez, M. Jiménez, M. García-Calvo y M. del Val  
Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Merck Research Laboratories. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas CSIC, Madrid. Universidad Autónoma de Madrid.

The generation of peptides presented by MHC class I molecules requires the proteolytic activity of the proteasome and/or other peptidases. The processing of a short vaccinia virus-encoded antigen can take place by a proteasome-independent pathway involving initiator caspases 5 and 10, which generate antigenic peptides recognised by CD8+ T lymphocytes. In the present study, comparing single versus double enzyme digestions by mass spectrometry analysis, both qualitative and quantitative differences in the products obtained were identified. These in vitro data suggest that each enzyme can use the degradation products of the other as substrate for new cleavages, indicating concerted endoproteolytic activity of caspases 5 and 10.

#### **O-109. SUITABILITY OF C. ALBICANS AS A VEHICLE FOR ANTIGEN PRESENTATION**

D. Molina Arana, S. Iborra, J. Plá y M. del Val  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid.

Yeasts exhibit many features of immunostimulatory complexes. They naturally possess adjuvant-like properties (such as cell wall carbohydrates, glucan, mannan) and can be easily engineered to express multiple antigens (Stubbs et al. Nat Med. 2001;7:625-9). We have engineered a recombinant human opportunistic fungal pathogen, *Candida albicans*, to stably express MHC class II (ISQAVHAAHAEINEAGR) and MHC class I (SIINFEKL) epitopes of the ovoalbumin (OVA) protein. These epitopes are conveniently fused to the fluorescent protein GFP, whose expression is controlled by the *C. albicans* actin promoter and regulated by the Tet-ON system. This genetic tool has allowed us to use *C. albicans* as a vehicle to sensitize bone-marrow-derived dendritic cells, which are able to cross-present this model antigen and to activate SIINFEKL-specific CD8+ T lymphocytes in vitro. By contrast, specific CD8+ T-cell activation is not observed when bone-marrow-derived macrophages were used as antigen presenting cells, indicating that macrophages are not able to cross present the epitopes in a *C. albicans* vehicle-based context. In addition, we have developed other vehicles based in *C. albicans* signaling mutants that have an altered cell wall composition and are differentially recognized by a number of immune system cells (Galán-Díez et al. Infect Immun. 2010;78:1426-36). These results describe a powerful tool for the induction and modulation of cellular immune responses and, in the long term, a useful tool to develop different prophylactic or therapeutic approaches.

#### **O-110. ESTUDIO COMPARATIVO DE LOS REPERTORIOS PEPTÍDICOS DE MOLÉCULAS DE HLA-DR ASOCIADAS DIFERENCIALMENTE CON ARTRITIS REUMATOIDE**

E.M. Scholz Valero, J.A. Collado Miguens, G. Espinosa Carrasco, D. Jaraquemada Pérez de Guzmán e I. Álvarez Pérez

Unitat d'Immunologia, Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona.

**Objetivos:** La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la inflamación crónica de las articulaciones. Presenta una prevalencia en la población general entre 0,3-1% y es más abundante en mujeres. Aunque su etiología permanece incierta, se sabe que el desarrollo de la enfermedad depende de factores ambientales y genéticos. La asociación más fuerte es con determinados alelos de HLA-DR, entre los que se encuentran algunos subtipos de DR4 (DRB1\*0401, DRB1\*0404, DRB1\*0405, DRB1\*0408), DR1 (DRB1\*0101) y DR10 (DRB1\*1001). En contraposición se han descrito otros alelos asociados a bajo riesgo, como DR15 (DRB1\*1501), DR7 (DRB1\*0701), DR8 (DRB1\*0801) y DR9 (DRB1\*0901). Los alelos asociados con susceptibilidad a RA contienen una secuencia en la tercera región hipervariable de la cadena HLA-DR $\beta$  que contiene residuos básicos, denominada shared epitope (SE). Se ha postulado que el SE puede influir en el desarrollo de la enfermedad modulando el conjunto de péptidos unido a HLA, al determinar la posición P4 de los mismos o interaccionando directamente con el TCR. En un estudio previo, hemos determinado el motivo de anclaje de DR10, lo que sugirió que los repertorios peptídicos de los antígenos HLA asociados a RA se parecen más entre ellos que a los alelos no asociados a enfermedad. Aquí presentamos el análisis comparativo directo mediante espectrometría de masas de los repertorios peptídicos de 4 alelos diferencialmente asociados a RA: DR1, DR4, DR10 y DR15.

**Material y métodos:** Se utilizaron líneas celulares linfoblastoides homozigotas para DR1, DR4, DR10 y DR15. Alrededor de 109 células se lisaron en presencia del detergente no iónico NP-40 y las moléculas de HLA-DR se inmunopurificaron con el anticuerpo monoclonal B8.11.2, que reconoce un determinante monomórfico de HLA-DR. El pool peptídico se purificó mediante elución ácida y ultrafiltración con centriprep-10. Los péptidos se fraccionaron por HPLC de fase reversa básica y se analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y LC-ESI.

**Resultados:** Se han identificado un total de 542 péptidos, correspondientes a DR1 (n = 107), DR4 (n = 246), DR10 (n = 103) y DR15 (n = 86). En dicho conjunto de péptidos, DR10 comparte 9 péptidos con DR1, 7 con DR4 y ninguno con DR15. Por su parte DR15 comparte 1 ligando con DR1 y otro con DR4. Finalmente, DR1 y DR4 comparten 2 péptidos.

**Conclusiones:** El análisis directo de los péptidos asociados a HLA-DR confirma que alelos que contienen el SE (DR1, DR4 y DR10) presentan repertorios peptídicos más similares entre ellos que con HLA-DR15, molécula no asociada a la enfermedad.

## VACUNAS

**Moderadores:** Juan J. Lasarte Sagastibelza (Pamplona) y África González Fernández (Vigo)

### O-111. INMUNIZACIÓN ORAL CON UN PREPARADO BACTERIANO POLIVALENTE EN PACIENTES CON INFECCIONES RESPIRATORIAS RECURRENTES: INMUNOMODULACIÓN E IMPACTO CLÍNICO

D. Alecsandru, L. Valor, S. Sánchez Ramón, J. Navarro, J. Gil, J. Carbone, C. Rodríguez Sainz y E. Fernández-Cruz Pérez

Hospital Universitario General Gregorio Marañón, Madrid.

**Objetivos:** Evidenciar si la inmunización oral con una vacuna bacteriana polivalente induce una respuesta inmunomoduladora específica y su impacto sobre las manifestaciones clínicas en pacientes con infecciones respiratorias recurrentes (IRR).

**Métodos:** Diecisiete pacientes con IRR (edad: 21-77) atendidos en la Unidad de Inmunología Clínica del Hospital Gregorio Marañón, han sido reclutados en este estudio piloto. Los pacientes han recibido a diario, un preparado oral bacteriano polivalente, Bactek® ( $10^7$  bacterias inactivadas) durante 6 meses. La valoración inmunológica y clínica ha sido realizada basal y al final de la inmunización. El estudio inmunológico ha incluido: respuesta linfoproliferativa CD4+ y CD8+ específica para Bactek®, inmunoglobulinas séricas (IgG, IgA, IgM); anticuerpos específicos (IgG) frente a neumococo y toxoide tetánico; linfocitos B, T y NK.

**Resultados:** Se ha objetivado un aumento significativo en la capacidad proliferativa específica de las células T CD3+CD4+CFSElow frente a los antígenos contenidos en Bactek® a los 6 meses comparando con basal ( $p < 0,0001$ ). Un incremento significativo de las células T totales CD3+ ha sido también observado ( $p < 0,05$ ). No se ha evidenciado ninguna diferencia estadísticamente significativa entre pre- y post-vacunación sobre el nivel sérico de las Ig, Ac específicos, LB, LT y NK. Una reducción importante en la tasa de infecciones respiratorias (IRR) comparando con 1 año anterior al inicio del tratamiento con Bactek® ha sido objetivada ( $p < 0,0001$ ).

**Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que la administración sublingual de un preparado bacteriano polivalente en pacientes con IRR tiene un efecto inmunomodulador estimulante sobre la respuesta específica de las células T CD4+ y que este efecto podría ser asociado a un beneficio clínico importante.

### O-112. COMBINACIÓN DE ADYUVANTES Y VEHICULIZACIÓN DEL ANTÍGENO COMO ESTRATEGIA PARA INDUCIR RESPUESTAS T POLIFUNCIONALES Y DE ALTA AVIDEZ FRENTE A TUMORES POCO INMUNOGÉNICOS

F. Aranda Vega, D. Llópiz, N. Díaz-Valdés, J.I. Riezu-Boj, J. Bezugantea, M. Ruiz, C. Mansilla, J. Prieto, J.J. Lasarte, F. Borrás-Cuesta y P. Sarobe

Área de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada CIMA, Universidad de Navarra, Pamplona.

La baja expresión antigénica y la ausencia de señales inmunoestimuladoras son algunas de las causas de la baja inmuno-

genicidad de muchos tumores. Por ello, la caracterización de una combinación de antígenos y adyuvantes que superen esta situación activando respuestas antitumorales eficaces es un importante objetivo. Usando el melanoma B16-OVA como modelo de tumor poco inmunogénico, hemos ensayado diferentes combinaciones de antígeno y adyuvantes para tratar tumores establecidos. Sin la inclusión de antígenos tumorales exógenos, la administración del ligando de TLR7 Imiquimod y anticuerpos agomistas anti-CD40 activó solamente la inmunidad innata, que no rechazó los tumores. La administración de esta combinación de adyuvantes junto con OVA como antígeno tumoral indujo respuestas de linfocitos T que retrasaron el crecimiento tumoral pero no indujeron su rechazo. Sin embargo, el tratamiento con una combinación de los adyuvantes anti-CD40 y ligandos de TLR3 y TLR7 junto con el antígeno vehiculizado a las células dendríticas a través de TLR4, indujo el rechazo tumoral en el 50% de los animales. Esto se asoció a una mejor activación de la inmunidad innata y a la inducción de linfocitos T CD8+ polifuncionales de alta avidez, responsables del rechazo tumoral. Esta terapia activó no solo respuestas frente a OVA, proporcionando protección futura frente al propio tumor, sino también respuestas frente a otros antígenos asociados al melanoma, que protegieron frente al tumor parental B16.F10. Estos resultados sugieren que una combinación múltiple de adyuvantes y la vehiculización del antígeno podría ser una estrategia útil en la inmunoterapia de tumores poco inmunogénicos.

### O-113. ERRADICACIÓN DE TUMORES DE GRAN TAMAÑO QUE EXPRESAN LA PROTEÍNA E7 DEL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO MEDIANTE LA VACUNACIÓN TERAPÉUTICA CON E7 FUSIONADO AL DOMINIO EXTRA A DE FIBRONECTINA

P. Berraondo López, C. Mansilla, M. Martínez, N. Casares, L. Arribillaga, M. Durantez, J. Fioravanti, P. Sarobe, J. Prieto, C. Leclerc y J.J. Lasarte

Área de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada CIMA, Pamplona. Institut Pasteur, Unité de Régulation Immunitaire et Vaccinologie, INSERM, Paris, Francia.

El carcinoma de cérvix es uno de los cánceres más comunes en las mujeres en todo el mundo. La infección crónica del tracto genital por virus del papiloma humano (VPH) causa el cáncer cervical. La inmunidad celular de la proteína E7 del VPH (VPHE7) se ha asociado con la resolución clínica y citológica de las lesiones producidas por el VPH. Por lo tanto, decidimos probar si el direccionamiento de la proteína VPHE7 a las células dendríticas usando una proteína de fusión entre el dominio extra A (EDA) de la fibronectina, un ligando natural para TLR4, y VPHE7 (EDA-VPHE7) podría ser una vacuna eficaz para el tratamiento del carcinoma de cuello uterino. Se encontró que la proteína de fusión EDA-VPHE7 es captada de manera eficiente por células dendríticas derivadas de médula ósea in vitro e induce su maduración, aumentándose los marcadores de la maduración y la producción de IL-12. La inmunización de ratones con proteína de fusión EDA-VPHE7 induce respuestas antitumorales mediadas por linfocitos T CD8 en ausencia de adyuvantes adicionales. Además, la vacunación con EDA-VPHE7 en combinación con el ligando TLR3 ácido poliinosínico -policitidílico, o con dosis bajas de ciclofosfamida y el ligando de TLR9 CpG-B acomplejado en lípidos catiónicos, es capaz de erradicar tumores TC1 grandes y establecidos. Por lo tanto, la vacunación terapéutica con la proteína de fusión EDA-VPHE7 puede

ser eficaz en el tratamiento del carcinoma de cuello uterino en humanos.

#### O-114. COMPARATIVE STUDY OF CLINICAL GRADE HUMAN TOLEROGENIC DENDRITIC CELLS

F. Borràs Serres, M. Naranjo Gómez, D. Raïch Regué, C. Oñate, L. Grau López, C. Ramo Tello, R. Pujol Borrell y E. Martínez Cáceres

*Laboratory of Immunobiology for Research and Diagnosis (LIRAD), Blood and Tissue Bank (BTB), Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol. Badalona, Barcelona. Multiple Sclerosis Unit, Department of Neurosciences, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona Barcelona.*

**Introduction:** Tolerogenic dendritic cells (tol-DC) are of promising therapeutic potential in autoimmune disorders. Commonly, immunomodulatory DCs are generated using pharmacological mediators such as dexamethasone (Dexa), rapamycin (Rapa) and vitamin D3 (VitD3). Most protocols, however, do not accomplish the strict regulatory rules of clinically applicable products.

**Objectives:** The aim of this study is to compare these different tolerance-inducing agents on DC biology under GMP conditions.

**Methods:** Tol-DCs were generated by adding tolerogenic agents to a maturation cocktail comprised of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and PGE2. We evaluated the effects of each agent on phenotype, cytokine secretion and stability, the stimulatory capacity of tol-DCs and the T-cell profiles induced.

**Results:** Clinically relevant differences were observed with the different cellular products. Phenotypically, while Dexa- and VitD3-tol-DCs were similar to immature DCs, Rapa-tol-DCs were not distinguishable from mature DCs. In addition, only Dexa- and VitD3-tol-DCs exhibited IL-10 production. Interestingly, in all cases, tol-DCs were not modified by a subsequent TLR stimulation, indicating a stable phenotype. Functionally, clearly reduced alloantigen T cell proliferation and total interferon-gamma secretion was obtained using any of these agent.

**Conclusions:** Our results demonstrate contrasting influence of different clinical-grade pharmacological agents on human tol-DC generation. This should be taken into account for decisions on the use of a specific agent for the appropriate cellular therapy in the context of a particular disease.

#### O-115. SUPRESIÓN DE LA ACTIVIDAD T REGULADORA CON UN PÉPTIDO INHIBidor DE FOXP3

N. Casares Lagar, L. Arriballaga Arangoa, F. Rudilla Salvador, T. Lozano Moreda, D. Llopiz Katchikian, J.I. Riezu Boj, P. Sarobe Ugarriza, F. Borràs Cuesta, J. Prieto Valtueña y J.J. Lasarte Sagastibelza

*Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Pamplona.*

Los linfocitos T reguladores (Treg) FOXP3+ son capaces de inhibir la activación de respuestas inmunitarias frente al cáncer y enfermedades virales. Por ello, el desarrollo de estrategias para modular los Treg en estas patologías tiene gran interés clínico. En este estudio, usando una librería de fagos, se ha identificado un péptido, llamado P60, que es capaz de unirse a FOXP3. Estudios in vitro demuestran que P60 inhibe la actividad de las Treg purificadas tanto humanas como de

ratón. En ratones, P60 restablece la proliferación de esplenocitos, la cual es inhibida en presencia de Treg. Igualmente en estudios con células humanas, la proliferación de células mononucleares queda inhibida en presencia de Treg y la adición de P60 al cultivo, restaura dicha respuesta. En cuanto al mecanismo de acción, mediante un sistema de transfección con un plásmido FOXP3-GFP, comprobamos que P60 inhibe la translocación nuclear de FOXP3. Además, P60 reduce la capacidad de FOXP3 para inhibir la actividad transcripcional de NFAT y NF- $\kappa$ B. En estudios in vivo, la inhibición de FOXP3 con P60 en ratones neonatos induce un síndrome autoinmune similar a los ratones scurfy que carecen de FOXP3. Por otro lado, en ratones adultos, la administración de P60 potencia la inmunogenicidad de vacunas que contienen antígenos virales o tumorales. Así, se ha comprobado en distintos modelos que la combinación de dichas vacunas con P60 induce una mayor respuesta antitumoral o antiviral. Estos resultados demuestran que moléculas inhibidoras de FOXP3, como P60, podrían ser de gran utilidad para aumentar la eficacia de vacunas contra patógenos o antígenos tumorales.

#### O-116. CHIMERIC CALICIVIRUS-LIKE PARTICLES ELICIT IMMUNE RESPONSES AGAINST A T-CELL EPITOPE OF FOOT-AND-MOUTH DISEASE VIRUS IN PIGS

E. Crisci, L. Fraile, N. Moreno, E. Blanco, T. Mussá, P. Martínez Orellana, M. Baratelli, J. Martínez, J. Bárcena y M. Montoya

*Centre de Recerca en Sanitat Animal CReSA, UAB-IRTA; Departament de Sanitat i Anatomia Animals, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra. Universitat de Lleida. Centro de Investigación en Sanidad Animal CISA-INIA, Valdeolmos, Madrid. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentària, Barcelona.*

**Objectives:** The aim was to assess the immunogenicity of chimeric calicivirus-like particles (cRHDV-VLPs) containing a T epitope of 3A protein of foot-and-mouth disease virus (FMDV) in pigs.

**Material and methods:** Fifty conventional pigs, 6-7 weeks old, were divided in 3 groups (B,C,D) and one control group (A). Groups B, C, D were inoculated twice in 2 week interval with cRHDV-3AT-VLPs at different doses (20, 60, 180  $\mu$ g/pig) using intranasal (IN) (B) or intramuscular (IM) (C,D) inoculation. Group C was inoculated IM with adjuvant MontanideTM ISA 206 (SEPPIC). Blood was collected at day 14 and 28 after immunisation. PBMCs were obtained and analyzed for specific IFN- $\gamma$  production by ELISPOT and for lymphoproliferation assay by incorporation of [ $\text{methyl } ^3\text{H}$ ]thymidine. After culling at D28, the site of IM inoculation was also analysed.

**Results:** Two weeks after the last inoculation with cRHDV-3AT-VLPs, specific IFN- $\gamma$ -secreting cells against 3AT were detected in PBMCs by ELISPOT. Group C exhibited the highest IFN- $\gamma$ -secreting cell number compared with other groups. Induction of FMDV-specific T cells was also detected by lymphoproliferation assay of cRHDV-3AT-VLP immunized pigs. High specific responses against cRHDV-VLPs and 3AT were found in group C after the second inoculation. Lesion score of inoculation site was higher in group C than in the other groups.

**Conclusions:** Chimeric RHDV-VLPs containing a T 3A epitope of FMDV were generated, showing a powerful capacity to elicit a potent anti-viral response in pigs. This is the first immunological report on the potential use of chimeric RHDV-VLPs as antigen vectors in pigs.

## O-117. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE LAS FLAGELINAS DE MARINOBACTER ALGICOLA Y SU APLICACIÓN TERAPÉUTICA EN COMBINACIÓN CON LA FLAGELINA DE SALMONELLA

E. Gómez Casado

Departamento de Biotecnología, Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria INIA, Madrid.

**Objetivos:** Estudiar la capacidad adyuvante "in vitro" e "in vivo" de las flagelinas de *Marinobacter algicola* (F y FR) respecto a la de *Salmonella typhimurium* (FljB), y la funcionalidad cruzada de estas flagelinas en individuos hiperinmunizados (HPI) con cada una de ellas.

**Material y métodos:** "In vitro", se midió IL8 secretada por células Caco-2 tras estimulación con las flagelinas, y también en presencia de anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella* y *Marinobacter*. "In vivo", se midió: 1) los anticuerpos frente a un epitopo fusionado a las flagelinas; y 2) la capacidad adyuvante de las flagelinas (niveles de CCL20) en ratones hiperinmunes con anticuerpos anti-flagelina de *Salmonella*.

**Resultados:** F y FR tienen una capacidad adyuvante "in vitro" e "in vivo" similar (vías SC e IN) a FljB por la IL8 medida, y por los anticuerpos específicos en ratón. Los anticuerpos anti-FljB de ratones HPI con FljB neutralizan FljB, pero no las flagelinas F/FR, que siguen siendo funcionales a concentraciones muy bajas (50 ng). "In vivo", los ratones HPI con FljB no respondían a FljB, mientras FR no se neutralizó, promoviendo la producción de CCL20.

**Conclusiones:** Las flagelinas de *Marinobacter* son adyuvantes similares a la de *Salmonella*, y funcionales "in vivo" en ratones no respondedores a la flagelina de *Salmonella*. Estos *hallazgos* permiten usar las flagelinas de *Marinobacter* en hiperinmunitados con *Salmonella* y viceversa. Se establece un mejor uso dosis/respuesta aplicando secuencialmente ambas flagelinas como adyuvantes en vacunas, para tumores y radioterapia pero evitando el riesgo de sufrir un shock por el efecto proinflamatorio.

## O-118. ESTUDIO PROSPECTIVO FASE II SOBRE EFICACIA Y SEGURIDAD DE LA VACUNACIÓN CON CÉLULAS DENDRÍTICAS AUTÓLOGAS EN PACIENTES CON GLIOBLASTOMA MULTIFORME TRAS RESECCIÓN QUIRÚRGICA COMPLETA CON MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

S. Inogés Sancho, A. López Díaz de Cerio, R. Díez Valle, S. Tejada Solís, J. Pérez Calvo, H. Villanueva Ruiz, M. Legarrea Goñi, P. Rubio Bermejo, A. González Muñoz y M. Bendandi

Laboratorio de Inmunoterapia, Área de Oncología y Área de Terapia Celular, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Departamento de Neurocirugía y Servicio de Hematología, CUN, Pamplona.

El glioblastoma multiforme (GB) es un tumor altamente agresivo. Su tratamiento estándar incluye la extirpación máxima posible, seguida de radioterapia y quimioterapia. Con este esquema se consiguen 6,9 meses de mediana de supervivencia libre de progresión (SLP) y 14,6 meses de supervivencia global (SG). Es necesario abordar nuevas estrategias, entre las que se encuentra la combinación del tratamiento estándar con inmunoterapia. Se plantea un ensayo clínico fase II para pacientes con GB para valorar la eficacia y seguridad de la vacunación con células dendríticas (CD) autólogas pulsadas con lisado tumoral autólogo tras resección completa y asociada al tratamiento radioquimioterápico estándar. En el ensayo clínico se incluirán 37 pacientes. Tras la resección quirúrgica completa con microscopio de fluorescencia y 5-ALA se obtienen los lisados de las células

tumorales que se utilizarán para pulsar CD generadas a partir de células CD14+ seleccionadas. Estas células se maduran y luego se administran (4 vacunas mensuales, 4 bimensuales y 4 trimestrales). De momento se han reclutado 18 pacientes: 2 fallecieron por causas distintas a su tumor, 6 pacientes progresaron durante la vacunación con una SLP de 15, 12, 7, 7, 7 y 3,5 meses. De los 10 restantes, uno tiene un seguimiento de 14 meses y sigue libre de enfermedad, mientras que el resto acaba de iniciar el calendario vacunal. Se presentarán los resultados actualizados. Aunque hace falta más tiempo de seguimiento tanto en los pacientes progresados como en el resto, parece que la vacuna con CD podría tener un efecto beneficioso contra el GB.

## O-119. ESTRATEGIAS DE INMUNOTERAPIA PARA EL TRATAMIENTO DEL LINFOMA FOLICULAR: VACUNA IDIOTÍPICA E INMUNOTERAPIA COMBINADA DE LAK + RITUXIMAB

A. López Díaz de Cerio, S. Inogés Sancho, C. Panizo Santos, H. Villanueva Ruiz, M. Legarrea Goñi, P. Rubio Bermejo, A. González Muñoz y M. Bendandi

Laboratorio de Inmunoterapia, Área de Oncología, CIMA, Pamplona. Área de Terapia Celular y Servicio de Hematología, CUN, Pamplona.

Los linfomas no Hodgkin son la neoplasia hematológica más frecuente en EEUU y en Europa, siendo la cuarta parte linfoma folicular (LF). El LF es una neoplasia de células B maduras que actualmente se considera incurable. Por eso, hay que buscar alternativas terapéuticas. Estamos llevando a cabo un protocolo con vacunas idiotípicas en pacientes con LF. La vacuna idiotípica consiste en la inmunoglobulina tumor específica conjugada con KLH y administrada con GM-CSF. Analizando los resultados de los 25 pacientes con más seguimiento, podemos concluir que los pacientes que responden inmunológicamente a la vacuna (20/25) tienen una segunda remisión completa superior a la esperable con quimioterapia sola. Además, en estos pacientes, la duración de la segunda remisión completa supera la de la primera remisión alcanzada con quimioterapia ± rituximab ( $p < 0,0001$ ), por lo que concluimos que la vacuna idiotípica cambia la historia natural de la enfermedad. Se presentarán los datos actualizados de todos los pacientes. Por otra parte, en los últimos años ha crecido el interés en el uso de anticuerpos monoclonales (AcMo). De hecho el tratamiento de primera línea del LF se basa en la administración de quimioterapia junto con un anticuerpo anti-CD20 (rituximab). Puesto que uno de los mecanismos de acción predominantes de los anticuerpos es la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC), el tratamiento combinado de rituximab + células efectoras autólogas expandidas "in vitro" podría potenciar la acción del rituximab solo. En este sentido, se presentará el ensayo clínico que acabamos de iniciar.

## O-120. RESPUESTA INMUNE A NANOVACUNAS: ESTUDIOS IN VITRO E IN VIVO

M. Peleteiro Olmedo, J.F. Correia Pinto, B. Díaz Freitas, A. Hernández Fernández, M.J. Alonso Fernández y A. González Fernández

Centro de Investigaciones Biomédicas, Inmunología, Universidad de Vigo, Pontevedra. Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica, Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña.

**Introducción:** La vacunación ha sido uno de los grandes éxitos en la historia de la medicina, sin embargo tiene algunos inconvenientes como son la necesidad de refrigeración, el uso de je-

ringas y la necesidad de múltiples dosis. En este contexto la nanomedicina puede ayudar a desarrollar vacunas más eficaces y termoestables, de una sola dosis, o que puedan administrarse por vías alternativas (vía mucosa, oral, vaginal). Los estudios convencionales para testar vacunas suelen iniciarse con ensayos en ratones, y es necesario buscar métodos alternativos de screening de los distintos prototipos que pueda permitir obviar el uso de animales.

**Objetivos:** Diseño de métodos in vitro que sirvan como primeros pasos para el screening de prototipos de nanovacunas, previo a confirmar su efectividad en modelos in vivo.

**Material y métodos:** Se testaron dos prototipos de nanovacunas poliméricas (proporcionadas por el grupo de la Dra. María José Alonso) en presencia de proteína recombinante de antígeno de hepatitis B (HBsAg). Se utilizaron marcados o no con fluorocromos (TAMRA-5, SE). Estudios de internalización de nanovacunas (M. confocal), producción de citocinas, modulación de marcadores de activación CD80, CD86 (por citometría) fueron realizados

con macrófagos peritoneales de ratón y con la línea murina Raw 264.7. La activación de complemento humano se realizó mediante Western blot. Estudios in vivo: ratones BALB-c fueron inmunizados por vía intranasal o intramuscular, y tras diversos sangrados los anticuerpos IgG específicos frente al HBsAg se testaron mediante ELISA indirecto.

**Resultados:** En los estudios in vitro los dos prototipos comparados estudiados indujeron internalización, con buena captación de las nanovacunas, pero no se observó activación celular (escasa producción de citocinas, no modulación de marcadores de activación, y pequeña activación de complemento). La respuesta sérica observada en los ratones fue muy baja también en ambos casos, incluso tras varias inmunizaciones.

**Conclusiones:** Existe correlación entre los ensayos in vitro e in vivo realizados, ya que los prototipos utilizados no inducen una buena respuesta inmune en ninguno de los dos casos. Estamos continuando el estudio con otros prototipos en la actualidad para seguir confirmando la correlación entre ambos métodos.