



XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Española de Inmunología

Pamplona, 8-11 de junio de 2011

PÓSTERS

AUTOINMUNIDAD

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

P-001. IMPORTANCIA DEL SCREENING DE AUTOANTICUERPOS EN EL DIAGNÓSTICO Y SEGUIMIENTO DEL DÉFICIT DE IGA

M.I. Alcalá Peña, M.L. Vargas Pérez, J. Melero Ruiz, C. García Roiz, M.J. Fernández-Cavada Pollo y E. Hidalgo Barquero

Complejo Hospitalario Universitario de Badajoz.

Objetivos: El déficit selectivo de IgA (sIgAD) es la principal causa de derivación a las consultas de Inmunología Clínica. La asociación entre esta inmunodeficiencia y el desarrollo de enfermedades autoinmunes (EAI) hace recomendable la realización de un screening de autoanticuerpos a estos pacientes. Nuestro objetivo es estudiar la prevalencia de autoanticuerpos y EAI en pacientes con sIgAD.

Material y métodos: Se recogen datos de 48 pacientes diagnosticados de sIgAD en la consulta de Inmunología Clínica del Hospital Infantil Cristina de Badajoz, con edades comprendidas entre 4 y 61 años. El 54,2% son adultos, y el 45,8% pacientes pediátricos.

Resultados: De nuestra serie de 48 pacientes, un 16,7% tenía ya diagnosticada alguna EAI al comienzo del estudio. Sin embargo, hasta un 70,8% de la serie presentaron, al inicio o durante el seguimiento, positividad para alguno de los autoanticuerpos estudiados. Una paciente desarrolló una EAI en el transcurso del seguimiento. Se trató de una niña de 9 años de edad con diagnóstico de celiaquía e hipotiroidismo, a la que se diagnosticó de sIgAD, detectándose un título elevado de anticuerpos antinu-

cleares. A los seis meses aumentó este título, apareciendo además anticuerpos anti DNA nativo. Este hallazgo permitió un diagnóstico precoz de lupus eritematoso sistémico, aun antes de la aparición de síntomas.

Conclusiones: Existe una alta asociación entre el sIgAD y la patología autoinmune. El estudio de autoanticuerpos resulta muy útil en el seguimiento de estos pacientes, ya que posibilita el diagnóstico precoz de EAI.

P-002. ESTUDIO DE ANTÍGENOS DE LA FAMILIA HERPESVIRIDAE RECONOCIDOS POR LA IgG PRESENTE EN LCR DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

R. Alenda Asensi, R. Álvarez Lafuente, S. Mirete Bachiller, J. Coll Martín, J.C. Álvarez Cermeño y L.M. Villar Guimerans

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Objetivos: Puesta a punto de un método para el estudio de antígenos virales reconocidos por IgG presente en LCR de pacientes con esclerosis múltiple (EM). Se ensayaron extractos del virus herpes humano 6 (HHV-6), virus de Epstein-Barr (EBV) y virus del herpes simple 1 (HSV-1).

Material y métodos: Pacientes: 15 con EM; 8 con forma recidivante-remitente (RR) y 7 con forma primariamente-progresiva (PP) y 8 controles. Detección de bandas oligoclonales de IgG (BOC): isoelectroenfoque e inmunodetección. Lisados virales (ABI): HHV-6A (cepa GS), EBV (cepa B95-8), HSV-1 (cepa MacIntryre).

Resultados: La IgG de LCR se purificó mediante cromatografía de afinidad sobre proteína G sefara. Se unió la IgG de cada paciente a una microcolumna de sefara 4B activada. Se pasaron por cada columna 50 o 100 µg de extractos virales. A continuación las columnas se lavaron y se eluyeron con dietilamina 50 mM pH 11.5. Las proteínas eluídas se analizaron mediante SDS-PAGE y tinción de plata. Se obtuvo una banda de alrededor de 60 kD a partir del virus HHV-6 en 3 pacientes con EMPP y un paciente con EMRR y una de 50 kD del extracto del EBV que se unía a la IgG de 3 pacientes con EMRR.

Conclusiones: Este método permite seleccionar los antígenos reconocidos por las inmunoglobulinas de los pacientes de forma nativa. Permite el ensayo de múltiples muestras virales. Nuestros resultados sugieren una asociación entre diferentes antígenos virales y las distintas formas de EM.

P-003. ANTICUERPOS ANTI-GANGLÍOSIDOS EN ENCEFALOPATÍA AUTOINMUNE

R. Alenda Asensi, F.G. Silva Carreras, I. Toboso de Lamo, S. Merina Heras, I. Hernández Medrano y A. Carrasco Sayalero

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivo: Demostrar la asociación de los anticuerpos anti-gangliosidos con un cuadro clínico de encefalopatía y temblor generalizado.

Material y métodos: Mujer de 29 años de edad con antecedentes de parálisis cerebral infantil. Anticuerpos anti-mycoplasma IgM y VHC positiva. Afectación aguda del SNC con manifestaciones clínicas de encefalopatía y temblor como único signo de afectación del tronco. Realizamos detección de anticuerpos IgM e IgG anti-gangliosidos mediante Inmunoblot (euroimmun) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

Resultados: Se observaron 2 bandas a nivel de los antígenos GM2 y GM3 isótipo IgM por Inmunoblot. El paciente fue tratado con corticosteroides e inmunoglobulinas humanas iv, los cuales no modificaron el cuadro neurológico. Posteriormente fue tratado con anti-CD20 (rituximab) resolviendo el cuadro neurológico.

Conclusiones: La efectividad del tratamiento con rituximab confirma la naturaleza autoinmune del cuadro neurológico en asociación con la presencia de anticuerpos anti-gangliosidos. La detección de estos anticuerpos ayudó a orientar hacia un diagnóstico de etiología autoinmune.

P-004. ESTUDIO COMPARATIVO DE UN NUEVO SISTEMA QUIMIOLUMINISCENTE PARA LA DETERMINACIÓN DE ENA INDIVIDUALES Y LUMINEX

M.B. Aparicio Hernández, F. Moreno Obregón y J.A. Navajo Galindo

Laboratorio de Autoinmunidad, Hospital Universitario de Salamanca.

Objetivos: Realizamos un estudio comparativo preliminar de un nuevo sistema automatizado quimioluminiscente (Zennit-Ra) para la determinación de autoantígenos nucleares extraíbles (ENA) individuales y Luminex (Citrometría Flujo).

Material y métodos: Para este estudio se analizaron en paralelo 78 muestras enviadas a nuestro laboratorio procedentes de Atención Primaria y diferentes áreas del hospital. Todas las muestras fueron estudiadas por ANA IFI ($> 1/80$) y posteriormente se determinaron los autoanticuerpos más comunes que reaccionan específicamente con los ENA con mayor significación clínica: SSA/Ro, SSB/La, RNP, SM, Scl-70 y Jo-1. El punto de corte establecido por los fabricantes para el analizador Luminex fue de 20 U/mL mientras que para el Zennit Ra fue de 10 U/ml. Para el análisis de datos se ha utilizado el programa Microsoft Excel de Office, calculando las rectas de regresión y los coeficientes de correlación de Pearson.

Resultados: Las rectas de regresión obtenidas y los coeficientes de correlación de Pearson entre los dos métodos son los siguientes, SSA R² = 0,80 ($y = 0,95x$); SSB R² = 0,86 ($y = x$); RNP R² = 0,69 ($y = 0,84x$) y Jo1 R² = 0,49 ($y = 0,5x$) y los coeficientes de correlación: SSA (R = 0,89), SSB (R = 0,93), RNP (R = 0,83) y Jo1 (R = 0,70).

Conclusiones: En nuestro estudio preliminar, la correlación entre el nuevo método de análisis automatizado de quimioluminiscencia (Zennit-Ra) y el Luminex es buena, aunque se continuará ampliando el estudio para poder correlacionar todos los Enas (como ocurre con Scl-70 y Sm que no se pudo obtener correlación por escasos resultados positivos).

P-005. EVALUACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTITRANSGLUTAMINASA Y ANTIGLIADINA DEAMIDADA COMO MÉTODO DE SCREENING EN LA ENFERMEDAD CELÍACA EN POBLACIÓN PEDIÁTRICA MENOR DE 5 AÑOS

A. Bermejo Becerro, M. Sáenz Cuesta, L. Arriarán Arones, E. Cuadrado del Barrio, P. Echániz Aizpuru, M. de Juan Echavarri, M. Rey Rey, F.J. Eizaguirre Arocena y A. Prada Iñurrategui

Inmunología, Gastroenterología Infantil, Hospital Donostia, San Sebastián.

Objetivo: Evaluar los anticuerpos antitransglutaminasa (ATG) IgA y antigliadina deamidada (AGA) IgA como "screening" en población inferior a 5 años.

Material y métodos: Se analizan los resultados de un año en pacientes con sospecha de EC. A los positivos se les realizó el tipaje HLA (HLA DQ2/DQ8) biopsia intestinal y fenotipaje de los LIEs. El diagnóstico se estableció con criterios clínicos, analíticos y anatopatológico.

Resultados: Se analizaron 730 pacientes. Celiacos 23 pacientes (3,15%), ATG positivo 22. AGA positivo 22, Tipaje HLA: HLA DQ2: 21 p, HLA DQ2/DQ8 2 p, LIEs compatible con EC 23 pacientes. Biopsia intestinal: MARSH 3a: 2 pacientes, MARSH 3b: 11 p, MARSH 3c: 4 p, No valorable 3 p, Negativos 3 p. 684 fueron negativos para ambos test AGA (N) y ATG (N). 22 fueron positivos para AGA (P) y ATG (P). 17 fueron AGA (P) y ATG (N), 7 fueron TG (P) y AGA (N). Presentaron déficit de IgA 9 p. AGA-IgG y ATG IgG. Negativos. El valor diagnóstico de los ATG fue S (95,6%), E (99%), VPP (75,8%) y VPN (98,1%) El valor diagnóstico de los AGA fue S (95,6%), E (96,9%), VPP (50%) y VPN (99,5%) Curvas ROC: ATG Área. 957. AGA Área. 955.

Conclusiones: 1. Los ATG IgA y los AGA IgA son útiles y complementarios en el "screening" de EC en población pediátrica con edad inferior a los 5 años. 2. Los ATG IgA presentan especificidad y valor predictivo positivo más altos. Mientras que los AGA IgA mayor valor predictivo negativo.

P-006. INFLUENCE OF AIRE POLYMORPHISMS ON ITS EXPRESSION AND IN GRAVES-BASEDOW DISEASE

R. Colobran Oriol, M.P. Armengol Barnils, E. Porta Pardo, R. Faner Canet, O. Martorell Alemany y R. Puig Borrell

Banc de Sang i Teixits, Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques, Badalona, Barcelona.

Fundació IGTP, Badalona, Barcelona. Universitat Autònoma de Barcelona. Unitat d'Immunologia, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona.

Autoimmune regulator (AIRE) gene plays a fundamental role in the expression of a range of tissue restricted antigens by mTECs, a step required to establish central tolerance. AIRE mutations lead to type-1 autoimmune polyglandular syndrome (APS-1) but other than these mutations, AIRE polymorphisms that influence its thymic expression have not been reported. Of interest, as AIRE is located in chromosome 21, Down syndrome (DS) individuals should have an excess of AIRE expression but, paradoxically, they show a higher incidence of organ specific autoimmune diseases (i.e. thyroid autoimmunity). The aim of this study is to analyze the influence of AIRE polymorphisms on its expression and their possible autoimmunity predisposing effects using our collection of 200 normal and 19 DS thymic samples and of 140 gDNA from Graves' disease (GD) patients. 27 AIRE SNPs were genotyped in controls and GD samples and a case-control analysis was performed. Results showed no

significant associations. Interindividual variation in thymic expression was however large in both normal and DS thymic glands (coefficient of variation 59% and 68% respectively). Using allele specific quantification we ruled out that these large variability is mainly due to the effect of cis-acting polymorphisms. Strikingly, no gene dose effect was observed in the DS thymi in spite of the fact that we demonstrated that the three copies are expressed. As a general conclusion, AIRE gene expression is unaffected by cis acting elements and gene dosage which do not preclude an overall large individual variability in the level of thymic expression.

P-007. LINFOCITOS CD4+CD25-FOXP3+ EN ARTRITIS REUMATOIDE. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON GLUCOCORTICOIDEOS

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

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

Objetivos: Investigar la expresión de FOXP3 no asociada a CD25 en células T CD4+ de pacientes con artritis reumatoide (AR) y evaluar su significado clínico y asociación con el tratamiento.

Métodos: Se analizó la expresión de FOXP3 y la acumulación intracelular de citocinas (IL-10, TNF α , IFN γ e IL-17) en linfocitos CD4+ mediante citometría de flujo en 29 controles y 146 pacientes en los que se determinó la actividad de la enfermedad. La presencia del polimorfismo genético asociado con una buena respuesta al tratamiento con corticoides (-1082 IL-10GG) se determinó mediante amplificación e hibridación con sondas aleloespecíficas.

Resultados: Se observó un incremento en el porcentaje de linfocitos CD4+CD25-FOXP3+ en pacientes de AR comparado con controles. El análisis de las características clínicas mostró una fuerte correlación negativa entre esta población y la actividad de la enfermedad (DAS28 y otros parámetros clínicos). Además, los pacientes tratados con corticoides y portadores del genotipo -1082GG presentaban niveles significativamente más elevados de linfocitos CD25-FOXP3+ y de células que expresaban IL-10 que los pacientes portadores de otros genotipos, mientras que los niveles relativos de células TNF α +, IL-17+ e IFN γ + eran menores. Finalmente, este efecto del genotipo sobre la respuesta a los corticoides fue corroborado en un grupo de pacientes analizados antes y después del tratamiento.

Conclusiones: Pacientes portadores del genotipo bien respondedor a corticoides (-1082 IL-10GG) presentan un incremento en la población de linfocitos CD4+CD25-FOXP3+ que está asociado con una menor actividad de la enfermedad y una disminución en los niveles relativos de células productoras de TNF α , IL-17 e IFN γ en pacientes de AR.

P-008. ANÁLISIS DE LIGANDOS DE MOLÉCULAS DE HLA DE CLASE I EN TIMO HUMANO

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

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

Objetivos: El timo es el órgano donde maduran los linfocitos T y se genera el repertorio de linfocitos circulantes. Durante su maduración, los timocitos contactan con complejos for-

mados por péptidos propios asociados a moléculas de HLA. Para poder generar un repertorio de linfocitos T inmunocompetente y no autorreactivo, el conjunto de péptidos que es presentado por las células presentadoras del timo debe representar todas los potenciales ligandos que los linfocitos T podrán ver en periferia, incluyendo aquellos derivados de antígenos específicos de tejido (TRAs). No se conoce qué péptidos llevan a cabo la selección positiva de los linfocitos T CD8+. Las moléculas de HLA de clase I se expresan en el timo en multitud de tipos celulares, incluidos los propios timocitos, lo que puede ser relevante en la selección de diferentes tipos de linfocitos T CD8+. Hasta ahora no hay apenas datos sobre los péptidos restringidos por los antígenos de HLA de clase I que se presentan en el timo. En este trabajo nos hemos propuesto analizar el repertorio peptídico asociado a dichas moléculas en timo humano.

Material y métodos: Se utilizaron 5 muestras de timo humano obtenidas de cirugía pediátrica coronaria. El tejido se homogeneizó y las moléculas de HLA de clase I se purificaron mediante cromatografía de inmunofijación en columnas que contenían el anticuerpo monoclonal W6/32, específico de las moléculas de HLA de clase I. Los péptidos se purificaron mediante elución ácida y ultrafiltración con centriprep-3. En algunas muestras, los péptidos asociados a HLA de clase I se fraccionaron mediante cromatografía de intercambio iónico y en otras se analizaron directamente. Finalmente, los péptidos se analizaron por LC-MS usando una columna de fase reversa acoplada a un espectrómetro de masas de trampa iónica.

Resultados: Se han identificado 71 ligandos naturales que se han podido asignar como binders de alguno de los alelos expresados en la muestra correspondiente. No se ha encontrado ningún péptido proveniente de TRAs.

Conclusiones: El análisis por espectrometría de masas de los péptidos asociados a HLA de clase I en timo humano ha permitido identificar 71 ligandos que provienen en su mayoría de proteínas nucleares y citoplasmáticas. No se ha encontrado ningún péptido proveniente de TRAs.

P-009. IMPORTANCIA DE LA MOLÉCULA HLA DQ8 EN EL DESARROLLO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA EN ADULTOS

M.J. Fernández-Cavada Pollo, L. Vargas Pérez, M. García Cerrada, C. González Roiz e I. Alcalà Peña

Hospital Universitario Infanta Cristina, Badajoz.

Objetivo: Demostrar la importancia de la molécula HLA DQ8 en la enfermedad celíaca del adulto.

Material y métodos: Estudio de 306 pacientes diagnosticados de celiacos, distribuidos en 133 adultos y 173 niños, a los que determinamos mediante biología molecular el heterodímero DQA1*05 DQB1*02 y la molécula HLA DQ8 (DQB1*0302) Los datos se analizan utilizando el paquete estadístico SPSS 17.0.

Resultados: El 14,2% de los pacientes celíacos diagnosticados en edad adulta presentan exclusivamente la molécula HLA DQ8, siendo el heterodímero negativo, frente a un 5,7% de la población celíaca infantil. La molécula HLA DQ8 está presente en el 21% de los enfermos celíacos adultos frente a un 11,5% de los celíacos infantiles, resultado estadísticamente significativo ($p = 0,024$).

Conclusiones: La molécula HLA DQ8 se puede considerar como un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad celíaca en adultos.

P-010. INCREASED PLASMA CALPROTECTIN AND S100A8 RELATIVE GENE EXPRESSION LEVELS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS OF PATIENTS WITH PSORIASIS AND SUBCLINICAL ATHEROSCLEROSIS

S. García Rodríguez, S. Arias Santiago, R. Perandrés López, E.C. Zumaquero Martínez, P. Navarro Cuesta, J. Orgaz, A. Buendía, J. Sancho López y M. Zubiaur Marcos

Department of Cellular Biology and Immunology, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Armilla, Granada. Dermatology Department, Hospital Universitario San Cecilio, Granada.

Introduction: Patients with psoriasis autoimmune-mediated inflammatory skin and joints disorder have an increased incidence of cardiovascular disease (CVD) and cardiovascular risk factors (CVRF), such as, increased risk for metabolic syndrome (MS) and its individual components according to ATP-III criteria.

Methods: Psoriatic patients with different CVRF were studied and the carotid artery intima-media thickness (CIMT) was assessed: patients with MS and carotid atheroma plaque (AtP) ($n = 10$), with MS without AtP ($n = 6$), and without MS and non AtP ($n = 16$). We analyzed mRNA and protein expression levels of S100A8 and S100A9 in PBMC and its association with plasma cytokines and Calprotectin. Changes in the ratio of relative gene expression of T-helper transcription factors were assessed.

Results: Patients with MS and AtP had significantly greater CIMT than those with MS without AtP or those without MS and non AtP. Correlation between CIMT and PASI severity index was observed ($r = 0.488$; $p = 0.0046$, $N = 32$). Plasma IL-6, IL-2, IFN- γ , TNF- α , IL-10 and IL-13 were increased in patients with psoriasis and higher CVRF. Correlation between disease duration and RORC transcription factor (Th17) relative mRNA levels was observed ($r = 0.41$; $p = 0.0227$, $N = 31$). Plasma Calprotectin was significantly elevated in patients with CIMT ≥ 1 vs patients with CIMT < 1 and vs controls. Increased S100A8 relative gene expression ($p = 0.0338$) and moderate increase in S100A9 relative gene expression were observed in patients with CIMT ≥ 1 . Calprotectin plasma levels correlated with S100A8 relative gene expression levels, and with neutrophils.

Conclusions: Elevated levels of S100A8/A9 in psoriasis might be associated with CVRF.

P-011. INCIDENCIA DE ENFERMEDAD CELÍACA EN DIABÉTICOS TIPO 1 EN LOS ÚLTIMOS 20 AÑOS EN LA PROVINCIA DE CÁCERES

J.A. García Trujillo, S. Romero Chala, C. Cámera Hijón, P. Barros García, M.J. López Rodríguez y L. Fernández Pereira

Laboratorio de Inmunología; Servicio de Pediatría, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres.

Objetivo: Determinar la incidencia de EC en pacientes con DM en nuestra provincia en los últimos 20 años.

Material y métodos: Estudio observacional, retrospectivo de pacientes menores de 14 años diagnosticados de DM y EC entre 1991-2010. Screening de EC (EMA IgA o TRG IgA) al debut de DM y anualmente. Confirmación diagnóstica mediante estudio histológico y tipaje HLA.

Resultados: De 310 pacientes diagnosticados de DM en los últimos 20 años, 15 presentaron EC (4,83%). Nos llamó la atención el incremento de incidencia en los últimos 10 años. De 1991 a 2000 hubo 2 casos de 121 DM (1,6%) mientras que de 2001 a 2010 hubo 13 de 189 (6,87%). Odds Ratio 4,39 ($p = 0,036$). Rango de edad al diagnóstico de EC: 2-13,9 años. Media 8,8 años. Sexo: 9

hombres/6 mujeres. Clínica: solo un paciente presentaba clínica, siendo el resto asintomáticos. Diagnóstico de EC: se realizó al debut en el 33,3% de los pacientes. El tiempo medio de evolución de la DM previo a la detección de EC fue de 1,3 años. Grados de Marsh de las lesiones histológicas: 57,1% 3b, 21,4% 3a, 14,3% 3c y 7,2% 2. Todos eran HLA DQ2. Tras la retirada del gluten, el 100% negativizó los marcadores.

Conclusiones: Casi el 5% de los niños diabéticos presentaron EC, la mayor parte de ellos de forma silente. No encontramos razones metodológicas para el incremento de la incidencia de EC en los últimos 10 años (4 veces más). Destacamos la utilidad de los programas de screening de EC, tanto al diagnóstico, como en el control anual.

P-012. CONCORDANCIA DEL SCREENING DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR TECNOLOGÍA MULTIPLEX E INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

S. Lermo Rojo, M.D. Talise, P. Talayero, D.M. Valero, M. Sevilla, P. Suárez, A. Valero, E. Paz-Artal y A. Serrano

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Introducción y objetivos: La determinación de los anticuerpos antinucleares (ANA) se suele realizar mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2. Existen métodos alternativos basados en paneles de抗ígenos como el ELISA o la tecnología Multiplex, que presentan mayor reproducibilidad. En un estudio previo de nuestro grupo sobre 500 sueros se describió una discrepancia entre tecnología Multiplex e IFI del 12%. El presente estudio evalúa un grupo mayor de muestras.

Material y métodos: Se procesaron 2.150 sueros recibidos en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre entre mayo y septiembre de 2010. Los sueros se analizaron mediante tecnología Multiplex (Bioplex 2200-Bio-Rad) e IFI en células HEp-2.

Resultados: De las 2.150 muestras, 297 (14%) resultaron positivas y 1.655 (77%) negativas por ambos métodos. Evaluando la IFI, se observó un 9,2% de falsos negativos y un 9,2% de falsos positivos. Respecto a la tecnología Multiplex, se observó un 36,1% de falsos positivos y un 1,8% de falsos positivos.

Conclusiones: Tras la ampliación del número de sueros incluidos en este estudio, se observan únicamente diferencias en el porcentaje de falsos positivos por IFI (9,2% actual frente al 34,6% obtenido en el estudio anterior). Debido a la reproducibilidad variable que presenta la IFI, el aumento del tamaño muestral consigue corregir estas diferencias, obteniendo resultados más fiables. Los resultados obtenidos confirman además la elevada sensibilidad de la tecnología Multiplex y su utilidad como método de screening.

P-013. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD DE LOS MÉTODOS DE SCREENING DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES: TECNOLOGÍA MULTIPLEX FRENTE A INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

S. Lermo Rojo, P. Talayero, D.M. Valero, M.D. Talise, M. Sevilla, P. Suárez, A. Valero, E. Paz-Artal y A. Serrano

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Introducción y objetivos: Los anticuerpos antinucleares (ANA) se vienen determinando mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre células HEp-2, aunque recientemente se desarrollaron métodos de ANA-screening con paneles de抗ígenos. El objetivo de este estudio es analizar los casos positivos me-

diente tecnología Multiplex que mostraron resultados negativos por IFI en HEp-2.

Material y métodos: Se procesaron 2.100 sueros recibidos en el Servicio de Inmunología del Hospital 12 de Octubre entre diciembre de 2010 y febrero de 2011. Los sueros se analizaron mediante tecnología Multiplex (Bioplex 2200-Bio-Rad). Las muestras Multiplex positivas (MP+) se confirmaron mediante IFI en células HEp-2. Los resultados discordantes entre Multiplex e IFI se procesaron con inmunoblot.

Resultados: El 20,5% de los sueros resultaron MP+, y de ellos, el 39,1% resultaron negativos por IFI (IFI-) en células HEp-2. La mayoría de estas muestras mostraron especificidad frente a SS-A/Ro (39,6%) y RNP (27,6%). El 52,1% de las muestras MP+ IFI-, reprodujeron las mismas especificidades cuando fueron testadas por inmunoblot.

Conclusiones: El mayor porcentaje de muestras MP+ se debe a una mayor sensibilidad de esta técnica frente a la IFI ya que al menos el 52% de los sueros MP+ IFI pueden considerarse verdaderos positivos al ser confirmados por inmunoblot. El resto de muestras MP+ no confirmadas por blot no deberían considerarse directamente falsos positivos ya que podrían tratarse de anticuerpos predictivos. En el futuro deberá considerarse ajustar los puntos de corte del Multiplex, así como realizarse estudios prospectivos que aclaren el valor predictivo de estos anticuerpos.

P-014. ESTUDIO DE LA SÍNTESIS INTRATECAL DE INMUNOGLOBULINAS EN RATONES RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES A LA ENCEFALOMIELITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL

N. Marín Crespo, M.J. Mansilla, J.C. Álvarez Cermeño, X. Montalbán Gairín, C. Guaza Rodríguez, C. Espejo Ruiz y L.M. Villar Guimerans

Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid. Instituto de Recerca, Hospital Universitario Vall d'Hebron, Barcelona. Instituto Cajal, Madrid.

Objetivos: Estudio de la síntesis intratecal de inmunoglobulinas con distintos protocolos de inmunización, en cepas de ratones resistentes y susceptibles de desarrollar encefalomielitis autoinmune experimental (EAE) mediante inmunización con el péptido encefalítogénico PLP139-151.

Material y métodos: Detección de bandas oligoclonales (BOC) de IgM e IgG en suero y líquido cefalorraquídeo (LCR) de ratón mediante isoelectroenfoque e inmunodetección. Análisis de suero y LCR de ratones SJL y Balb/c inmunizados con adyuvante completo de Freund (ACF), toxina pertussis, ACF y toxina pertussis e inmunización completa con el péptido PLP139-151 a día 14 postinmunización.

Resultados: Se detecta la presencia de un patrón de BOC en espejo de IgG en ratones SJL con inmunización completa y en el 40% de los inmunizados con ACF. No se detecta respuesta oligoclonal de IgG en ratones Balb/c. Se observa un patrón de BOC en espejo de IgM en el 20% de los SJL inmunizados con toxina pertussis. En los ratones SJL con inmunización completa se detecta síntesis intratecal de IgM en los períodos de actividad de la enfermedad y patrón en espejo en los períodos de remisión.

Conclusiones: No existe síntesis intratecal de IgG en este modelo de EAE. Existe una respuesta periférica que pasa al sistema nervioso central en ratones susceptibles. Esta respuesta no se asocia con la actividad de la EAE. En cambio se observa síntesis intratecal de IgM que aparece en los ratones susceptibles durante los períodos de actividad de la enfermedad.

P-015. ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTINUCLEOLARES EN EL LABORATORIO ASISTENCIAL DE AUTOINMUNIDAD

M.J. Martínez Becerra, M.M. González García-Parreño, M. Sánchez Blázquez, R. Vidal García, P. Tramón Gutiérrez, J. Rodríguez Iglesias, O. Sánchez Pernaute y C. Serrano del Castillo

Servicio de Inmunología; Unidad de Microscopía Confocal, Servicio de Apoyo a la Investigación; Servicio de Reumatología; Servicio de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Objetivo: Identificar especificidades antigenicas asociadas a anticuerpos con patrón nucleolar por inmunofluorescencia indirecta (IFI), así como su asociación clínica.

Material y métodos: Estudio prospectivo de 800 sueros. Los que presentaron patrón nucleolar se analizaron por ELISA de cribado de Anticuerpos Antinucleares [QUANTA-Lite®-(1) y ELIA CTD®-(2)] y de Antígenos Extraíbles Nucleares [QUANTA-Lite® ENA6-(3)]. Las positividades se estudiaron mediante ELIA® IgG-ImmunoCap (Phadia®). Como especificidades asociadas a patrón nucleolar se determinaron: anti-Scl70, anti-RNA-Pol-III y anti-PM-Scl.

Resultados: El 1,8% mostró patrón de IFI nucleolar, siendo el más frecuente nucleolar-moteado. El 29% fue positivo para anti-Scl70 y el 29% anti-RNA-Pol-III. En un 50% no se identificó especificidad. El 86% de los antinucleolares fueron positivos por ELISA1, 57% por ELISA2 y 36% por ELISA3. ELISA3 detectó los antígenos que incorpora. ELISA1 y ELISA2 captaron el 75% de anti-RNA-Pol-III y el 100% de anti-Scl70, anti-SSA/Ro, anti-centrómero y anti-DNAdb. El 29% fue positivo solo por ELISA1 y no reveló ninguna especificidad antigenica estudiada. El diagnóstico más frecuente fue Esclerosis Sistémica (SSc).

Conclusiones: Se confirma la baja prevalencia de anticuerpos antinucleolares que no son siempre detectados por ELISA de cribado, aunque algunos llegan a captar un 86%. No todos los anti-RNA-Pol-III se detectaron por ELISA de cribado, a pesar de que ELISA2 incorpora el antígeno purificado. En un alto porcentaje de antinucleolares no se identifica especificidad antigenica, aunque en estos el diagnóstico no siempre se asocia a enfermedad autoinmune. El alto valor predictivo, especialmente en el contexto de SSc, obliga a caracterizar el patrón de IFI y estudiar posibles identidades.

P-016. ASOCIACIÓN CLÍNICA Y UTILIDAD DIAGNÓSTICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-SSA/RO 60 Y 52

A. Menéndez González, E. Escanlar Monteserín, J. Gómez Arbesu y L. Mozo Avellaneda

Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos: Determinar la asociación clínica y utilidad diagnóstica de la presencia simultánea y aislada de los anticuerpos anti-SSA/Ro60 y 52.

Material y métodos: Se revisó el diagnóstico de 218 pacientes positivos para anti-SSA/Ro60 y/o anti-SSA/Ro52 detectados mediante blot, estableciéndose cinco grupos: lupus eritematoso sistémico (LES) (69), síndrome de Sjögren (SS) (48), otras conectivopatías (52), otras enfermedades autoinmunes (25) y patologías no autoinmunes (24).

Resultados: La prevalencia de enfermedades autoinmunes en el grupo anti-SSA/Ro60 positivo era independiente de la presencia de anti-SSA/Ro52 y significativamente mayor que en los pacientes con únicamente anti-SSA/Ro52 ($p < 0,05$). De hecho, la reactividad aislada anti-SSA/Ro52 era la más prevalente en el grupo de patologías no autoinmunes (62,5%). En el LES y SS, la presencia simultánea de los dos Ac era superior a la aislada. Al analizar

los pacientes de LES y SS con reactividad aislada, se observó que el LES se asociaba significativamente con anti-SSA/Ro60 ($p < 0,05$) mientras que los pacientes con SS tenían una mayor prevalencia de anti-SSA/Ro52. En el grupo de otras conectivopatías y de otras enfermedades autoinmunes, las frecuencias de reactividad simultánea y aislada anti-SSA/Ro52 eran similares y superiores a la de únicamente anti-SSA/Ro60.

Conclusiones: Los Ac anti-SSA/Ro60 se asocian con patologías autoinmunes y LES. En otras enfermedades autoinmunes y en patologías no autoinmunes, la presencia aislada de anti-SSA/Ro52 es más frecuente que la de anti-SSA/Ro60. Los distintos patrones de reactividad dependientes de la patología analizada detectados en este trabajo apoyan la detección e informe independiente de los anticuerpos anti-SSA/Ro60 y 52.

P-017. ANTICUERPOS ANTI-SSA/RO60 Y 52: ASOCIACIÓN CON MANIFESTACIONES CLÍNICAS EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

A. Menéndez González, L. Mozo Avellaneda y J. Gómez Arbesu
Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos: Determinar la prevalencia y las posibles asociaciones clínicas de los anticuerpos (Ac) anti-SSA/Ro52 y SSA/Ro60 en el lupus eritematoso (LES).

Material y métodos: Se seleccionaron 153 pacientes que cumplían los criterios del ACR para el LES. Sus características y la evaluación de la actividad mediante el índice SLEDAI estaban disponibles en la base de datos del registro del LES establecido en Asturias desde 2003. La determinación de anti-SSA/Ro60 y anti-SSA/Ro52 se realizó mediante ELISA.

Resultados: El 37,9% de los sueros analizados eran positivos para anti-SSA/Ro60 y/o 52. De estos pacientes, el 55,2% presentaban reactividad simultánea, el 41,4% solo anti-SSA/Ro60 mientras que únicamente el 3,4% presentaban reactividad aislada anti-SSA/Ro52. Los dos tipos de Ac se asociaban con fotosensibilidad ($p < 0,05$), Raynaud ($p < 0,05$), queratoconjuntivitis seca ($p < 0,05$) y síndrome de Sjögren secundario (SSs) ($p < 0,05$). Al analizar conjuntamente los pacientes con queratoconjuntivitis seca y/o SSs, comprobamos que el 53,4% eran positivos para anti-SSA/Ro60 y/o 52 mientras que la reactividad frente a alguno de estos Ac solo se presentaba en el 21,0% del resto de pacientes ($p < 0,001$). Además, los Ac anti-SSA/Ro52 se asociaron a la presencia de citopenias ($p < 0,05$). Los niveles de los dos autoAc eran muy estables en el tiempo no encontrándose correlación con el SLEDAI.

Conclusiones: En el LES, la presencia de Ac anti-SSA/Ro60 y/o 52 puede definir un subgrupo de pacientes con mayor probabilidad de padecer SSs. Ambos Ac también se asocian a fotosensibilidad y Raynaud mientras que la asociación con citopenia es exclusiva de los Ac SSA/Ro52.

P-018. ANTICUERPOS ANTIHIPÓFISIS EN PACIENTES CON SOSPECHA DE HIPOFISITIS AUTOINMUNE

P. Nozal Aranda, M. Alba Domínguez, J.M. Torres Canizales, M.C. Salcedo Moreno, C. Álvarez Escalá y R. Álvarez Doforno
Unidad de Inmunología; Servicio de Endocrinología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Objetivos: La hipofisitis linfocitaria es una enfermedad autoinmune rara, que está frecuentemente asociada a otras endocrinopatías. El objetivo del estudio es determinar la prevalencia de anticuerpos antihipófisis (AAH) y otros anticuerpos órgano específicos en pacientes con sospecha y diagnóstico de hipofisitis autoinmune.

Material y métodos: Durante los años 2006-2010 se determinó la presencia de AAH, anticuerpos anti islotes pancreáticos (ICAs), antiadrenales (ACAs), anti ovario/testículo mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre los distintos tejidos de mono, y la presencia de anticuerpos antitiroideos por EliA InmuNoCap 250, en 77 pacientes con endocrinopatías y 13 controles sanos, agrupados de la siguiente manera: 1. Insuficiencia suprarrenal secundaria aislada, ($n = 14$). 2. Deficiencias hormonales hipofisarias aisladas, ($n = 4$). 3. Hiperprolactinemia idiopática, ($n = 8$). 4. Síndrome poliglandular autoinmune, ($n = 14$). 5. Silla turca vacía, ($n = 14$). 6. Hipofisitis linfocitaria y panhipopituitarismo, ($n = 23$). 7. Controles, ($n = 13$).

Resultados: Se han detectado AAH en un 17,4% de los pacientes con hipofisitis, 21,4% de los pacientes con insuficiencia suprarrenal secundaria y con síndrome poliglandular autoinmune, 14,3% de aquellos con silla turca vacía y en un 12,5% de los pacientes con hiperprolactinemia idiopática. El 69,2% de los pacientes con AAH positivos presentaban también positividad para alguno de los otros anticuerpos estudiados. Durante el seguimiento se encontró seroconversión en 4 de los pacientes con AAH.

Conclusiones: Los AAH aunque son raros, se detectan en un amplio rango de enfermedades autoinmunes endocrinas incluyendo la hipofisitis linfocitaria, encontrándose frecuentemente asociados a otros autoanticuerpos. La utilidad clínico-diagnóstica de los AAH no está aún bien definida debido a sus diferentes reactividades, por lo que sería imprescindible identificar las especificidades en cada una de las patologías a las que están asociados para esclarecer su papel en ellas.

P-019. INFLUENCIA DE LA INMUNOGENICIDAD EN LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO A LARGO PLAZO CON INFILIXIMAB EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE

D. Pascual-Salcedo Pascual, C. Plasencia Rodríguez, S. Ramiro Latienda, L.N. Nuño, G. Bonilla Hernán y A. Balsa Criado

Servicios de Inmunología y Reumatología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.

Introducción: Infliximab es un anticuerpo monoclonal químérico frente al TNF. A pesar de la eficacia inicial del fármaco en pacientes con artritis reumatoide (AR), algunos pacientes pierden la capacidad de respuesta a lo largo del tratamiento.

Objetivos: Analizar la relevancia clínica de la producción de anticuerpos anti-infliximab en pacientes con AR en tratamiento con infliximab.

Métodos: Se analizaron las características clínicas, niveles séricos de infliximab y anticuerpos anti-infliximab en 85 pacientes con AR en tratamiento con infliximab. La actividad de la enfermedad se midió por el "Disease Activity Score 28" (DAS28) (basal, 6 meses, 1 año y > 4 años) y por la respuesta EULAR.

Resultados: Los anticuerpos anti-infliximab se detectaron en 28 (32,9%) pacientes. Todos los pacientes no respondedores (EULAR) tenían anticuerpos contra el fármaco. Los niveles de anticuerpos fueron superiores en los pacientes no respondedores que en los respondedores durante todo el período de estudio. Nueve pacientes (10,5%) desarrollaron reacciones infusionales, todos con anticuerpos anti-infliximab. Los pacientes con anti-infliximab requirieron con mayor frecuencia incrementar la dosis del fármaco o acortar intervalo de administración (51,7%) ($p = 0,032$) y tuvieron una supervivencia del tratamiento con infliximab más (4,15 años vs 8,89 años en los pacientes sin anti-infliximab) ($p = 0,0006$). El tratamiento combinado con metotrexato se asoció con niveles más bajos de anticuerpos ($p = 0,073$) y con una mayor supervivencia del fármaco ($p = 0,015$).

Conclusiones: La formación de anticuerpos anti-infliximab se asocia con peor respuesta clínica, aparición de reacciones infusionales y la interrupción más precoz del tratamiento.

P-020. LOS GLUCOCORTICOIDES AUMENTAN EL DESBALANCE TH17/TH1 Y LA EXPRESIÓN DE STAT3 EN PACIENTES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

C. Prado Cueto, B. de Paz Cazón, J. Gómez Arbesú, P. López Suárez, J. Rodríguez Carrío y A. Suárez Díaz

Área de Immunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias (IPLA, CSIC), Villaviciosa.

Objetivos: Analizar las poblaciones Th17 y Th1 en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y el efecto que los tratamientos o las características clínicas pueden tener sobre ellas.

Material y métodos: Se determinaron los porcentajes de linfocitos T CD4+ IL-17+IFN γ - (Th17) e IFN γ +IL-17- (Th1) mediante citometría de flujo en 75 pacientes de LES y 19 controles sanos. La expresión génica de STAT3, STAT4, IL-6R e IL-12R se analizó en 30 pacientes y 8 controles mediante RT-PCR a tiempo real. Estos datos se relacionaron con parámetros clínicos y con el tratamiento seguido durante los últimos tres meses.

Resultados: Se encontró un incremento significativo de las células Th17 y el ratio Th17/Th1 en los pacientes de LES tratados con corticoides en comparación con controles, pacientes no tratados o pacientes bajo otros tratamientos. La actividad de la enfermedad (SLEDAI) se correlacionó con el ratio Th17/Th1 solo en los pacientes tratados con corticoides. No se encontró asociación con parámetros clínicos, pero los pacientes anti-ENA+ mostraron incrementada su respuesta Th17. Asimismo, la expresión génica de STAT3 e IL-6R estuvo significativamente elevada en los pacientes de LES bajo tratamiento corticoideo.

Conclusiones: Este trabajo muestra que el desbalance Th17/Th1 en el LES está relacionado con el uso de glucocorticoides y sugiere que este efecto podría deberse a su capacidad para aumentar la expresión de STAT3 e IL-6R. Además, la presencia de anticuerpos anti-ENA en los pacientes de LES podría ser utilizado como un biomarcador que indicaría desviación hacia respuesta Th17.

P-021. UTILIDAD DEL ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DIFERENCIAL (2D-DIGE) Y LA ESPECTROMETRÍA DE MASAS PARA LA IDENTIFICACIÓN EN SUERO DE POSIBLES CANDIDATOS A MARCADORES DE LA ARTRITIS INDUCIDA POR COLÁGENO DE POLLO

A. Rosal Vela, J. Postigo, S. García Rodríguez, E. Zumaquero, M.V. Longobardo, A. Lario, P. Navarro, R. Merino, J. Merino, M. Zubiaur y J. Sancho

Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander. Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC, Santander.

Introducción: Los ratones B6 silvestres (WT) desarrollan una artritis crónica inducida por colágeno de pollo (AIC) más parecida a la artritis reumatoide (AR) humana que otros modelos con colágeno bovino, con una prolongada respuesta T dependiente contra el colágeno autólogo y presencia de autoanticuerpos anti-colágeno en el suero. La ausencia de CD38 atenúa la severidad de la enfermedad.

Objetivos: Búsqueda en el suero de proteínas con expresión diferencial entre ratones WT y CD38ko inmunizados con colágeno tipo II de pollo.

Métodos: Sueros de ratones WT y CD38ko que desarrollaron o no la AIC fueron fraccionados mediante Proteominer y posterior marcaje 2D-DIGE. Primera y segunda dimensión en sistemas Protein IEF Cell y Criterion (BioRad), respectivamente. Digitalización de los geles mediante Typhoon Imager 9400 y el software DeCyder 6.0 (GE) para el análisis de expresión diferencial. Proteínas identificadas por espectrometría de masas (MS-MALDI-TOF) y validación por Western-blot.

Resultados: El análisis ANOVA de dos vías indicaba que unas 20 proteínas se expresaban diferencialmente dependiendo de si se trataban de sueros de ratones WT o CD38ko (1^a condición), o de ratones afectados o no por AIC (2^a condición). Para la 1^a condición siete proteínas estaban aumentadas en WT y cuatro en CD38ko. Para la 2^a condición tres proteínas en ratones afectados por AIC+ y seis en ratones AIC-.

Conclusiones: La mayoría de las proteínas con expresión diferencial entre los cuatro grupos analizados participan en procesos inflamatorios y se correlacionan con la distinta respuesta de los ratones WT y CD38ko a la inmunización por colágeno.

P-022. REGENERATING GENE 1A IS A NEW BIOMARKER FOR DIAGNOSISMONITORING OF CELIAC DISEASE

E. Ruiz Ortiz de Arrizabaleta, R. Planas Bas, I. Pujol Autonell, M. Montraveta Querol, E. Cabré Gelada, A. Lucas Martín, R. Pujol Borrell, E. Martínez Cáceres y M. Vives Pi

Laboratori d'Immunologia i Diagnòstic Molecular, LIRAD, Banc de Sang i Teixits, Institut de Recerca Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. Departament de Pediatría; Departament e Gastroenterologia; Departament d'Endocrinologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. Centro de Investigación Biomédica en Red de Enfermedades Hepáticas y Digestivas, CIBERehd, Barcelona. Departament de Biología Celular, Fisiología e Immunología, Universitat Autònoma de Barcelona.

The Regenerating gene (Reg) is a multi-gene family tightly linked with tissue repair and regeneration. REG1A protein is expressed in the pancreas and the gastrointestinal tract and is involved in the pathophysiology of gastritis, pancreatitis, cancer, inflammatory bowel disease and type 1 diabetes (T1D). Celiac disease (CD) is an autoimmune disorder of the small intestine, affecting nearly 1% of most populations. CD is caused by a reaction to gliadin, a prolamin (gluten protein) found in wheat, in genetically susceptible individuals. Our aim was to determine if serum REG1A concentration reflects the destructive/regenerative process that takes place at the small bowel in CD patients. REG1A levels were determined by ELISA in 40 patients with active CD. In 18 of them REG1A determination was repeated after following a gluten free diet. Autoantibodies to transglutaminase, gliadin and endomysium were also measured. REG1A was also assessed in other autoimmune diseases of the gastrointestinal tract and digestive glands, Type 1 Diabetes (T1D) and Pernicious Anemia (PA), both groups at clinical onset. We found a significant increase in REG1A in the sera of CD patients when compared to controls. REG1A levels decreased after gluten-free diet together with a significant reduction of anti-transglutaminase antibodies. Pediatric T1D and adult PA patients displayed normal serum REG1A concentrations although adult T1D patients showed lower levels of this protein when compared to controls. In conclusion, we present evidence that REG1A is a new molecular marker for the diagnosis and monitoring of CD.

P-023. ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS POSITIVOS OBTENIDOS TRAS LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDO CÍCLICO CITRULINADO EN UN LABORATORIO DE AUTOINMUNIDAD

M. Sánchez Blázquez, M.J. Martínez Becerra, R. Vidal García, P. Tramón Gutiérrez, J. Rodríguez Iglesias, O. Sánchez Pernaute, I. Mahillo Fernández y C. Serrano del Castillo

Servicio de Inmunología; Servicio de Reumatología; Unidad de Epidemiología y Metodología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Introducción: Los anticuerpos anti-péptido cílico citrulinado (anti-PCC) se determinan por su especificidad y VPP para la artritis reumatoide (AR) aunque también se describen en otras enfermedades.

Objetivos: Analizar los diagnósticos que se asocian a la presencia de anticuerpos anti-PCC y los niveles encontrados.

Material y métodos: Se determinaron los anticuerpos anti-PCC por ELISA en 1.102 muestras. Se revisó la historia clínica de los pacientes con anti-PCC positivo.

Resultados: El 16,24% (179/1102) fueron positivos. El 83,8% estaban diagnosticados de AR (Grupo-0) o de AR de inicio (ARI) (Grupo-1). El 16,20% fueron artritis no AR (Grupo-2) u otras enfermedades osteoarticulares (Grupo-3). Los valores de anti-PCC fueron más elevados en AR ($p: 0,0225$). No se encontraron diferencias en los niveles de anti-PCC de AR y de ARI. Los grupos 2 y 3 presentan niveles de FR más bajos ($p: 0,0164$). El 39,66% (71/179) tenían estudios de tuberculosis: el 23,4% de las AR tenían tuberculosis activa frente al 71,4% de los pacientes sin AR ($p: 0,0164$).

Conclusiones: Los anticuerpos anti-PCC no son específicos de AR. No hay diferencias en los niveles detectados en ARI y AR bien establecida. Se encontraron niveles elevados asociados a otros diagnósticos clínicos aunque los resultados de anti-PCC y FR son más bajos. La proporción de pacientes con artritis, anti-PCC y tuberculosis activa es elevada aunque fueron pocos los pacientes a los que se les descartó la infección. La aparición de los anticuerpos años antes del diagnóstico de AR nos obliga a seguir el comportamiento sintomático del enfermo aunque no siempre desarrollarán la enfermedad.

P-024. ESTUDIO DE ANTICUERPOS ANTIGANGLÍOSIDOS: DETECCIÓN POR ELISA

F.G. Silva Carreras, R. Alenda Asensi, I. Toboso de Lamo, S. Medina Heras y A. Carrasco Salayero

Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos: Evaluar una técnica por ELISA para la detección de anticuerpos anti-gangliósidos.

Material y métodos: Ocho pacientes (p8) con enfermedad neuropática y anticuerpos antigangliósidos positivos detectados por Inmunoblot: dos con síndrome de Miller-Fisher (p1 GQ1+IgG y p2 GQ1+IgM), cuatro con síndrome de Guillain-Barré (p4 y p5 con GM1+IgM, p3 y p8 GM2+IgM), uno con polineuropatía crónica sensitivo-motora (p6 GD1b+IgM y GD1a+IgG) y uno con síndrome de tronco encefálico (p7 GM2+ GM3+ y GD1b+IgM). La positividad del Inmunoblot se determinó por unidades de intensidad: < 11U negativo, 11-25U (+), 26-50U (++) y > 50 (+++). Se realizó un ELISA (Bülmann®) de cada uno de los sueros de estos pacientes siguiendo las recomendaciones establecidas por el fabricante. Se determinó la positividad de cada gangliósido según los rangos recomendados: < 30% negativo, 30-50% (+), 50 y 150% (++) y > 150% (+++). Se observaron los anticuerpos anti-gangliósidos detectados por el ELISA y se compararon con el Inmunoblot.

Resultados: Detección del ELISA para cada gangliósido. GM1: pacientes p4, p5, p6 y p7. asialo-GM1: p4, p5, p6 y p7. GM2: no detectado. GD1a: p4 y p7. GD1b: p4, p6 y p7. GQ1b: p2, p5, p7 y p8.

Conclusiones: El ELISA parece ser un buen método de detección para pacientes con sospecha de Guillain-Barré. El GQ1b+ del ELISA correlaciona con los cuatro casos de enfermedad neuropática desmielinizante no siendo exclusivo del síndrome de Miller-Fisher. El ELISA no detectó los casos en el que el inmunoblot mostraba anticuerpos antigangliósidos del isotipo IgG.

P-025. EVALUACIÓN DEL KIT ANTI-TRANSGLUTAMINASA TISULAR DE NUEVA GENERACIÓN COMO ÚNICO MÉTODO DE SCREENING PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ASOCIADOS A ENFERMEDAD CELÍACA

P. Talayero Giménez de Azcárate, S. Lermo-Rojo, M. Sevilla, P. Suárez, A. Valero, E. Paz-Artal y A. Serrano

Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Introducción: El Hospital 12 de Octubre recibe aproximadamente 500 muestras mensuales para la determinación de anticuerpos asociados a enfermedad celiaca (gliadina y transglutaminasa), resultando un 4% de las muestras positivas para al menos uno de los anticuerpos. El aumento de la demanda por parte de Atención Primaria (50% de las muestras recibidas) o la existencia de otros anticuerpos no detectados por el método actual, fomentan la búsqueda de nuevos métodos que permitan una determinación fiable con el mínimo coste. La aparición de kits diagnósticos de EC de nueva generación que emplean transglutaminasa recombinante humana unida a péptidos específicos de gliadina, permiten la detección de mayor variedad de anticuerpos (gliadina, gliadinas unidas, gliadina unida a transglutaminasa y transglutaminasa sola) en un único test.

Objetivos: Evaluación del kit anti-transglutaminasa tisular IgA (Bio-Rad) como método de screening de anticuerpos asociados a EC.

Métodos: Se testaron muestras de 40 pacientes analizadas previamente mediante ELISA Celikey® y Gliadin IgA antibodies (VarxEliSA®, Phadia): 15 muestras negativas para ambos (5 con valores límites para anti-gliadina y 3 con valores límites para anti-transglutaminasa), 10 muestras anti-gliadina+ anti-transglutaminasa-, 5 muestras anti-gliadinaanti- transglutaminasa+ y 10 muestras positivas para ambos.

Resultados: Todas las muestras con alguno de los anticuerpos positivos resultaron positivas con el nuevo kit, detectándose además las muestras con valores límite. No aparecieron falsos negativos y solo un falso positivo.

Conclusiones: El kit anti-transglutaminasa tisular de nueva generación resulta válido como único método de screening para la detección de anticuerpos asociados a EC debido a su elevada sensibilidad.

P-026. UTILIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GLIADINA DESAMINADA EN EL DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA

P. Talayero Giménez de Azcárate, S. Lermo-Rojo, M. Sevilla, P. Suárez, A. Valero, E. Paz-Artal y A. Serrano

Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Introducción: El diagnóstico serológico de la enfermedad celíaca (EC) se basa principalmente en la detección de anticuerpos anti-transglutaminasa, aunque en algunos casos también se sigue empleando la determinación de anticuerpos anti-gliadina

que resultan de menor especificidad. Entre los pacientes con al menos uno de los dos anticuerpos positivos, existe un grupo numeroso (71%) que presentan únicamente anticuerpos anti-gliadina, no llegando a presentar nunca anticuerpos anti-transglutaminasa y dando lugar en muchas ocasiones a un diagnóstico incierto y confuso. Recientemente se ha descrito en pacientes con EC la existencia de anticuerpos anti-gliadina desaminada, de mayor especificidad que los anticuerpos anti-gliadina clásicos.

Objetivos: Determinación de la utilidad en el diagnóstico de EC de los anticuerpos anti-gliadina desaminada en un grupo de pacientes con anticuerpos anti-gliadina positivos y anti-transglutaminasa negativos mantenidos en el tiempo.

Métodos: Se determinó la presencia de anticuerpos anti-gliadina desaminada mediante EliA GliadinDP® en 40 muestras de pacientes analizadas previamente mediante ELISA Celikey® y Gliadin IgA antibodies (VarEliSA®, Phadia) que habían resultado anti-gliadina+anti-transglutaminasa+.

Resultados: De las 40 muestras testadas, 17 resultaron positivas para anticuerpos anti-gliadina desaminada mientras que 23 de ellas presentaron valores negativos. De las muestras positivas, solo 4 de ellas correlacionaron con biopsia intestinal patológica para EC.

Conclusiones: Aunque los anticuerpos anti-gliadina desaminada presentan mayor especificidad que los anticuerpos anti-gliadina clásicos, no terminan de resultar un marcador de EC tan específico como los anticuerpos anti-transglutaminasa. La determinación de estos anticuerpos podría ser sin embargo complementaria en aquellos pacientes con anticuerpos anti-transglutaminasa positivos para el seguimiento de la enfermedad.

P-027. CARACTERIZACIÓN DE EMIGRANTES RECIENTES TÍMICOS (PTK7+) Y LINFOCITOS TH17 EN ESCLEROSIS MÚLTIPLE Y SU POSIBLE PAPEL EN SU PATOGENIA

A. Teniente Serra, L. Grau López, M.J. Martínez Arconada, M. Fernández Sanmartín, C. Ramo Tello, R. Pujol Borrell y E. Martínez Cáceres

LIRAD-BST; Unidad de Esclerosis Múltiple, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. Unidad de Citometría, Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona.

Introducción: Desde el descubrimiento del papel de la tolerancia central en el síndrome poliglandular autoinmunitario (APE-CED), se está valorando el papel de un fallo en la tolerancia central en el desarrollo de las enfermedades autoinmunes. Un aumento de células T reciente emigradas del timo (RTEs), y/o de células B de la médula ósea, apoyaría esta hipótesis.

Objetivos: Caracterizar fenotípicamente en pacientes con esclerosis múltiple (EM) los RTEs (CD45RA+CCR7+CD31+PTK7+) y linfocitos B transicionales (LBtrans; CD19+CD24hiCD38hiCD27-) en el contexto de las distintas subpoblaciones linfocitarias de sangre periférica, para conocer mejor su papel en la patogenia de la EM.

Material y métodos: Sangre periférica de 23 donantes (DS) del Banc de Sang i Teixits de Catalunya y 32 pacientes con EM del Hospital Germans Trias i Pujol (24 EMRR, 4 EMPP y 3 EMSP). Análisis por citometría de flujo de los estadios de maduración de linfocitos T (CD3/CD4/CD8/CD45RA/CCR7/CD27/CD31/PTK7), Th17 (CD4+CCR6+CCR4+CCR7-) y linfocitos B (CD19/CD24/CD38/CD27).

Resultados: No se han observado diferencias entre DS y EM en el porcentaje de RTEs ($3,81 \pm 3,06$ vs $3,49 \pm 1,54$, $p = 0,65$) y LBtrans ($8,60 \pm 3,88$ vs $10,06 \pm 5,50$, $p = 0,33$), respectivamente.

Sin embargo, se han detectado diferencias en la subpoblación CD4 memoria efectora (CD45RA-CCR7-CD27+) ($24,47 \pm 8,13$ vs $19,53 \pm 5,35$, $p < 0,01$), así como un incremento de los linfocitos Th17 en EM ($5,75 \pm 2,01$ vs $8,57 \pm 3,05$, $p < 0,05$).

Conclusiones: Los resultados de este estudio preliminar no apoyarían un papel de la tolerancia central en la patogenia de la EM, sino que sugerirían que una pérdida de los mecanismos de tolerancia periférica podría estar involucrada en el desarrollo de la enfermedad.

P-028. EXPRESIÓN DE PERFORINA EN TREG EN EL LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO DE PACIENTES EN BROTE CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

M. Tejera Alhambra, L. Valor, B. Alonso, R. Teijeiro, C. de Andrés, E. Fernández-Cruz y S. Sánchez-Ramón

Servicios de Inmunología y Neurología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción: Los linfocitos T reguladores (CD4+CD25+FoxP3+) presentan una función alterada en la esclerosis múltiple (EM). Se sabe que ejercen citotoxicidad frente a otras células autólogas a través de un mecanismo dependiente de contacto celular. La vía de la perforina/granzima podría ser un mecanismo relevante de inmunosupresión.

Objetivos: Estudiar la presencia y expresión de perforina de linfocitos Treg CD4+ en líquido cefalorraquídeo (LCR) y sangre periférica (SP) de pacientes en brote con EM. Comparar la expresión de perforina frente a controles sanos.

Material y métodos: Se analizaron en paralelo mediante citometría de flujo multiparamétrica muestras de LCR y de SP de pacientes con EM ($n = 17$, 4 varones y 13 mujeres) y la SP de controles sanos ($n = 42$, 17 varones y 25 mujeres).

Resultados: Se observó un enriquecimiento de linfocitos Treg: CD4+CD25+FoxP3+ ($p = 0,01$) y CD4+CD25+high ($p = 0,002$) en LCR respecto a SP. En el LCR, la expresión intracelular de perforina era mayor en porcentaje en los linfocitos CD4+CD25+FoxP3+ ($p = 0,005$) y en CD4+FoxP3+ tanto en porcentaje ($p = 0,001$) como en intensidad media de fluorescencia (MFI) ($p = 0,002$). En la periferia del grupo control se observó una menor MFI de perforina de los controles respecto a los pacientes en CD4+CD25+high ($p = 0,004$) y la misma tendencia en CD4+CD25+FoxP3+ ($p = 0,1$) que si alcanzó diferencias significativas al comparar solo a los varones ($p = 0,04$).

Conclusiones: En nuestra cohorte de pacientes de EM durante el brote observamos una mayor expresión de perforina en los linfocitos Treg que se encuentran en el compartimento central y una mayor expresión de perforina en la periferia respecto a controles sanos.

P-029. DIMORFISMO SEXUAL EN LAS CÉLULAS T REGULADORAS PRESENTES EN EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL DE PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE

M. Tejera Alhambra, B. Alonso, C. de Andrés, R. Teijeiro, L. Valor, E. Fernández-Cruz y S. Sánchez-Ramón

Servicios de Inmunología y Neurología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción: En la esclerosis múltiple (EM) las diferentes subpoblaciones de linfocitos T reguladores CD4+ y CD8+ participan en la supresión de la respuesta efectora.

Objetivos: Determinar la contribución de estos linfocitos T reguladores en el SNC de hombres y mujeres con EM durante el brote.

Material y métodos: Se analizaron en paralelo mediante citometría de flujo multiparamétrica muestras de líquido cefalorraquídeo (LCR) y de sangre periférica (SP) de pacientes con EM ($n = 17$, 4 varones y 13 mujeres) y SP de controles sanos ($n = 29$, 17 varones y 12 mujeres).

Resultados: En el SNC los varones con EM presentaban proporciones mayores de linfocitos T CD8+ reguladores (CD8+FoxP3+, $p = 0,02$). Mientras que las mujeres presentaban porcentajes mayores de linfocitos Treg CD4+:CD4+CD25+high ($p = 0,02$); CD4+CD25+FoxP3+ ($p = 0,06$). En la periferia de los pacientes se observó una tendencia de mayores proporciones de linfocitos T CD4+CD25+FoxP3+ en mujeres que en hombres ($p = 0,1$). La proporción de linfocitos T CD8+ totales observada en SP era mayor en hombres que en mujeres ($p = 0,002$). En el grupo control el porcentaje de linfocitos CD4+CD25+high fue más abundante en mujeres que en hombres ($p = 0,004$).

Conclusiones: En nuestra cohorte de pacientes en primer brote de EM observamos un dimorfismo sexual en las poblaciones de linfocitos T reguladores en el SNC. Los varones presentan un mayor porcentaje de linfocitos T CD8+ reguladores, mientras que las mujeres presentan mayores proporciones de linfocitos Treg CD4+. Estos datos podrían indicar que la inmunorregulación está sometida a un control por hormonas sexuales que podría explicar diferencias en la incidencia y severidad de la enfermedad según el sexo.

P-030. ¿ESTÁN LOS NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-TRANSGLUTAMINASA RELACIONADOS CON LA LINFOCITOSIS INTRAEPITELIAL CARACTERÍSTICA DE LA ENTEROPATÍA CELÍACA?

I. Toboso de Lamo, F.G. Silva Carreras, C. Camarero, A. de Andrés Martín y G. Roy Ariño

Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos: La enteropatía celíaca (EC) se debe a una atrofia villositaria del intestino delgado por un proceso inmune específico frente al gluten, en personas genéticamente predispuestas. Los anticuerpos anti-transglutaminasa (tTG) constituyen la expresión de una respuesta inmune específica en la lámina propia y son un marcador eficaz de la EC. Del mismo modo, los linfocitos intra-epiteliales (LIEs) en pacientes celiacos muestran un fenotipo característico y son los efectores de la respuesta inmune innata que tiene lugar en el epitelio. Determinar si los niveles de tTG correlacionan con el fenotipo y densidades de los LIEs y establecer algún nexo entre la intensidad de la respuesta inmune innata y la adquirida a nivel de la mucosa duodenal.

Material y métodos: 228 biopsias diagnósticas de pacientes celiacos activos, confirmadas por anatomía patológica y con tTG positivos. Los parámetros definidos han sido analizados estadísticamente mediante una correlación de Pearson.

Resultados: El coeficiente de correlación entre los niveles séricos de tTG y el % de LIEs totales respecto al epitelio, % de linfocitos TCRγδ y % CD3- CD7+ en la mucosa duodenal, no fue significativo en ninguno de los tres casos (0,111, 0,010 y -0,222, respectivamente).

Conclusiones: Los niveles de tTG no se correlacionan con el aumento de LIEs totales en pacientes con enteropatía celíaca, ni con la intensidad de los cambios en el porcentaje de las subpoblaciones TCRγδ y CD3- CD7+. Por tanto, los niveles de tTG no reflejan la intensidad de la respuesta inmune innata que tiene lugar en el epitelio de pacientes con enteropatía celíaca.

P-031. ESTUDIO COMPARATIVO DE 2 KITS COMERCIALES PARA LA DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS FREnte A PR3 MEDIANTE TÉCNICA DE ELISA

S. Toro Llamas, I.M. Martínez Morán, F. Torrecillas Nicolás, A. Osuna Molina, T. García González, M.A. Montes Cano y A. Núñez Roldán

Servicio de Inmunología, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla.

Objetivos: Evaluar dos métodos de análisis cuantitativo de anticuerpos frente a proteína-3 (PR3) en pacientes con sospecha de vasculitis mediante técnicas de ELISA.

Material y métodos: Se incluyeron un total de 92 pacientes (40 hombres y 48 mujeres), con una edad media de 50 ± 24 años, y remitidos desde diferentes consultas para estudio de anticuerpos frente a PR3. La concentración de anticuerpos anti-PR3 se realizó utilizando dos variantes (PR3 y PR3S) de la casa comercial Phadia. La determinación se llevó a cabo mediante el analizador automático Inmuno CAP-250. Los datos fueron analizados mediante el paquete estadístico SPSS.

Resultados: Cuando analizamos el grupo completo de pacientes encontramos que un 46,7% (43/92) y un 33,7% (31/92) fueron positivos para los anticuerpos frente a PR3 y PR3S respectivamente. Del total de los pacientes incluidos en el estudio, en 31 se diagnosticó una vasculitis sistémica, y en 20 de ellos se estableció un diagnóstico definitivo de enfermedad granulomatosa de Wegener (GW). Al analizar los resultados en los pacientes con GW obtuvimos que un 85% (17/20) fueron positivos para PR3, mientras que solo el 75% (15/20) de los pacientes presentaron anticuerpos positivos para PR3S. Los resultados de sensibilidad y especificidad para PR3 y PR3S fueron de (85% y 75%) y de (64% y 76,4%) respectivamente.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que aunque la sensibilidad del método PR3 para determinación de autoanticuerpos frente a proteína-3 es ligeramente más sensible que el método PR3S, la especificidad de este último es superior.

P-032. LAS CONDICIONES DE POLARIZACIÓN HACIA LINFOCITOS TH17 Y LA REDUCCIÓN DE TH1 FAVORECEN LA SÍNTESIS DE GALECTINA-1: CASO PARA LA DIABETES TIPO 1 HUMANA

R. Varela Calviño, I. Gómez Touriño, C. Sánchez Espinel, A. Hernández Fernández, A. González Fernández, E. Pena González, J. Rodríguez García y J. García López

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Farmacia; Departamento de Medicina, Facultad de Medicina, Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña. Área de Inmunología y Unidad Compartida de Inmunología, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Universidad de Vigo, Pontevedra. Servicio de Endocrinología, Hospital do Meixoeiro, Complejo Hospitalario Universitario de Vigo, Pontevedra. Laboratorio Central; Servicio de Endocrinología, Complejo Hospitalario Universitario de Santiago, A Coruña.

Objetivos: Determinar la expresión y secreción de galectina-1 por distintos tipos de linfocitos T CD4 y evaluar posibles diferencias en la síntesis de esta lectina immunomoduladora por parte de linfocitos obtenidos de pacientes diabéticos de tipo 1 (T1D).

Material y métodos: Se determinó la síntesis y secreción de galectina-1 mediante ELISA de linfocitos T CD4 tipo Th1, Th2 y Th17 así como de células mononucleares periféricas CD4 negativas. Esta determinación se realizó a partir de células obtenidas de sujetos sanos y pacientes con T1D.

Resultados: Las condiciones de polarización in vitro hacia linfocitos Th17 inducen la síntesis de niveles elevados de galectina-1 en comparación con linfocitos polarizados hacia una respuesta Th1. En el caso de la T1D, células mononucleares periféricas obtenidas de estos pacientes secretan niveles significativamente más bajos de galectina1 en comparación con sujetos sanos. Dicha secreción reducida tiene lugar en un ambiente dominado por citocinas pro-inflamatorias tipo Th1 y es debida fundamentalmente a la baja secreción por parte de células CD4-. Sorprendentemente, linfocitos T CD4+ obtenidos de pacientes diabéticos secretan niveles de galectina-1 comparables a los de individuos sanos, debido probablemente a la mayor presencia de citocinas tipo Th17. La eliminación de glúcidios de superficie en linfocitos reduce la síntesis de IL-17 y eleva el ratio IFN- γ /ILg-10 en dichos cultivos.

Conclusiones: linfocitos T CD4+ de pacientes con T1D producen niveles normales de galectina-1 pero la secreción reducida de esta lectina por parte de células CD4 ayuda a mantener una respuesta proinflamatoria Th1 en estos pacientes.

P-033. ASOCIACIÓN CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-RO/SSA POSITIVOS DETERMINADOS EN EL LABORATORIO DE AUTOINMUNIDAD

R. Vidal García, M.J. Martínez Becerra, M. Sánchez Blázquez, P. Tramón Gutiérrez, J. Rodríguez Iglesias, I. Mahillo Fernández y C. Serrano del Castillo

Servicio de Inmunología; Área de Epidemiología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid.

Introducción: La clasificación clínica de pacientes positivos Ro/SSA no es siempre clara. Aunque se describen frecuentemente asociados a enfermedades autoinmunes (EAI), su hallazgo en otros contextos clínicos (NoEAI) produce confusión.

Objetivos: Evaluar la presencia de los autoanticuerpos anti-Ro/SSA positivos aislados en relación a su diagnóstico clínico y a diferentes datos analíticos.

Material y métodos: Un total de 3.943 muestras de suero recibidas entre marzo 2010-febrero 2011 son analizadas siguiendo el algoritmo de trabajo mediante ELISA Quanta Lite ANA-INOVA Diagnostics®- y QUANTA Lite ENA 6 -INOVA®-. Se compararon los positivos con los resultados IFI (INOVA®) para posteriormente confirmar los Ro/SSA mediante ELIA® IgG ImmunoCap 250 (Phadia®). Se excluyeron los resultados positivos para Sm, RNP, SS-B, Scl-70, Jo-1, CENP-B y dsDNA. Estos datos se completaron, entre otros, con los niveles de inmunoglobulinas, nº de neutrófilos y plaquetas. Los cálculos estadísticos son valorados con el Software Stata 11.

Resultados: 260 pacientes (6,59%) fueron positivos para Ro/SSA de forma aislada. Las frecuencias más altas según su diagnóstico clínico fueron SS (17,4%), LES (16,6%), AR (8,7%), LED (6,4%) y conectivopatía indiferenciada (6,4%). Los niveles de autoanticuerpos fueron significativamente más altos en pacientes con SS. Existe una correlación entre estos niveles y los de la IgG.

Conclusiones: La presencia de anticuerpos anti-Ro/SSA es frecuente y no siempre se asocia a clínica autoinmune. Los niveles no son significativamente diferentes entre los grupos EAI y NoEAI. Estos resultados indican que se debe valorar todos los datos clínicos y analíticos del paciente para evitar errores de clasificación diagnóstica.

CÉLULAS B E HIPERSENSIBILIDAD

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

P-034. EFECTO DE ESTÍMULOS DE TIPO INFLAMATORIO EN LA DINÁMICA DE LAS CÉLULAS B NAÏVE

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

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

El rastreo y encuentro de antígeno específico por las células B en el contexto de los órganos linfoides secundarios, está facilitado por CXCL13; esta quimioquina promueve a través de su receptor CXCR5 la migración de las células B sobre el network de células foliculares dendríticas, presentadoras de antígeno para células B. Sin embargo, los estímulos antigenicos no llegan aislados a los órganos linfoides secundarios, sino que pueden venir acompañados de estímulos de carácter inflamatorio con capacidad para modular la respuesta de las células B. Nuestro objetivo es estudiar en un modelo in vitro cómo estímulos de tipo inflamatorio, concretamente vía receptores tipo-Toll (TLR), afectan al comportamiento o dinámica celular de las células B naïve en respuesta a CXCL13, y, en consecuencia, su efecto sobre la capacidad de las células B para encontrar antígeno y activarse. Los resultados obtenidos hasta el momento indican que la estimulación de células B naïve vía TLR4 a dosis capaces de inducir la expresión de los marcadores de activación CD86 y CD69, alteran los niveles de expresión de CXCR5, así como también la capacidad migratoria de las células B naïve en respuesta a un gradiente quimiotáctico de CXCL13. Además, mediante el uso de un modelo bidimensional que mimetiza la superficie de las células foliculares dendríticas en combinación con técnicas de microscopía confocal en tiempo real, hemos observado que la señalización a través de TLR4 altera ciertos parámetros dinámicos de las células B en respuesta a CXCL13.

P-035. DIAGNÓSTICO DE SOSPECHA DE UN CASO DE LINFOMA INTRAOULAR MEDIANTE LA DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN HUMOR ACUOSO POR CITOMETRÍA DE FLUJO

C. Cámara Hijón, E. Rodríguez Neila, J.A. García Trujillo, C. Rodríguez Villacé, S. Romero Chala y L. Fernández Pereira

Sección de Inmunología y Servicio de Oftalmología, Complejo Hospitalario de Cáceres.

Objetivos: Valorar si la medición de citoquinas en una pequeña cantidad (25 μ l) de humor acuoso obtenido por paracentesis de la cámara anterior podría ayudar a orientar el diagnóstico ante un caso de uveítis resistente a los corticosteroides. La paciente tenía 83 años y pérdida de agudeza visual, con una exploración que mostraba vitritis, hemorragia retiniana y un área blanquecina en retina periférica.

Material y métodos: Se utilizaron los kits de Flow Cytomix de Bender MedSystems para determinación simultánea de IL6, 10, 4, 1 β y TNF α . Se analizaron en un citómetro FC500 de Coulter Systems utilizando el software CXP para la adquisición y el Flow CytomixTM Pro 2.4 para el análisis.

Resultados: Se detectaron niveles superiores a 30.000 pg/ml de IL10, 74,55 pg/ml de IL-6, siendo indetectables el resto de citoquinas estudiadas.

Conclusiones: El diagnóstico de certeza de los LIO se realiza mediante estudio de citoquinas (IL10 > 100, ratio IL10/IL6 > 1), reordenamiento del gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas y citología del humor vítreo obtenido por vitrectomía. El estudio de una mínima cantidad de humor acusoso permite orientar el diagnóstico de forma rápida para acortar el tiempo de diagnóstico definitivo de LIO, fundamental para prevenir su expansión al SNC.

P-036. MONITORING LATEX IMMUNOTHERAPY EFFICACY WITH IN VIVO AND IN VITRO METHODS (BASOPHIL ACTIVATION TEST)

J.A. García Trujillo, A. Rodríguez Trabado, S. Romero Chala, C. Cámará Hijón y L.M. Fernández Pereira

Laboratorio de Inmunología, Hospital San Pedro de Alcántara, Cáceres. Unidad de Alergología, Hospital Campo Arañuelo, Navalmoral de la Mata, Cáceres.

Background: Basophil Activation Test (BAT) has been used to monitor specific immunotherapy and other immunologist treatments, such as omalizumab. A decrease in the basophil sensitivity has been found after few months of treatment.

Clinical case: We report the case of a 47-year-old woman with acute urticaria due to latex allergy and latex-fruit syndrome. Latex sublingual immunotherapy (LSLIT) was prescribed. Two months after beginning the treatment the patient referred tolerance to kiwi intake, unknown to pineapple.

Methods and results: Total IgE: 82.1 mU/mL. Specific IgE (kU/L): latex 4.28, rHev b 6.01 1.58, negative for rHev b1, 3, 5, 8 and 11. Glove-use test before treatment: Positive (habonose lesson y hand). BAT was performed in hole heparinized blood. Basophil population was detected with CD203-FITC and basophil activation with CD63-PE. Serum saline was used as negative control and the bacterian peptide fMLP as positive. A powder latex extract was tested at different concentrations (50, 100, 250, 500 y 1000 ng/ml). An activation of at least 15% of basophils after latex stimulation was required to consider the test positive. Before treatment, BAT was positive with 250 ng/ml and higher concentrations. After two months treatment: Glove-use test: No lessons after forty minutes glove contact. BAT required concentration of 1000 ng/ml and higher to give a positive result.

Conclusions: A decrease in the basophil sensitivity, according to an improvement in the glove-use test, indicates that BAT can be useful as a non-invasive test to monitor clinical efficacy of sublingual immunotherapy with latex.

P-037. LA SECRECIÓN DE ANTICUERPOS EN CÉLULAS PLASMÁTICAS HUMANAS ESTÁ REGULADA POR LAS PROTEÍNAS SNARES

M.L. Gómez Jaramillo, L. Delgado Pérez y A. Campos Caro

Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Las células plasmáticas (CP) son el estadio final de diferenciación de los linfocitos B cuya función principal es la producción y secreción de anticuerpos, también conocidos como inmunoglobulinas (Ig) para llevar a cabo la respuesta inmune humoral. En todas las células, las proteínas SNARE participan en mecanismos de fusión de membrana entre distintos compartimentos, formando un complejo denominado "SNARE" en el que intervienen proteínas localizadas en las membranas de los dos compartimentos que se fusionan. Nuestro objetivo es definir que proteínas están forman-

do parte del complejo y a qué nivel de membrana se localizan. Para estudiar la localización subcelular de las proteínas SNARE usamos microscopía confocal en líneas de CP U266. Para ver cómo afecta funcionalmente a la secreción de Ig la inhibición de las distintas proteínas SNAREs hemos utilizado ensayos de transfección con RNA interferente (iRNA) así como líneas celulares estables con "small hairpin" RNA (shRNA) inhibidores de los SNAREs. Mediante ELISA vemos como afecta a la secreción la inhibición específica de estas proteínas. Mientras sintaxina 3 se encuentra fundamentalmente en la membrana plasmática y en una estructura citoplasmática, localizamos SNAP-23 y sintaxina 4 en la membrana plasmática. En ensayos funcionales vemos que la producción de IgE disminuye cuando inhibimos la expresión de Snap 23 en las líneas estables shRNA y que disminuye la secreción significativamente cuando además transfectamos estas células con iRNA para sintaxina 3 y sintaxina 4. Concluimos que, al menos, SNAP-23, sintaxina 3 y sintaxina 4 están implicadas en el mecanismo de secreción de anticuerpos.

P-038. CARACTERIZACIÓN DE LOS CUERPOS NUCLEARES NBS EN LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA (LLC)

R. Góngora Fernández, W. Nieto Pérez, R. Bartolomé Casado, M. Fuentes García, E. Blanco Álvarez y A. Orfao de Matos

Departamento de Medicina, Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca.

Objetivos: La leucemia linfocítica crónica de linfocitos B (LLC) es la leucemia más común en individuos adultos y su frecuencia aumenta considerablemente con la edad. Asimismo, hay individuos sanos en los que se detecta una pequeña expansión de clones de linfocitos B y que, eventualmente, pueden llegar a progresar a LLC. Este estado se conoce con el nombre de linfocitosis B monoclonal (MBL) y sus células son fenotípicamente similares a LLC. Todo ello ha llevado a considerar que la LLC puede ser una consecuencia de la senescencia "aging" de la respuesta inmune. Los cuerpos nucleares (Nbs) son complejos de proteínas presentes en el núcleo de todas las células y regulan funciones tan esenciales como el ciclo celular y la apoptosis. PML, el componente prototípico de estos Nbs puede interaccionar y regular la función de componentes claves en senescencia y cáncer tales como p53. Aquí presentamos la caracterización de los Nbs en estas células.

Material y métodos: Células leucémicas de pacientes en proceso de diagnóstico, fueron aisladas a partir de sangre periférica por separación magnética y centrifugadas a portas de vidrio, fijadas en formaldehído al 4% y teñidas con anticuerpos de interés y analizadas por microscopía confocal.

Resultados: El patrón de expresión de los Nbs no parece mostrar diferencias en los individuos analizados frente a diversos parámetros clínicos. p53 no se localiza en los Nbs.

Conclusiones: Es especialmente interesante extender el análisis a otros marcadores de senescencia y, por supuesto, comparar los resultados con individuos con diferentes grados de MBL.

P-039. AUMENTO DE LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITO B DE MEMORIA (CD27+IGM+IGD+) EN PACIENTE CON HIPERGAMMAGLOBULINEMIA IGM E HIPOGAMMAGLOBULINEMIA IGG

I. Hidalgo Izaguirre, S. Sobre Casas, S. Medina Heras, A. Andrés Martín y J. Castañer Alabau

Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos: Presentar el caso de una paciente con hipogammaglobulinemia IgG leve e hipergammaglobulinemia IgM leve con

antecedentes de patología autoinmune (psoriasis, vitíligo y cuadro artromiálgico) y diarrea crónica en la que sospecha una IDVC y se detecta una linfocitosis B de memoria policlonal funcional. **Caso clínico:** Mujer, 41 años; con diarrea crónica, descarto enfermedad celiaca. Antecedentes autoinmunes (vitíligo, psoriasis y fibroartromialgia) e infecciosos (*H. pylori* y *Blastocystis hominis*). La analítica objetiva alteraciones leves de la Inmunoglobulinas; IgG (559 mg/dL) e IgM (411 mg/dL). Subclases de IgG límite bajo de normalidad. Serología virus negativas. Respondió a vacunación. ANAS y ENAS negativos. Leucocitos (14.000 uL) y neutrofilia (11.200/uL).

Material y métodos: Estudio inmunofenotípico de subpoblaciones linfocitarias B en sangre periférica.

Resultados: Se detectó un aumento de los linfocitos B de memoria de la zona marginal-like (CD19+CD27+IgM+IgD+): 80% de los linfocitos B; 600/uL (VN: 7-32%) y células B de memoria con cambio de isótipo (CD19+CD27+IgM-IgD-) en rango bajo de normalidad: 2% de los linfocitos B; 15/uL (VN: 7-32%) y linfocitos B naïve disminuidos: 17% de los linfocitos B; 128/uL (VN: 42-82%). **Discusión y conclusiones:** La detección de esta subpoblación de linfocitos B de memoria policlonal aumentada de significado incierto (marginal zone-like) circulante productora IgM, podría estar relacionada con la activación de una respuesta T independiente debido a un estímulo antigenico mantenido (polisacáridos o autoinunitario). Este proceso linfoproliferativo policlonal se ha asociado a la aparición de la translocación t (14;18) por lo que se requiere un seguimiento estrecho por el riesgo de desarrollar linfoma.

P-040. LA INTERLEUCINA 10 POTENCIA EL EFECTO DE LAS CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS SOBRE LA INHIBICIÓN DE LA APOPTOSIS DE LOS LINFOCITOS B

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

Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC, Granada. Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, CIBM, Universidad de Granada. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Granada.

Objetivos: Las células foliculares dendríticas (follicular dendritic cells, FDC) se encuentran en los folículos linfoides, actuando de reservorio de antígenos nativos en su superficie y proporcionando señales de inhibición de apoptosis a linfocitos B foliculares. Para ello, es necesario un contacto célula-célula. Nuestro grupo ha demostrado que las FDC expresan alfa-SM-actina, proteína que dota a estas células con capacidad contractil. Citocinas tipo Th1 (IL-2, TNF y INFgamma) inducen contractilidad de las FDC, mientras que la IL-10 inhibe esa contractilidad e induce relajación de las FDC. Puesto que los cambios en la morfología determinados por la contractilidad celular afecta a la interacción célula-célula, el objetivo del presente estudio ha sido determinar si las citocinas que afectan a la contractilidad de las FDC pueden además ejercer un efecto en las FDC en la capacidad de estas células de inhibir la apoptosis de los linfocitos B.

Material y métodos: FDC y linfocitos B se obtuvieron de amigdalas procedentes de pacientes con amigdalitis (3-10 años). Las FDC fueron cultivadas en Opti-MEM y en su fase de crecimiento se procedió al estudio. Los linfocitos B fueron purificados en base a CD19. A continuación, se realizaron cultivos de FDC/B en ausencia o presencia de citoquinas y se determinó posteriormente la apoptosis de linfocitos B por cuantificación de la fase sub-G1.

Resultados: Linfocitos B cultivados con FDC y en presencia de IL-2, INFgamma y TNF, no presentaron ningún cambio en la inhibición de la apoptosis con respecto al control; en cambio, la

IL-10 indujo un aumento del efecto de la FDC en la inhibición de apoptosis de los linfocitos B.

Conclusiones: La IL-10 citocina produce relajación en FDC y aumenta la capacidad de estas células de inhibir la apoptosis de los linfocitos B.

P-041. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE SLAMS Y DE OTRAS MOLÉCULAS MODULADORAS DURANTE LA MADURACIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS HUMANAS

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

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

Objetivos: Las células plasmáticas (CP) constituyen la fase final de diferenciación del linfocito B, siendo responsables del mantenimiento de la respuesta inmune humoral. Las CP conforman un compartimento heterogéneo. Así, las CP procedentes de los órganos linfoides secundarios y de la sangre periférica (SP) muestran menor capacidad de supervivencia y de producción de anticuerpos que las CP de médula ósea (MO). El objetivo del presente trabajo fue explorar el patrón de expresión de diferentes moléculas inmunomoduladoras en CP humanas en diferentes estadios de maduración.

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. La identificación de las CP y el análisis de expresión de moléculas de superficie se realizaron mediante citometría de flujo.

Resultados: Todas la CP humanas expresaban SLAMF1 (CD150), SLAMF2 (CD48), SLAMF3 (CD229), SLAMF6 (CD352) y SLAMF7 (CD319), pero no SLAMF4 (CD244). La mayoría de las CP circulantes expresaban TNFRSF14 (CD270), BTLA (CD272), B7-1 (CD80) y B7-2 (CD86), y una importante fracción de ellas mostró positividad para TNFRSF18 (CD357), FCRL1 (CD307a) y LAIR-1 (CD305). Sin embargo, las CP de amígdala y MO solo expresaban parcialmente TNFRSF14 y B7-2, un patrón de expresión molecular similar al mostrado por linfocitos B del centro germlinal.

Conclusiones: Las CP exhiben un patrón común de expresión de proteínas SLAMF, pero difieren en el resto de moléculas reguladoras examinadas. Estas diferencias podrían estar asociadas a sus distintos requerimientos funcionales y de alojamiento.

P-042. ESPELTA: CEREAL HIPOALERGÉNICO EN ALERGIA A ALIMENTOS CON TRIGO Y ASMA DEL PANADERO

A. San Miguel Hernández, B. Martín Armentia y A. Armentia Medina

Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid.

La espelta, también conocida como dintel es una forma primitiva de trigo originaria de la zona del mar Caspio, en el suroeste de Asia. El grano parece protegido por una dura cascarilla que dificulta la trilla. Tanto para la provocación oral como bronquial se han utilizado extractos de granos de espelta fresco y, asimismo, en los test cutáneos, siguiendo procedimientos descritos en estudios anteriores. La IgE específica a los cereales se ha efectuado mediante el sistema de Immunocap (Phadia, Uppsala, Suecia). En total, se han estudiado 66 pacientes (45 varones y 21 mujeres, edad media 28,6 ± 12,9 años), dando el consentimiento informado. La provocación bronquial fue positiva para el trigo Astral en 44 (67%) pacientes que sufrían de

asma. De estos pacientes, 31 (47%) fueron positivos a la provocación por espelta. La provocación oral fue positiva en 22 (33%) pacientes (síndrome oral y urticaria) y negativa en 16 de ellos (24%). La evaluación de la rentabilidad diagnóstica de las pruebas de rutina para determinar la alergia a espelta en base a las respuestas específicas de provocación positiva ha mostrado una buena sensibilidad (94%, 86,5-99,4, IC95%) y especificidad (86%, 84 a 90, IC95%). La asociación entre las pruebas positivas para diferentes proteínas purificadas y nativas (prick e IgE) fue buena $p < 0,0001$. La inmunodetección ha detectado pequeñas diferencias entre los diferentes extractos. Las pruebas de pinchazo (test de Prick) y las de provocación oral y bronquial han detectado eficientemente la sensibilización a espelta y sus niveles han sido relacionados con perfiles clínicos severos (anafilaxia, asma) pero el área de pápula fue significativamente más baja con espelta ($p < 0,001$) y el porcentaje de ensayos de provocación positivos disminuyó. Algunas estrategias han sido utilizadas para producir cultivos hipoalergénicos, entre las siguientes tenemos: líneas de germoplasma son examinadas para detectar la ausencia o contenido reducido de determinadas proteínas alergénicas y la transformación genética se utiliza para silenciar a los genes nativos que codifican las proteínas alergénicas.

P-043. VALOR CLÍNICO DE LA IGE ESPECÍFICA A MORFINA Y FOLCODINA EN PACIENTES CON ANAFILAXIA

A. San Miguel Hernández, B. Martín Armentia y A. Armentia Medina

Hospital Universitario Río Hortega, Valladolid.

Introducción y objetivos: La anafilaxia es una reacción sistemática aguda que amenaza la vida y requiere un diagnóstico precoz para salvar la vida al paciente. Las principales causas, 50-70% de casos, son agentes bloqueadores neuromusculares (NMBA). La estructura de la morfina es similar al ión de amonio cuaternario encontrado en los NMBA. La detección de IgE específica a opiáceos puede ser un marcador para la sensibilización a NMBA en pacientes alérgicos y consumidores de heroína. Se evaluó la hipersensibilidad alérgica mediada por IgE a opiáceos en 6 pacientes, uno de los cuales, heroinómano, sufrió de anafilaxis durante la anestesia.

Material y métodos: Hemos evaluado el valor clínico de IgE específica a morfina y folcodina. Hemos utilizado extractos de semilla de opio como sustituto de extractos de heroína. Estos extractos han sido utilizados tanto para los test de provocación bronquial como cutáneos. 6 pacientes han resultado positivos en la IgE específica a semillas de opio pero ninguno de ellos ha exhibido anticuerpos frente a morfina o folcodina.

Resultados y conclusiones: 5 pacientes han resultado positivos al test cutáneo y al de provocación bronquial a extractos de cuerpos lipídicos de semillas de opio. El paciente que falleció durante la intervención tenía IgE específica a semillas de opio 6,46 KU/l. Las IgE específicas han sido analizadas posteriormente por Inmunoblot con extractos de proteínas de semillas de opio, hidro y liposolubles. Ya que es sabido, que los excipientes de fármacos, como el aceite de soja pueden ser causa de reacciones de hipersensibilidad. Los opiáceos pueden provocar ataques alérgicos comprometedores para la vida y esta posibilidad puede ser tomada en cuenta en consumidores de drogas, cuyo asma esté pobemente controlado así como en aquellos candidatos a cirugía o analgesia. Por tanto, es posible diagnosticar la sensibilidad a opiáceos (morfina, heroína, codeína, etc.) y prevenir síntomas fatales mediante métodos adecuados como son el cutáneo y la determinación de IgE específica a semillas de opio.

P-044. LA DESENSIBILIZACIÓN ORAL AL HUEVO MOVILIZA A LAS CÉLULAS TREG Y LAS CAPACITA A PROLIFERAR EN PRESENCIA DEL ALÉRGENO

J.M. Urra Ardanaz¹, R. García Rodríguez², F. Feo Brito², R. Melero Valencia¹, A. Ortega², G. Moral², I. Ródenas Garrido¹ y L. Rincón de Pablos¹

¹Inmunología; ²Alergia, Hospital General de Ciudad Real.

Introducción: En alergias alimentarias es posible inducir tolerancia a través de la administración controlada de dosis crecientes del alimento. La generación de células inhibitorias (Treg) constituye un mecanismo esencial en la inducción de tolerancia. **Objetivo:** Analizar el papel de las células Treg (CD4+Foxp3+) en un protocolo de desensibilización activa de niños con alergia al huevo.

Métodos: Células mononucleadas de pacientes sometidos a un protocolo de desensibilización al huevo ($n = 20$), pacientes no sometidos ($n = 9$) y controles sanos ($n = 9$) fueron estimuladas durante 48 horas con un 1% de clara de huevo. Se realizó un conteo de células CD4+Foxp3+ periféricas por citometría de flujo.

Resultados: Inicialmente el porcentaje de CD4+Foxp3+ circulantes es mayor en niños sanos que en niños con alergia al huevo (3,3% vs 1,0%). Sin embargo la estimulación con huevo genera una proliferación mayor de células Treg en los niños con alergia al huevo (1,5 vs 5,3, $p = 0,03$). El protocolo de desensibilización generó tolerancia a 18 de 20 niños alérgicos (90%). En ausencia de estimulación las células CD4+Foxp3+ circulantes disminuyeron en los niños sometidos a desensibilización mientras que no variaron en pacientes no sometidos al protocolo de desensibilización ($p = 0,006$). El protocolo de desensibilización incrementó la proliferación de células Treg por estimulación con huevo sin que se observaran diferencias en pacientes no sometidos al protocolo ($p = 0,01$).

Conclusiones: La desensibilización oral al huevo genera una movilización de células Treg desde sangre periférica y capacita a estas células a proliferar en presencia del antígeno.

P-045. APPLICACIONES DE LOS MICROARRAYS AL DIAGNÓSTICO ALERGOLÓGICO

M. Vilches Moreno, M.T. Martínez de Saavedra Álvarez, R. López Blanco, E. García Moreno, J.A. Brieva Romero y A. Sampalo Lainz

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

Introducción: La creciente disponibilidad de componentes alergénicos nativos y recombinantes y su incorporación a una plataforma de inmunoensayos (microarray), que permite realizar mediciones de IgE específica frente a múltiples componentes alergénicos, promete ser un arma útil para diferenciar entre alergia genuina y reactividad cruzada.

Métodos: Muestras de 60 pacientes se sometieron a un análisis multialergénico con la tecnología ISAC (análisis simultáneo de 103 alergenos pertenecientes a 40 fuentes alergénicas). Se seleccionaron pacientes con los siguientes diagnósticos: anafilaxia idiopática ($n = 9$), prescripción de inmunoterapia ($n = 11$), dermatitis atópica severa ($n = 17$), síndromes mixtos de alergia alimentaria y respiratoria ($n = 14$) y otros ($n = 9$).

Resultados: 42 muestras fueron positivas y 18 negativas. 28 pacientes presentaron alergia a proteínas de reacción cruzada entre pólennos y alimentos vegetales: 13 a proteínas transportadoras de lípidos (LTP), termoestables y capaces de inducir reacciones severas. 17 a proteínas homólogas al alergeno del abedul (Betv1) y 7 a profilinas. Ambos tipos de proteínas son ter-

molábulos y suelen asociarse a reacciones más leves. 4 mostraron reactividad a tropomiosinas (proteína de fibras musculares de ácaros y crustáceos), 4 a albúminas séricas (leche, huevo, carne...) y 1 a polcalcina.

Conclusiones: El análisis múltiple por componentes alergénicos es útil en la discriminación entre alergia a componentes individuales y reactividad cruzada, y aporta una información útil en cuanto a la actitud terapéutica y pruebas de provocación en alergia alimentaria y para el diseño de inmunoterapia.

CÉLULAS DENDRÍTICAS E INMUNIDAD INNATA

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

P-046. LÍPIDOS PROCEDENTES DEL POLEN DE OLIVO (OLEA EUROPAEA) SON CAPACES DE INDUCIR UNA RESPUESTA EN CÉLULAS INKT HUMANAS A TRAVÉS DE CD1D

B. Abós Gracia, M. Gómez del Moral Martín Consuegra, J. López Relaño, V. Viana Huete, L. Castro de las Cuevas, M. Villalba Díaz y E. Martínez Naves

Área de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Facultad de Químicas, Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos: CD1d es una molécula de tipo MHC no polimórfica que restringe a células NKT (Natural Killer T). CD1d presenta antígenos de naturaleza lipídica, a células NKT que son capaces de iniciar respuestas de tipo Th1 y Th2. El polen es uno de los principales agentes ambientales que puede actuar como antígeno estimulando respuestas alérgicas. Por ello, estudiamos la capacidad de las células dendríticas (DCs) para presentar antígenos lipídicos procedentes del polen de olivo a las células NKT.

Material y métodos: Se diferenciaron células dendríticas a partir de monocitos (MDDCs) utilizando GM-CSF e IL-4, en presencia o ausencia de lípidos totales, fosfolípidos (PL) y triglicéridos (TG) procedentes del polen de olivo. Se analizó la expresión en superficie de las moléculas CD1d y CD1a, HLA de clase II y CD86. Por último, se realizaron ensayos funcionales de citotoxicidad, producción de citoquinas y proliferación de iNKTs frente a MDDCs tratadas con lípidos del polen.

Resultados: Las MDDCs tratadas con los lípidos totales del polen de olivo incrementaron la expresión de CD1d y de CD86 respecto a las células control. Este aumento de CD1d también se observó a nivel de RNA y resultó ser dependiente de la activación de PPAR γ . Con la fracción de PLs se observó un gran aumento en proteína total de CD1d, sin cambios en su expresión génica y de forma PPAR γ independiente. Las células NKT fueron capaces de proliferar, producir IFN- γ e IL-4 y lisar MDDCs tratadas con lípidos totales del polen.

Conclusiones: Los lípidos del polen de olivo son capaces de aumentar la expresión de CD1d en MDDCs. Este aumento induce una respuesta en las células iNKT, lo que sugiere un papel importante de estas células en la respuesta inmune frente a alergenos como el polen de olivo.

P-047. PERIVASCULAR ADIPOCYTES AND SIGNALING THROUGH TOLL-LIKE RECEPTORS: ROLE IN THE PATHOPHYSIOLOGY OF ATHEROSCLEROSIS

C. Benaiges Martínez, X. García-Moll, E. Mateus, C. Muñoz, E. Cantó, E. Pérez, R. Leta, E. Moga, S. Vidal y C. Juárez

Departamentos de Inmunología, Cardiología y Cirugía Cardíaca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introduction: Perivascular adipose tissue has emerged as a critical regulator of vascular function implicated in the pathophysiology of atherosclerosis. Virtually all arteries are surrounded by a significant amount of perivascular adipose tissue. This tissue is a very active endocrine and paracrine source of inflammatory cytokines and adipokines. Moreover, adipocytes express toll-like receptors (TLRs) to be able to respond to lipids and other self and nonself molecules activating proinflammatory pathways. We analyze the TLR/JAK-STAT/SOCS transduction pathways in adipose tissue to unravel the mechanisms implicated in the pathophysiology of atherosclerosis.

Material and methods: Perivascular and subcutaneous adipose tissue was obtained from atherosclerosis and control patients. Adipose tissue was cultured in the presence of TLR ligands to analyze the activation of TLR/JAK-STAT pathways. Expression and activation levels of STATs were measured by western blot and immunohistochemistry analysis using specific anti STATs antibodies. The secretion of adipokines (Adiponectin, Resistin and Leptin) and cytokines (IL-6, IL-10 and TNF) in supernatants were quantified by ELISA.

Results: Western blot and immunohistochemistry analysis of STAT proteins upon stimulation of adipose tissue by TLR ligands showed an increased expression of STAT-1, STAT-3, Phospho-STAT1, Phospho-STAT3 and Phospho-STAT5. Cytokine secretion increased in those supernatants that were stimulated with TLR ligands, especially IL-6 secretion. Adipokine secretion did not show significant variations after stimulation.

Conclusions: We identified alterations in the TLR/JAK-STAT signaling pathways in adipose tissue that would help to explain the deleterious effects of lipids and other TLR ligands in the pathophysiology of atherosclerosis. The results will be very useful to understand the role played by adipose tissue in atherosclerosis and to design therapeutic approaches to control this inflammatory process.

P-048. EFECTO DEL ENVEJECIMIENTO EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS DIFERENTES SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS NK DE DONANTES SANOS

C. Campos Fernández, A. Pera, I. Gayoso, B. Sánchez-Correa, S. Morgado, R. Tarazona y R. Solana

Departamento de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, IMIBIC, Universidad de Córdoba. Departamento de Fisiología, Área de Inmunología, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Introducción: El proceso de inmunosenescencia afecta tanto a la respuesta inmune innata como adquirida, y estudios previos, incluyen a las células NK dentro de las poblaciones afectadas.

Objetivos: Estudiar *in vitro* el efecto de la edad en el fenotipo y función de las subpoblaciones de células NK, cuantificando el contenido basal de granzima A/B y perforina y la secreción de linfoquinas y proliferación celular tras estimulación con rhIL-2.

Material y métodos: El análisis de citotoxicidad se realizó mediante marcaje intracelular de PBMCs para citometría de flujo. El estudio de la capacidad proliferativa se realizó mediante el marcaje con CFSE de células NK Enriquecidas y cultivo durante 5 días. La capacidad de secreción de linfoquinas (citoquinas y

quimioquinas) se determinó en sobrenadante de cultivo de NK enriquecidas y se cuantificó mediante inmunoensayo MILLI-PLEX® MAP y luminex.

Resultados: Encontramos un aumento significativo en el contenido de las granzimas y perforina en las células CD56bright de ancianos. En cuanto a la proliferación celular, observamos que tanto las células NK totales como las subpoblaciones CD56dim y CD56bright de los individuos ancianos proliferaban menos que las de los jóvenes. En cuanto a la capacidad de secreción de linfoquinas, encontramos que las células NK de ancianos producían quimioquinas y citoquinas en respuesta a rIL-2, si bien no alcanzaban los niveles de producción de los individuos jóvenes.

Conclusiones: Los resultados obtenidos indican que las células NK se encuentran entre las poblaciones linfocitarias afectadas por la "inmunosenescencia" en fenotipo y función, y que estos cambios, afectan de diferente forma a las distintas subpoblaciones de células NK.

P-049. EL SUPLEMENTO EXTERNO DE L-ARGININA AUMENTA LA RESISTENCIA DE RATONES BALB/C A LA INFECCIÓN POR TRYPANOSOMA CRUZI

S. Carbajosa González, H. Cuervo Grajal,
N.A. Guerrero Gutiérrez, J. Santi-Rocca, M. Fresno Escudero
y N. Gironés Pujol

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid.

Uno de los principales mecanismos de defensa contra *Trypanosoma cruzi* se basa en la producción de NO por parte de macrófagos. Por otro lado, la fase aguda de la infección por *T. cruzi* está caracterizada por alteraciones en el sistema inmune como defectos en la proliferación de células T. La L-arginina es un aminoácido semiesencial imprescindible para la producción de NO, ya que es sustrato de la reacción, y el mantenimiento de una adecuada función y proliferación de las células T. En trabajos preliminares del laboratorio se observó que durante la fase aguda de infección por *T. cruzi* se daba una depleción de L-arginina en plasma en ratones BALB/c, susceptibles a la infección. Debido a similitudes encontradas entre la fase aguda de la infección por *T. cruzi* y modelos de déficit en L-arginina nos planteamos el objetivo de determinar si esta depleción de L-arginina en plasma podía ser responsable, en parte, de la susceptibilidad de BALB/c a la infección y si era posible aumentar su resistencia al parásito mediante el suministro externo de este aminoácido. Para llevar a cabo el trabajo infectamos BALB/c con la cepa Y, 2.000 parásitos/ratón. Suplementamos L-arginina en el agua de bebida y por inyección intraperitoneal y determinamos parasitemia, carga parasitaria en corazón y supervivencia. Los resultados obtenidos indican que el suministro externo de L-arginina disminuye en gran medida la parasitemia y la carga parasitaria en corazón, y conduce al 100% de supervivencia.

P-050. IDENTIFICACIÓN DE UN NUEVO LIGANDO DE CD5: MUC5B

E. Carrasco de Miguel, C. Escoda Ferran,
M. Martínez Florensa, U. Holmskov y F. Lozano Soto

Centro Esther Koplovitz, Institut of Medical Biology, Servicio de Inmunología, IDIBAPS- Hospital Clínic, Barcelona.

El análisis de interacciones ligando-receptor mediadas por CD5 es un tema todavía en estudio. Hasta el momento se han reportado tres ligandos: CD72, gp35-40 y la región framework de IgVH. Su validez está cuestionada porque algunos de ellos no han podido ser validados por otros grupos y porque solo expli-

carián interacciones T-B o B-B mediadas por CD5. Con el fin de aportar datos más concluyentes se realizó el análisis de interacciones moleculares mediadas por rshCD5 mediante phage display. Los resultados indicaron que, además de confirmar la posible interacción de CD5 con regiones framework de la región variable de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, podría existir una conexión entre la familia de las mucinas (MUC1, 6, 17, 20 y 5B) y CD5. Se utilizó la proteína secretada MUC5B para realizar ensayos tipo ELISA y de co-inmunoprecipitación (con CD5 soluble y de membrana). Los resultados indicaron que MUC5B interacciona tanto con la forma soluble como con la de membrana de CD5. Posteriormente se analizó el contenido de MUC5B en líquido peritoneal de ratones C57Bl/6 tanto en situación basal como tras 10 y 20 días de una inyección intraperitoneal de Pristane. El análisis mediante ELISA y western blot reveló una disminución progresiva de los niveles de MUC5B tras el tratamiento con Pristane, así como un aumento de los niveles de CD5. Estos resultados indicarían que en condiciones basales MUC5B podría estar asociada a CD5, a medida que progresara el proceso inflamatorio y aumentaran los niveles de CD5 ya no sería necesaria la función que pudiera desempeñar MUC5B junto a CD5 y por tanto, MUC5B, podría ser proteolizada y degradada. Será necesario un estudio más detallado para dilucidar la función de MUC5B jun-
to a CD5.

P-051. PORCINE INFLUENZA VIRUS INTERACTION WITH CONVENTIONAL PORCINE DENDRITIC CELLS

T.N. Ibrahim Mussá, C. Rodríguez-Cariño, M. Pujol,
L. Córdoba, E. Crisci, N. Busquets, L. Fraile y M. Montoya

Centre de Recerca en Sanitat Animal CReSA, Departament de Medicina i Sanitat Animals, Universitat Autònoma de Barcelona.
Facultad de Ciencias Veterinarias, Universidad Central de Venezuela. Institut de Recerca i Tecnologia Agroalimentaria IRTA, Universitat de Lleida.

Objectives: To study the interaction of swine influenza virus (SIV) with conventional porcine bone marrow derived dendritic cells (poBMDC) in vitro.

Material and methods: Porcine BMDC were generated as previously described. Morphology and virus infection were evaluated by transmission electron microscopy (TEM). poBMDC and Madin-Darby Canine Kidney Cells (MDCK) were infected with A/swine/Spain/SF32071/2007(H3N2) at 0.01 MOI for 4, 8, 16 and 24h. After infection, supernatants and cells where collected to evaluate virus progeny by virus titration in MDCK and by RT-PCR respectively. Twenty four hours post infection (hpi) mock or infected-cells where collected and treated for conventional and immunogold staining and analysed by TEM JEOL1440. Furthermore, 24 hpi, mock or infected-poBMDC where collected to perform an infectious centre (ICA) and Transwell (TA) assays using MDCK as permissive cell line.

Results: After infection, an increased virus titre was detected in MDCK compared to poBMDC. Using RT-PCR, some replication was detected in poBMDC from 4 to 8hpi and then it decreased 2 whereas 8CT (difference in threshold cycles) increased in MDCK. Using TEM, infectedBMDC exhibited structures resembling influenza virus in the cytoplasm. To establish whether these structures were SIV, poBMDC were stained with anti-influenza nucleoprotein antibody coupled to gold particles. Specific binding was observed inside infected-poBMDC. SIV from poBMDC was able to infect other cells in close contact and this infection was dependent on cell to cell interaction.

Conclusion: Our results unravel the particular interaction of SIV with conventional DC, extending the current understanding of porcine immune response against influenza virus.

P-052. LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS DECIDUALIZADAS SECRETAN FACTORES QUE INDUCEN APOPTOSIS EN CÉLULAS NO DECIDUALIDAS PERO PROTEGEN A LOS LINFOCITOS DECIDUALES DE LA APOPTOSIS ESPONTÁNEA

E. Leno Durán, A. Prados, R. Muñoz Fernández, D. García Morales, P. Martínez González, M.C. Ruiz Ruiz y E. García Olivares

Instituto de Biopatología y Medicina Regenerativa, Centro de Investigación Biomédica, Granada.

Objetivos: Las células deciduales estromales (DSC) constituyen el componente celular más abundante de la decidua humana, el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Las DSC se diferencian (decidualizan) por efecto de la progesterona. Durante este proceso, las DSC aumentan su tamaño y cambian su morfología desde un aspecto fibroblástico a una morfología poligonal. Las DSC decidualizadas secretan factores como IL-15, IL-11, VEGF y prolactina. Las DSC parecen desarrollar un papel clave en la tolerancia inmunológica materno-fetal; de hecho, nuestro grupo ha demostrado que estas células protegen a los linfocitos deciduales de la apoptosis. Paradójicamente, conforme progresó el embarazo, las DSC mueren progresivamente por apoptosis, aunque la causa y objetivo de este fenómeno son desconocidos. El objetivo de este trabajo es determinar las causas de la muerte por apoptosis de las DSC, junto al efecto protector de la apoptosis que estas células tienen sobre los linfocitos deciduales.

Material y métodos: DSC proceden de abortos inducidos del primer trimestre de embarazo de mujeres sanas (20-30 años). Las líneas celulares obtenidas fueron cultivadas en OPTI-MEM y diferenciadas con progesterona 300 nM y cAMP 500 μM. El sobrenadante fue recogido de células diferenciadas a los 18 días de tratamiento. Los linfocitos deciduales fueron obtenidos a partir de muestras de decidua. Las células apoptóticas fueron detectadas por citometría de flujo cuantificando las células en la fase sub-G1 del ciclo celular.

Resultados: Las DSC aisladas *in vitro* son resistentes a la inducción de apoptosis por distintos inductores (ligandos de muerte, drogas genotóxicas, drogas epigenéticas...). Sin embargo, la progesterona y cAMP, no solo inducen la diferenciación de las DSC, aumentando la producción de prolactina e IL-15, sino que también determina que una proporción de estas células entre en apoptosis. Se ha observado que los sobrenadantes procedentes de DSC decidualizadas inducen apoptosis en las propias DSC; por el contrario estos mismos sobrenadantes protegen de la apoptosis espontánea a linfocitos deciduales.

Conclusiones: Durante la diferenciación de las DSC secretan factores solubles que induce apoptosis en estas mismas células, y protegen de la apoptosis a los linfocitos deciduales.

P-053. EFECTO IN VITRO DE LA LENALIDOMIDA SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS

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

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

Objetivos: La lenalidomida es un fármaco con una reconocida función immunomoduladora y antitumoral, indicado para el tratamiento de mieloma múltiple. Se ha descrito su capacidad de activar a las células NKT (Natural Killer T cells), un tipo de linfocito T con funciones immunomoduladoras que reconoce antígenos

nos lipídicos presentados por la molécula CD1d. Las principales células activadoras de NKTs son las células dendríticas y los monocitos. Por ello nos planteamos estudiar el efecto de la lenalidomida en el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a células dendríticas inmaduras (iDCs).

Material y métodos: Se diferenciaron células dendríticas a partir de monocitos (MDDCs) utilizando GM-CSF e IL-4, en presencia o ausencia de lenalidomida. Se analizó la expresión en superficie de las moléculas CD1d y CD1a; HLA de clase I y II; y las moléculas coestimuladoras CD86 y CD80. Se realizaron ensayos funcionales de fagocitosis de estas MDDCs.

Resultados: Las MDDCs diferenciadas en presencia de lenalidomida presentaron un aumento de la expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD86 y sobre todo de HLA-DR, con respecto a las células control. Las iDCs generadas en presencia de lenalidomida presentaron mayor capacidad de fagocitosis frente a bacterias y zymosan.

Conclusiones: La lenalidomida modifica el proceso de diferenciación *in vitro* de monocitos a células dendríticas, generándose unas MDDCs con una mayor capacidad fagocítica, así como aumentando la expresión en superficie de las moléculas CD1d, CD86 y sobre todo HLA-DR, lo que sugiere un efecto positivo del fármaco sobre la capacidad presentadora de las MDDCs.

P-054. AIM, A SOLUBLE MEMBER OF THE SRCR SUPERFAMILY, INTERACTS WITH MICROORGANISMS AND DISPLAYS ANTI-INFLAMMATORY AND ANTI-INFECTIOUS PROPERTIES

V. Martínez, C. Escoda Ferran, M. Martínez Florensa, I.T. Simões, A. Castrillo y F. Lozano

Instituto de Investigaciones Biomédicas August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Centro Esther Koplowitz, Barcelona. ImmunNovative Developments, Barcelona. Immune Signalling Laboratory, Department of Biochemistry and Molecular Biology, School of Medicine, University of Las Palmas. Servicio de Inmunología, Hospital Clínic, Barcelona. Departamento de Biología Celular, Inmunología y Neurociencias, Universidad de Barcelona.

AIM (apoptosis inhibitor expressed in macrophages), a homologue of human Spa, is a soluble member of the scavenger receptor cysteine-rich (SRCR) superfamily, a group of proteins involved in both the innate and adaptive immune response for which no unifying function has yet been described. Pleiotropic functions have been ascribed to AIM, from viability support in lymphocytes during thymic selection to anti-inflammatory effects in autoimmune pathologies. Using a recombinant form of AIM (rAIM) expressed in HEK-EBNA cells, we show that this protein is able to bind and aggregate a number of Gram-positive and Gram-negative bacteria, as well as fungal species, both pathogenic (*C. albicans*, *C. neoformans*) and saprophytic (*S. cerevisiae*). More importantly, we show that endogenous AIM from mouse serum also binds to microorganisms. To further support a role for AIM in the protection of murine tissues against infection, we have shown that the presence of this protein inhibits bacterial adhesion to epithelial cells in culture. Moreover, secretion of this protein is induced in murine macrophages following exposure to *E. coli*. Using HEK-TLR2 cells, we also report that the presence of AIM was able to inhibit peptidoglycan-stimulated cytokine release, suggesting an immuno-modulatory role for this protein. Altogether, these data suggest that AIM might play a role in the innate defence and homeostasis of certain epithelial surfaces.

P-055. SELECTIVE LOSS OF CHEMOKINE RECEPTOR EXPRESSION ON LEUKOCYTES AFTER CELL ISOLATION

J.C. Nieto Sánchez, E. Cantó, C. Zamora, M.A. Ortiz, C. Juárez y S. Vidal

Departamento de Inmunología, Hospital de Sant Pau, Institut de Recerca, Hospital de Sant Pau, Barcelona.

Chemokine receptors are distinctively exposed on cells to characterize their migration pattern. However, little is known about factors that may regulate their expression. To determine the optimal conditions for an accurate analysis of chemokine receptors, we compared the expression of CCR2, CCR4, CCR5, CCR6, CXCR3 and CXCR4 on different leukocyte subsets using whole blood (WB) plus erythrocyte lysis and density gradient isolation (Ficoll). Most WB monocytes were CCR2+ ($93.5 \pm 2.9\%$) whereas $32.8 \pm 6.0\%$ of monocytes from Ficoll-PBMC expressed CCR2 ($p < 0.001$). Significant reductions of CCR6 and CXCR3 on monocytes were also observed after Ficoll isolation (WB: $46.4 \pm 7.5\%$ and $57.1 \pm 5.5\%$; Ficoll: $29.5 \pm 2.2\%$ and $5.4 \pm 4.3\%$ respectively) ($p < 0.01$). Although comparable percentages of WB and Ficoll-PBMC monocytes expressed CCR4, CCR5 and CXCR4, Ficoll isolation significantly reduced the levels of CXCR4 (WB: MFI 5 ± 0.4 and Ficoll: MFI 3.3 ± 0.1) ($p < 0.05$). Similarly to monocytes, CCR2, CXCR3 and CXCR4 were also reduced on lymphocytes. In addition, Ficoll isolation significantly reduced the percentage of CCR4 positive lymphocytes (WB: $90.2 \pm 4.5\%$ and Ficoll: $55 \pm 4.1\%$) ($p < 0.01$). The loss of expression of chemokine receptors after isolation of monocytes was not dependent on either the anticoagulant or the density gradient method. It was irreversible and could not be restored by LPS activation or in vitro macrophage differentiation. Experiments tagged with anti-CCR2 antibodies prior to density gradient isolation demonstrated that Ficoll internalized chemokine receptors. The method for cell isolation may alter not only the expression of certain chemokine receptors but also the respective functional migration assay. The final choice to analyze their expression should therefore depend on the receptor to be measured.

P-056. EFECTO DE LA EDAD Y LA INFECCIÓN POR CMV EN LA FUNCIONALIDAD DE LAS CÉLULAS NK

A. Pera Rojas, C. Campos, I. Gayoso, R. Tarazona y R. Solana

Departamento de Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía, Universidad de Córdoba, IMIBIC, Córdoba; Departamento de Fisiología, Área de Inmunología, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Introducción: El desarrollo de una adecuada respuesta a vacunas/infecciones se asocia a la capacidad de que un mismo linfocito T sintetice varias citoquinas ("multifuncionalidad" como marcador de calidad) más que a la frecuencia (cantidad) de linfocitos específicos. Los estudios funcionales han ido dirigidos a analizar las bases de una determinada alteración funcional más que a analizar la capacidad de una determinada célula de desarrollar múltiples funciones.

Objetivos: Analizar el efecto de la edad y la infección por CMV en la funcionalidad de las células NK y sus subpoblaciones.

Métodos: Analizamos la citotoxicidad-NK (definidas como CD3-/CD56+) frente a la línea 721.221 y a un estímulo inespecífico, a través del nivel de expresión del marcador de degranulación CD107 y el contenido de las citoquinas TNF- α e INF- γ . El estudio se realizará en individuos jóvenes y ancianos, estratificados según seropositividad para CMV.

Resultados: Frente a la línea 221, observamos en ancianos un descenso en el número de células NK-CD107/INF, así como en la producción de INF y un descenso de la expresión de CD107, en las NK-totales y NK-dim. En las NK-bright hay un descenso de células CD107/INF, CD107/TNF y TNF/INF y menor producción de INF; además, frente a PMA-ionomicina, disminuye la producción de INF y la cantidad de células TNF/INF. Comparando jóvenes CMV-/CMV+ no encontramos diferencias significativas, aunque la producción de citoquinas y la funcionalidad están disminuidas en los individuos CMV+.

Conclusiones: La edad y la infección por CMV tienen un efecto negativo sobre la funcionalidad de las células NK.

P-057. SLAMF8 MODULA LA ACTIVACIÓN DE LA NADPH OXIDASA EN MACRÓFAGOS DE RATÓN

D.I. Rojas Barros, L. Calvache, M. Alemán, C. Terhorst y A.C. Abadía-Molina

CIBM, Universidad de Granada. Beth Israel Deaconess Medical Center, Boston Harvard, EE.UU.

Las familias del SLAM son un conjunto de receptores implicados en la modulación de las funciones inmunológicas de aquellas células en las que se expresan. SLAMF8 es uno de los nueve miembros más recientemente descrito. La función de esta molécula está aún por determinar. Nosotros hemos observado que los macrófagos de ratón expresan SLAM frente a varios estímulos. En estudios sobre la funcionalidad de macrófagos procedentes de ratones deficientes para SLAM hemos observado que producen mayor cantidad de Superóxido que en los macrófagos de ratones salvajes, por lo que pensamos que la NADPH oxidasa está más activada en los macrófagos SLAMF8-KO. Estos datos se confirman al estudiar la fosforilación de las subunidades p40phox y p47phox, siendo mayor la cantidad de molécula fosforilada de ambas subunidades en los macrófagos SLAMF8-KO. Todo esto indica que SLAMF8 modula negativamente la activación de NADPH oxidasa en macrófagos de ratón.

P-058. LINFOCITOS REGULADORES RESTABLECEN EL CONTROL NEURONAL DE LA RESPUESTA INNATA EN SEPSIS

L. Ulloa, L. Ramos, G. Pena y G. Vida

UMDNJ, Universidad de Medicina, New Jersey, EE.UU.

El objetivo de este estudio es determinar si el sistema nervioso simpático controla la producción de citoquinas inflamatorias directamente. Los métodos utilizados incluyen el cultivo primario de esplenocitos y los modelos clásicos de sepsis experimental. Nuestros estudios sugieren un nuevo tipo de linfocitos reguladores capaces de restablecer la modulación colinérgica antiinflamatoria en sepsis. Activación del nervio vago controla inflamación en animales control, pero no en animales sépticos. Igualmente, el nervio vago y agonistas colinérgicos no controlan la inflamación en los animales esplenectomizados y deficientes en linfocitos. A diferencia de las típicas células regulatorias CD25+, los linfocitos CD4+CD25- α 7nR restablecen el potencial antiinflamatorio del nervio vago y los agonistas colinérgicos en animales inmunodeprimidos y sépticos. Estos linfocitos colinérgicos restablecen la protección bazo y el potencial de los agonistas colinérgicos para rescatar animales inmunodeprimidos con Sepsis establecida. Estos resultados revelan este nuevo tipo de linfocitos reguladores como el primer objetivo fisiológico conocido para neuromodulación de la respuesta inmune innata y un posible objetivo terapéutico para el tratamiento de sepsis.

P-059. WNT5A INDUCE LA DIFERENCIACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DISFUNCIONALES CON CARACTERÍSTICAS TOLEROGÉNICAS

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

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

Objetivos: Resultados recientes muestran que la ruta de señalización Wnt juega un papel en el establecimiento del balance entre inmunidad y tolerancia, siendo las células dendríticas (DCs) un blanco directo para sus efectos inmunoreguladores. En el presente trabajo estudiamos el efecto del incremento de la señalización Wnt en la diferenciación de las DCs humanas derivadas de monocitos, analizando su repercusión fenotípica y funcional así como los mecanismos de señalización implicados.

Material y métodos: Células CD14+ fueron cultivadas con GM-CSF/IL-4 adicionándose o no Wnt5a (Wnt5a-DCs). Los cambios fenotípicos funcionales, tras maduración en respuesta a ligandos TLR, fueron analizados por FACs, ELISA, RT-PCRq y MLRs. Se emplearon inhibidores enzimáticos específicos para analizar las posibles rutas de señalización implicadas.

Resultados y conclusiones: El incremento de la señalización Wnt5a durante la diferenciación de las DCs altera su fenotipo y compromete su posterior maduración en respuesta a ligandos TLR. La capacidad de las Wnt5a-DCs para secretar IL-12 y TNF- α se ve severamente afectada mientras que la producción de IL-10 se incrementa. Consecuentemente, estas DCs presentan una menor capacidad para inducir una respuesta Th1 favoreciendo la secreción de IL-10. Los cambios encontrados en el perfil transcripcional de las Wnt5a-DC justifican sus cambios funcionales relacionados, posiblemente, con un incremento en la señalización IL-6/IL-10 durante su diferenciación. El efecto de Wnt5a depende de la activación de la ruta no canónica, vía CaMKII/NF- κ B. Nuestros resultados sugieren que, bajo la influencia de niveles altos de Wnt5a, típicos de una situación inflamatoria, los monocitos podrían diferenciar a DCs disfuncionales con características tolerogénicas.

P-060. EFECTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL RECEPTOR TOLL-LIKE 4 EN LA SUPERVIVENCIA DEL TRASPLANTE HEPÁTICO

D.M. Valero Hervás, M. Castillo Rama, M.J. Castro Panete, P. Morales Pérez, J.C. Meneu Díaz, E. Moreno González, M. Guzmán, S. Lermo Rojo, P. Talayero Giménez de Azcárate y E. Paz Artal

Servicio de Inmunología; Unidad de Trasplante Abdominal y Cirugía Digestiva, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Objetivo: En el contexto del trasplante de órganos, TLR 4 está implicado en la señalización de daño e inflamación por ligandos endógenos producidos particularmente en procesos de isquemia-reperfusión ligados al procedimiento quirúrgico. Los polimorfismos cosegregantes Asp299Gly y Thr399Ile generan receptores TLR4 con funcionalidad disminuida. El objetivo fue determinar la influencia de los genotipos de TLR4 en la supervivencia del trasplante hepático y en la aparición de fallo del injerto (rechazo agudo y/o disfunción crónica).

Material y métodos: En 325 receptores hepáticos transplantados en el Hospital 12 de Octubre se analizaron los polimorfismos

Asp299Gly/Thr399Ile mediante PCR a tiempo real (Light Cycler). Se determinó la supervivencia de los pacientes y el tiempo medio de la aparición de fallo del injerto mediante seguimiento prospectivo a 5 años post-trasplante (análisis Kaplan-Meier, SPSSv.12).

Resultados: En el conjunto de receptores, 264 fueron WT homocigotos (Asp/Asp en 299 y Thr/Thr en 399) y 34 heterocigotos (Asp/Gly en 299 y Thr/Ile en 399, frecuencia de heterocigotos = 10,5%). La supervivencia media fue de 8,74 meses en pacientes WT homocigotos frente a 2,18 meses en heterocigotos ($p = 0,73$). El tiempo medio de aparición de fallo del injerto fue de 26,1 meses en receptores homocigotos frente a 35 en heterocigotos ($p = 0,71$).

Conclusiones: Los polimorfismos Asp299Gly y Thr399Ile de TLR4 no determinan ninguna diferencia en la supervivencia ni en la aparición de fallo del injerto hepático. La baja frecuencia de heterocigotos implica la necesidad de ampliar la muestra para poder alcanzar conclusiones significativas.

P-061. TLR SIGNALS MODIFY THE EXPRESSION OF SCAVENGER RECEPTORS

C. Zamora Atenza, E. Cantó Naves, J.C. Nieto Sáchica, C. Juárez Rubio y S. Vidal Alcorisa

Institut de Recerca, Hospital de Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introduction: TLRs and scavenger receptors (SR) are expressed on monocytes to participate in relevant immune functions. It has been established that TLRs can discriminate molecular structures normally absent in healthy hosts, whereas CD36 is a class B SR that can coordinate responses to TLR2:TLR6 agonists. It is not known whether TLRs can regulate the expression of SR. To understand how TLR signals can interact with SR, we analyzed the expression of CD36 on monocytes after the stimulation with TLR4 (LPS) and TLR2 (Pam3CSK4 and FSL1) ligands.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells from healthy donors were incubated with Pam3CSK4, FSL1 and LPS. After 24h, 48h and 72h of culture, CD36 expression was analyzed by flow cytometry and cytokine production was determined by ELISA.

Results: After culturing with each TLR ligand, CD36 expression was downregulated on CD14+ monocytes, being LPS the ligand with the strongest effect. The kinetics analysis revealed that 48h was the peak of downregulation, with the recovery of CD36 expression at 72h in FSL1 cultures. Since the binding of TLR ligands induced cytokine production and secretion, we analyzed whether these cytokines were responsible for the observed downregulation. TNFalpha and IFNgamma (at lesser extent) but not IL-10 and IL-6 were able to downregulate CD36 expression. Blocking specifically the TNF effect after TLR binding with neutralizing antibodies, CD36 downregulation was partially abrogated. While after TLR2 or TLR4 binding, CD36 was downregulated by internalization, other SR or molecules involved in the TLR ligand recognition were not modulated.

Conclusions: Since CD36 is required for TLR responses, the TLR-induced downregulation of CD36 could operate as a regulator of the innate immune response through TLRs.

INMUNODEFICIENCIAS

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

P-062. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL DE SÍNDROMES HEMOFAGOCÍTICOS PRIMARIO Y SECUNDARIO

R. Aguado Álvarez¹, E. Mateos², J. Rumbao², J.L. Pérez², I. Ibarra², S. Fernández³, C. Ortega³ y M. Santamaría^{1,3}

¹Unidad de Inmunología Clínica; ²UGC de Pediatría y Especialidades, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

³Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba.

La linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) comprende formas primarias (genéticamente determinadas) y secundarias o adquiridas. Estudios en tres pacientes (Pt 1 3 años; Pt 2 2 años y Pt 3 7 años) con leishmania donovani (LD) que cumplían más de cinco criterios diagnósticos de HLH (HLH guidelines), mostraron signos de hemofagocitosis en médula ósea. Pt1 y Pt2 mostraron ausencia de perforina en citometría en células T y NK y actividad NK ($Cr51 < 3\%$ de los controles). Pt3 presentó actividad NK y expresión de perforina similares a los controles. Los pacientes fueron tratados con un ciclo completo de amfotericina B liposomal (AmB). Pt1 y Pt2 no presentaron respuesta al tratamiento, recibiendo las siguientes 4 semanas tratamiento según protocolo HLH-2009. Pt1 evolucionó a exitus por hemorragia intratecal durante este tratamiento y Pt2 empeoró. La persistencia de PCR+ a LD promovió a un segundo ciclo de AmB resultando en la plena recuperación del paciente y normalización de la expresión de perforina y actividad NK. El diagnóstico diferencial entre síndromes hemofagocíticos primario y secundarios es de extraordinaria dificultad pudiendo presentar alteraciones inmunológicas aparentemente similares. Por ello la secuenciación de los genes responsables de las diversas formas de HLH (o al menos PRF1) debe considerarse una urgencia médica de primera magnitud. En nuestro caso Pt1 y Pt2 se comportaron inmunológicamente de manera indistinguible. Sin embargo Pt1 sufría una mutación heterocigota en PRF1 mientras que Pt2 no presentó alteración alguna en las secuencias genómicas de PRF1 ni UNC13D.

P-063. NUEVA MUTACIÓN (E357A) EN EL GEN STAT3 EN PACIENTE CON SÍNDROME DE HIPER IGE

V. Daza Cajigal, B. Sánchez Sánchez, E.J. Cañas García, A. Serra Cabrer, N. Martínez Pomar y N. Matamoros Florí

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca. Servicio de Inmunología; Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

El síndrome de Hiper IgE (HIES) constituye una inmunodeficiencia primaria con patrón de herencia autosómico dominante o recesivo, aunque frecuentemente se observan casos esporádicos. Se caracteriza por la presencia de eczema, eosinofilia y valores séricos elevados de IgE ($> 2.000 \text{ IU/ml}$), así como infecciones cutáneas y pulmonares recurrentes, entre otras manifestaciones. En 2007 se describió que mutaciones en el gen STAT3 que codifica signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) se asocian a la forma autosómica dominante de HIES. Se presenta una paciente de 30 años de edad con historia de dermatitis atópica, abscesos cutáneos recidivantes e hidrosadenitis supurativa, con niveles elevados de IgE (2.000-5.000 UI/L). El estudio molecular del gen STAT3 muestra la presencia de una

transición del nucleótido 1081 (c.1081 A > C) en el exón 11. Esta mutación origina el cambio del aminoácido glutamato por alanina en posición 357 (p.E357A), que se localiza en el dominio de unión a ADN. No hemos encontrado esta variante en la base de datos de single nucleotide polymorphism (dbSNP) ni se ha descrito previamente en pacientes con HIES. El análisis de la predicción funcional de variación utilizando el programa PolyPhen predice la existencia de probable daño funcional de la proteína. Estudios funcionales futuros podrán vincular dicha mutación con la fisiopatogenia de la enfermedad.

P-064. NUEVAS MUTACIONES EN WAS EN 2 PACIENTES ESPAÑOLES CON SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH

V. Daza Cajigal, N. Martínez Pomar, A. Cambra Conejero, O. Estévez, C. Ortega, A. Urberuaga, A. Iglesias, A.K. Vega, S. Torres, I.J. Molina y J.M. García

Servicio de Inmunología; Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. Unidad de Inmunología, Universidad de Córdoba. Unidad de Oncología/Hematología Infantil; Unidad de Alergia/Inmunología Infantil, Servicio de Pediatría, Hospital de Cruces, Barakaldo. Centro de Investigación Biomédica, Parque Tecnológico de Ciencias de la Salud, Universidad de Granada.

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es un trastorno recesivo ligado al cromosoma X, que se caracteriza por la triada de trombocitopenia, eczema y diferentes grados de inmunodeficiencia. Se han descrito variantes de menor severidad como la trombocitopenia ligada al cromosoma X, trombocitopenia intermitente y neutropenia congénita ligada al cromosoma X. Las mutaciones en el gen WAS son responsables de este síndrome y se ha descrito asociación genotípico-fenotípico. En el presente estudio se reportan dos nuevas mutaciones en el gen WAS, identificadas en dos pacientes afectos de Síndrome de Wiskott-Aldrich. En el primer caso se describe una delección de 4pb en el exón 5 (166-169delAGAC) que resulta en una nueva secuencia aminoacídica con un codón stop prematuro. En el segundo caso se describe un cambio de nucleótido G > C en el intrón 6 (+5, Int6) que origina un splicing erróneo. Esta mutación previamente ha sido descrita con sustitución de G > A. Los estudios de expresión proteica muestran ausencia completa de WASP y el estudio familiar revela en ambos casos que la madre es portadora. Los pacientes con WAS pueden presentar desde tempranas etapas de la vida susceptibilidad a infecciones y severas manifestaciones hemorrágicas que pueden comprometer su vida. La confirmación diagnóstica mediante estudio molecular es fundamental para valorar el pronóstico y la instauración de un tratamiento curativo precoz en estos pacientes.

P-065. SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH CON FENOTIPO XLT Y SIN AFECTACIÓN INMUNOLÓGICA

O. Estévez Cordero, N. Martínez Pomar, C. Ortega Gromaz, V. Daza Cajigal, S. Fernández Álvarez, I. Molina Pineda, N. Matamoros Florí y M. Santamaría y Ossorio

Unidad de Inmunología Clínica, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

El síndrome de Wiskott-Aldrich es una inmunodeficiencia primaria bien definida causada por una mutación en el gen WASP.

La tríada clínica que lo caracteriza es la presencia de hemorragia, eccema e inmunodeficiencia progresiva por defecto de reorganización del citoesqueleto celular. Una característica inmunológica de este síndrome es su incapacidad para la respuesta a determinados抗igenos de microorganismos mientras mantienen intacta la capacidad para desarrollar alorrespuestas y por ello requieren para su tratamiento alotrasplantes de individuos HLA idénticos preferentemente. Presentamos un caso correspondiente a un paciente de 3 años de edad con una presentación clínica limitada exclusivamente a purpuras repetidas desde los 11 meses. Sin eccema ni manifestaciones infecciosas. El estudio inmunológico mostró la normalidad en términos cuantitativos de los componentes del sistema inmune, incluyendo leucocitos, linfocitos T y B, producción de anticuerpos específicos frente a las inmunizaciones recibidas. Se observó una discreta disminución de su capacidad para responder a estímulo con anti-CD3. El análisis molecular mostró mutación patogénica del gen y ausencia de expresión de proteína WASP. Tras su trasplante con hermano idéntico se analizaron las poblaciones T y B en el paciente que muestran una reconstitución parcial de su repertorio T y B periférico y capacidad de producción de citoquinas proinflamatorias cuando se compara con el donante de progenitores. Se discutirán las posibles implicaciones fisiopatológicas de estos hallazgos.

P-066. ESTUDIO INMUNOLÓGICO Y MOLECULAR DE UN CASO DE SÍNDROME HEMOFAGOCÍTICO IDIOPÁTICO

S. García Rodríguez, E.C. Zumaquero Martínez, R. Ríos Fernández, A. Rosal Vela, P. Navarro Cuesta, J.L. Callejas Rubio, M. Zubiaur Marcos, N. Ortego Centeno y J. Sancho López

Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, IPBLN-CSIC, Granada. Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada.

Objetivos: Analizar las citoquinas plasmáticas; el inmunofenotipo y la expresión génica en células mononucleares de sangre periférica en una paciente con síndrome hemofagocítico idiopático.

Métodos: Se realizaron 6 tomas de muestras a lo largo de 20 meses. La paciente recibió distintos tratamientos: ciclosporina, prednisona, inmunoglobulinas intravenosas, etopósido, adalimumab, anfotericina B y finalmente tocilizumab (anti-IL-6).

Resultados: Se observaron: a) una proporción anormalmente alta de granulocitos de baja densidad (GBD), con dos subpoblaciones, una de neutrófilos maduros activados (CD15+CD10+CD64+) y otra de neutrófilos inmaduros (CD15+CD10-CD64+). b) un elevado % de monocitos circulantes con expresión aumentada de CD64, CD38 y HLA-DR; c) % bajo de células NK y aumento de la expresión de CD38 en NKT; d) % bajo de células B con aumento de la subpoblación de células plasmáticas (CD19+CD20-CD38+++); e) aumento en la expresión de CD38 en células CD3+CD8+. Al inicio del estudio, la expresión génica de: IL-2 e IL-6 estaban disminuidas, mientras que la de STAT-4, GATA-3; ZAP-70, IL-10 y NFkB-1 estaban aumentadas. La expresión de IFN-γ, CD38, y p38-MAPK14 estaban aumentadas al inicio y se mantuvieron por encima de los niveles normales. Mientras que T-bet, RORγt, SAP, perforina y granzima-B estaban inhibidas. Despues del tratamiento con tocilizumab se observaron descensos en los niveles plasmáticos elevados de IL-6, IL-10, e incrementos transitorios de la expresión de IL-22 y de Foxp3.

Conclusiones: Tratamientos selectivos para inhibir la producción de IL-6 dieron lugar a una disminución significativa de marcadores de activación y de la proporción de GBD.

P-067. SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE SIN ALTERACIONES HEREDADAS DEL GEN TNFRSF6

R. López Blanco, M. Vilches Moreno, M. Martínez de Saavedra Álvarez, E. García Moreno, P. Ruiz Ocaña, C. Rodríguez Hernández, F. Mora López y A. Nieto Díaz

Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

El síndrome linfoproliferativo autoinmune (SLPA) se debe a un defecto en la apoptosis linfocitaria, que cursa con linfoproliferación crónica no maligna, manifestaciones autoinmunes y riesgo de linfoma. Característicamente, se detecta un incremento de linfocitos TCRab+CD4-CD8-. La mayoría de casos se deben a mutaciones en línea germinal en el gen TNFRSF6 (proteína Fas). La segunda causa más frecuente es la aparición de mutaciones somáticas en este mismo gen. Otros genes involucrados son CASP10 y FASLG. Muy recientemente, se han revisado los criterios diagnósticos estableciéndose las categorías de SLPA probable y SLPA definitivo. Al mismo tiempo se ha propuesto un algoritmo para establecer el diagnóstico definitivo. Dicho diagnóstico recae en la demostración de un defecto funcional de la apoptosis linfocitaria y/o de un defecto patogénico germinal o somático de los genes mencionados. Presentamos el caso de una niña de 4 años con antecedentes de DM tipo 1 desde los 2 años, con diagnóstico de SLPA probable con las siguientes manifestaciones: linfadenopatía generalizada crónica no maligna ni infecciosa; infiltrado pulmonar inespecífico; porcentaje de linfocitos TCRab+CD4-CD8- del 6.4% (normal ≤ 2,5); episodios repetidos de PTI, episodio de pancitopenia transitoria coincidente con el debut de la linfadenopatía; niveles elevados de IL-10 (200 pg/mL) y vitamina B12 (1.290 pg/mL); hipergammaglobulinemia G polyclonal (1.639 mg/dL); y anticuerpos anti-músculo liso (1/640) y de especificidad F-actina sin enfermedad hepática; anticardiolipina IgG positivo medio (37,7 GPL/mL). En una primera aproximación al diagnóstico genético no se detectaron mutaciones heredadas en zona codificante de TNFRSF6. Se discutirá el algoritmo seguido para conseguir el diagnóstico definitivo en este caso.

P-068. CONCLUSIONES DE LA REUNIÓN DE TRABAJO SOBRE EL USO DE GAMMAGLOBULINAS EN INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS

E. López Granados¹ y N. Matamoros Flor², en representación de los participantes en la Reunión

¹Unidad de Inmunología, Hospital Universitario La Paz-IdiPAZ, Madrid. ²Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Son Espases, Palma de Mallorca.

Objetivos: Analizar el proceso diagnóstico, la indicación de tratamiento y sus modalidades en 11 hospitales españoles que atienden inmunodeficiencias tratadas con gammaglobulina.

Métodos: Mediante una encuesta se recogió información sobre diagnóstico, recomendaciones, monitorización y tratamiento (preparados y profesionales implicados en su manejo). La información remitida se recopiló para analizarla en una reunión de trabajo.

Resultados: Los procesos de diagnóstico son muy uniformes en cuanto a las técnicas para la medición de respuestas espe-

cíficas, aunque no siempre inmunólogos realizan la determinación y/o validación de niveles de inmunoglobulinas y subclases. Se realizan estudios genéticos en un buen número de centros. Muchos son consultados también por inmunodeficiencias secundarias al uso de inmunosupresores, aunque mayoritariamente solo cuando el estado de inmunodeficiencia está avanzado. Se dispone de media de 3 productos distintos para infusión intravenosa, siendo el número y compañías determinado por el inmunólogo o consensuado con la dirección. 4 de 11 centros no disponen aún de gammaglobulina subcutánea. Se reflejan varias dificultades para su uso, aún escaso sobre todo en adultos. La administración intravenosa se realiza en diversos hospitales de día, y solo en un centro Inmunología dispone del suyo. En la mitad de los centros el inmunólogo participa además en el uso de gammaglobulinas por otras indicaciones.

Conclusiones: Las modalidades de tratamiento en cuanto a vías, preparados disponibles y entorno de infusión son múltiples en España, pero aún menos diversas que en otros países europeos. Se acuerda estudiar la viabilidad de la administración domiciliaria por vía endovenosa y aunar esfuerzos para atajar las dificultades en el uso de la vía subcutánea.

P-069. BIOBANCO DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS: PUESTA EN MARCHA DE LA PRIMERA EXPERIENCIA EN ESPAÑA

E. Mancebo Sierra, L. Allende, J. Ruiz Contreras, J. Guerra Vales, P. Morales Pérez, M.J. Castro Panete, S. Lermo Rojo, J.I. González Granado, P. Varela Peña, V. Pérez Aradas y E. Paz Artal

Servicio de Inmunología; Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación; Servicio de Pediatría, Sección de Inmunodeficiencias, Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

El creciente peso específico de la investigación en inmunodeficiencias primarias (IDP) demanda la disponibilidad y acceso a un número suficiente de muestras biológicas de alta calidad que fortalezcan la solidez de los trabajos. Se trata de un material escaso, ya que son enfermedades raras, que en el marco de la normativa actual requiere de garantías de calidad ética, legal y técnica. El objetivo de este proyecto fue crear un biobanco de IDP (BIDP) que albergara material biológico de los pacientes y familias diagnosticados, así como la información clínica, genética y analítica relativa. En la actualidad el BIDP contiene el registro de 1.001 muestras, procedentes de 115 individuos diagnosticados de IDP. De ellos, 76 poseen diagnóstico molecular. Los 24 restantes son individuos con Inmunodeficiencia Común Variable y déficit de IgA. A esos 115 individuos se añaden 134 más, familiares de pacientes. El BIDP es una estructura dinámica, con diferentes protocolos de recogida de material biológico según el tipo de IDP diagnosticada. El material recogido es mayoritariamente suero (n = 260), PBL (n = 216), DNA (n = 342) y RNA (n = 116). El BIDP se gestiona con la plataforma informática Bio-e-Bank®, que permite la gestión detallada de donaciones, recepción, codificación e identificación de muestras, procesos de transformación, almacenamiento y envío a peticionarios. Bio-e-Bank® hace posible la explotación estadística y es acorde con las leyes de Protección de Datos e Investigación Biomédica 14/2007. El BIDP del Hospital 12 de Octubre persigue fomentar la investigación sobre IDP facilitando el acceso a muestras biológicas y a los datos a ellas asociados.

Proyecto realizado mediante la ayuda FIS PI060170 a Estela Paz Artal.

P-070. SECUENCIACIÓN DE LOS GENES MUNC13-4 Y SYNTAXIN 11 EN PACIENTES CON LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA NO ASOCIADOS A DEFECTOS DE PERFORINA

E. Mancebo Sierra, C. Aquilino, A. López Herradón, L. Allende, J. Ruiz Contreras y E. Paz Artal

Servicio de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. Grupo de Inmunodeficiencias e Inmunología del Trasplante, Instituto de Investigación Hospital 12 de Octubre, Madrid. Servicio de Pediatría, Sección de Inmunodeficiencias Primarias, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Introducción: La linfohistiocitosis hemofagocítica (HLH) se caracteriza por la activación incontrolada de células T y macrófagos y producción excesiva de citoquinas inflamatorias. El diagnóstico genético es necesario para distinguir entre formas secundarias y primarias (HLH familiar, FLH), debidas a mutaciones en genes implicados en citolisis.

Objetivos: Determinar la presencia de mutaciones en los genes, MUNC13-4 y STX11 en 5 pacientes (P1 a P5) con criterios clínicos de HLH no asociados a defectos en PRF1. Se secuenciaron los exones y regiones flanqueantes en DNA genómico.

Resultados: P1 y P2 desarrollaron HLH severo de inicio temprano, P1 falleció a los 6 meses. P2, con una hermana fallecida tras HLH, respondió adecuadamente al tratamiento (HLH-2004), presentando un segundo episodio dos años después. P3 desarrolló HLH a los 7 años de edad estando en remisión completa de una leucemia linfoblástica previa. P4 y P5 son hermanos que fallecieron con 5 y 6 años tras HLH y mononucleosis por infección EBV. Se descartó XLP ya que uno de los pacientes era niña. No se encontraron alteraciones en Munc 13-4 o STX11 en los pacientes, excepto en P1, que resultó portadora en heterocigosis de la mutación c.C2782T en MUNC 13-4, previamente descrita como patogénica.

Conclusiones: Aunque la severidad, edad de presentación e historia familiar en nuestros pacientes sugieren HLH de causa genética, esta no se asocia a alteraciones en los genes analizados, salvo en P1. Este resultado contrasta con series publicadas en las que mutaciones en MUNC13-4 y STX11 explican entre el 20% y el 64% de la FLH sin mutaciones en PRF1, sugiriendo una base genética muy heterogénea para esta enfermedad.

Proyecto realizado mediante la ayuda FIS PI060170 a Estela Paz Artal.

P-071. HENRIETTA LACKS'S DERIVED STING PRESENTS AN ALTERED ABILITY TO INDUCE IFN- β

E. Rodríguez García, E. Nistal Villán, L. Suárez Amarán y G. González Aseguinolaza

Division of Hepatology and Gene Therapy, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona.

Cellular innate immune system is a crucial element in detecting early invading pathogens. Cordates present a complex detection of pathogen associated molecular patterns (PAMPs) that leads to the activation of interferon (IFN), a key factor in activation of responses against invading pathogens. Stimulator of interferon genes (STING) is a critical protein involved in IFN-beta induction by some DNA and RNA pathogens upon infection, including herpes simplex virus-1 (HSV-1), *Listeria monocytogenes* and RNA viruses like vesicular stomatitis virus (VSV). We have used total RNA from HeLa cells, a human cell line derived from a cervical cancer, to amplify full length STING mRNA by RT-PCR. Full length STING PCR product was cloned in a mammalian expression plasmid and sequenced. We have detected four non-synonymous single nucleotide polymorphisms (SNPs), R71H-G230A-

H232R-R293Q. A recent report has described a haplotype that associates three of those SNPs, R71H-G230A-R293Q (named the HAQ haplotype). Individuals with HAQ haplotype exhibit a 90% loss in the ability to stimulate IFN- β production. We have tested the ability of over-expressed HeLa STING to induce IFN- β compared to a previously reported human STING. We have also tested the ability of VSV-GFP to replicate in HeLa cells overexpressing either the described or the HeLa version of STING. From our data we can conclude that IFN mediated antiviral response in HeLa cells is partially altered by the presence of R71H-G230A-H232R-R293Q SNPs in STING. We are currently exploring possible relationship between R71H-G230A-H232R-R293Q STING haplotype and chronic viral infections, a marker that could help to fight infections.

INMUNOGENÉTICA, HLA Y TRASPLANTE

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

P-072. ASOCIACIÓN DE TLR10, INDEPENDIENTE A NOD2, CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD DE CROHN

C. Abad Molina, M.F. González Escribano, J.M. Lucena Soto, J.L. Márquez, E. Leo, C. Crivell, M. Gómez García, J. Martín, A. Núñez Roldán y J.R. García Lozano

Servicio de Inmunología y Aparato Digestivo, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Granada.

Objetivos: Investigar el posible papel del cluster génico TLR10-TLR1-TLR6 en la susceptibilidad a desarrollar enfermedad de Crohn (EC).

Material y métodos: Se incluyeron un total de 382 donantes de médula ósea y 379 pacientes con EC. Se genotiparon 11 SNPs del cluster génico TLR10-TLR1-TLR6 y las mutaciones en el gen NOD2 mediante sondas Taqman. Las interacciones entre NOD2 y TLR se analizaron por regresión logística y multifactor-dimensionality reduction (MDR).

Resultados: Se identificó un haplotipo en el gen TLR10 (TLR10GGGG) asociado con susceptibilidad a EC. Los individuos con 2 copias del haplotipo TLR10GGGG tenían dos veces más riesgo de padecer EC que los individuos sin ninguna copia (OR = 2,32, IC95% 1,54-3,48, p = 0,0001). El análisis MDR demostró que el modelo de dos locos que incluía las mutaciones en NOD2 y el haplotipo TLR10GGGG fue el modelo más fuerte para predecir el riesgo a desarrollar EC (p < 0,0001). Sin embargo, la ganancia de interacción obtenida por la combinación de ambos genes fue negativa ($\Delta G = -2,43\%$), indicando un efecto de ambos loci redundante o independiente.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que el gen TLR10 está asociado con la susceptibilidad a padecer EC. El efecto de TLR10 sería independiente del efecto de las variantes de NOD2 asociadas a esta enfermedad, sugiriendo que NOD2 y TLR10 tienen diferentes rutas de señalización.

P-073. POLIMORFISMOS EN EL GEN HAVCR1 Y CURSO CLÍNICO DE LA INFECIÓN POR VIRUS DE LA HEPATITIS C

C. Abad Molina, J.R. García Lozano, M.A. Montes Cano, A. Torres Cornejo, M. Romero Gómez, N. Barroso Relinque, L.F. López Cortés, J. Aguilar Reina, A. Núñez Roldán y M.F. González Escribano

Servicio de Inmunología y Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla (IBIS), Sevilla. Servicio de Hepatología, Hospital Universitario de Valme, Sevilla. Servicio de Digestivo, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Objetivos: Replicar la asociación del gen HAVCR1 y el aclaramiento viral espontáneo del virus de la hepatitis C (HCV). Investigar la influencia del gen en el curso de la infección por HCV.

Material y métodos: 285 pacientes monoinfectados (cohorte 1, 278 con datos de genotipo viral: 213 G1 y 65 no G1) y 182 co-infectados con HIV (cohorte 2, 87 infectados con G1 y 95 no 1) con infección persistente, 69 individuos aclaradores espontáneos (AE) y 320 no infectados. Los datos de respuesta al tratamiento se conocían en 217 de la cohorte 1 (112 con respuesta sostenida, RS y 105 con no RS) y 126 de la cohorte 2 (68 con RS y 58 no RS). Se genotiparon 6 tagSNPs usando sondas Taqman y 3 Ins/Del mediante análisis de fragmentos. Se construyeron haplotipos utilizando Famhap. Las frecuencias se compararon mediante χ^2 . El estudio de homología entre secuencias se realizó utilizando el algoritmo BLAST.

Resultados: No se encontraron diferencias significativas en la distribución de haplotipos de HAVCR1 al comparar crónicos con AE ni RS con no RS. El haplotipo C presentaba la mayor tasa de infección por G1 (75,8% p = 8×10^{-5}) y el haplotipo D la más baja (57,8%, p = 0,06). Existen zonas de homología entre genotipos virales (G1, G2 y G3) y el exón 4 del gen. El grado de homología depende del genotipo viral y del haplotipo del gen.

Conclusiones: Nuestros resultados apoyan la influencia de los factores genéticos del hospedador en la evolución de la infección por HCV.

P-074. ANTICUERPOS ANTI-HLA PREFORMADOS ESPECÍFICOS DEL DONANTE (DSA) DETECTADOS POR CDC Y ENSAYO EN FASE SÓLIDA SON PERJUDICIALES PARA LA BUENA EVOLUCIÓN A LARGO PLAZO DEL ALOINJERTO HEPÁTICO: CÓMO GRADUAR EL RIESGO INMUNOLÓGICO ESTUDIANDO UNA SERIE AMPLIA

M.R. Álvarez López, A. Bosch, F. Boix, R. López Hernández, H. Martínez Banaclocha, G. Salgado, J.A. Campillo, A. Minguela, M. Miras, M.R. Álvarez López y M. Muro

Servicios de Inmunología y Medicina Digestiva, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

The actual significance of a positive cross-match (CM) in liver transplantation remains controversial. In this retrospective study, we analyzed the effect of the presence of preformed DSA in a cohort of 869 liver transplants. CMs were performed by CDC and antibody screening by flow cytometry and luminex (LabScreenTM, OL). Positive anti-donor CM was detected in 4.1%. Acute rejection frequency in +CDC CM patients was not different from that observed in -CDC CM patients. There were also no differences in the severity of the rejection episodes between patients transplanted with positive or negative CDC CM. Chronic rejection incidence was 6.5% and only two of the patients transplanted with +CDC CM developed chronic rejection. However, the patients with +CDC CM showed a significantly lower al-

lograft survival rate (25.8% vs. 59.1%) ($p = 0.001$), and the majority of them had allograft failures before the end of the first post-transplant year, mainly within the 3 first months. A greater, but not statistically significant number of patients with positive donor-specific CDC CM, as compared with those with negative CDC test, lost their grafts due to sepsis. Indeed, positive micro-beads array determination was concordant with the data of CDC assay. In conclusion, these findings show a direct correlation between the presence of DSA preformed antibodies and a very poor allograft survival in liver transplantation, indicating the important role of anti-donor CDC CM and the interest of the performance of this test prior to liver allograft transplantation as a predictive factor for the early graft tolerance rupture and organ failure.

P-075. GENES HLA EN AMERINDIOS WAYU DE COLOMBIA

A. Arnaiz Villena, D. Rey Medrano, C. Silvera, C. Areces Viña, C. Parga Lozano, J. Martínez Laso y M. Enríquez de Salamanca Carrascosa

Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Hospital 12 de Octubre, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Departamento de Genética, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia. Unidad de Inmunoterapia Celular, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Objetivos: Los amerindios Wayu se distribuyen entre Venezuela y Colombia. Los orígenes y la prehistoria de los Amerindios siguen todavía en debate. Su perfil HLA es diferente al de todas las otras poblaciones del mundo, aunque tienen alelos en común con asiáticos, australianos y habitantes de las islas del Pacífico. En el presente trabajo, se han estudiado los alelos de HLA-A, -B, -DRB1, -DQB1 en amerindios Wayu procedentes de Colombia.

Material y métodos: Se ha estudiado una muestra de individuos Wayu colombianos no relacionados. Los alelos y haplotipos HLA, las distancias genéticas y los dendogramas NJ se calcularon con los programas de computador Arlequin y DISPAN.

Resultados: Solo unos pocos alelos de clase I y de clase II fueron observados. Los haplotipos extendidos más comunes incluyen: A*24-B*51-DRB1*0403-DQB1*0302, A*2-B*15-DRB1*1602-DQB1*0301, A*2-B*35-DRB1*0407-DQB1*0302, así como A*68-B*15-DRB1*0403-DQB1*0302.

Conclusiones: El perfil HLA de Wayu es típicamente amerindio y muestra como, en este caso particularmente, lenguas y genes no se correlacionan. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser útiles para futuros programas de trasplante y también para enfermedades ligadas al HLA y farmacogenética individualizada.

P-076. GENES HLA DE CLASE II EN AMERINDIOS MAYAS DE MÉXICO: RELACIÓN CON LOS MAYAS DE GUATEMALA Y OTRAS POBLACIONES

A. Arnaiz Villena, D. Rey Medrano, G. Vargas Alarcón, S. Abd El-Fatah-Khalil, C. Areces Viña, C. Parga Lozano y M. Enríquez de Salamanca Carrascosa

Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Hospital 12 de Octubre, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Departamento de Biología Molecular, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, México.

Objetivos, material y métodos: Hemos analizado las frecuencias alélicas de HLA de clase II Mayas sanos no emparentados. Su emparentamiento con otras poblaciones del mundo ha sido

estudiada analizando un total de 11.540 cromosomas de todo el mundo.

Resultados: Los alelos más frecuentes fueron HLA-DRB1*04, HLA-DRB1*01, HLA-DQB1*0302 y HLA-DQB1*0501. Los Mayas muestran una elevada frecuencia de HLA-DRB1*01 cuando se comparan con Nahuas, Mayos, Teneek y Mazatecos ($p < 0.05$), y de HLA-DRB1*04 al compararlos con Nahuas ($p < 0.05$). Los análisis de HLA-DQB1 muestran una elevada frecuencia de HLA-DQB1*0302 en Mayas cuando se comparan con Nahuas y Mazatecos ($p < 0.05$) mientras que la de HLA-DQB1*0301 disminuye ($p < 0.05$). Se ha encontrado una disminución de la frecuencia de HLA-DQB1*0501 en Mayas al compararlos con Nahuas. El dendrograma "Neighbour Joining" muestra que los Mayas procedentes de México se encuentran genéticamente próximos a algunos de los grupos más antiguos que viven en la nación mexicana y a algunos Amerindios de Sudamérica. Sin embargo, los Mayas de Guatemala no se agrupan junto con los Mayas de México, lo que muestra que las lenguas no se correlacionan con los genes, particularmente en Amerindios.

Conclusiones: Los datos corroboran el polimorfismo restringido de los alelos de HLA-DRB1 y HLA-DQB1, así como la elevada frecuencia de HLA-DRB1*04 y HLA-DQB1*0302 en Mayas procedentes de México, y su poco emparentamiento genético con los Mayas de Guatemala, de nuevo sugiriendo que las lenguas pueden ser adquiridas o impuestas en grupos étnicos poco emparentados genéticamente.

P-077. EL ORIGEN DE LOS AMERINDIOS Y EL POBLAMIENTO DE AMÉRICA DE ACUERDO CON LOS GENES HLA: FLUJO GENÉTICO CON ASIÁTICOS Y HABITANTES DE LAS ISLAS DEL PACÍFICO

A. Arnaiz Villena, C. Parga Lozano, E. Moreno, C. Areces Viña, M. Fernández Honrado y D. Rey Medrano

Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Hospital 12 de Octubre, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Servicio de Cirugía General, Unidad de Trasplante, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

Objetivos: La teoría clásica de las tres oleadas migratorias del poblamiento de América a través de Beringia, basada en antropología y lingüística, está hoy muy discutida. Existen datos arqueológicos, antropológicos y genéticos que contradicen este dogma.

Material y métodos: En el presente trabajo, hemos reunido los datos más disponibles de HLA ya obtenidos de las primeras poblaciones nativas de América, que levantan dudas sobre la hipótesis clásica de las tres oleadas migratorias del poblamiento de América Central del Norte y del Sur. Se han estudiado con los programas Arlequin y Treeview y diferentes poblaciones Amerindias y mundiales (número de cromosomas = 14.698).

Resultados y conclusiones: En resumen, nuestras conclusiones son: 1) Los Atabascos del Noroeste de Canadá han tenido intercambio genético con: a) poblaciones vecinas próximas, b) Amerindios, c) poblaciones de las islas del Pacífico incluyendo australianos orientales y d) Siberianos; 2) Probablemente, Beringia no fue la única entrada de gentes a América: los viajes en barco por el Océano Pacífico pudieron contribuir al perfil genético HLA americano, un flujo de población inverso también podría haber ocurrido; 3) Los Amerindios muestran muy pocos "alelos particulares", casi todos son compartidos con otros Amerindios, Atabascos, habitantes de las islas del Pacífico, incluyendo australianos orientales, y Siberianos; 4) Por último, se demuestra que los análisis de frecuencias alélicas, árboles de emparentamiento y distancias genéticas en estudios de poblaciones y migraciones deberían completarse con análisis genealógicos de genes específicos.

P-078. LOS RESIDUOS PROTEICOS CONSERVADOS Y EL TAMAÑO DEL INTRÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I EN LAS PEQUEÑAS AVES DE CANTO REVELAN UNA EVOLUCIÓN ÚNICA EN VERTEBRADOS

A. Arnaiz Villena, D. Rey Medrano, P. Gómez Prieto, P. Reche, E. Lowy, J. Zamora, C. Areces Viña, C. Parga Lozano y J.I. Serrano Vela

Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Hospital 12 de Octubre, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

Objetivos: Las aves se consideran dinosaurios que pasaron el cuello de botella de hace 65 millones de años. Las aves de canto (Páseriformes) comprenden alrededor de la mitad (aproximadamente 5000) de las especies de aves existentes. Las moléculas de histocompatibilidad (MHC) de clase I tienen siete residuos conservados en todos los vertebrados desde los peces mandibulados, de hace 300 millones de años, hasta el hombre, incluyendo el pollo.

Material, métodos y resultados: La amplificación, clonación y secuenciación fueron realizadas con metodología estándar de las moléculas MHC de clase I de aves. La alineación de las secuencias fue llevada a cabo utilizando los programas MEGA y PAUP. Todas las especies de aves de canto salvajes analizadas por nosotros ($n = 18$) y otras ($n = 2$) difieren en los residuo 10 y 96 de los dominio $\alpha 1$ y $\alpha 2$ respectivamente, de todos los otros vertebrados. Además, se ha encontrado que los intrones de MHC de clase I de Páseriformes (aves de canto) son más largos que los de los humanos, y que los de pollo son los más cortos.

Conclusiones: Las pequeñas aves de canto, principalmente voladoras, (Páseriformes) han sido objeto de un camino evolutivo diferente, en cuanto a MHC, al de todos los otros vertebrados analizados y otras aves terrestres, aunque la estabilidad entrópica-crystalográfica es similar. Esto pudo haber tenido su origen en otro linaje diferente de dinosaurios o en la adaptación a un ambiente más aéreo que terrestre o en otras causas desconocidas.

P-079. BAJA INTENSIDAD MEDIA DE FLUORESCENCIA PODRÍA NO SER UN PARÁMETRO SEGURO PARA EVALUAR EL DIFERENTE RIESGO INMUNOLÓGICO EN PACIENTES CON EPÍTOPOS MOLECULARES EPLETS EN TRASPLANTE RENAL

A. Bosch Martínez, S. Llorente, F. Boix, R. López Hernández, M. López Sánchez, M.J. González Soriano, G. Salgado, J.A. Campillo, N. Pérez, M.R. Álvarez López y M. Muro

Servicios de Inmunología y Nefrología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Objectives, material and methods: This work presents divergences with respect to luminex MFI levels considered as low risk (< 1500), but producing humoral rejection. A 42-year-old-woman (HLA-A*26; B*07,*37; DRB1*10,*15) was re-transplanted (A*02,*03; B*07; DRB1*03,*15). Our patient was pre-transplant (PrT) sensitized (PRA = 33%) by microbeads array (OL), against one previous Tx performed with A32, B35 and DR4 mismatches.

Results: Thus, the detected sensitized Ags were A32, 30,3 1, CREG5C, DQ3 with MFI_{max} 3000. Before 2nd Tx, CM CDC was negative. In post-Tx, the patient had instability in renal function and we detected an increase in PRA = 69% with MFI_{max} = 15000 (A*32) with other Ags [detected with a low PrT MFI < 1000] as A*03 (MFI_{max} = 12000) and A*11 (MFI_{max} = 12500) specificities. A*03 was a DSA (2nd donor+). Biopsy was compatible with humoral rejection +C4d. She was pulsed with corticosteroids/PP/IVIG without functional improvement. Thus, we added anti-CD20 and clinical response was highly favorable suggesting reversion. The MFI A*03DSA had fallen to 6900 and later to 5500. After 4 months, the patient is currently well with MFI-

max = 3000, creatine < 1.6 mg/dl and proteinuria < 100mg/day. It was possible to define the potential immunizing epitopes eplets whose recognition determined Ab production. A*32:01,*30:01,*31:01 (detected PrT), *11:01 and *03:01 (detected PT) have shared eplets being 62QE present on all alleles. Thus, the recognition of 62QE in the first Tx modeled the Ab response of our recipient with Ags not detected (low MFI) in 2nd PrT (A*03,*11) and detected PT.

Conclusions: Low MFI level with low risk could be important in the PT humoral rejection, although the patient can restores her function. Thus, alloAbs can form against specific shared eplets and should be investigated in previous Tx mismatches.

P-080. ASOCIACIÓN ENTRE EL ALELO HLA-B*35 Y SUSCEPTIBILIDAD PARA EL DESARROLLO DE LIPODISTROFIA CLÍNICA EN UN GRUPO DE PACIENTES CON INFECCIÓN VIH DE MÁLAGA

M.J. Bravo Romero, J.D. Colmenero Castillo, M.I. Queipo Ortuño, F. Jiménez Oñate, M. Delgado Fernández, F. Orihuela Cañadas, R. Lavado Valenzuela, A. Alonso Ortiz, A. Caballero González y N. Fernández Arcás

Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga.

Introducción: La terapia antirretroviral de gran actividad (TARGA), ha mejorado la expectativa de vida de los pacientes con infección VIH pero conlleva efectos metabólicos adversos. La complicación más frecuente es la dislipemia acompañada frecuentemente del desarrollo progresivo de lipodistrofia (LD), caracterizado por la pérdida de tejido adiposo subcutáneo en cara, nalgas y extremidades- y/o un incremento de la adiposidad perivisceral abdominal, referido como lipohipertrofia. Hay datos que parecen indicar que existe una predisposición genética individual para el desarrollo de la lipodistrofia y los desórdenes lipídicos asociados.

Objetivos: Evaluar si existe algún alelo HLA clase I prevalente en los pacientes con infección VIH que desarrollan lipodistrofia clínica.

Sujetos y métodos: Hemos incluido 42 pacientes con infección VIH que presentaban lipodistrofia severa y 73 controles sanos. Las muestras de ADN se han extraído a partir de sangre total mediante un kit comercial (Quiagen). El tipaje de los alelos HLA clase I se determinó con LABtype SSO typing test kit (One Lambda).

Resultados: El análisis de la distribución de las frecuencias del alelo HLA-B*35 mostró que se encuentra porcentualmente más representado en pacientes con lipodistrofia respecto a los controles (38,1% vs 13,7%) $p = 0,005$; siendo este alelo el más frecuente en la distribución de pacientes que desarrollan lipodistrofia.

Conclusiones: Estos resultados sugieren que la variante HLA-B*35 podría estar involucrada en la susceptibilidad frente al desarrollo de lipodistrofia en un grupo de pacientes con infección VIH de Málaga, aunque serían necesarios estudios posteriores para confirmar este hallazgo.

P-081. LOW TITERS OF ANTI-CMV ANTIBODIES DESPITE CMV-SPECIFIC INTRAVENOUS IMMUNOGLOBULIN PROPHYLAXIS IN SERONEGATIVE HEART RECIPIENTS

J. Carbone, N. Lanio, A. Gallego, N. del Pozo, J. Rodríguez Molina, J. Fernández Yáñez, J. Palomo, J. Navarro, P. Muñoz y E. Sarmiento

Servicios de Inmunología, Microbiología y Cardiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Objectives: Discordant CMV serological status (Donor+/Receptor-) is a risk factor for development of CMV associated

complications (primoinfection and disease) in heart recipients (HR). CMV-specific intravenous immunoglobulin (CMV-IVIG) prophylaxis is indicated in discordant recipients. In our cohort of HR, discordant patients disclosed a significantly higher prevalence of CMV complications (64 vs 14%, $p = 0.001$) than seropositive recipients. We assessed the reconstitution of specific anti-CMV antibodies after administration of CMV-IVIG.

Methods: In a prospective follow-up study, 11 consecutive discordant HR were studied. Prophylaxis with ganciclovir/valganciclovir was administered for up to 100 days after transplantation. CMV-IVIG was added as follows: 150 mg/kg within 24 hours after transplantation and 100 mg/kg at days 2, 7, 14, 22, 35, 56, and 77. The CMV-IVIG preparation contained 50 Units of the Paul-Ehrlich Institute per mL. 65 CMV seropositive HR who did not developed severe infectious complications during follow-up were studied as controls. Anti-CMV titers were performed by ELISA.

Results: As compared with baseline values, discordant recipients reached significantly higher anti-CMV Ln-titers at day-7 ($p = 0.007$), 1-month ($p = 0.004$) and 3-months ($p = 0.032$). However, anti-CMV titers were significantly lower as compared with uninfected controls at all study points: baseline, 5.46 vs 9.69, $p < 0.001$; day-7, 8.51 vs 9.52, $p = 0.005$; 1-month, 7.55 vs 9.38, $p < 0.001$; 3-months, 7.44 vs 9.55, $p < 0.001$; 6-months, 6.37 vs 9.93, $p < 0.001$; and 1-year, 8.55 vs 9.84, $p = 0.004$.

Conclusions: Discordant HR did not reached specific anti-CMV titers associated with better control of CMV complications despite administration of protocolized doses of CMV-IVIG. This protocol should be reevaluated.

P-082. HLA CLASS I AND II ANTIGEN EXPRESSION IN HUMAN BLADDER CANCER CELL LINES

A.B. del Campo Alonso, J. Carretero Coca, S. Zinchenko, N. Aptsiauri y F. Garrido Torres-Puchol

Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

Tumor immune escape plays a critical role in cancer progression, but the mechanisms involved in this process have still to be defined. In the recent years, different HLA class I abnormalities have been found in tumors. The lack or downregulation of the expression of single or multiple components of the HLA class I antigen processing pathway may help tumor cells to avoid the recognition and elimination by tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes. Altered expression of HLA class I antigens was previously reported in bladder carcinoma (Maleno et al 2006, 2010) describing high frequency of the loss of heterozygosity (LOH) in chromosomes 6p21.3 (35%) and 15q21 (44%). Here we analyzed the HLA class I expression in seven human bladder cell lines by FACS with a panel of monoclonal antibodies against HLA class I-II proteins. None of the cells lines showed a total loss of HLA class I molecules, however several cases of locus-A, -B or -C downregulation were detected. None of the studied cell lines expressed HLA class II in basal conditions. The HLA-class I genomic typing was performed by PCR-SSO and the presence of LOH in chromosome 6 and 15 is being analyzed by microsatellite analysis. Preliminary results suggest that the studied cell lines have high incidence of LOH in chromosome 6, comparable with the data in bladder carcinoma tissues, while the frequency of LOH in chromosome 15 was found to be lower in cell lines than in tumors.

P-083. EL LOCUS IGH EN FELINOS

F. Gambón Deza, S. Mirete Bachiller, S. Magadán Mompó y C. Sánchez Espinel

Unidad de Inmunología, Hospital do Meixoeiro, Vigo.

En los últimos años se están poniendo a disposición de la comunidad científica numerosos genomas de vertebrados. En estos genomas se puede estudiar la composición del locus IGH. Se presenta la estructura de este locus deducida de las secuencias del proyecto del genoma de *Felis catus*. En un segmento del cromosoma B3 encontramos genes para todos los anticuerpos que se encuentran en los mamíferos incluyendo la IgM, IgG e IgE (descriptas en esta especie los RNA mensajeros) y describiendo la IgD y la IgA del gato que no habían sido anteriormente estudiadas. También hacemos la descripción de los segmentos VH, D y JH. Los genomas en su estado de borrador como este presentan numerosos huecos que hacen difícil su estudio. Nosotros presentamos un método para llenar los gaps y corregir secuencias aprovechando el archivo SRA del NCBI con secuencias provenientes de los secuenciadores de última generación.

P-084. ANÁLISIS DE LA IDENTIDAD EN LA REGIÓN MHC ENTRE PACIENTES Y DONANTES NO EMPARENTADOS HLA IDÉNTICOS EN TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

V. García López, J. Gil, C. Ambrós, E. Campos, L. Mongay, J. Caro, S. Mantecón, M.J. Herrero, I. Salvador, R. Faner y E. Palou

Banc de Sang i Teixits, Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona.

Objetivos: En el trasplante de progenitores hematopoyéticos con donantes HLA idénticos no emparentados se ha observado que la incompatibilidad en el conjunto del haplotipo MHC, a pesar de identidad total en los loci HLA clásicos, aumenta el riesgo de enfermedad del injerto contra el huésped aguda. El objetivo del presente trabajo es averiguar el grado de identidad real de los haplotipos MHC entre pacientes trasplantados y donantes no emparentados HLA idénticos.

Material y métodos: Se han estudiado 46 parejas paciente-donante no emparentado HLA idénticos por alta resolución en los 5 loci HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 y HLA-DQB1, procedentes de tres hospitales (Hospital Vall d'Hebron, Hospital Germans Trias i Pujol y ICO-Durán i Reynals). Se han analizado 7 microsatélites de DNA (STRs) situados en la región MHC mediante PCR multiplex.

Resultados: Los microsatélites más conservados son D6S273 y D6S265, situados en la región de los genes de HLA clásicos, con 14 y 20 parejas con los 2 haplotipos idénticos y con solo 0 y 1 parejas con los 2 haplotipos diferentes, respectivamente. Los menos conservados son los situados en los extremos de las regiones extendidas de clase I y II. Para cada pareja el grado de disparidad varía entre 5 identidades de 14 posibles hasta 12 de 14, siendo la media 7,8.

Conclusiones: El grado de identidad entre pacientes trasplantados y sus donantes no emparentados HLA idénticos en la región MHC es globalmente del 55%, concentrándose esta identidad alrededor de los genes HLA clásicos.

P-085. IMPORTANCIA DE LAS ASOCIACIONES HLA B-C Y SUS LIGANDOS KIR EN PACIENTES CON ESPONDILITIS ANQUILOPOYÉTICA

R. González Fernández, B. Manzanares Martín, M. Frías Casas, E. Collantes Estévez y J. Peña Martínez
Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Introducción: La espondilitis anquilopoyética (EA) es una enfermedad crónica, inflamatoria, que presenta gran asociación con HLA-B27. Se han descrito diferentes asociaciones entre HLA-B27 y HLA-C: B*27:05 con C*01:02 y 02:02 y B*27:02 con C*02:02. Los KIR corresponden a un grupo de moléculas reguladoras que reconocerían diferentes moléculas de clase I y dependiendo de las mismas podrían transmitir señales inhibidoras o activadoras. Este desbalance ha resultado importante en diferentes patologías inflamatorias estudiadas.

Objetivos: Analizar si el polimorfismo KIR presente en pacientes con EA y las asociaciones HLA B-C son importantes en la susceptibilidad a la enfermedad.

Pacientes y métodos: Se han genotipado HLA B, C y KIR en 75 pacientes con EA. "B y C locus High Res SSP Unitray Kit" Invitrogen y "KIR Genotyping SSP Kit", invitrogen.

Resultados: Se han clasificado los pacientes en función de Bw4 (homo o heterocigotos) y HLA C-Asn80 (C1) o HLA C-Lys80 (C2). También se han analizado las diferentes asociaciones HLA B-C y la presencia de genes y haplotipos KIR en estos pacientes. Un 36,6% de nuestros pacientes son Bw4 homozigotos y el 63,3% heterozigotos. El 53% de EA presentan B*27:05 y C*01:02, 30% B*27:05 y C*02:02, 10% B*27:02 y C*02:02 y 7% otros. C1/C1 39%, C1/C2 50% y C2/C2 11%. Se presentarán también los datos referentes a susceptibilidad a padecer la enfermedad en los diferentes grupos y de la evolución clínica.

Conclusiones: La realización conjunta del genotipaje HLA B, HLA C y KIR puede resultar de ayuda para determinar la susceptibilidad a EA.

P-086. ASOCIACIÓN DEL GENOTIPO KIR AA CON NIVELES CELULARES AUMENTADOS DE DNA DEL VIH-1 EN INDIVIDUOS CON INFECCIÓN CRÓNICA VIH-1

D.C. Hernández Flórez, C. Rodríguez Sainz, J. Modrego Ruiz y E. Fernández Cruz

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos: El sistema KIR consta de 15 genes polimórficos que codifican los receptores KIR (Killer Immunoglobulin-like Receptors) de las células NK y T CD8+ citotóxicas. Se han definido dos genotipos KIR básicos: AA y Bx. En infección crónica por VIH-1 el genotipo Bx se ha asociado a recuentos más bajos de linfocitos T CD4+. Nuestro objetivo era estudiar el impacto de los genotipos KIR en el contenido celular de DNA del VIH-1.

Material y métodos: Analizamos retrospectivamente el genotipo KIR en 94 individuos con infección crónica VIH-1 y sin tratamiento antirretroviral, que participaron en el ensayo clínico STIR-2102. Se estudiaron las cargas de DNA del VIH-1 asociadas a las células mononucleares de sangre periférica (PBMC), los recuentos de linfocitos T CD4+ y las cargas virales RNA del VIH-1 plasmáticas (CV) correspondientes al momento del reclutamiento en el estudio. El efecto de los genotipos KIR en estas variables se estudió mediante análisis de regresión lineal.

Resultados: Encontramos una asociación entre los genotipos y la carga celular de DNA del VIH-1 en un análisis de regresión li-

neal univariante ($p = 0,006$). El genotipo AA se asocia a cargas celulares de DNA del VIH-1 más elevadas que el genotipo Bx [mediana = 1.603 copias/106 PBMCs (rango: 245-32.560) vs mediana = 553 copias/106 PBMCs (rango: 245-32.240), respectivamente]. No encontramos diferencias entre los genotipos AA y Bx para el recuento de T CD4+ ni para la CV.

Conclusiones: En nuestro estudio el genotipo KIR AA se asocia a mayor contenido celular de DNA del VIH-1.

P-087. CARACTERIZACIÓN INMUNOVIROLÓGICA DE UN PACIENTE VIH-1+ HOMOZIGOTO PARA LA DELECIÓN CCR5DELTA32

D.C. Hernández Flórez, E. Fernández Cruz, J. Modrego Ruiz, D. Alecsandru y C. Rodríguez Sainz

Servicio de Inmunología Clínica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos: La delección CCR5delta32 impide la expresión en la superficie celular del co-receptor CCR5 y determina resistencia a la infección por el VIH-1. Los individuos homozigotos para CCR5delta32 VIH-1+ son raros, con un total de doce casos publicados. Nuestro objetivo era estudiar la evolución inmunoviroológica de un paciente homozigoto CCR5delta32/CCR5delta32 durante un período de seguimiento de 5 años tras iniciar la terapia antiviral.

Material y métodos: El individuo CCR5delta32/CCR5delta32 formaba parte de una cohorte de 187 pacientes VIH-1+ sin tratamiento previo que participaron en el ensayo clínico STIR-2102. El paciente fue aleatorizado a recibir terapia antirretroviral con zidovudina, didanosina más un inmunógeno VIH-1. Los recuentos de linfocitos T CD4+ y los niveles plasmáticos de RNA del VIH-1 se determinaron trimestralmente durante 5 años de estudio. De forma retrospectiva los pacientes fueron genotipados, se cuantificaron los niveles de DNA del VIH-1 en las células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) y se efectuó el análisis genotípico del trofismo viral.

Resultados: El recuento pre-ART de linfocitos T CD4+ fue de 327 células/ μ L y la viremia RNA VIH-1 y la carga celular de DNA VIH-1 fueron indetectables. Durante los 60 meses siguientes el paciente permaneció con porcentajes estables de CD4+ (entre 17 y 22% [329 a 625 células/ μ L]) y el RNA VIH-1 se mantuvo por debajo de los límites de detección. Antes y después de la terapia encontramos variantes X4 (o X4/R5).

Conclusiones: El individuo CCR5delta32/CCR5delta32 permaneció inmunovirológicamente estable durante el estudio, con variantes virales CXCR4 trópicas.

P-088. ANÁLISIS DE SNPs (-238G/A Y -308G/A) DEL PROMOTOR DEL GEN DE TNF-A Y LA RESPUESTA AL INHIBIDOR INFILIXIMAB EN PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL

R. López Hernández, A. Cánovas, P. Martínez, F. Boix, J.A. Campillo, H. Salama, N. Pérez, M. Miras, F. Carballo, M.R. Álvarez López y M. Muro

Servicios de Inmunología y Medicina Digestiva, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.

Introduction: TNF- α , codified on IBD3 region, is a key cytokine known to play a role in inflammatory response. TNF- α /TNF receptor interactions can modify inflammatory response and also cause apoptosis, cell proliferation and

differentiation. Alterations in the regulation of TNF- α , especially TNF- α over-production, have been implicated in autoimmune disorders, including IBD and Crohn disease (CD). Indeed, a common treatment of CD is the use of TNF- α inhibitors such as the monoclonal antibody, infliximab (IFX). Several SNPs in the TNF- α promoter region affect the level of gene expression.

Objectives: The aim was to investigate the role that these SNPs in the TNF- α promoter gene play in the risk of IBDs in a Spanish population and the individual response to IFX treatment. Materials: DNA samples from 60 patients with CD, 30 patients suffering UC and 154 controls from the Murcia Region (Spain) were screened for TNF- α -238G/A and -308G/A SNPs by PCR-SSOP method using a microbeads luminex assay (Gen-Probe, CA).

Results: There were not any statistical differences in individual -238G/A and -308G/A allele and genotype frequencies between patients with CD, UC, IBD and healthy control groups for each studied polymorphism. The study of combinations between the two polymorphisms and the different pathologies were also not statistically significant. Indeed, the comparisons of allele and genotypes frequencies with respect to the treatment with the TNF- α inhibitor, IFX, were also not significant.

Conclusions: TNF- α promoter gene polymorphism does not seem play a role in susceptibility and response to TNF- α inhibitor IFX treatment in IBD patients.

P-089. RESULTADOS DE BÚSQUEDAS FAMILIARES AMPLIADAS DE DONANTES DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS PARA PACIENTES HEMATOLÓGICOS DE CÓRDOBA Y JAÉN

B. Manzanares Martín, C. Martín Calvo, R. González Fernández, L. Castro Orgaz, A. Torres Gómez, J. Ramírez Huerta y J. Peña Martínez

Hospital Reina Sofía, Córdoba. Hospital Ciudad de Jaén.

Introducción: La probabilidad de encontrar donantes depende de la frecuencia de los alelos y haplotipos HLA del paciente y viene definida en gran parte por la raza y zona geográfica del mismo. Por lo tanto, es necesario conocer los datos para cada población con el fin de evaluar el enfoque y la búsqueda de donantes.

Objetivos: Primero: Analizar los alelos y haplotipos HLA más frecuentes en nuestros pacientes hematológicos. Segundo: Analizar el resultado de la búsqueda familiar ampliada en nuestros pacientes sin donantes en registros internacionales.

Pacientes y métodos: En el presente trabajo se han estudiado 200 pacientes en espera de donantes de progenitores hematopoyéticos de Córdoba y Jaén. Se ha tipado HLA-A*, B*, C* y DRB1* por alta resolución ("A, B y C locus High Res SSP Unitray Kit", Invitrogen e "Inno-Lipa HLA DRB decoder", Innogenetics).

Resultados: En la mayoría de nuestros pacientes el donante fue un hermano o un no relacionado. En un caso fue un progenitor (solo una incompatibilidad en DPB1). En el resto de pacientes se inició una búsqueda familiar ampliada. Los haplotipos más comunes en nuestra población no coincidieron con los más frecuentes que presentaban los pacientes en los que se inició la búsqueda familiar ampliada. El mejor resultado consiguió un donante con 7 de 8 compatibilidades y pertenecía a la familia más amplia y no a la del haplotipo menos frecuente.

Conclusiones: Se considera de gran interés el conocimiento de alelos y haplotipos HLA de cada zona para establecer la política de búsqueda de donante.

P-090. HAPLOTIPOS HLA EN CÓRDOBA Y JAÉN EN LOS QUE ESTÁ INDICADA UNA BÚSQUEDA FAMILIAR AMPLIADA DE DONANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

B. Manzanares Martín, R. González Fernández, R. Rojas Contreras, M. Frías Casas, S. Durán Nieto, J. Peña Martínez y A. Torres Gómez

Hospital Reina Sofía, Córdoba. Hospital Ciudad de Jaén.

Introducción: A pesar de la creciente expansión de los registros de donantes, la compatibilidad HLA sigue siendo un problema para muchos pacientes debido al gran polimorfismo de estos genes. Por tanto el conocimiento de las frecuencias HLA de cada región es útil para determinar la probabilidad de encontrar un donante con un particular HLA y establecer los criterios de búsqueda.

Objetivos: establecer aquellos haplotipos con frecuencia mayor al 1% en nuestra zona geográfica a fin de establecer los criterios de inicio de una búsqueda familiar ampliada.

Pacientes y métodos: Se han tipado los alelos (HLA)-A-B-C-DRB1 y se han seleccionado los 4 haplotipos de cada una de las 100 familias estudiadas de las provincias de Córdoba y Jaén.

Resultados: Los resultados sobre la distribución de los alelos más comunes y asociaciones entre alelos demostraron en parte similitud con los datos publicados anteriormente en poblaciones caucásicas, dado el origen geográfico de la población estudiada. Sin embargo entre los haplotipos más frecuentes encontrados y con una frecuencia superior al 1% encontramos un número significativo de los mismos que no coinciden con los presentes en otras poblaciones estudiadas. Entre ellos destaca A*01:01-B*57:01-C*07:01-DRB1*07:01. En este haplotipo se presenta además la asociación B*5701-C*0701 en vez de B*57:01-C*06:02 que es más frecuente en nuestra población. También se reseña A*02:01-B*44:02-C*05:01 que se asocia a diferentes DRB1 pero en nuestro caso destaca DRB1*01:01.

Conclusiones: El estudio de las frecuencias HLA por áreas geográficas podría permitir diseñar las estrategias de búsqueda más eficientemente.

P-091. IMPORTANCIA DE LAS ASOCIACIONES HLA B-C EN LA BÚSQUEDA DE DONANTES DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

B. Manzanares Martín, R. González Fernández, C. Martín Calvo, A. Carrero González, G. Fornés Torres, L. Castro Orgaz, J.A. López López, A. Torres Gómez y J. Peña Martínez

Hospital Reina Sofía, Córdoba. Hospital Ciudad de Jaén.

Introducción: Aunque es frecuente encontrar una estrecha asociación HLA B-C existen alelos HLA B asociados a múltiples HLA C y asociaciones HLA B-C poco frecuentes. Estos datos deben ser tenidos en cuenta porque podrían estar involucrados en complicaciones después del trasplante por incompatibilidades HLA C del paciente con un posible donante no relacionado ante la imposibilidad de encontrar un donante HLA idéntico en este locus.

Objetivos: Estudio de las asociaciones HLA B-C y su implicación en la búsqueda de donante de progenitores hematopoyéticos.

Pacientes y métodos: Se ha tipado HLA B* y C en 150 familias mediante: "B y C locus High Res SSP Unitray Kit", Invitrogen con resolución de 4 dígitos.

Resultados: Los datos obtenidos son parecidos a los publicados de poblaciones caucásicas aunque hay aspectos diferenciales que merecen ser destacados. Se presentarán las asociaciones poco frecuentes, los alelos HLA-B que se asocian a mayor núme-

ro de HLA-C y las asociaciones HLA-B-C más estrechas. En algunos casos fue necesario conocer HLA-A y DRB1 para discriminar entre dos opciones. Se han encontrado 51 alelos HLA B* y 21 HLA C*. B*51:01 y B*55:01 son los alelos que se han visto involucrados en un mayor número de asociaciones, seguidos por B*44:02, B*44:03, B*15:01 y B*1801. C*07:04 a su vez se ha asociado a diferentes alelos HLA B*. Se discutirá la influencia de estos datos en la búsqueda de donantes.

Conclusiones: El tipaje HLA B-C por sí mismo es un factor importante en la búsqueda de donantes.

P-092. SEGUIMIENTO DE TRASPLANTE DUAL (CORDÓN-DONANTE HAPLOIDÉNTICO) MEDIANTE EL ESTUDIO DE STRS. EXPERIENCIA EN NUESTRO LABORATORIO

A.M. Marín, R. Duarte, E. Campos, P. Caro, J. Gil, S. Mantecón, C. Ambrós, L. Mongay, E. Palou y M.J. Herrero

Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques del Banc de Sang i Teixits (LIRAD BST), Barcelona. Institut Català d'Oncologia Hospital Duran i Reynals (ICO-Dir), Barcelona.

Introducción: Las limitaciones del trasplante con una USC en adultos (mayor tasa de fallo del injerto y lenta recuperación hematopoyética), pueden salvarse co-infundiendo con PH movilizados de un DHI. El método elegido en nuestro laboratorio para estudiar el quimerismo en pacientes trasplantados es el análisis de STRs en ADN de células sangre periférica (SP) y/o médula ósea (MO).

Objetivos: Realizar el seguimiento de pacientes co-trasplantados con sangre de cordón (USC) y progenitores hematopoyéticos (PH) movilizados de un donante haploidéntico (DHI) mediante el análisis de microsatélites DNA STRs.

Pacientes y métodos: Durante 2009-2010 se recibieron 44 muestras (31 SP y 13 MO) correspondientes a 7 pacientes a los que se les había realizado un trasplante dual (USC+PH-DHI). Para el estudio de quimerismo se amplificaron 9 loci con marcadores STRs (AmpFl STR ProfilerPlus, Applied Biosystems). Se compararon los perfiles STRs de las 3 muestras pre-trasplante (paciente, USC y DHI) con la muestra post-trasplante del paciente (GeneScan Análisis).

Resultados: En todos los pacientes se observó un injerto precoz de células del DHI. Tras un período variable de quimerismo doble completo DHI+USC, en 5 pacientes se logró un quimerismo completo de USC. Los dos pacientes que no consiguieron este quimerismo completo, fallecieron.

Conclusiones: La sensibilidad de la técnica utilizada permite detectar tres poblaciones celulares diferentes en muestras de pacientes co-trasplantados (USC+DHI). En el seguimiento post-trasplante, se observa una relación directa entre la evolución del injerto y el estudio de los perfiles STRs, confirmando el éxito del trasplante con el quimerismo completo de la USC.

P-093. ANÁLISIS DE LA IMPORTANCIA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-GSTT1 EN EL DESARROLLO DE EICH HEPÁTICA

M.J. Martínez Bravo, I. Aguilera, I. Tallón, I. Espigado, J.A. Pérez Simón y A. Núñez Roldán

Servicio de Inmunología; Servicio de Hematología, Hospital Universitario Virgen del Rocío e Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Introducción: La mayor complicación tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (alo-TPH) es la Enfermedad Injerto contra Huésped (EICH) producida por la incompatibili-

dad en los sistemas menores de histocompatibilidad entre donante (D) y receptor (R). La proteína Glutatión-S transferasa T1 (GSTT1) es una enzima detoxificadora hepática que presenta el alelo nulo en el 20% de la población caucásica. En el trasplante hepático, el receptor GSTT1 nulo desarrolla, frecuentemente, rechazo contra injertos GSTT1-positivos mediado por anticuerpos anti-GSTT1.

Objetivos: Analizar la influencia de la incompatibilidad genética GSTT1 entre donante y receptor tras el alo-TPH y su implicación en la EICH hepática.

Pacientes y métodos: Estudiamos 40 pacientes sometidos a alo-TPH en nuestro hospital (2004-2009). El genotipado se realizó por PCR y la detección de anticuerpos anti-GSTT1 mediante ELISA en muestras seriadas pre y post-trasplante.

Resultados: La distribución de las combinaciones genéticas fue 25 D+/R+; 6 D+/R-; 5 D-/R+ y 4 D-/R-. Detectamos anticuerpos anti-GSTT1 en 4 pacientes, tres de los cuales, con donantes multíparas (D-/R+) los desarrollaron tras la infusión coincidiendo con el diagnóstico de EICH hepática aguda. La cuarta paciente con anticuerpos (D-/R-) los presentaba previos al trasplante y desaparecieron el día +30. Dicha paciente multípara nunca desarrolló EICH hepática.

Conclusiones: Nuestros resultados sugieren que las donantes GSTT1-nulas desarrollaron una respuesta inmune frente al GSTT1 fetal y las células B memoria de la infusión se activaron con la GSTT1 expresada en el hígado del receptor. Demostramos que los anticuerpos anti-GSTT1 post-trasplante están asociados con el desarrollo de EICH hepática aguda ($p = 0,0076$).

P-094. IRF5 NO SE ENCUENTRA ASOCIADO A ENFERMEDAD CELÍACA EN POBLACIÓN ESPAÑOLA

L.M. Medrano de Dios, M. Fernández Arquero, C. Maluenda, I. Polanco, E. Gómez de la Concha y C. Núñez

Servicio de Inmunología Clínica; Servicio de Pediatría, Hospital Clínico San Carlos. Madrid. Servicio de Gastroenterología Pediátrica, Hospital La Paz, Madrid.

Objetivos: La enfermedad celiaca (EC) es un desorden inflamatorio intestinal provocado por la ingesta de gluten en individuos genéticamente susceptibles. El gen IRF5 (Factor regulador de Interferón 5) codifica para un factor de transcripción relacionado con la vía de señalización de IFN de tipo I. Algunos polimorfismos de este gen se han asociado a otras enfermedades autoinmunes como artritis reumatoide, esclerosis múltiple o enfermedad inflamatoria intestinal. Nuestro objetivo fue analizar la relación de diferentes polimorfismos de IRF5 con la susceptibilidad a EC.

Métodos: Se estudiaron dos polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) pertenecientes al gen IRF5, rs4728142 y rs3807306, en 740 pacientes con EC y 685 controles; además se llevó a cabo un estudio familiar analizando los progenitores de 406 enfermos. La comparación de las frecuencias genéticas en el estudio caso-control se realizó mediante el test chi-cuadrado y el estudio familiar se realizó con el TDT (test de desequilibrio de transmisión).

Resultados: No se observó asociación entre IRF5 y EC ni en el estudio caso-control: $p = 0,87$, OR = 1,01, IC95% 0,87-1,18 para rs4728142 y $p = 0,69$, OR = 0,97, IC95% 0,83-1,13 para rs3807306; ni en el estudio familiar por TDT. Los resultados se estratificaron por presencia o ausencia del HLA-DQ2, principal factor genético de riesgo, sin observar cambios significativos. El análisis haplotípico no aportó información adicional. Nuestro estudio tiene una potencia del 80% para detectar una OR $\geq 1,2$ en ambos SNPs.

Conclusiones: Nuestros resultados descartan la asociación moderada (OR $\geq 1,2$) de polimorfismos de IRF5 con el riesgo a EC, a diferencia de otras enfermedades autoinmunes.

P-095. OBTENCIÓN DE LA SECUENCIA GENÓMICA COMPLETA DEL NUEVO ALELO HLA-C*04:71 MEDIANTE AMPLIFICACIÓN ALELO-ESPECÍFICA

M. Moraru, A. Balas, R. de Pablo, R. Solís, J.L. Vicario y C. Vilches

Laboratorio de Inmunogenética-HLA, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid. Departamento de Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.

Al estudiar una paciente con leucemia linfocítica crónica que iba a ser sometida a trasplante de progenitores hematopoyéticos de donante no emparentado, hemos identificado una secuencia del exón 2 de HLA-C no descrita previamente. Las secuencias de los exones 2 y 3 de este alelo correspondían al HLA-C*04:01:01, salvo por un polimorfismo C98T que genera un cambio de aminoácido en la posición 9 de la proteína. Este cambio consiste en la sustitución de una serina, característica de las moléculas HLA-Cw4 y C*14, por una fenilalanina, típica de las moléculas HLA-Cw1. Para caracterizar la secuencia genómica completa de este nuevo alelo HLA-C hemos diseñado una pareja de cebadores específicos para las zonas 5' y 3' UTR del gen HLA-C, que discriminan entre C*04 y C*16, el otro alelo HLA-C de la paciente. Mediante secuenciación directa a partir del amplicón generado (3135 pb), hemos caracterizado la secuencia completa del nuevo alelo, designado oficialmente HLA-C*04:71. Confirmamos la presencia del polimorfismo C98T y encontramos además otra diferencia con el alelo HLA-C*04:01:01:01, un cambio A > G en la posición 107 del intrón 5, no descrito en otros alelos HLA-C. Un estudio familiar estableció el haplotipo que incluye el nuevo alelo HLA-C en este paciente: HLA-A*01:01:01G, B*35:01:01G, C*04:71, DRB1*11:01:01. C*04:71 se comportó serológicamente como un HLA-Cw4 común. Sin embargo, el aminoácido en posición 9 de la cadena alfa de HLA-C participa en la generación de los bolsillos B y C, por lo que este cambio influiría en la unión de péptidos antigenicos y en la respuesta alogénica.

P-096. ASOCIACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DEL GEN IL10 CON LA ACALASIA IDIOPÁTICA

M.A. Ortiz Rosales, M.A. García González, J. Pérez de la Serna, A. Ruiz de León y A. González Vigo

Hospital Clínico San Carlos, Madrid. Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza.

La acalasia idiopática (prevalencia 0,01%) es un trastorno motor esofágico de etiología desconocida caracterizado por la ausencia de peristalsis esofágica y la alteración dinámica del esfínter esofágico inferior. Diversas evidencias apoyan la idea de que la acalasia idiopática es una enfermedad de causa inmunológica y, de hecho, la acalasia se ha asociado con determinados alelos del HLA de clase II, del gen PTPN22 y del IL23R. Por otro lado, numerosos estudios han demostrado la asociación de polimorfismos del promotor del gen IL10 con varias enfermedades inflamatorias y autoinmunes. Nuestro objetivo fue evaluar el papel de polimorfismos funcionales del promotor de IL10 en la susceptibilidad a padecer acalasia idiopática. Para ello realizamos un estudio caso-control de las posiciones -1082, -819 y -592 de IL10 en 282 pacientes y 529 controles y en una muestra de replicación independiente con 75 pacientes y 575 controles. Los pacientes de acalasia fueron diagnosticados mediante criterios clínicos, radiológicos, endoscópicos y manométricos. Encontramos una asociación entre el haplotipo GCC del promotor de IL10 y un menor riesgo a padecer acalasia en la muestra inicial ($OR = 0,79$, $IC95\% = 0,64-0,98$, $p = 0,029$). Dicha asociación fue posterior-

mente validada en la muestra de replicación ($OR = 0,69$, $IC95\% = 0,48-1,00$, $p = 0,04$). El análisis combinado no mostró heterogeneidad entre las poblaciones y los datos de la asociación del haplotipo GCC para este análisis fueron $ORMH = 0,76$, $IC95\% = 0,63-0,91$, $p = 0,003$. Nuestros resultados muestran por primera vez asociación entre el gen IL10 y la acalasia idiopática y sugieren la contribución de la IL-10 a la patogénesis de la enfermedad.

P-097. GENES HLA EN JAIDUKAMA: UNA POBLACIÓN AMERINDIA AISLADA PROcedente DE COLOMBIA CON NUEVOS HAPLOTIPOS Y ALELOS COMPARTIDOS CON ASIÁTICOS Y HABITANTES DE LAS ISLAS DEL PACÍFICO

C. Parga Lozano, D. Rey Medrano, J. Martínez Laso, F. Montoya, C. Areces Viña, C. Silvera, P. Gómez Prieto, M. Enríquez de Salamanca Carrascosa y A. Arnaiz Villena

Departamento de Inmunología, Universidad Complutense, Hospital 12 de Octubre, Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Unidad de Inmunoterapia Celular, Centro Nacional de Microbiología I, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Sección de Inmunología, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia. Departamento de Genética, Universidad del Norte, Barranquilla, Colombia.

Objetivos: Los primeros habitantes de América y su poblamiento no están aún determinados. Con el fin de saber más sobre estas cuestiones, hemos detectado los genes HLA en una comunidad Amerindia aislada: los Jaidukama, que viven en la selva ecuatorial del Norte de Colombia.

Material y métodos: El genotipado HLA y los cálculos de los haplotipos extendidos se llevaron a cabo en 39 individuos no relacionados pertenecientes a 13 familias. Las frecuencias HLA se compararon con otros Amerindios y poblaciones de todo el mundo mediante el cálculo de las distancias genéticas, dendogramas de emparentamiento y análisis de correspondencia. Se han utilizado 12.202 cromosomas para los análisis.

Resultados: Solamente se han encontrado cuatro alelos DRB1 (*0404, *0407, *1402 y *1602). Sin embargo existen un total de 17 haplotipos HLA de clase I y II Amerindios, siendo nueve de ellos específicos de los Jaidukama.

Conclusiones: Este modelo único del estudio de familias Amerindias aisladas sugiere que la variación de haplotipos HLA es más rápida que la de alelos y además se encuentran alelos comunes con asiáticos y habitantes de islas del Pacífico. Este trabajo puede también ser útil para futuros programas de trasplante.

P-098. GENES HLA DE PREDISPOSICIÓN A CELIAQUÍA EN LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL CRÓNICA: COLITIS ULCEROSA Y ENFERMEDAD DE CROHN

D. Planelles Silvestre, M.M. Bosca, M. Minguez, M. Rodríguez-Cebriá, J. Tosca, N. Puig, E. Alba, E. Laguarda, A. Benages, J.A. Montoro y R.J. Roig

Laboratorio de Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. Valencia. Servicio de Digestivo, Hospital Clínico Universitario de Valencia.

El objetivo de este estudio ha sido determinar la predisposición genética para desarrollar celiaquía en pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal crónica (EIIC), cuantificando la prevalencia de los genes HLA codificantes de las moléculas DQ2 y DQ8 tanto en pacientes con colitis ulcerosa (CU) como en en-

fermedad de Crohn (EC). Se ha realizado un estudio caso-control que ha incluido 427 pacientes con EIIC (192 con CU y 235 con EC) y 577 controles, de los que se han analizado datos clínico-biológicos y frecuencias de los haplotipos HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01, DQA1*03-DQB1*03:02, DQA1*02:01-DQB1*02:02 y DQA1*05:05-DQB1*03:01. No se observaron diferencias significativas cuando se compararon las frecuencias de los haplotipos HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01, HLA-DQA1*03-DQB1*03:02 y la del genotipo heterocigoto HLA-DQA1*02:01-DQB1*02:02+DQA1*05:05-DQB1*03:01 entre la población total de pacientes con EIIC y los controles, si bien sí se detectó menor proporción de homocigotos a HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 ($p = 0,032$). Cuando se subdividió la población en función del sexo se observó que las mujeres con EIIC presentaban una prevalencia del haplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01 inferior a la de las mujeres control ($p = 0,047$). La frecuencia de este haplotipo también apareció significativamente disminuida en el grupo de pacientes con CU ($p = 0,042$), y la del haplotipo HLA-DQA1*03-DQB1*03:02 fue significativamente inferior en los pacientes con EC ($p = 0,025$) con respecto al control. En conclusión, los genes HLA celiacogénicos no parecen ser factores de predisposición para desarrollar EIIC. La menor proporción de portadores del haplotipo HLA-DQA1*05:01-DQB1*02:01, sobre todo en homocigosis, en algunos subgrupos de estos pacientes, podría indicar que los individuos con EIIC tienen una menor susceptibilidad genética a celiaquía que la población general.

P-099. HLA-C*07:170, UN NUEVO ALELO IDENTIFICADO DURANTE EL GENOTIPAJE DE RUTINA PARA TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS

D. Planellés Silvestre, A. Balas, M. Rodríguez-Cebriá, F. García-Sánchez, P. Solves, D. Jarque, R. Granell, J.A. Montoro, R.J. Roig y J.L. Vicario

Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, Valencia. Centro de Transfusión de Madrid.

Se describe la identificación de un nuevo alelo HLA-C*07 durante el genotipaje para trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH). El estudio HLA de un paciente con indicación para TPH y sus familiares incluyó inicialmente tipaje HLA-A, -B, -C y -DRB1 mediante PCR-rSSO (LABType® SSO). El paciente y su hermano resultaron HLA idénticos por resolución intermedia, pero en ambos casos el tipaje HLA-C, C*07:XX,C*12:GFAV, mostraba resultados inconcluyentes que afectaban a la definición del grupo alélico C*07. El tipaje de alta resolución mediante PCR-SSP (Olerup SSP®) fue HLA-C*07:01, C*12:03. Para confirmar el tipaje HLA-C se procedió al análisis por secuenciación de los exones 2, 3 y 4, dando como resultado C*07:01:01G, C*12:03:01G, con dos mismatches en los nucleótidos 512 y 513 del exón 3. La secuenciación de varios clones del producto de amplificación genómica completa específica de HLA-C confirmó un nuevo alelo HLA-C*07, oficialmente nombrado C*07:170 (HWS10012182, HQ616677), que mostraba dos diferencias nucleotídicas en el codón 147 (TTG > TAT) con respecto a C*07:01:01, produciendo una sustitución aminoacídica en posición 147 (L > Y). Estudios de segregación familiar definieron el haplotipo HLA como A*02:01, B*18:01, C*07:170, DRB1*11:01. El residuo 147 está altamente conservado en las moléculas HLA-clase I, siendo los aminoácidos 147W y 147L los encontrados en la mayoría de antígenos. La alineación de secuencias HLA de clase I mostró que 147W es el residuo consenso, mientras que 147L se encuentra en un número limitado de grupos alélicos. HLA-C*07:170 es el

primer alelo HLA de clase I clásico que muestra 147Y, residuo consenso para los alelos HLA-F.

P-100. ASOCIACIÓN DEL POLIMORFISMO RS8177374 (C > T) EN EL GEN TIRAP, CAUSANTE DE LA VARIANTE S180L EN LA PROTEÍNA ADAPTADORA MAL (MYD88-ADAPTOR LIKE), Y TUBERCULOSIS EN LA POBLACIÓN DE CANTABRIA

E. Puente de Mateo, M. Gutiérrez Cuadra, J.L. Arroyo, R. Agüero Balbín, M.A. Hoz, P. Sánchez Velasco, F. Ausín Ortega, F. Leyva Cobián y J.G. Ocejo Vinyals

Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander. Banco Regional de Sangre y Tejidos de Cantabria, Santander.

Algunos TLRs reconocen patrones moleculares de *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) e inician la activación de vías de transducción de señal que desencadenan a su vez la activación, entre otras, de respuestas inmunes innatas, producción de citocinas y respuestas inmunes adquiridas. Las micobacterias son inicalmente reconocidas por TLR-1, -2, -4, -6, y -9, las cuales interactúan con proteínas adaptadoras asociadas a sus receptores (MyD88 y MAL o TIRAP). Un polimorfismo en el gen TIRAP, rs8177374 (C/T), el cual da lugar a una sustitución de serina por leucina en la proteína Mal (S180L), ha sido asociado con susceptibilidad a diferentes infecciones, entre las que destaca la infección producida por Mtb en diferentes poblaciones aunque en otras, este hecho no ha podido ser confirmado. Para estudiar la posible asociación de este polimorfismo en una población genéticamente bien conservada, hemos puesto a punto un método de PCR específico de alelo y analizado 138 pacientes con tuberculosis pulmonar activa, 65 individuos con infección tuberculosa latente y 33 con tuberculosis extrapulmonar. Los resultados obtenidos en nuestro estudio tanto en la distribución de los diferentes genotipos (CC, CT y TT) como de los alelos (C y T) en las diferentes poblaciones estudiadas no mostraron ninguna diferencia estadísticamente significativa. En conclusión, el polimorfismo rs8177374 C > T en el gen TIRAP que da lugar al cambio de aminoácido (S180L) en la proteína adaptadora MAL no parece estar asociado con susceptibilidad o resistencia frente a la enfermedad o infección causadas por *Mycobacterium tuberculosis*, al menos en la población de Cantabria.

P-101. IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES INMUNOLÓGICOS COMO SEÑALIZADORES PRONÓSTICO DE EVI EN EL TRASPLANTE CARDÍACO

C. Roldán Francisco, S. Mirabet, C.A. Mendoza, V. Brossa, Y. Alvaro, E. Moltó, L. López, E. Roig y C. Gelpí

Servicios de Inmunología de Cardiología, Hospital de Sant Pau, Barcelona.

Introducción: La enfermedad vascular del injerto (EVI) es uno de los factores principales en la limitación de la supervivencia a largo plazo en pacientes trasplantados cardíacos (TC). La EVI es consecuencia de la disfunción endotelial de las arterias coronarias del órgano transplantado debida entre otras causas a la respuesta inmunológica del receptor.

Objetivos: Identificar marcadores inmunológicos en sangre periférica que se puedan correlacionar con el desarrollo de EVI.

Material y métodos: Se han estudiado de manera prospectiva 19 pacientes trasplantados en el Hospital de Sant Pau entre los años 2007-2010, de forma puntual 15 pacientes trasplantados de más de 2 años de evolución y como control 19 donantes del

banco de sangre. Las muestras se han obtenido periódicamente según protocolo de seguimiento clínico. Los parámetros analizados en sangre periférica han sido las poblaciones linfocitarias CD3, CD4, CD8, CD19, CD56, CD3/IFNg CD4+CD25+FoxP3+ mediante citometría de flujo. Paralelamente se han realizado biopsias endomiocárdicas, y al año y dos años, coronariografía para estudio de EVI.

Resultados: Durante los primeros meses después del trasplante cardíaco se observa un descenso en el índice CD4/CD8. La población de linfocitos efectores Th1 muestra una tendencia a incrementar a lo largo del tiempo en los pacientes que muestran una evolución clínica peor y su porcentaje es claramente superior en los pacientes con EVI documentada que en aquellos pacientes que no muestran EVI incluso después de más de 5 años del trasplante. Las poblaciones Treg muestran gran variabilidad de respuesta. El índice Th1/Treg incrementa durante el seguimiento habiéndose demostrado en el 50% de los casos su relación con mala evolución y/o EVI.

Conclusiones: El índice entre poblaciones efectoras y reguladoras puede ser un parámetro a valorar como marcador precoz de desarrollo de EVI. La prolongación del estudio, la ampliación del número de pacientes y el análisis de otras poblaciones linfocitarias, proporcionará un mejor conocimiento de los mecanismos inmunológicos de la EVI.

P-102. ANÁLISIS DEL TIPAJE DE ALTA RESOLUCIÓN DRB1 POR SSOP LUMINEX

F.P. Sánchez Gordo, E.M. Christensen, A. Carrasco Hidalgo, R. Rodríguez Pena e I. Prat Arrojo

Centro de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Málaga.

Introducción: Los requerimientos para el trasplante de progenitores hematopoyéticos a partir de sangre de placenta son de compatibilidad HLA A y B por baja resolución y DRB1 en alta resolución. Hemos realizado una valoración del tipaje DRB1 alta resolución y la frecuencia de los alelos encontrados en nuestro laboratorio.

Material y métodos: Analizamos el tipaje HLA DRB1 de 1000 muestras de cordón umbilical tipadas entre el 17 de Noviembre de 2009 y el 4 de febrero de 2010 mediante el lote 05 del kit RS-SOH2B1 (One Lambda, SSO Luminex® PCR). La extracción de DNA se realizó mediante el sistema automático Magtration® MagaZorb® Kit, y en cada muestra se mide la concentración y pureza del DNA por espectrofotometría (Eppendorf).

Resultados: El tipaje a nivel de cuatro dígitos se alcanzó en un 76% de los casos, (en 240 muestras no se llegó a un nivel de resolución de 4 dígitos, en 172 por falta de discriminación del método, y en 168 muestras por reacciones cercanas al cutoff correspondientes a sondas complejas que discriminaban alelos raros). Mostramos las frecuencias de los alelos encontrados y el nivel de discriminación. Las limitaciones encontradas fueron; la no distinción entre DRB1 *14:01/54, *12:01/06/10/17 (en ambos casos la secuencia del exón 2 es idéntica), *04:03/52, *04:04/23, *04:05/08; y ambigüedad entre *01:02 *11:04 vs *01:20 *11:06, siendo la principal limitación para alcanzar alta resolución la dificultad de establecer el adecuado cutoff para diferenciar *03:01 de 03:16/18/28 (especialmente en muestras 03:01 homozigotas) y *07:01/16.

Conclusiones: Usada como técnica inicial alcanzamos un nivel de resolución de 4 dígitos del 76%, si bien, si nos ceñimos a los criterios EFI (exón 2) el porcentaje se eleva al 86%, y sería del 91% si pudiésemos estandarizar adecuadamente el cutoff de los beds complejos (múltiples sondas) que diferencian el alelo 03:01 y 07:01 de "excepcionales" 03 y 07. En conclusión podemos decir que es una técnica eficaz y con una muy buena relación calidad-precio.

P-103. AUSENCIA DE ASOCIACIÓN ENTRE HLA-B*4001 Y LIPODISTROFIA SECUNDARIA A ESTAVUDINA

M.T. Sanz Martínez, M. García Ormaechea, M. Agustí, E. Pérez Ranz, C. Juárez, P. Domingo y O. de la Calle Martín

Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Objetivos: La estavudina es un análogo sintético del nucleósido de timidina, que se utiliza en combinación con otros fármacos en el tratamiento de los pacientes infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Como efecto secundario al tratamiento con esta droga antirretroviral se ha descrito el desarrollo de lipodistrofia. Recientemente se ha asociado como un potente factor de riesgo para dicho efecto la presencia del alelo HLA-B*4001 en población tailandesa. El objetivo de este trabajo es estudiar esta asociación en población española.

Métodos: Se realizó un estudio de casos-control en pacientes infectados por VIH que recibían estavudina como parte del tratamiento. Algunos de dichos pacientes desarrollaron lipodistrofia, mientras que el resto no lo hicieron. Con este fin se aisló DNA de 146 pacientes y de una población control de 150 individuos y se determinaron sus alelos HLA-B mediante PCR-SSO usando la tecnología Luminex®.

Resultados: Se comparó la frecuencia del alelo HLA-B*4001 en tres grupos: pacientes VIH tratados con estavudina con lipodistrofia, pacientes sin lipodistrofia y controles sanos. La distribución de los alelos HLA-B y más concretamente del alelo HLA-B*4001 es similar en pacientes de SIDA y controles sanos. No se encuentran diferencias significativas entre los pacientes tratados con estavudina que desarrollan lipodistrofia y los que no.

Conclusiones: En la población española el alelo HLA-B*4001 no presenta ningún tipo de asociación con el desarrollo de lipodistrofia iatrogénica, a diferencia de la observada en los pacientes de SIDA tratados con estavudina de la población tailandesa.

P-104. INFLUENCIA DEL RECEPTOR DE INTERLEUCINA 6 EN LA ARTRITIS REUMATOIDE DE INICIO

F. Torrecillas Nicolás, M.A. Montes Cano, S. Reneses Cesteros, C. Abad Molina, A. García López, A. Núñez Roldán, J.R. García Lozano y M.F. González Escribano

Servicio de Inmunología; Sección de Reumatología, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío/Instituto de Biomedicina de Sevilla.

Objetivo: Investigar la asociación entre el receptor de IL6 (IL6R) y la artritis reumatoide de inicio (RA).

Pacientes y métodos: Se incluyeron 141 pacientes con RA (criterios ACR 2010) y menos de 1 año de evolución y 206 controles sanos. Los niveles de IL6R soluble (IL6SR) se determinaron mediante ELISA y el polimorfismo funcional Asp358Ala utilizando sondas Taqman. Las variables cualitativas se analizaron mediante χ^2 y las cuantitativas mediante test de Kruskal Wallis de comparación de medianas.

Resultados: La concentración de IL6SR era más baja en pacientes que en controles (164,4 ng/mL vs 185,3 ng/mL, $p = 0,0002$). Se encontraron diferencias significativas en la concentración de IL6SR entre los diferentes genotipos tanto en pacientes ($p < 0,0001$) como en controles ($p < 0,0001$). Las diferencias se encontraban entre el genotipo bajo productor (AA) y el resto (AC y CC). La concentración de IL6SR era más baja en los dos grupos pacientes que en sus correspondientes grupos de controles ($p = 0,01$ para AA y $p = 0,04$ para AC+CC). La distribución del genotipo AA no mostraba diferencias significativas entre los grupos de pacientes y controles (42,2% vs 39,9%, $p = 0,18$).

Conclusiones: El polimorfismo funcional Asp358Ala determina diferencias en la concentración de IL6SR. Deben existir otros factores que condicione la menor concentración de IL6SR encontrada en el grupo de pacientes, ya que, las diferencias se mantienen cuando los grupos se estratifican según sus genotipos. No se encontró asociación entre este polimorfismo y la susceptibilidad a padecer RA en nuestra serie de RA de comienzo.

P-105. ESTUDIO DEL PAPEL DE LA VARIANTE M89V DEL GEN SIAE (SIALIC ACID ACETYLESTERASE) SOBRE EL RIESGO DE PADECER ENFERMEDADES AUTOINMUNES

J. Varadé López, B. de la Hera Hernanz,
A. de la Encarnación Salmerón, R. Álvarez Lafuente,
B. Fernández Gutiérrez y E. Urcelay García

Servicio de Inmunología; Servicio de Reumatología;
Servicio de Neurología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Objetivos: La acetilesterasa de ácidos siálicos (SIAE) es una enzima que regula negativamente la señal del receptor de antígenos de linfocitos B. Esta proteína parece estar implicada en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica en ratones. Los individuos homocigotos mutantes para el polimorfismo rs78778622 (M89V), situado en la región codificante de este gen, son incapaces de secretar esta proteína al espacio extracelular. Se ha descrito que esta homocigosis parece predisponer al desarrollo diversas enfermedades autoinmunes como la artritis reumatoide (AR), la esclerosis múltiple (EM) o la diabetes tipo 1 (D1T) en población norte-americana de origen europeo. Sin embargo, esta asociación no ha sido replicada posteriormente en cohortes independientes, por lo que nos propusimos el estudio del efecto de este marcador en la población española.

Material y métodos: Para ello analizamos un total de 2353 individuos de los cuales 529 eran pacientes de AR, 651 de EM, 428 de D1T y 745 individuos sanos empleados como controles. El genotípado se realizó mediante sondas TaqMan. Las frecuencias genotípicas y alélicas se compararon por el test de χ^2 . Las Odds ratio (OR) y los valores de p se calcularon con el paquete estadístico SPSS v.15.

Resultados: Pese a duplicar el tamaño muestral del estudio inicial, no encontramos ninguna asociación entre el polimorfismo analizado y las distintas enfermedades autoinmunes incluidas en nuestro estudio.

Conclusiones: Aunque existen genes de susceptibilidad comunes a distintas enfermedades autoinmunes, nuestros datos parecen descartar el papel del polimorfismo rs78778622 con en el riesgo a desarrollar AR, EM o D1T.

P-106. EL ESTUDIO DE LOS POLIMORFISMOS DE IL-28B Y PDCD-1, JUNTO CON EL TIPO DE LOS GENES KIR, PREDICE EN UN ALTO PORCENTAJE LA BUENA RESPUESTA AL TRATAMIENTO COMBINADO POR INFECCIÓN CRÓNICA DE HCV

J.R. Vidal Castiñeira, A. López Vázquez, R. Alonso Arias,
R. Pérez, R. Pérez y C. López Larrea

Unidad de Histocompatibilidad, Servicio de Inmunología; Servicio de Gastroenterología, Hospital Universitario Central de Asturias.

Objetivos: Varios estudios han demostrado la relación de diversos polimorfismos del gen de la IL-28b y de los receptores KIR con la respuesta al tratamiento de la infección por HCV. Por otro lado, la molécula reguladora PDCD-1 está implicada en la progresión de la infección. Se pretende analizar el efecto de estos 3

factores en relación con la respuesta al tratamiento de la infección por HCV.

Material y métodos: Se incluyeron 383 pacientes monitorizados durante y después del tratamiento con Peg-IFN- α /rivabirina. Se analizaron los polimorfismos de PDCD-1 mediante PCR-RFLP, los receptores KIR mediante LUMINEX y los polimorfismos de IL-28b mediante sondas Taq-man. El análisis estadístico se realizó mediante SPSS.

Resultados: El polimorfismo rs12979860 de IL-28b está aumentado significativamente en respondedores en su forma C/C ($p < 0,0001$). Dentro del grupo de pacientes C/T, cuya tasa de respuesta es del 42%, encontramos que un 85% de los pacientes con HOMOKIR2DL3-HLA-C1C1 responden al tratamiento ($p < 0,0001$). Finalmente, dentro del grupo de pacientes que son negativos para C/C y para HOMOKIR2DL3-HLA-C1C1 un 68% de los pacientes con el alelo PD-1 A responden favorablemente al tratamiento ($p < 0,0001$). Estos resultados son independientes del genotipo viral.

Conclusiones: La presencia de los distintos factores genéticos analizados en este estudio en pacientes con infección crónica por HCV parece condicionar de manera independiente la respuesta al tratamiento viral.

P-107. ACEPTABILIDAD DE ANTÍGENOS HLA-I Y II EN PACIENTES ALTAMENTE SENSIBILIZADOS

P. Villarreal Vázquez, Y.R. Arias Murillo, M. Digón, C. Luna,
G. Ercilla y J. Martorell

Servicio de Inmunología, CDB, Hospital Clínic de Barcelona.

Objetivos: Determinar cuáles son los alelos HLA que tienen mayor probabilidad de ser aceptados en una población de pacientes hipersensibilizados.

Material y métodos: Se seleccionaron 50 pacientes en lista de espera para trasplante renal con un porcentaje de anticuerpos anti-panel (PRA) por microlinfocitotoxicidad dependiente de complemento (CDC) > 80%. Se determinó la especificidad de aloanticuerpos anti-HLA por técnica de antígeno aislado mediante reactivo Lifecodes para Luminex y se analizó con el software quick type lifematch®.

Resultados: Se determinó la probabilidad de aceptación de cada uno de los alelos. Los alelos con mayor probabilidad de aceptación fueron el A80, A36, A30; B14, B46, B48; CW16, Cw08, Cw06; DP04, DP02, DQ06, DQ05, DR03, DR15. El número de alelos aceptado por paciente fue (Media ± DE): para el locus A 15 ± 8; B 25 ± 13; C 15 ± 4; DR 19 ± 6; DQ 13 ± 5; DP 18 ± 5. Las probabilidades de aceptación de un determinado alelo para cada locus; ordenadas de más a menos fueron: DP 81,9%, Cw 81,7%, DR 72,4%, DQ 68,9%, B 55,4%, A 53,0%.

Conclusiones: La mayoría de pacientes hipersensibilizados podrían aceptar de media unos 15 alelos HLA no idénticos a los propios. Los alelos del donante definen la probabilidad de ser aceptables para un paciente hipersensibilizado. Los datos de este estudio permiten hacer un cálculo de probabilidades conociendo el tipaje del donante. Aquellos con mayor probabilidad serían los donantes HLA- B*14, Cw*16, DRB1*03. Es posible ampliar las perspectivas de pacientes altamente sensibilizados para acceder a un trasplante, determinando las incompatibilidades aceptables.

INMUNOLOGÍA E INFECCIONES

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

P-108. LONGITUDINAL ASSESSMENT OF INTERLEUKIN 7 PLASMA LEVELS IN HIV-INFECTED PATIENTS IN THE ABSENCE OF AND UNDER ANTIRETROVIRAL THERAPY

J.M. Benito Huete, N.I. Rallón Afanador, M. López Vázquez de la Torre, S. Lozano Cedillo, J.M. Sempere Ortells, V. Soriano Vázquez y J.M. Benito Huete
Hospital Carlos III, Madrid. Universidad de Alicante.

Introduction: Cross-sectional studies in HIV-infected individuals suggest that interleukin 7 (IL-7) plasma levels increase in parallel to CD4 declines during the natural course of infection. We tested this hypothesis in a longitudinal study examining in parallel the evolution of IL-7 and CD4 counts.

Methods: IL-7 and CD4 counts were periodically monitored in 72 antiretroviral-naïve HIV-infected individuals, 30 of whom remained untreated for a mean of 46+14 months. The remaining 42 initiated antiretroviral therapy and kept undetectable viremia for 24 months. Multivariate linear regression analysis was used to ascertain which factors were associated with IL-7 variations during follow-up.

Results: In untreated patients CD4 counts significantly decreased ($p < 0.0001$), whereas plasma HIV-RNA and IL-7 levels remained fairly stable. In treated patients, CD4 counts significantly increased ($p < 0.0001$) while IL-7 levels tended to decline ($p = 0.1$). There was no correlation between CD4 and IL-7 variations neither in treated nor in untreated groups. A significant negative correlation was found between baseline IL-7 plasma levels and subsequent IL-7 changes.

Conclusions: In HIV-infected individuals without severe immunodeficiency, CD4 counts and plasma IL-7 do not evolve in parallel, suggesting that factors other than CD4 counts must drive the up-regulation of IL-7 characteristically seen during the natural course of HIV infection.

P-109. RETRASO EN LA RECONSTITUCIÓN DE LA INMUNIDAD ADAPTATIVA EN UNA PACIENTE TRASPLANTADA DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS DE CORDÓN Y SU RELACIÓN CON LA INFECCIÓN RECURRENTE POR CMV

S. Cantisán Bohórquez, C. Martín Calvo, J. Torre-Cisneros, R. Lara Contreras, A. Torres Gómez y R. Solana Lara

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Servicio de Hematología, Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Introducción: El trasplante de células progenitoras de cordón se asocia a mayor riesgo de infecciones virales debido a la ausencia de células memoria antígeno-específicas.

Objetivos: Estudiar la respuesta inmune CMV-específica en paciente con leucemia linfoblástica aguda (LLA), trasplantada de progenitores hematopoyéticos (PH) procedentes de cordón, con infección recurrente por CMV.

Material y métodos: Paciente: mujer de 33 años, CMV-seropositiva, con LLA, que recibió TPH alógénico de cordón. Desarrolló episodios de infección recurrente por CMV, que se trataron con valganciclovir. Tras fallo terapéutico, se hizo estudio de resistencia con resultado positivo para UL97/pol, iniciándose tratamien-

to con foscarnet. Falleció a los 15 meses post-TPH por encefalitis por CMV. Respuesta inmune CMV-específica: A los trece meses post-TPH se estudió la inmunidad CMV-específica. Se incubaron los PBMCs con pentámero CMVpp65 HLA-A*0201 y anticuerpos monoclonales frente a CD3, CD56, CD8, CD28, CD27, CCR7, PD-1 y CD45RA. Se analizó por citometría de flujo de cuatro colores.

Resultados: El número de linfocitos se mantenía por debajo del límite inferior del rango ($0,9\text{--}5,2 \times 10^3/\mu\text{l}$) desde el momento del TPH. En la muestra de estudio las células NK representaban un 76% del gate seleccionado, mientras que los linfocitos T CD3+ solo un 1,4%. Más del 96% de estas células CD3+ eran CD8+, que mostraban, además, un fenotipo muy diferenciado. No se observaba subpoblación CD8+ CMV-específica.

Conclusiones: El retraso en la reconstitución de la inmunidad adaptativa lleva a la replicación descontrolada de CMV y al uso prolongado de la terapia antiviral, que se asocia con la aparición de resistencia al tratamiento. En estos pacientes de alto riesgo de infección por CMV se debería considerar el uso terapéutico de la transferencia de células CMV-específicas.

P-110. NIVELES DE HLA-G SOLUBLE EN PACIENTES VIH-1+ EN DIFERENTES SITUACIONES TERAPÉUTICAS

L. Castro Orgaz, M. Cobo Medina, L. Montes Torres, M. Frías Casas, R. González Fernández, M.I. Torres López y J. Peña Martínez

Instituto Maimónides de Investigación Biomédica de Córdoba. Facultad de Ciencias Experimentales de Jaén.

Objetivos: Analizar los niveles de la molécula tolerogénica HLA-G en su forma soluble (sHLA-G) en pacientes VIH-1+ bajo diferentes modalidades de terapia antirretroviral (ART).

Material y métodos: En el estudio se incluyen pacientes naïve ($n = 8$), pacientes que han recibido ART ($n = 12$) (tratados con PI, tratados con NRTI+NNRTI y tratados con NRTI+PI) y pacientes con interrupción programada del ART ($n = 8$). La molécula sHLA-G fue medida en plasma de dichos pacientes mediante ELISA.

Resultados: Los niveles de sHLA-G en pacientes tratados con PI fue de $74,6 \pm 52,26 \text{ ng/ml}$, mientras en los pacientes tratados con NRTI+NNRTI fue de $172,07 \pm 36,46 \text{ ng/ml}$ y en los pacientes tratados con NRTI+PI de $157,83 \pm 51,57 \text{ ng/ml}$. Se observa que los valores obtenidos con PI son significativamente diferentes a los obtenidos con NRTI+PI y con NRTI+NNRTI, mientras que entre pacientes naïve y con interrupción del tratamiento no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas.

Conclusiones: Se concluye que el componente NRTI de ART podría ser responsable del aumento del sHLA-G observado en los pacientes tratados con ART, descartando la posibilidad de que el PI participe en los cambios del sHLA-G observados. Se discutirán estos resultados y su posible impacto en la terapia contra el VIH.

P-111. ASOCIACIÓN DEL HLA-B*5701 Y MUTACIÓN EN LA TRANSCRIPTASA INVERSA EN EL CODÓN 245 EN UNA POBLACIÓN DE 747 PACIENTES VIH-1 SIN TARGA

S. García Jiménez, O. Calabia González, P. Llorente Jiménez, M. Fernández Guerrero, M. Górgolas Fernández de Mora y R. García Delgado

Departamento de Inmunología y Enfermedades Infecciosas, Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid.

Introducción: La asociación del alelo HLA-B*5701 y la hipersensibilidad a abacavir ha hecho imprescindible la determinación

de este parámetro al inicio del TAR en pacientes VIH positivos. Si esta determinación no es posible, según los resultados publicados en el artículo (Chui et al, 2007) la presencia en la secuencia de la transcriptasa inversa de polimorfismos en posición de V245, se asociaría a la positividad de dicho alelo.

Material y métodos: Para demostrarlo, en el presente trabajo se presentan los resultados obtenidos con 747 pacientes VIH positivos, sin TARGA, procedentes del Departamento de infecciosas, en los cuales se ha determinado el alelo HLA-B57*01 (Inno-Lipa. Innogenetics) y la secuencia de la transcriptasa inversa de VIH-1 (Trugene. Siemens).

Resultados: De 747 pacientes, 44 pacientes fueron positivos para HLA-B*57, con una incidencia del 6%, en el rango descrito para población mediterránea. Dentro de los pacientes VIH+ HLA-B*57 positivos, la frecuencia de mutaciones para el codón 245V de la transcriptasa inversa fue: 45% para 245E, 32% para 245K, 8% para otros polimorfismos y no presentaban wild type 245V. En contraste, los pacientes VIH+ HLA-B*57 negativos presentaban una frecuencia de: 8,7% para 245E, 6,6% para 245K, 15% para otros polimorfismos y un 9% para la wild type 245V.

Conclusiones: Si no es posible realizar el test de HLA-B*57, la presencia de posibles polimorfismos en el codón 245 de la retrotranscriptasa y la no presencia de la wild type 245V puede utilizarse para descartar o no el tratamiento abacavir en pacientes naïve.

P-112. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA “INTERFERON GAMMA RELEASE ASSAY (IGRA)” EN PACIENTES CON SOSPECHA DE INFECCIÓN TUBERCULOSA ACTIVA Y LATENTE

M. García Ormaechea, M.T. Sanz Martínez,
N. Rodríguez Valero, P. Moya Alvarado,
M.A. Martínez Carretero, V. Pomar Solchaga,
M.A. Sambeat Domènech y E. Moga Naranjo

Departamento de Inmunología, Unidad de Enfermedades Infecciosas y Unidad de Reumatología, Departamento de Medicina Interna, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

Introducción: Según datos provisionales facilitados por la Agencia de Salud Pública catalana, la incidencia de tuberculosis en Barcelona ha aumentado del 23,8% al 26,1% (2009 vs 2010). El control de la enfermedad radica en un buen diagnóstico tanto de la infección tuberculosa activa como la latente, por el incremento de reactivación en pacientes inmunodeprimidos (VIH-terapias biológicas).

Métodos: La técnica IGRA utilizada fue el Quantiferon-TB Gold In-tube. Se analizaron pacientes adultos con sospecha de enfermedad tuberculosa (TB), contactos de TB, estudio de infección latente (LTBI) previo al tratamiento con fármacos biológicos y en pacientes VIH+, durante dos años.

Resultados: Se analizaron 1.557 pacientes con sospecha diagnóstica de: LTBI un 45%, enfermedad tuberculosa un 23,5%, VIH+ un 20,9%, contactos de TB un 8,9% y sin diagnóstico el 1,47%. El porcentaje de positivos fue del 27,1% (422/1.557), que correspondieron a 12,7% LTBI, 8,28% sospecha de enfermedad tuberculosa, 3,5% contactos TB y 2,3% VIH+. El 1,79% (28/1.557) presentaron un resultado indeterminado. En paralelo se realizó el PPD a 557 pacientes. El 17,8% no acudió a la lectura, el 18% PPD+/QTF+, el 49,4% PPD-/QTF-, el 5,5% PPD-/QTF+ (11/31 inmunodeprimidos) y el 7,2% PPD+/QTF-(35/40 vacunación con BCG), con un índice kappa de 0,62.

Conclusiones: El IGRA nos permite superar las limitaciones más importantes del PPD como son la falta de sensibilidad en situaciones de inmunodeficiencias, los resultados positivos por la vacunación con BCG y la infección por micobacterias no tuberculosas, así como la falta de seguimiento, todo ello con un porcentaje mínimo de indeterminados.

P-113. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LINFOCITOS T CD8-CMV ESPECÍFICOS EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS (TPH). EFECTO DE LA INFECCIÓN, RECHAZO (EICH) Y SEROSTATUS RECEPTOR/DONANTE (CMVRD) EN LA POBLACIÓN CMV ESPECÍFICA

I. Gayoso Cabada, C. Cerrato, S. Cantisán, J. Sánchez-García, J.D. Tallón, J. Serrano, R. Rojas, F. Martínez, A. Torres-Gómez, J. Torre-Cisneros y R. Solana Lara

UGC de Enfermedades Infecciosas; Servicio de Hematología; Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

Objetivos: El citomegalovirus (CMV) es uno de los principales causantes de la morbilidad y mortalidad en pacientes trasplantados de precursores hematopoyéticos (TPH). Nuestro objetivo es estudiar en TPH los LTCD8+ CMV-específicos con diferentes fenotipos de maduración y su contenido en perforina, relacionando todo ello con la replicación del CMV post-trasplante.

Métodos: Estudio trasversal de 26 pacientes de TPH A*0201, con antigüedad mínima de seis meses. La detección y cuantificación de la población de LTCD8+ CMV-específicos se realizó con pentámeros CMV-pp65, (NLVPVMATV) y anticuerpos monoclonales frente a CD8, CD45RA, CCR7, CD28, CD27 y Perforina, todo ello adquirido por citometría de flujo y analizado con el software FlowJo7. El estudio estadístico se realizó con el programa SPSS18.

Resultados: La serología para CMV receptor/donante fue de un 38,5% de alto riesgo (R+D-). El 42% de los pacientes presentaron EICH y el 57,7% de los trasplantados tuvieron replicación de CMV (PCR positiva en plasma). La media del porcentaje de LTCD8+ CMV-específicos fue de un 1,36%. Encontramos una asociación significativa de LTCD8+ CMV-específicas con fenotipo naïve (CD28+CD27+CD45RA+CCR7+) y la replicación de CMV post-TPH. El estudio multivariante, ajustado por el EICH y por el seroestatus R/D muestra también un descenso significativo en la población de LTCD8+ CMV-específica con fenotipo naïve en TPH que sufren replicación de CMV post-TPH.

Conclusiones: Existe asociación entre el fenotipo naïve y la replicación de CMV post-TPH de manera que los pacientes que tienen replicación post-TPH muestran un descenso de LTCD8+ CMV-específicos con fenotipo naïve.

P-114. DESARROLLO DE UN MODELO MURINO PARA EL ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE FRENTES A LAS PROTEÍNAS DE LA CÁPSIDE DEL VIRUS ADENOASOCIADO AAV

I. Gil Fariña, M. di Scala, F. Mingozzi, A. Vales, C. Olagüe, K. High, J. Prieto y G. González-Aseguinolaza

Division of Hepatology-Gene Therapy, Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Liver Unit, CIBERehd, Clínica Universitaria de Navarra, Pamplona. Childrens Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania, Philadelphia, EE.UU.

Objetivos: El éxito de un protocolo de terapia génica para enfermedades hereditarias depende de conseguir la expresión prolongada de la proteína deficitaria. En muchas ocasiones esto se ve impedido por el desarrollo de respuestas inmunes frente al trasgén o como en el caso del ensayo clínico para el tratamiento de la hemofilia B frente al virus. En los estudios preclínicos realizados para el tratamiento de la hemofilia no se observó el desarrollo de respuesta inmune frente a la cápside que hiciera sospechar que esto podría ocurrir. Estudios posteriores encaminados a inducir respuestas inmunes frente a la cápside capaces de eliminar los hepatocitos transducidos han fracasado. En este trabajo nos proponemos desarrollar dicho modelo, que servirá

para el desarrollo de estrategias que puedan evitar el desarrollo de respuesta inmune frente al AAV y permitir la expresión prolongada del trásigen.

Material y métodos: Construcción y producción de un AAV portador de la IL-12 bajo el control de un promotor de expresión constitutiva y hepatoespecífica. Inyección intravenosa distintas dosis del AAV-AAT-IL-12 junto con un AAV que expresa luciferasa. Análisis de la expresión de la citoquina y luciferasa, la supervivencia, transaminasas y respuesta inmune.

Resultados y conclusiones: Hemos comprobado que la expresión sostenida de la IL-12 es extremadamente tóxica produciendo la muerte de los animales a dosis altas. A dosis bajas observamos una clara inhibición de la expresión de la luciferasa coincidiendo con transaminitis, muy probablemente debida al desarrollo de una respuesta inmune frente a la cápside del AAV y que estamos caracterizando actualmente.

P-115. PARASITOSIS INTESTINAL EN NIÑA DE 13 AÑOS VIH POSITIVO: A PROPÓSITO DE UN CASO

M.P. Polo Moyano, M. Martínez López,
A. Pérez-Alija Fernández, F. Garrido Torres-Puchol
y A. del Campo Alonso

Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Introducción: La diarrea es el síntoma gastrointestinal más frecuente en personas infectadas por el VIH, evoluciona con frecuencia a cronicidad y tiene morbilidad importante asociada. Las infecciones por parásitos son una causa frecuente de de diarrea crónica en pacientes inmunodeprimidos.

Material y métodos: Presentamos el caso de una niña de 13 años con infección por VIH en estadio C3 con inmunodepresión grave, CD4 1% y carga viral 15.000 copias/ml. con mal cumplimiento terapéutico con trastorno negativista y situación de riesgo social. Acude a urgencias por dolor abdominal con elevación de transaminasas, sugerente de hepatitis tóxica. Esta clínica se acompaña de cuadro de diarrea intermitente presentando antígenos positivos tanto de *G. lamblia* como de *Cryptosporidium* y quistes de *G. lamblia* en heces. Sigue curso desfavorable con cuadro de malnutrición severa e hipopotasemia de difícil control a pesar de aportes elevados por vía oral y fiebre en picos, aislando-se *Candida albicans* en sangre y PAC (Port-A-Cath). Se detecta un deterioro progresivo del estado general, con insuficiencia respiratoria que ocasiona fallo cardiorrespiratorio y exitus.

Resultados y conclusiones: En esta niña el desequilibrio hidroelectrolítico por la diarrea asociada a infección oportunista por *Cryptosporidium*, a consecuencia del mal cumplimiento terapéutico, y *G. lamblia*, adquirido probablemente por las condiciones higiénico-sanitarias deficientes, ocasionaron junto con la sepsis por cándida la muerte de esta niña. Hubiera sido útil en este caso de riesgo de exclusión social un seguimiento multidisciplinar más estricto: psiquiatría, pediatría y servicios sociales.

P-116. HCV-SPECIFIC T CELL RESPONSES IN HIV/HCV COINFECTED PATIENTS ON HAART ARE COMPARABLE TO THOSE OBSERVED IN HCV-MONINFECTED INDIVIDUALS

N.I. Rallón Afanador, V. Soriano Vázquez,
C. Restrepo González, J. García-Samaniego Rey, P. Labarga,
M. López Vázquez de la Torre, A. Peris Pertusa,
J. González Lahoz y J.M. Benito Huete

Hospital Carlos III, Madrid.

Introduction: Cellular responses against HCV are impaired in HIV/HCV-coinfected patients showing uncontrolled viral

replication and immune suppression. Very few studies have explored to what extent HCV-specific response improves as a consequence of control of HIV replication by HAART. We compared HCV-specific T-cell responses between HIV/HCV-coinfected patients, showing complete viral suppression, and HCV-monoinfected patients.

Methods: HCV-specific T-cell responses were examined in 50 interferon-naïve patients with chronic hepatitis C: 27 HCV-monoinfected and 23 HIV/HCV-coinfected on HAART and undetectable HIV load. Production of IFNgamma and TNF α were simultaneously measured in response to genotype-matched overlapping peptides spanning the whole HCV proteome by flow cytometry. Differences between groups were tested using non-parametric tests.

Results: More than half of patients presented CD4+ (60%) or CD8+ (57%) response to at least one HCV-protein, with no significant differences between both groups. Intensity and breadth of response response were also similar between groups. The functional profile of response was represented, in both groups, mainly by monofunctional subsets, although there were some differences between CD4+ and CD8+ T-cells response. CD8+ response was mediated almost exclusively by monofunctional IFNgamma+ cells, whereas bifunctional IFNgamma+TNF α + cells showed a moderate contribution to CD4+ response. Most of CD8+ response was mediated by IFNgamma, whereas TNF α was the highest contributor to CD4+ response.

Conclusions: Our study demonstrates that in HIV/HCV-coinfected patients with maximal HIV suppression under HAART, several characteristics of anti-HCV T cell response are similar to those found in HCV-monoinfected patients, suggesting that control of HIV replication might improve HCV-specific T-cell response in HIV/HCV-coinfected patients.

P-117. ESTUDIO DE 3 RECEPTORES DE ENTRADA DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LAS CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON INFECCIÓN CLÁSICA Y OCULTA

M.C. Roque Cuéllar, B. Sánchez Sánchez, J.R. García Lozano,
A. Garrido Serrano, M. Sayago, J.M. Praena Fernández,
A. Núñez y J. Aguilar Reina

Servicios de Aparato Digestivo e Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción: Estudio de tres receptores de entrada del virus de la hepatitis C en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con infección clásica y oculta.

Objetivos: CD81, scavenger receptor BI (SR-BI) y el receptor de las lipoproteínas de baja densidad, LDLR, son receptores del virus de la hepatitis C (VHC). Evaluamos su expresión en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de 66 pacientes infectados por VHC (genotipo 1), con o sin viremia (ARN-VHC en suero) e infección oculta, y en 20 controles sanos.

Métodos: La expresión de CD81 y LDLR en linfocitos y monocitos así como de SR-BI en monocitos se determinó mediante citometría de flujo. En los pacientes sin viremia se investigó la infección oculta mediante PCR a tiempo real, existencia de la cadena positiva y negativa del ARN-VHC en CMSP, indicativas de presencia y replicación viral. Estudio estadístico, U de Mann Whitney, $p < 0.05$.

Resultados: Los controles presentaron una expresión menor de CD81 y LDLR en linfocitos, y de LDLR y SR-BI en monocitos, que los pacientes. Los pacientes con viremia presentaron una expresión mayor de LDLR en linfocitos que aquellos sin viremia. Se detectó cadena positiva y negativa viral en 19 y 9 pacientes, respectivamente. La diferencia entre ambos radicaba en la expre-

sión de LDLR en linfocitos y monocitos, mayor en el segundo grupo.

Conclusiones: La replicación de VHC en suero y en CMSP, determina el aumento de LDLR en linfocitos en la infección clásica, y en linfocitos y monocitos en la oculta.

INMUNOLOGÍA TUMORAL

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

P-118. CHRONIC LYMPHOCYTIC LEUKEMIA-LIKE MBL: A PHYSIOLOGICAL MORE THAN A PATHOLOGICAL CONDITION?

J. Almeida Parra, W. Nieto, C. Teodosio, C.E. Pedreira, A. López Fernández, P. Fernández Navarro, S. Muñoz Criado, M. Jara Acevedo, A. Romero Furones y A. Orfao

Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer/IBMCC (CSIC-USAL), Salamanca. Servicio de Citometría y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca. School of Medicine and COPPE-PEE-Engineering Graduate Program, Federal University of Rio de Janeiro (UFRJ), Brasil. CAP de Ledesma, Sanidad de Castilla y León (SACYL), Salamanca. Servicio de Microbiología, Hospital Universitario de Salamanca. Gerencia de Atención Primaria de Salud de Salamanca, Sanidad de Castilla y León (SACYL).

Introduction: It has recently been shown that monoclonal B-cell lymphocytosis (MBL) is highly prevalent among the general population.

Objectives: In the present study we aimed to retrospectively analyze the frequency of CLL (chronic lymphocytic leukemia)-like MBL in 639 healthy adults (> 40 years old) with normal lymphocyte counts, representative of the population living in the area of Salamanca (Western Spain), to determine whether the frequency of detection of CLL-like B-cells raises to 100% if higher volumes of peripheral blood (PB) had been screened.

Methods: PB samples were immunophenotyped using a high-sensitive flow cytometry approach, based on 8-color staining panels and the systematic screening for $> 5 \times 10^6$ total PB leukocytes. A predictive model (power regression) was built, to calculate the percentage of MBL cases that would have been detected for blood volumes larger than those actually measured.

Results: An overall frequency of 12.5% of cases carrying CLL-like B-cells was detected after measuring 0.9 to 1.2 mL of PB. The predictive model suggested that, if larger volumes of PB (e.g. ≥ 46 mL) were analyzed, 100% of healthy adults over 70 years may carry detectable CLL-like B-cells; further staining of around 50 mL of PB from 9 initially negative adults aged > 70 years confirmed the presence of –frequently multiclonal– CLL-like B-cells in all but one of them.

Conclusions: These results support that over a certain age, the emergence of one or more CLL-like B-cell populations would occur;

further studies are required to elucidate whether these cells represent the physiological counterpart of CLL vs an ancestral leukemic cell.

P-119. ANÁLISIS DEL PERFIL DE METILACIÓN DE LOS LIGANDOS DE NKG2D (NKG2D-L) EN DIFERENTES LÍNEAS TUMORALES MEDIANTE LA TÉCNICA DE PIROSECUENCIACIÓN

A. Baragaño Raneros, B. Suárez Álvarez y C. López Larrea

Unidad de Histocompatibilidad y Trasplante, Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo.

Objetivos: NKG2D es un receptor de activación de células NKs que reconoce diversos ligandos (MICA, MICB y ULBPs) inducidos en células tumorales jugando un papel importante en la inmunidad antitumoral. En este trabajo hemos analizado el perfil de metilación del ADN de los (NKG2D-L) en diferentes líneas celulares tumorales de origen hematológico y epitelial.

Métodos: La expresión de los NKG2D-L fue determinada por citometría de flujo y RT-PCR cuantitativa en 20 líneas celulares tumorales pertenecientes a leucemia mieloide aguda, cáncer de mama y hepático. La determinación de la región promotora susceptible de metilación se realizó mediante modificación con bisulfito sódico y secuenciación. La técnica de pirosecuenciación ha sido puesta a punto para determinar el grado de metilación de la región promotora de interés de los NKG2D-L.

Resultados: Los niveles de expresión de los NKG2D-L son variables en las líneas celulares siendo MICA/B los ligandos mayoritarios a nivel de ARNm, mientras las ULBPs se expresan principalmente en la superficie celular. La pirosecuenciación ha resultado una técnica fiable y eficaz para analizar el grado de metilación de los NKG2D-L. Se ha observado correlación entre el grado de metilación y el nivel de expresión de los NKG2D-L lo cual podría tener relevancia en la inmunidad antitumoral. **Conclusiones:**

La metilación del ADN parece ser un mecanismo de regulación epigenética de los NKG2D-L. La pirosecuenciación podría ser una técnica útil para diferenciar diferentes grados de metilación de los NKG2D-L en pacientes con patología clínica tumoral lo cual podría suponer diferente respuesta inmune frente al cáncer.

P-120. THREE DIFFERENT MECHANISMS UNDERLYING MAJOR HISTOCOMPATIBILITY COMPLEX CLASS I DOWN-REGULATION IN COLORECTAL CARCINOMAS

M. Bernal Sánchez, P. Sáenz-López, A. Concha, A.I. Rodríguez, A. Moreno, T. Cabrera, F. Garrido y F. Ruiz-Cabello

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objectives: In this study we analyzed the mechanisms involved in total lost or downregulation of HLA-ABC expression in microsatellite unstable (MSI) and microsatellite stable (MSS) colorectal carcinomas (CRCs).

Material and methods: We studied the expression of HLA-ABC molecules by immunohistochemistry; mRNA expression was evaluated by q-PCR technique; gene sequencing were done to study mutations affecting B2-m gene and TAP1/TAP2 microsatellite sequences; the MSI phenotype was studied using microsatellite markers and BRAF mutation by RFLP analysis.

Results: I group: Mutations in the B2m gene were found exclusively in MSI tumors. No alterations in TAP1/TAP2 microsatellite

sequences were observed in the tumors studied. II group: Down-modulation of B2m gene expression, but no detectable mutations, was found in MSS tumors. III group: tumors with down regulation of both heavy chain and B2m genes were also associated with MSS phenotype.

Conclusions: In MSI CRCs, the selection of mutations in B2m gene is the major mechanism involved in tumor escape. Heterozygous B2m mutations also cause total loss of protein, possibly by a dominant negative effect, epigenetic mechanisms or mutations affecting proteins from the APM machinery. Tumors with MSS phenotype showed two different mechanisms: a) a selective down-regulation of B2m gene expression with unclear mechanisms, b) a combined down-regulation affecting the expression of HLA heavy chain and B2m genes. CpG island methylator phenotype (CIMP) has been suggested as a possible mechanism responsible for HLA class I down regulation in MSS/HLA- tumors. However, the BRAF mutation associated to CIMP was not detected in these tumors.

P-121. TOTAL LOSS OF HUMAN LEUKOCYTE ANTIGEN CLASS I EXPRESSION IN COLON CARCINOMAS IS NOT ASSOCIATED WITH A PARTICULAR PATTERN OF PROINFLAMMATORY GENE EXPRESSION AND LYMPHOCYTE INFILTRATION

M. Bernal Sánchez, F. García Alcalde, A. Concha, A.I. Rodríguez, A. Blanco, F. Garrido y F. Ruiz-Cabello

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Bioinformatics and Genomics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia. Department of Computer Science and Artificial Intelligence, Universidad de Granada.

Objectives: We compared gene expression profiles and inflammatory responses between CRCs that shared a common phenotype, total loss of HLA Class I expression, and CRCs without detectable HLA class I loss (control group).

Material and methods: We studied the leukocyte infiltration (lymphocytes and macrophages) and HLA-class I expression by immunohistochemistry. We also analyzed MSI phenotypes using microsatellite markers. Finally, gene expression profiles were analyzed using Affymetrix HG-U133-Plus-PM Array Plate.

Results: In MSI-H CRCs, we found 58 significant genes ($p < 0.05$) associated with inflammatory and cytotoxic functions, which were differentially expressed with respect to control group. Genes encoding macrophage and T Lymphocytes-attractant-chemokines, adhesion molecules, macrophage markers and molecules related to activation, proliferation and cytolytic functions of CTLs appeared to be over-expressed in MSI CRCs as compared to Control tumors. Genes related to TGF-β pathway were differentially overexpressed ($p < 0.05$), and genes associated to antigen processing machinery and MHC class I molecules were down-regulated in MSS/HLA- CRC group compared to Control tumors.

Conclusions: Tumors with total loss of HLA class I expression presented distinct patterns of leukocyte infiltration (composition and intensity) that were associated with different gene-expression of proinflammatory cytokines profiles. Higher infiltration by CD8+ lymphocytes, and cytotoxic markers appear to be a intrinsic characteristic of tumors exhibiting the MSI phenotype. Furthermore, HLA class I total loss due to B2m gene mutations suggest an early onset of immunoselective pressure. The mechanisms underlying in the MSS HLA class I negative loss and the significance of this phenotype are not yet fully understood.

P-122. GALECTIN-3 AND PROGRAMMED CELL DEATH-1 LIGAND EXPRESSION IN COLORECTAL MICROSATELLITE INSTABILITY POSITIVE AND NEGATIVE TUMORS

M. Bernal Sánchez, A.I. Rodríguez, P. Sáenz-López, T. Cabrera, F. Garrido y F. Ruiz-Cabello

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objectives: Recent studies had identified molecules expressed by tumor cells with immunoregulatory actions, such as Galectin-3 and Programmed cell death-1 ligand (PDL-1). The lectin induces apoptosis of T-cells and loss of their antitumor effector functions, and PDL-1 also regulates peripheral tolerance, inducing anergy, unresponsiveness and functional exhaustion of T cells. We studied the tumor expression of galectin-3 and PDL-1 in colon carcinomas (CRCs) samples with Microsatellite Instability (MSI) phenotype and total loss of HLA class I expression, compared to CRCs with MSS phenotype (HLA- and HLA+).

Material and methods: We studied HLA-class I expression and leukocyte infiltration (lymphocytes and macrophages) in CRCs samples. We also analyzed MSI phenotypes using microsatellite markers. Galectin-3 and PDL-1 tumor expression was studied in 24 selected CRCs by immunohistochemistry using appropriate monoclonal antibodies.

Results: The majority of tumors positive for PDL-1 and galectin-3 showed focal or scattered expression, predominantly in the cytoplasm. The frequency and pattern of galectin-3 expression did not differ among MSI-H HLA class I negative tumors, MSS HLA class I negative tumors, and the control group, whereas there was a tendency for a higher frequency of PDL-1 in the MSI-H group, in which the highest infiltration by CD8+ cells was observed.

Conclusions: There was no correlation of tumor leukocyte infiltration with parameters associated to tumor immune evasion such as galectin-3. However, there was a tendency for PDL-1 expression to be increased in tumors with high CD8+ T cells infiltration (MSI-H), although further studies are required to confirm this observation.

P-123. ANÁLISIS DE LAS MUTACIONES DEL GEN DE B2M EN TUMORES HUMANOS

M. Bernal Sánchez, A.B. del Campo, E.M. García, F. Garrido y F. Ruiz-Cabello

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objetivos: Hemos realizado un análisis del tipo de mutaciones encontradas en el gen de β2-microglobulina (B2m) humana en diferentes tipos de cáncer.

Material y métodos: Líneas y tumores estudiados por nuestro grupo y publicados en la bibliografía de distinta estirpe. Se ha estudiado el posible mecanismo mutagénico, tipo de mutación, secuencia diana, y su asociación a inestabilidad de microsatélites, (MSI), y/o pérdida de heterocigosidad (LOH).

Resultados y discusión: Por el sesgo introducido en el screening se observó que la mayoría de las mutaciones inactivan B2m (mutaciones sin sentido o ins/del). Estas últimas se asociaron al fenotipo MSI en colon y afectaron mayoritariamente a una zona de repetición en los codones 13-15. En colon, el mecanismo puede deberse a deficiencias en los genes de reparación MMR asociados al fenotipo MSI. Cabe destacar que mientras en melanoma se detectó la inactivación simultánea de la otra copia de B2m por LOH, no ocurrió así en colon. Entre las mutaciones puntuales, predominaron las mutaciones sin sentido a las sustituciones. Casi ninguna de las mutaciones se encontraron en el sitio consenso para citosín desaminasa (AID):WRC o GYW.

Conclusiones: Las del/ins condujeron a la pérdida de la proteína B2m, y parecen deberse a deficiencias en reparación del DNA, al menos en colon, permaneciendo su origen más oscuro en el caso del melanoma. Los mecanismos que generan las mutaciones puntuales no están claros y no parece intervenir la activación aberrante de AID. Es probable que algunas de las sustituciones no solo interfieran con el tráfico por ER/Golgi o con el ensamblaje de la molécula HLA sino que puedan tener un efecto dominante-negativo.

P-124. ANÁLISIS DE LA CATEGORÍA BIOLÓGICA DE LOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESADOS EN TUMORES DE COLON CON INESTABILIDAD DE MICROSATÉLITES FRENTE A TUMORES CON ESTABILIDAD

M. Bernal Sánchez, F. García Alcalde, A. Moreno, A. Concha, A. Blanco, F. Garrido y F. Ruiz-Cabello

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología; Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Bioinformatics and Genomics Department, Centro de Investigación Príncipe Felipe, Valencia. Department of Computer Science and Artificial Intelligence, Universidad de Granada.

Objetivos: Hemos analizado los perfiles de expresión génica diferencial y categorías biológicas implicadas en tumores de colon (CRC) con fenotipo de inestabilidad de microsatélites (MSI) frente a tumores con estabilidad de microsatélites (MSS).

Material y métodos: El fenotipo MSI se determinó mediante el empleo de varios marcadores de microsatélites. El estudio de expresión génica se realizó empleando la tecnología de Affymetrix mediante el array HG-U133-Plus-PM Plate. En el análisis de los datos se utilizó el Bioconductor package RMA (Robust MultiArrays Average) y Partek Genomic Suite. Gene Ontology (GO) nos permitió determinar la categoría biológica de los genes diferencialmente expresados.

Resultados: Obtuvimos 2.170 secuencias que correspondían a genes diferencialmente expresados en la comparación entre tumores MSI-H y tumores MSS (casos control). El estudio mediante GO destacaron los siguientes procesos celulares (1.128 genes, $p = 0,03$), programa de apoptosis (119 genes, $p = 5,1 \times 10^{-7}$), metabolismo lipídico celular (101 genes, $p = 10^{-4}$), activación leucocitaria (32 genes, $p = 0,01$), activación de células T (20 genes, $p = 0,01$), o producción de citoquinas (19 genes, $p = 0,04$). Los genes relacionados con inflamación y citotoxicidad aparecían sobreexpresados en tumores MSI, mientras, en los genes implicados en apoptosis (119 genes) no se observó una tendencia clara hacia mecanismos pro- o anti-apoptóticos el grupo MSI.

Conclusiones: La sobreexpresión de genes implicados en citotoxicidad se asocia al fenotipo MSI. No está claro sin embargo, el papel de las secuencias génicas asociadas a apoptosis en tumores MSI, que sin duda requieren más investigación.

P-125. ANALYSIS OF THE MOLECULAR MECHANISMS UNDERLYING HLA CLASS I ALTERED EXPRESSION IN HUMAN PROSTATE CANCER AND IN PROSTATIC HYPERPLASIA

J. Carretero Coca, A. del Campo Alonso, A.I. Rodríguez, A. Moreno, A. Suárez, T. Cabrera, J.M. Cázaro, N. Aptziauri y F. Garrido Torres-Puchol

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología y Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

Objectives: The altered expression of target protein antigens and HLA molecules is the predominant immune escape mecha-

nism of malignant cells. However, the existing information on the frequency and molecular mechanisms of HLA class I defects in prostate cancer is limited. We analyzed HLA class I expression patterns and underlying molecular mechanisms in frozen human prostate cancer samples and in prostate with hyperplasia.

Material and methods: tumor immunohistochemistry, tissue microdissection, microsatellite analysis of chromosomes 6 and 15, and real-time PCR were used to asses HLA class I heavy chain, beta2-microglobulin (beta2-m) and antigen presentation machinery (APM) expression in 40 prostate tumors and 5 prostate hyperplasias.

Results: Tumor immunohistochemistry revealed a high percentage (90%) of HLA class I altered expression ranging from partial to total loss, while hyperplastic prostate was HLA-positive. Nevertheless, mRNA expression level of all the studied molecules in tumors was higher than in prostate hyperplasia. In addition, tumors with HLA class I altered phenotypes showed higher expression of beta2-m and heavy chain mRNA, but lower APM mRNA when compared to hyperplasia. This discordance between protein and mRNA expression levels requires a more detailed study. Microsatellite analysis of chromosomes 6 and 15 using DNA from microdissected prostate tumor samples demonstrated that 57% of the analyzed samples have LOH at least in one chromosome.

Conclusions: HLA class I abnormalities, including low tissue protein expression with underlying structural defects, such as LOH are frequent in prostate cancer and might play a negative role in the clinical course and in the outcome of T cell-based immunotherapies.

P-126. ASSOCIATION OF GENETIC POLYMORPHISM IN TLR GENES WITH BLADDER CANCER

R. Carretero Coca, M. Guirado Rodríguez, A.I. Rodríguez Fernández, E. Gil, P. Sáenz-López Larrocha, F. Garrido Torres-Puchol, J.M. Cázaro Olmo y F. Ruiz-Cabello Osuna

Universidad de Granada. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objectives: Several evidences have been published linking polymorphism in genes involved in chronic or recurrent inflammation with increased tumor risk and progression. Nevertheless the influence of innate immune receptors in urothelial cancer risk and characteristics has not been sufficient explored. Toll-like receptors (TLRs) are a family of proteins that play a key role in the innate immune system. We assessed if genetic polymorphisms in genes encoding TLR 2, TLR 3, TLR 7, TLR and TLR 9 were associated with the risk clinical progression of urothelial cancer.

Material and methods: We analysed polymorphisms in genes encoding TLR 2, TLR 3, TLR 7, TLR, TLR 9 and TLR 10 in 275 patients and 475 healthy controls in a Spanish population. The SPSS version 17.0 was used for statistical analyses.

Results: We found statistical differences in TLR 9 rs352140 between case and controls ($p < 0,001$) and with lymph node ($p = 0,037$) and organ metastases ($p = 0,001$). We also found a relation between TLR 7 rs179008 and tumor stage ($p = 0,030$) grade ($p = 0,038$) and size ($p = 0,006$). Cox analyses reveal a strong correlation of polymorphism in TLR 2, 3, 7, 8 and 9 in tumor relapse and importantly, that polymorphism in TLR 3 rs5743305 is an independent prognosis of survival.

Conclusions: Our results showed a major role of TLR receptors in the modulation of urothelial cancer susceptibility and development.

P-127. UN VECTOR DEL VIRUS DEL BOSQUE DE SEMLIKI (SFV) QUE EXPRESA INTERFERÓN- α INDUCE POTENTES RESPUESTAS ANTITUMORALES EN UN MODELO MURINO DE CÁNCER CERVICAL

J. Fioravanti, J. Quetglás Mas, N. Ardaiz Iriarte, J. Medina Echeverz, I. Baraíbar Argota, J. Prieto Valtueña, P. Berraondo López y C. Smerdou Picazo

División de Terapia Génica y Hepatología, Facultad de Medicina, Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona.

Objetivos: Los vectores basados en el virus del Bosque de Semliki (SFV) representan una herramienta prometedora para la terapia génica del cáncer. Esto es debido tanto a sus elevados niveles de expresión de proteínas recombinantes como a su capacidad de inducir apoptosis en las células que infectan. El IFN α es una molécula que posee actividad antitumoral per se, tanto por sus propiedades citostáticas como por su capacidad para potenciar la respuesta inmune frente al tumor.

Material y métodos: Para este trabajo, generamos un vector de SFV que expresa interferón- α murino (SFV-IFN). A pesar de la actividad antiviral inherente al IFN α , el vector SFV-IFN pudo producirse a altos títulos en células BHK-21. SFV-IFN fue capaz de infectar células TC-1, una línea tumoral de ratón que expresa las proteínas E6 y E7 del virus del papiloma humano, produciendo altas cantidades de IFN α , tanto *in vitro* como *in vivo*.

Resultados: La inyección intratumoral de SFV-IFN en tumores TC-1 subcutáneos fue capaz de inducir una respuesta citotóxica específica frente al antígeno E7, que fue acompañada de una alteración en el número de células inmunosupresoras presentes en el tumor. Como consecuencia directa de estos efectos, el tratamiento con SFV-IFN produjo la eliminación de un 58% de tumores TC-1 cuando se trataron tras 21 días de su implantación. Los ratones tratados con este vector mostraron una elevada supervivencia con muy baja toxicidad.

Conclusiones: Los datos presentados en este trabajo sugieren que SFV-IFN podría representar una nueva y potente herramienta para tratar tumores establecidos en pacientes.

P-128. HLA-ABC GENE EXPRESSION IN PBL'S, COLON MUCOSA, BLADDER MUCOSA, STOMACH MUCOSA AND NORMAL KIDNEY TISSUES BY LOCUS-SPECIFIC QUANTITATIVE RT-PCR

A.B. García Ruano, P. López-Sáenz Larrocha, J.M. Romero Noguera, T. Cabrera Castillo, F. Ruiz-Cabello Osuna y F. Garrido Torres-Puchol

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

We developed a novel locus-specific quantitative real-time polymerase chain reaction to determine the locus-specific gene expression of HLA-ABC heavy chain genes. We analyzed peripheral blood leukocytes from 53 healthy controls, 15 colon mucosa 15 larynx mucosa, 15 bladder mucosa, 15 stomach mucosa and 15 normal kidney tissues. Using laser assisted microdissection technique we were able to isolate selected cells without contamination with surrounding stoma cells. Our method has proven to yield specific amplification of each HLA loci and we have obtained data of tissue specific expression of each locus. The results were expressed as mean \pm standard deviation. In the

case of peripheral blood leukocytes we obtained the following values: HLA-A/G6PDH = 13.9 ± 10.1 ; HLA-B/G6PDH = 29.6 ± 23.2 ; HLA-C/G6PDH = 17.4 ± 17.2 . The results in larynx mucosa were: HLA-A/G6PDH = 23 ± 22.8 ; HLA-B/G6PDH = 19.8 ± 18.6 ; HLA-C/G6PDH = 4.9 ± 4.3 . The results obtained in the colon mucosa were: HLA-A/G6PDH = 16.4 ± 17 ; HLA-B/G6PDH = 18.6 ± 17.7 ; HLA-C/G6PDH = 11.2 ± 10.6 . In the case of bladder mucosa: HLA-A/G6PDH = 10.1 ± 4.9 ; HLA-B/G6PDH = 11.3 ± 9.9 ; HLA-C/G6PDH = 6.1 ± 9.7 . The results obtained in stomach mucosa were as follows: HLA-A/G6PDH = 1.0 ± 0.5 ; HLA-B/G6PDH = 2.0 ± 1.6 ; HLA-C/G6PDH = 2.2 ± 1.7 . Finally, the results obtained for the normal kidney samples were: HLA-A/G6PDH = 2.1 ± 1.2 ; HLA-B/G6PDH = 2.5 ± 2 ; HLA-C/G6PDH = 7 ± 7.1 . Larynx, colon and bladder mucosa showed a similar gene expression pattern where transcription levels of HLA-A and HLA-B locus are higher than those of HLA-C locus. This pattern was different in kidney tissue, where HLA-C transcription levels were higher than that of HLA-A and HLA-B loci. Additionally, we found a down regulation of HLA-ABC heavy chain gene transcription in stomach tissue. The biological significance of the observed differences are yet unknown, although it is known that changes in HLA-C locus expression may be involved in the regulation of NK cell function in these tissues.

P-129. CAMBIOS EN EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA DE CLASE I EN CÉLULAS BLÁSTICAS DURANTE LA TRANSFORMACIÓN DEL SÍNDROME MIELODISPLÁSICO A LEUCEMIA AGUDA MIELOBLÁSTICA

P. Garrido Collado, A. Pérez-Alija, P. Jiménez Gámiz, M. Almagro Sánchez de Puerta, A. Cabrera Torres, M. Jurado Chacón y F. Ruiz-Cabello Osuna

Servicio de Hematología; Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objetivos: Estudiar el nivel de expresión de moléculas HLA en blastos mieloides CD34+ en pacientes afectados de síndrome mielodisplásico (SMD)/leucemia aguda mieloblástica (LAM).

Material y métodos: Citometría de flujo sobre células CD34+ mieloides. Hemos realizado un análisis comparativo en individuos con SMD ($n = 9$)/LAM (M1-M2; $n = 17$ que incluyen tres casos de SMD transformados a LAM). El grupo control se incluyeron blastos CD34+ mieloides de individuos sin patología oncohematológica.

Resultados: Los niveles de expresión obtenidos en los blastos CD34+ se relativizaron frente a los obtenidos en los linfocitos CD3+. La expresión observada en linfocitos y en células blásticas de los controles fueron similares. Sin embargo se encontró una progresiva caída en la ratio observada en SMD ($p < 0,013$) y todavía más en blastos de LAM, $p < 0,001$ (3 de los 9 casos de SMD y en 14 de los 17 casos de LAM se encontraron niveles muy descendidos de HLA-ABC).

Conclusiones: La transformación de SMD a LAM puede transcurrir con un descenso en el nivel de expresión de moléculas HLA de clase I. Por tanto el descenso en la expresión de HLA de clase I podría ser un marcador de predicción de la evolución de SMD a LAM. Finalmente, aunque la pérdida de expresión total de HLA se puede considerar un hecho aislado (solo 1 caso de los estudiados), no así la reducción o pérdida de expresión parcial. La relevancia funcional de nuestros hallazgos podría interpretarse en el contexto de la evasión tanto de linfocitos T citotóxicos como de células NK.

P-130. IMMUNOTHERAPY TREATMENTS ERADICATE SPONTANEOUS METASTASES RESTORING IMMUNOSUPPRESSION GENERATED BY A MHC CLASS I POSITIVE PRIMARY TUMOR

C. Garrido López, I. Romero, I. Linares, A.B. Rodríguez, M. Martínez, I. Algarra, A. Collado, F. Garrido y A.M. García-Lora

Universidad de Granada. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. Universidad de Jaén.

Objectives: Analyze immunoescape mechanisms of GR9-A7 MHC-I positive fibrosarcoma clone highly aggressive in spontaneous metastasis assay and reverse metastatic lesions.

Material and methods: We performed spontaneous metastasis assay with GR9-A7. Mice were killed and complete necropsy was done isolating metastatic nodules. Metastases were adapted to tissue culture. MHC-I phenotype and transcriptional level of MHC-I related genes were analyzed. Spleen and peripheral blood lymphocyte populations were measured by flow cytometry. In this murine tumor system, we established three immunotherapy treatments: CpG plus 100Gy-irradiated GR9-A7 cells, PSK or PSK plus Docetaxel.

Results: GR9-A7 metastasized in 18/20 mice producing pulmonary (6-58) and lymph node metastases (0-4). 71% of metastases presented MHC-I downregulation due to downregulation of β2-microglobuline, H-2 class I heavy chains and APM transcriptional level. These alterations were reversible by IFN-gamma treatment. Lymphocyte populations showed that GR9-A7 tumor growth and metastatic development produced a decrease of CD3+, CD8+ and NK cells compared with non-tumor injected mice, whereas increased CD4+CD25+FoxP3+ Treg cells. Immunotherapy treatment inhibited metastases colonization. Lymphocyte populations were analyzed and compared with control group. CpG+A7-100Gy therapy increased levels CD3+, CD8+ and CD4+ T cells and decreased Treg cells. PSK therapy upregulated CD3+, CD8+, CD4+ and NK populations. Treatment with PSK+Docetaxel markedly downregulated Treg lymphocytes.

Conclusions: GR9-A7 MHC-I positive tumor promoted MHC-I reversible downregulation and immunosuppression as immunoescape mechanism. Immunotherapy restored immunosuppression and completely eradicated metastatic colonization.

P-131. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MICA POR LAS QUINASA ATM

S. González Rodríguez, A. Fernández Guizán, L. Huergo Zapico y A. Acebes Huerta

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

La expresión de los ligandos de NKG2D se induce en células tumorales por el daño genotóxico, condición que induce la expresión de las quinasas ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) o ATR (ATM- and Rad3-related) y Chk1, permitiendo la eliminación de estas células dañadas por el sistema inmune. MICA y las ULBPs son ligandos de NKG2D que muestran diferentes patrones de expresión en diferentes tipos de tumores. MICA se expresa frecuentemente en tumores epiteliales, mientras que las ULBPs apenas se expresan en estos tumores, pero se expresan más frecuentemente en cánceres hematológicos. En este trabajo hemos estudiado si ATM/ATR, que se activa de una forma precoz durante el desarrollo del cáncer, está implicada en la expresión de MICA en tumores epiteliales. Para ello inhibimos farmacológicamente su expresión en diversas líneas celu-

lares tumorales y estudiamos la expresión de MICA a nivel transcripcional, síntesis de ARN y expresión a nivel de proteína. Estos resultados fueron confirmados mediante el análisis de una línea celular deficiente en ATM, AT22IJE-T/pEBS7 (ATM -/-). Observamos que ATM regula la expresión de MICA en diversas líneas tumorales tanto a nivel transcripcional como posttranscricional. Mediante el análisis de la actividad promotorra y la expresión de ARN observamos que ATM induce la transcripción de MICA en líneas tumorales. Además, mediante la inhibición de la actividad catalítica del proteasoma observamos que ATM también induce la expresión de MICA mediante la reducción de su degradación en el proteasoma y el aumento de su estabilidad proteica.

P-132. SILENCIAMIENTO DE LA EXPRESIÓN DE MICA POR MECANISMOS EPIGENÉTICOS EN CÁNCER DE COLON

S. González Rodríguez, L. Huergo Zapico, A. Acebes Huerta y A. Fernández Guizán

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

MICA es un ligando del receptor activador de NKG2D implicado en la inmunovigilancia del cáncer. Las células tumorales pueden evadir la respuesta mediada por NKG2D mediante el silenciamiento de la expresión de MICA. Resultados previos nos sugieren que el silenciamiento de MICA puede estar regulado epigenéticamente. Aquí, hemos estudiado si la metilación del DNA y la remodelación de la cromatina por las desacetilasas de las histonas (HDAC) están implicadas en la regulación de la expresión de MICA en cáncer de colon. Mediante técnicas inmunohistoquímicas demostramos que la expresión de MICA se perdía en el 42% de los casos de adenocarcinomas de colon. La ausencia de MICA se correlacionó con la pérdida de diferenciación tumoral ($p < 0,05$), la afectación ganglionar ($p < 0,001$) y la invasión linfovascular ($p = 0,03$). El análisis de los promotores de MICA y las ULBPs en mucosa de colon normal y tumoral, y en líneas tumorales colorrectales demostró que la metilación no está implicada en el silenciamiento génico de MICA en estos tumores, aunque si puede estar implicado en la regulación de la expresión de alguna ULBP. Sin embargo, mediante análisis inmunohistoquímicos observamos que HDAC3 se sobre-expresa en tumores poco diferenciados y se correlaciona con el silenciamiento de MICA. Además, el tratamiento de líneas colorrectales con inhibidores de HDACs o mediante el silenciamiento génico de HDAC3 indujo dramáticamente la expresión de MICA. El análisis del mecanismo implicado en la represión de MICA demostró que HDAC3 reprime la expresión de MICA a nivel transcripcional mediante la interacción con su promotor mismo.

P-133. PAPEL DE SLIT/ROBO EN LA INTERACCIÓN ENTRE CÉLULAS ENDOTELIALES Y PERICITOS HUMANOS

I. Guijarro Muñoz, A. Cuesta Martínez, A. Álvarez de Cienfuegos Suárez-Inclán, L. Álvarez Vallina y L. Sanz Alcober

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

Objetivos: El proceso angiogénico es clave en una serie de patologías que abarcan desde enfermedades inflamatorias hasta el crecimiento tumoral. Para profundizar en el conocimiento

de los mecanismos moleculares implicados, nos propusimos estudiar el potencial efecto funcional de las moléculas de guía axonal Slit y Robo en células endoteliales y pericitos humanos.

Material y métodos: Mediante PCR en tiempo real se estudió la expresión de los miembros de las familias Robo y Slit en pericitos y células endoteliales. El papel de Slit2 se analizó mediante ensayos de adhesión, migración y morfogénesis sobre Matrigel. Para estudiar su efecto sobre el citoesqueleto, las células tratadas se tiñeron con faloidina y se determinó el estado de activación de Rac1.

Resultados: Los pericitos humanos expresan al menos tres de los cuatro miembros de la familia Robo, pero solo uno de sus ligandos, Slit2, al igual que las células endoteliales humanas HUVEC. En presencia de Slit2, la capacidad migratoria de los pericitos humanos disminuye, así como su capacidad de formar estructuras organizadas sobre Matrigel. Este efecto se correlaciona con cambios en la organización de citoesqueleto, con una disminución del número de filopodia, así como de la actividad de Rac1.

Conclusiones: Slit 2 podría actuar tanto de forma autocrina como paracrina sobre los pericitos de la microvasculatura en procesos angiogénicos fisiológicos o patológicos. En concordancia con el efecto repelente que esta molécula tiene durante el desarrollo del sistema nervioso central en la migración axonal, proponemos un papel regulador negativo de la capacidad de migración del pericito.

P-134. GENETIC POLYMORPHISM OF C13ORF31, NOD2, RIPK2 AND TLR10 IN UROTHELIAL BLADDER CANCER

M. Guirado Rodríguez, R. Carretero Coca,
A. Rodríguez Fernández, P. Sáenz-López Larrocha,
E. Gil, F. Garrido Torres-Puchol, J.M. Cázaro Olmo
y F. Ruiz-Cabello Osuna

Universidad de Granada. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objectives: Several evidences have been published linking polymorphism in genes involved in chronic or recurrent inflammation with increased tumor risk and progression. Nevertheless the influence of innate immune receptors in urothelial cancer risk and characteristics has not been sufficient explored. Toll-like receptors (TLRs) are a family of proteins that play a key role in the innate immune system. We assessed if genetic polymorphisms in genes encoding NOD2, RIPK2, TLR10 and C13ORF31 were associated with the risk clinical progression of urothelial cancer.

Material and methods: We analysed polymorphisms in genes encoding NOD2, RIPK2, TLR10 and C13ORF31 in 275 patients and 475 healthy controls in a Spanish population. The SPSS version 17.0 was used for statistical analyses.

Results: We found statistical differences in C13ORF31 (rs3764147) between case and controls ($p < 0.001$) and among tumor infiltration stages ($p = 0.022$) and grade ($p = 0.005$). TLR10 (rs4129009) was also associated with tumor infiltration ($p = 0.033$). NOD 2 (rs9302752) and RIPK2 (rs42490) were found to be associated with development of lymph node metastasis ($p = 0.011$ and $p = 0.015$). Importantly we detect association of TLR10 (Log Rank = 0.035) and RIPK2 (Log Rank = 0.040) with overall survival. Cox analyses revealed that both SNPs were survival prognosis factor independent of tumor stage and grade.

Conclusions: Our results indicate that innate immunity receptors play a role in modulating urothelial cancer risk and progression.

P-135. ESTUDIO CUANTITATIVO DE LAS POBLACIONES DE CÉLULAS MONONUCLEARES EN EL INFILTRADO INFLAMATORIO DE ADENOCARCINOMAS PANCRÉATICOS

R. Lavado Valenzuela, F. Batalla Fernández,
M.J. Bravo Romero, I. Alés Díaz, M. Benavides Orgaz,
N. Fernández Arcás, J.M. Miranda Sayago, A. Alonso Ortiz,
J. Santoyo Santoyo, D. Bautista Ojeda
y A. Caballero González

Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga.

Objetivos: El mal pronóstico de los tumores pancreáticos podría estar relacionado, entre otras cosas, con la función del sistema inmune del huésped frente al tumor. El microambiente de los tumores sólidos se caracteriza por la abundancia de mediadores inflamatorios. El objetivo de este estudio es caracterizar las distintas poblaciones celulares del infiltrado tumoral en cada paciente.

Material y métodos: Se incluyeron 39 pacientes con adenocarcinoma pancreático. Mediante estudio de inmunohistoquímica en muestras parafinadas, se evaluaron en tejido tumoral y normal los marcadores CD8 (linf T citotóxicos), CD4 (linf T helper), CD20 (linf B), CD68 (macrófagos) y CD56 (células NK). El análisis estadístico se realizó con U de Mann-Whitney, χ^2 con corrección de Yate y test exacto de Fisher en valores > 5 . Se consideraron estadísticamente significativos valores de $p \leq 0.05$.

Resultados: El análisis con U de Mann-Whitney reveló que existían diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos en tejido normal y en tejido tumoral en los marcadores CD8 y CD68 ($p \leq 0.001$). La χ^2 o test de Fisher confirmaron estos resultados (CD8: 4,89% vs 11,78%, $p = 0,047$, IC95%; CD68: 4,25% vs 16,11%, $p = 0,004$, IC95%).

Conclusiones: Los resultados muestran que en el infiltrado inflamatorio de los tumores se encuentra un alto porcentaje de linfocitos CD8 y macrófagos, siendo este porcentaje mucho más elevado que en tejido sano. Estos resultados sugieren que la respuesta antitumoral recae principalmente sobre estas poblaciones.

P-136. ESTUDIO DE LA EFICACIA DIAGNÓSTICA DE LA CITOMETRÍA DE FLUJO EN SÍNDROMES MIELODISPLÁSICOS

J. López López, V. Gómez García de Soria,
S. Martínez González, A. Ramírez Mengíbar, V. López Huete,
L. Vega Piris, F. Rodríguez Salvanes y C. Muñoz Calleja

Servicios de Inmunología, Hematología y Metodología, Instituto de Investigación Sanitaria-Instituto Princesa, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

Introducción: La citometría de flujo adquiere cada vez más relevancia en el diagnóstico de los síndromes mielodisplásicos (SMD). Sin embargo, no existe consenso sobre las moléculas a estudiar y los datos sobre especificidad/sensibilidad de la citometría en el diagnóstico de SMD son muy confusos. Las recomendaciones para el cribaje de SMD incluyen el empleo de un amplio panel de anticuerpos, difícil de asumir técnica y económico.

Métodos: Estudio prospectivo con un panel reducido de 3 tubos con 4 fluorocromos/tubo en 76 pacientes con citopenias no filiadas. En 22 pacientes se confirmó SMD y los restantes 54 se etiquetaron como citopenias secundarias. Se incluyeron 25 sujetos sanos. Los parámetros fenotípicos analizados no fueron seleccionados a priori. Se incluyeron porcentaje, tamaño y complejidad de las subpoblaciones medulares y el porcentaje de positividad y la media de intensidad de fluorescencia de todas las

moléculas analizadas. Para estudiar la asociación entre las variables incluidas y el diagnóstico de los pacientes utilizamos ANOVA; aquellas cuyo valor $p < 0,01$ y descartando la combinación lineal entre ellas fueron incluidas en un análisis discriminante con objeto de clasificar correctamente los tres grupos diagnósticos en estudio.

Resultados: Se identificaron 12 variables, de ellas se obtuvieron 6 y en ambos casos se clasificaron correctamente el 78,2% de los sujetos.

Conclusiones: Las variables incluidas tienen una capacidad de clasificación cercana al 78%. Este poder predictivo es similar al hallado en otros estudios que analizan un número mucho mayor de moléculas garantizando el mismo nivel de clasificación, con un importante ahorro de reactivos.

P-137. LOW DOSES OF CHEMOTHERAPEUTICS AGENTS MAY INCREASE MHC CLASS I SURFACE EXPRESSION IN TUMOUR CELL LINES

M. Martínez López, I. Romero García,
A. Pérez-Aluja Fernández, C. Garrido,
F. Garrido Torres-Puchol y A.M. García Lora

Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objectives: Previously, it has been reported an immunogenic component in the antitumor activity generated by some chemotherapeutic agents. Studies in dendritic cells have reported an increase in MHC class I surface expression and antigen processing machinery components promoted by different chemotherapeutic agents. In this study, we have analysed the effect of several chemotherapeutic agents, used at low doses, on MHC class I expression in tumour cells.

Material and methods: Tumour cell lines, with different MHC class I expression, derived from murine solid tumours of different histology were analysed. Chemotherapeutic agents used were: docetaxel, doxorubicin, metotrexate, vinblastine and mitomicin C. Treatments in vitro with chemotherapeutic agents were for 48 to 96h. MHC class I surface expression was analysed by flow cytometry.

Results: The results showed that in MHC class I-positive tumour cell lines, as i.e. GR9-A7 fibrosarcoma, several agents promoted an increase in MHC class I surface expression. Moreover, in MHC class I-negative tumour cell lines, as i.e. B16, some specific chemotherapeutic agents induced MHC class I surface expression but only in a specific MHC class I molecule. In all cases the used doses were below their cytotoxic maximum activity. Now, we are analysing transcriptional expression of MHC heavy chains and antigen processing machinery genes after of the treatments.

Conclusions: These results indicate that chemotherapeutic agents may modulate MHC class I expression in tumour cells. This increase in MHC class I expression might be implicated in the immunogenic activity of some chemotherapeutic agents.

P-138. EFECTO ANTITUMORAL DEL PÉPTIDO INHIBIDOR DE TGF-BETA P144 ESTABILIZADO CON APOLIPOPROTEÍNA A-I

J. Medina-Echeverz, J. Fioravanti, N. Ardaiz, C. Gomar,
J. Dotor, J. Prieto y P. Berraondo

División de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona. Unidad de Hígado, Clínica Universidad de Navarra, CIBEREHD, Pamplona.

El TGF-beta es una citoquina pleiotrópica que desempeña un papel clave en la progresión del cáncer debido a sus efectos

sobre la proliferación celular, angiogénesis, inmunosupresión y metástasis. Dentro de la pléthora de moléculas diseñadas para inhibir dicha citoquina y sus efectos, el péptido P144 ha demostrado su eficacia en varios modelos de fibrosis y cirrosis, aun siendo sus efectos limitados por su escasa vida media en el organismo. En este trabajo se diseñan distintas moléculas partiendo de la apolipoproteína Apo A-I, principal componente de las lipopartículas de alta densidad (HDL) y clave en el transporte inverso del colesterol, con el fin de aumentar la vida media del péptido y dirigir su acción al hígado. Ensayos de vacunación profiláctica e inmunomodulación de respuesta inmune inducida por interleuquina 12 revelaron a la fusión de Apo A-I y P144 mediante una secuencia larga de 11 aminoácidos -ApoLinkerP144- como la construcción más activa. ApoLinkerP144 es capaz de complejarse en HDL, manteniendo su actividad inhibitoria sobre el TGF-beta, así como de aumentar sustancialmente la vida media de P144. Experimentos con transfectantes estables de ApoLinkerP144 a partir de líneas celulares de carcinoma de colon y melanoma demuestran cómo dicha molécula afecta a la biología del tumor *in vitro* e *in vivo*. Finalmente, la expresión sistémica y estable de ApoLinkerP144 mediante un virus adenoasociado es capaz de reducir el área tumoral en modelos de metástasis primarias en hígado. En resumen, ApoLinkerP144 actúa como biomodulador de la actividad de TGF-beta y constituye una gran herramienta para su aplicación en estrategias de inmunoterapia.

P-139. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DEL LOCUS HLA-C EN UN PANEL DE LÍNEAS CELULARES DE MELANOMA

R.M. Méndez Vales, T. Hidalgo Crespo, J.M. Romero Noguera,
S. Brackenridge, A.B. García Ruano, A.B. del Campo Alonso,
N. Aptsiauri, F. Ruiz-Cabello Osuna, A. McMichael
y F. Garrido Torres-Puchol

Weatherall Institute of Molecular Medicine, University of Oxford,
John Radcliffe Hospital, Headington, Oxford, Reino Unido. Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La pérdida de expresión de los antígenos HLA de clase I es un fenómeno frecuente y heterogéneo en tumores. En estos estudios solo se analiza la expresión global HLA-ABC y no hay información sobre disminuciones o incrementos significativos en los locos HLA-A, HLA-B o HLA-C. Para este último en particular, no existían anticuerpos específicos por lo que su expresión no había sido estudiada hasta ahora. Tras el desarrollo del anticuerpo monoclonal DT9 específico para el locus HLA-C hemos estudiado la expresión de estos antígenos en un panel de líneas celulares de melanoma, mediante la citometría de flujo. Resultados preliminares, en 15 líneas de melanoma muestran una expresión variable del antígeno HLA-C. En aquellas líneas donde no se ha demostrado la presencia de alteraciones la expresión de HLA-C es similar a la de los antígenos HLA-A y HLA-B. En aquellas líneas con fenotipo alterado IIb o baja regulación del locus HLA-B hemos encontrado también una baja regulación del locus HLA-C. Solo hemos encontrado una línea con expresión normal para el locus HLA-B y baja regulación para HLA-C. Todas las líneas con baja regulación HLA-C, recuperan la expresión de este locus tras el tratamiento con interferón gamma. Actualmente estamos realizando los estudios de expresión a nivel de cDNA. La importancia de este estudio radica en la función de HLA-C como ligando inhibidor de las células NK. El incremento de esta molécula en tumores podría ser un mecanismo de evasión a estas células efectoras de la inmunidad innata.

P-140. EXPRESSION OF A10 CARBOHYDRATE EPITOPE ON HUMAN PROSTATE TUMORS: ITS RELATIONSHIP WITH THE BIOLOGICAL BEHAVIOR AND CLINICAL OUTCOME

L. Moltó Delgado, J. García-López Asenjo, J. Moreno Sierra, M. Fuentes Ferrer, S. Hernández Prieto, M. Arroyo Fernández, J. Tudela García y J. Subiza Garrido-Lestache

Servicios de Inmunología, Análisis Clínicos, Anatomía Patológica, Urología y Medicina Preventiva, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid.

Objectives: To assess the expression of MUC1-associated carbohydrate epitope defined by A10 mAb on prostate tumor tissues. A retrospective study was made by evaluating 171 biopsies at the time of tumor diagnosis from 184 samples corresponding to 38 benign prostate hyperplasia (BPH), 25 prostate intraepithelial neoplasias (PIN) and 121 prostate carcinoma lesions (PCa) by immunohistochemistry using a semiquantitative score grading. Disease progression in PCa patients was evaluated by serum PSA, metastasis development and survival time.

Results: Epithelial cells from BPHs exhibited a strong A10 immunostaining mostly in their cell membrane. PCa tissues exhibited a diffuse pattern of A10 immunostaining, including both membrane and cytoplasm compartments, with different staining intensities among biopsies that correlated inversely with the Gleason grading ($p < 0.000$). A weak or strong A10 immunostaining of PCa tissues at the time of diagnosis also correlated with the tumor progression assessed by the serum PSA levels and clinical outcome. Univariate Cox regression analysis show the A10 expression at diagnosis as an independent prognostic factor for cumulative survival time free of bone metastases ($p < 0.000$). Multivariate Cox regression analysis show that high-grade PCa, high serum PSA levels and A10 negative expression at diagnosis are significant prognostic factors for survival time free of bone metastases irrespective of primary treatment ($p < 0.000$).

Conclusions: A10 epitope is expressed variably in prostate tumor tissues. This expression, at the time of diagnosis, correlates significantly with their biological behaviour and clinical outcome.

P-141. EFECTO PROZONA EN LA CUANTIFICACIÓN DE IGE SÉRICA EN UN CASO DE MIELOMA MÚLTIPLE IGE

F. Morandeira Rego, J. Bonete Julià, S. Berenguer Corral y M. Mestre Playà

Servei d'Immunologia, Hospital Universitari de Bellvitge, L'Hospitalet de Llobregat, Barcelona.

Objetivos: El mieloma múltiple (MM) IgE es una paraproteinemia extremadamente infrecuente. Hay descritos menos de 60 casos en el mundo. Presentamos un caso de MM IgE en una mujer de 75 años que acude a nuestro hospital con dolor óseo y astenia.

Material y métodos: Proteinograma de suero mediante electroforesis capilar. Inmunofijación de suero y de orina. Cuantificación de IgE sérica mediante Immulite2000. Cuantificación de IgG, IgA, IgM y cadenas ligeras libres (CLL) en suero mediante nefelometría.

Resultados: El proteinograma de suero mostró un componente monoclonal de movilidad gamma de 5,1 g/L. La inmunofijación de suero mostró una banda monoclonal IgE kappa y el estudio de proteinuria de Bence-Jones mostró excreción de cadenas kappa monoclonales. Los resultados de IgG, IgA y IgM fueron normales, y la cuantificación de CLL dio un índice kappa/lambda de 53,57 (normal: 0,26-1,65). La cuantificación de IgE sérica dio inicialmente un resultado de 195 kU/L, valor que no se correspon-

día con la imagen de la inmunofijación. Posteriormente cuantificamos la IgE en diferentes diluciones seriadas. La concentración real de la muestra fue de 2.225.600 kU/L (normal < 85 kU/L). Fue necesaria una dilución 1/1600 para evitar el efecto prozona.

Conclusiones: Estamos ante el primer caso de MM IgE diagnosticado en Cataluña. Ante la sospecha de esta patología, es importante considerar el efecto prozona al cuantificar la IgE sérica para evitar infraestimar el resultado. Asimismo el índice de CLL kappa/lambda en suero puede ser un marcador útil para el diagnóstico del MM IgE.

P-142. RECONOCIMIENTO Y ELIMINACIÓN DE CÉLULAS DE MELANOMA POR CÉLULAS NK

S. Morgado García, J.G. Casado, B. Sánchez-Correa, E. Durán, J.J. Gordillo, I. Gayoso, R. Solana y R. Tarazona

Unidad de Inmunología, Departamento de Fisiología; Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Universidad de Extremadura, Cáceres. Unidad de Inmunología, IMIBIC-Universidad de Córdoba-Hospital Reina Sofía, Córdoba.

Objetivos: La activación de las células NK está regulada por un balance entre señales transmitidas por receptores de superficie activadores e inhibidores, estos últimos específicos para moléculas de MHC clase I. El objetivo de este trabajo fue analizar la capacidad de diferentes líneas celulares de melanoma de inducir la activación de las células NK.

Material y métodos: Hemos realizado, mediante citometría de flujo, ensayos de desgranulación analizando la expresión de CD107a/b en las células NK tras la estimulación con células de melanoma. Con objeto de ver la participación de los distintos receptores, se realizaron ensayos bloqueando diferentes receptores activadores en células NK y moléculas de HLA-I en células de melanoma. Como mecanismo de inmunoescape se ha analizado la presencia de MICAs y ULBP2 soluble (MICAs y ULBP2s) en el sobrenadante de cultivo de las líneas celulares de melanoma mediante ensayo ELISA.

Resultados: Un 76% de las líneas de melanoma en estudio indujeron la desgranulación de las células NK, el bloqueo de receptores mostró una alta variabilidad en los receptores implicados en la activación de las NK frente a diferentes líneas de melanoma, aunque NKG2D parece estar implicado en el reconocimiento de la mayoría de líneas de melanoma en estudio. Al bloquear HLA-I en células de melanoma, en la mayoría de las diferentes líneas se observó un incremento en la activación de las células NK. El análisis de la presencia de ligandos solubles reveló que aproximadamente el 50% de las líneas analizadas liberan estas moléculas, además las concentraciones halladas para ULBP2s son muy superiores a las concentraciones de MICAs.

Conclusiones: La activación simultánea de varios receptores activadores contribuye al reconocimiento y la lisis eficiente de las células de melanoma.

P-143. ESTUDIO DE COHORTE POBLACIONAL DE GAMMAPATÍAS MONOCLONALES DE SIGNIFICADO INCIERTO (GMSI) EN SEGOVIA CAPITAL

H. Muñoz Alcón, M.J. Jiménez Cobaleda, J.M. Hernández Martín, J.A. Queizan, M. Latorre, R. Caro, V. Villalta, B. de la Hoz, B. Pérez Moneo y L. González

Hospital General de Segovia, Centros de Salud Segovia I, Segovia II, Segovia III

Objetivos: Evaluar la prevalencia de GMSI en una población urbana (Segovia capital). Definir una cohorte y evaluar el riesgo de evolución a mieloma múltiple (MM).

Material y métodos: Población urbana > 50 años perteneciente al sistema nacional de salud (n = 19.675). Método de detección: electroforesis capilar sérica, si sospecha de pico monoclonal confirmación por inmunostracción y/o inmunofijación

Resultados y conclusiones: Se han analizado 6681 muestras con una media de edad de 66 años (50-98). Se han detectado 122 MGUS, de los cuales un 62% es IgG, un 22,3% es IgA, un 12,4% es IgM, un 2,5% es biclonal y un 2,8% de cadenas ligeras libres. La incidencia de MGUS en nuestra población es menor que la descrita por otros autores.

P-144. PROCEDIMIENTO DE CRIBADO PARA LA DETECCIÓN DE PARAPROTEÍNAS EN ORINA. ASPECTOS TÉCNICOS Y ESTANDARIZACIÓN

J.J. Rodríguez Molina, J. Navarro Caspistegui y E. Fernández-Cruz

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

Introducción: La detección de componentes monoclonales (CM) en orina de pacientes con sospecha de gammopathía monoclonal presenta dificultades por los bajos niveles de CM en orina, la presencia de otras proteínas urinarias y la variabilidad metodológica. Se describe la estandarización de un procedimiento de detección de CM en orina por inmunofijación en geles de agarosa (IFE) con antisero combinado: ac pentavalente (IgG, IgA, IgM, kappa y lambda) + albúmina y un control de fijador total de proteínas.

Material y métodos: 1. Se compararon dos métodos de cribado de CM en 76 muestras de orina: Método-A.- IFE con Ac pentavalente + albúmina/fijador de proteínas y Método-B.- "método A" + cuantificación de cadenas ligeras libres. 2. Confirmación por IFE convencional de los casos positivos en el cribado A. 3. Evaluación de casos con cribado A negativo: antecedentes, presencia de paraproteína en suero y cuantificación de cadenas ligeras libres en orina (CLL).

Resultados: 1. 26/76 muestras con cribado método A positivo, confirmados, por IFE: paraproteínas de cadenas ligeras y/o de inmunoglobulinas completas 2. 50/76 muestras con cribado método A negativo. Todas con niveles normales de CLL en orina y sin antecedentes de paraproteína en orina. Las muestras de suero correspondientes presentaban paraproteína en 17/50 casos.

Conclusiones: 1. Sensibilidad y especificidad del método de cribado comparable a la prueba de confirmación por inmunofijación. 2. Permite detectar situaciones de exceso de antígeno. 3. Permite prescindir de la cuantificación de cadenas libres libres en orina. 4. Método sencillo, reproducible y con óptima relación coste/beneficio.

P-145. EL GEN SUPRESOR DE TUMORES FHIT REGULA POSITIVAMENTE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS MHC-I

I. Romero García, C. Garrido, M. Martínez, I. Linares, I. Algarra, A. Rodríguez, F. Garrido y A. García Lora

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

En nuestro laboratorio, generamos un modelo tumoral murino compuesto por diferentes líneas metastásicas derivadas desde un clon celular obtenido de un fibrosarcoma inducido por metilcolantreno. Metástasis obtenidas en ratones inmunocompetentes con pérdida de expresión en superficie de moléculas MHC-I y metástasis obtenidas desde ratones nude con expresión en superficie de las tres moléculas MHC-I. La pérdida de expresión MHC-I se debe a una baja regulación coordinada de varios genes de la maquinaria de procesamiento y presentación antigenica

(APM). Para analizar qué genes pueden estar implicados en esta baja expresión de la APM, construimos una librería de sustracción de cDNAs comparando líneas tumorales que presentaban los dos fenotipos MHC-I. También se realizaron microarrays de expresión génica. Los genes expresados diferencialmente fueron analizados por RT-PCR a tiempo real. Los ensayos de librería de sustracción de cDNAs y microarrays mostraron que cuatro genes presentaban expresión diferencial entre estas metástasis: Ap2α, Fhit, Glis-1 y Myc. Los resultados de Real-Time-RT-PCR mostraron que solo dos genes, Ap2α y Fhit, eran expresados en las metástasis MHC-I positivas y no expresados en las metástasis MHC-I negativas. El bloqueo de la expresión de estos dos genes mediante siRNA mostró que Fhit está implicado en la expresión de moléculas MHC-I, mientras que no se encontró implicación del gen Ap2α. La pérdida de expresión de Fhit en estas células tumorales está implicada en la pérdida de expresión de moléculas MHC-I, regulando Fhit la expresión coordinada de la APM

P-146. THE METASTASIS DERIVED FROM A FIBROSARCOMA TUMOR CLONE ARE MAINTAINED IN DORMANCY STATE BY T LYMPHOCYTES

I. Romero García, I. Linares, A. Rodríguez, C. Garrido, M. Martínez, I. Algarra, F. Garrido, A. Coallado y A. García Lora

Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

We have developed a murine tumour system composed by several clones of a fibrosarcoma induced by methylcholanthrene and metastases derived from these fibrosarcoma clones in BALB/c mice. Several of these clones generated spontaneous metastases in immunocompetent mice, but one of them, GR9-B11 clone, did not generate spontaneous metastases in neither of the assays. Spontaneous metastasis assays were performed in nude and immunocompetent mice depleted of T lymphocytes six months later. Depletion of T lymphocytes was performed by weekly injection of anti-CD4+ and anti-CD8+ specific monoclonal antibodies. At the end of the assays the mice were killed and complete necropsy was performed. Metastases in the lungs were counted after Bouin's fixation. GR9-B11 does not present surface expression of H-2 D and L molecules, expressing only slightly H-2 K molecule. After treatment with IFN, H-2 K and D molecules were induced and slightly H-2 L molecule. In immunocompetent mice this clone did not generate spontaneous metastases, and the mice remained free of disease after one year. In contrast, when nude mice were used in spontaneous metastasis assays, this clone generated lung metastases. Surprisingly, metastases appeared in the lungs when immunocompetent mice were depleted of T lymphocytes, beginning with the depletion at day 180 after of surgical excision of primary tumour. These results indicate that metastases remained in latency state in immunocompetent mice, being totally controlled by T lymphocytes. Now, we are depleting different subpopulations of T lymphocytes to determine specifically the immune cells implied in the control of metastases.

P-147. CARACTERIZACIÓN DE LOS EFECTOS DE INHIBIDORES DE METILACIÓN DEL ADN ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS EN LEUCEMIAS DE CÉLULAS T

M.C. Ruiz Ruiz, J.M. Rodríguez Vargas, J. Durán Morales, M.A. Martín Marcos y M.J. Ruiz Magaña

Centro de Investigación Biomédica, Universidad de Granada.

Objetivos: Compuestos farmacológicos como los análogos de nucleósidos decitabine y zebularine, que inhiben a las enzimas

responsables de la metilación del ADN (DNMTs), han adquirido un gran interés en terapia antitumoral. El objetivo de este trabajo es conocer el mecanismo de acción citotóxica de decitabine y zebularine en células T leucémicas.

Material y métodos: Líneas de células T leucémicas humanas Jurkat, CEM-6 y MOLT-4; todas ellas cultivadas en medio RPMI completo a 37 °C y 5% de CO₂. La determinación de células apoptóticas, la caída del potencial de membrana mitocondrial, la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) y la activación de la proteína pro-apoptótica Bak se ensayaron mediante citometría de flujo. La expresión de proteínas se analizó mediante Western-blot y el daño al ADN mediante ensayo cometa.

Resultados: Decitabine y zebularine inducen diferentes eventos relacionados con la ruta intrínseca de apoptosis en células T leucémicas, como activación de Bak, caída del potencial de membrana mitocondrial y producción de ROS, siendo este último necesario para la inducción de apoptosis. Sin embargo, células Jurkat que no tienen caspasa-9 o que sobreexpresan las proteínas antiapoptóticas Bcl-2 o Bcl-xL no activan dichas señales mitocondriales y presentan resistencia a la inducción de apoptosis por decitabine y zebularine. Además, ambos agentes desmetilantes inducen roturas de doble cadena en el ADN y promueven la activación de proteínas implicadas en la reparación del daño.

Conclusiones: Decitabine y zebularine activan la ruta mitocondrial de apoptosis en células T leucémicas. El mecanismo de acción antitumoral de estos agentes parece estar relacionado con su capacidad para inducir daño al ADN.

P-148. ESTUDIO DE LA FRECUENCIA Y MECANISMOS QUE DETERMINAN LA PÉRDIDA DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I EN CÁNCER DE MAMA

P. Sáenz-López Larrocha¹, M. Bernal¹, A.I. Rodríguez¹, I. Maleno¹, N. Aptsiauri¹, A. Concha² y F. Garrido¹

¹Servicio de Análisis Clínicos; ²Servicio de Anatomía Patológica, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

Objetivos: Nos proponemos analizar la frecuencia con que se pierde la expresión de moléculas HLA de clase I en tumores de mama y el mecanismo molecular que los determina, y en particular si esos mecanismos son estructurales e irreversibles, como LOH o mutaciones, que podrían limitar el uso de vacunas en el tratamiento de estos pacientes.

Material y métodos: Hemos analizado 100 tumores de mama combinando diferentes técnicas, inmunohistología, microdiseción, análisis de microsatélites de cromosomas 6 y 15, secuenciación de B2m (B2-microglobulina) y RT-PCR para determinar la expresión de moléculas HLA de clase I.

Resultados: La alteración más frecuente que encontramos es una pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I, que aparece en un 55% de los casos. Solo un 16% de los casos no presenta ninguna alteración en la expresión. En el análisis de microsatélites en la región HLA, encontramos LOH en un 21% de los casos. En el cromosoma 15, donde se localiza el gen de la B2m, la frecuencia de LOH alcanza al 55% de los casos. No se han encontrado mutaciones en el gen de la B2m.

Conclusiones: En el análisis de los mecanismos moleculares de las alteraciones HLA de clase I en tumores de mama, hemos encontrado una baja frecuencia de alteraciones estructurales e irreversibles. Solo la alta frecuencia de LOH en B2m podría tener un impacto negativo en la eficacia de la inmunoterapia en estos pacientes.

P-149. TOLL-LIKE RECEPTOR POLYMORPHISMS AND PROSTATE CANCER

P. Sáenz-López Larrocha¹, A. Suárez², M. Guirado¹, R. Carretero¹, J.M. Cázaro² y F. Ruiz-Cabello¹

¹Servicio de Análisis Clínicos; ²Servicio de Urología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada. Departamento de Bioquímica, Biología Molecular III e Inmunología, Universidad de Granada.

Toll-like receptors (TLRs) play a role in the innate immune response. Polymorphisms in TLR genes could influence disease susceptibility and progression by altering the response to infection and the inflammatory effects. Some association studies between the risk of prostate cancer and polymorphism in the TLR genes have been reported for Sweden populations. In the present study, we aimed to determine the association between TLR polymorphisms with the risk and clinical parameters of prostate cancer in Spanish population. A case-control study design was used to test the association between prostate cancer risk and clinical parameters and the polymorphisms TLR3T/C (rs3775291), A/T (rs5743305), TLR7G/T (rs2302267), A/T (rs179008), TLR8A/G (rs5744082), A/G (3764880), TLR9C/T (rs 352140), C/T (rs5743846), TLR10T/G (rs11096955), T/C (rs4129009) in 405 patients diagnosed with prostate cancer and in 271 healthy controls from the same area. Diagnosis of prostate cancer was significantly associated with TLR3 (rs377591) ($p = 0,028$), TLR3 (rs5743305) ($p = 0,013$), TLR9 (rs352140) ($p = 0,037$), TLR10 (rs4129009) ($p = 0,041$), TLR10 (rs 11096955) ($p = 0,034$). There was a significant correlation between tumor stage and polymorphism TLR3 (rs377591) ($p = 0,028$), between initial PSA level and TLR3 (rs377591) ($p = 0,044$), TLR9 (rs 352140) ($p = 0,014$), as well as between Gleason grade and TLR3 (rs377591) ($p = 0,028$) polymorphism. By contrast, TLR7 and TLR8 polymorphisms were not significantly associated with the risk of prostate cancer in this cohort. We provide genetic evidence for association between polymorphisms in TLRs modulating susceptibility to prostate cancer. Our study suggests that polymorphism of the TLRs (TLR3, TLR9 and TLR10) influences prostate cancer risk and progression.

P-150. PAPEL ANTI-ADHESIVO Y ANTI-PROLIFERATIVO DEL DOMINIO COILED-COIL DEL BRAZO LARGO DE LA LAMININA

P. Santos Valle, I. Guijarro Muñoz, A. Cuesta, V. Alonso Camino, D. Sánchez Martín, F. Blanco y L. Álvarez-Vallina

Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Madrid. Unidad de Biología Estructural, CIC bioGUNE, Derio.

Objetivos: 1. Generación de una molécula recombinante de la laminina truncada, constituida únicamente por el brazo largo (dominio coiled-coil). 2. Producción, purificación y caracterización estructural y funcional.

Material y métodos: Clonaje de los dominios coiled-coil de la cadena α , β y γ de la laminina 111 murina (mCC $\alpha\beta\gamma$) en los vectores de expresión pCDNA3.1-Neo/Hygro/Zeo respectivamente. Generación de un triple transfectante en células HEK-293, purificación a partir del medio condicionado caracterización estructural (ultracentrifugación analítica y SEC-MALLS) y funcional (en ensayos de adhesión, migración, morfogénesis in vitro y proliferación).

Resultados: La forma intacta tiene una masa molecular de 346 kDa aproximadamente, lo que indica que, en condiciones fisiológicas, las subunidades individuales se asocian para producir una estructura heterotrimérica. El dominio mCC $\alpha\beta\gamma$ purificado

interacciona con receptores de superficie celular y a diferencia de la molécula de laminina intacta o de fragmentos proteolíticos derivados de sus segmentos globulares (E3), ejerce un efecto anti-adhesivo y anti-proliferativo. La investigación de los mecanismos involucrados en este efecto anti-adhesivo reveló una inhibición de la reorganización del citoesqueleto celular dependiente de actina.

Conclusiones: Los segmentos coiled-coil de las cadenas α , β y γ individuales contienen toda la información necesaria para el ensamblaje de un dominio heterotrimérico. En ausencia de segmentos globulares el dominio coiled-coil del brazo largo de la laminina, ejerce una función anti-adhesiva y anti-proliferativa.

INMUNOTERAPIA

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

P-151. GENERACIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS MEDIANTE LA SELECCIÓN DE REPERTORIOS. UNA NUEVA PLATAFORMA BASADA EN CÉLULAS T

V. Alonso Camino, D. Sánchez Martín, L. Sanz Alcober y L. Álvarez Vallina

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

Introducción: El uso de células inmunes humanas como nueva plataforma para la presentación y selección de repertorios de anticuerpos puede presentar ventajas frente a los métodos de selección convencionales.

Objetivos: 1. Construcción de un repertorio de anticuerpos recombinantes humanos en formato monocadena Fv (scFv), en un vector lentiviral que codifica un receptor de activación químerico (CAR, del inglés chimeric activation receptor) basado en la cadena ζ del complejo TCR-CD3 (scFv-CAR ζ). 2. Selección in vitro de anticuerpos tumor-específicos a partir del repertorio de scFvs humanos mediante la tecnología desarrollada

Material y métodos: El repertorio de scFv humanos se obtuvo a partir de una genoteca de fagos y se clonó en un vector lentiviral que contiene la secuencia de un CAR constituido por un scFv derivado del anticuerpo anti-CEA MFE-23 como dominio de unión, y la cadena ζ del complejo TCR-CD3 como dominio de activación. Con esta genoteca lentiviral se infectaron células T humanas Jurkat (genoteca scFv-CAR ζ 1)

Resultados: Se realizaron tres rondas de selección/activación (expresión de CD69) de la genoteca scFv-CAR ζ 1 frente a células tumorales humanas HeLa y se demostró un enriquecimiento en clones tumor específicos mediante citometría de flujo y ELISA.

Conclusiones: La utilización de células T humanas como plataforma para la selección de repertorios de anticuerpos presenta ventajas frente a otras tecnologías, debido a su mayor capacidad de penetración tisular y a la accesibilidad a zonas antigénicas y epítopos ocultos para los sistemas de selección convencionales.

P-152. ESTABILIDAD INMUNOFENOTÍPICA Y DEL POTENCIAL INMUNOMODULADOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES AISLADAS DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO

N. Fernández Arcás, J.M. Miranda Sayago, C. Benito López, J. Carrera, A. Reyes Engel y A. Alonso Ortiz

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Málaga. Servicio de Inmunología; Unidad de Genética; Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga.

Objetivos: El líquido amniótico humano se emplea en el diagnóstico prenatal y recientemente se ha mostrado como una fuente para el aislamiento de células mesenquimales estromales (hAMSCs), que poseen un enorme potencial de expansión y diferenciación y presentan capacidad inmunomoduladora, sin embargo desconocemos cómo de largas son y qué cambios ocurren en su fenotipo y en su capacidad inmunomoduladora evaluada a través del marcador CD90. El objetivo de este trabajo ha sido estudiar de forma sistemática el fenotipo de esta población celular durante todo su ciclo vital.

Material y métodos: Cultivos de hAMSCs en los pasos P1, P3, P5 y posteriormente cada 5 pasos fueron analizados para 27 mediante citometría de flujo e inmunohistoquímica.

Resultados: Todos los cultivos estudiados mantuvieron sin cambios significativos los porcentajes de expresión de los marcadores de superficie CD29, CD44, CD73, CD90, CD95, CD105 y HLA-ABC, así como de los marcadores intracelulares.

Conclusiones: Las hAMSCs tipo F muestran un fenotipo de superficie e intracelular estable, manteniendo durante todo su ciclo vital su naturaleza mesenquimal. Dado que la expresión de CD90 se mantuvo estable durante todo el ciclo de vida de estas células podemos suponer que sus capacidades inmunomoduladoras no se vieron alteradas.

P-153. EFECTO DE LA CRIOPRESERVACIÓN SOBRE EL INMUNOFENOTIPO Y EL POTENCIAL INMUNOMODULADOR DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES ESTROMALES AISLADAS DEL LÍQUIDO AMNIÓTICO HUMANO

N. Fernández Arcás, J.M. Miranda Sayago, C. Benito López, J.R. Herrero Cantarero, A. Reyes Engel y A. Alonso Ortiz

Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Málaga. Servicio de Inmunología; Unidad de Genética; Servicio de Ginecología y Obstetricia, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga.

Objetivos: Las células estromales mesenquimales derivadas del líquido amniótico humano (hAMSCs) han demostrado tener un gran potencial para ser empleadas en inmunoterapia, modulación del sistema inmunitario y medicina regenerativa, aunque se desconoce el impacto de la criopreservación sobre su naturaleza. En este trabajo evaluamos el impacto, sobre el inmunofenotipo de estas células, de un protocolo de criopreservación basado en: i) disminución progresiva de la temperatura, ii) dimetil sulfóxido (DMSO) como crioprotector y iii) índices de descongelación rápidos.

Material y métodos: Empleando muestras idénticas, sometidas y no sometidas a criopreservación, se ha analizado un panel de 25 marcadores de superficie mediante citometría de flujo, junto a dos marcadores intracelulares mediante inmunohistoquímica.

Resultados: El inmunofenotipo de superficie se mantuvo estable a lo largo de todo el ciclo vital de las hAMSCs, manteniendo en todo momento la identidad mesenquimal (CD73+ CD90+

CD105+) y su capacidad inmunomoduladora, evaluada por la expresión de CD90.

Conclusiones: Los antígenos implicados en la adherencia (CD29 y CD44), en la caracterización mesenquimal (CD73, CD90 y CD105), en el potencial inmunomodulador (CD90) y los marcadores embrionarios intracelulares NANOG y SOX2 mostraron unos porcentajes de expresión sin cambios durante todo su re-cultivo. Esta ausencia de diferencias señala que el protocolo de criopreservación ensayado por nuestro grupo no parece alterar el inmunofenotipo de las hAMSCs.

P-154. ANCLAJE DE IFN α A LA APO A-I: UNA ESTRATEGIA PARA DISMINUIR LOS EFECTOS TÓXICOS ASOCIADOS AL IFN α Y AUMENTAR SU PODER INMUNOESTIMULANTE

J. Fioravanti, I. González de la Tajada, J. Medina Echeverz, E. Larrea Leoz, N. Ardaiz Iriarte, G. González Aseguinolaza, J. Prieto Valtueña y P. Berraondo López

División de Terapia Génica y Hepatología, Facultad de Medicina, Centro para la Investigación Médica Aplicada (CIMA), Universidad de Navarra, Pamplona.

Objetivos: El interferón alfa (IFN α) constituye una terapia eficiente en enfermedades virales y neoplásicas, pero sus efectos secundarios y corta vida media limitan el uso clínico.

Material y métodos: Hemos diseñado una proteína químérica que une IFN α a la apolipoproteína A-I. En ratones cuyos hígados han sido transducidos con plásmidos codificantes para IFN α (pIFN), IA (pIA) o albúmina-IFN α (pALF), observamos que la vida media de IA es mayor que la del IFN α , y menor que la de albúmina-IFN α .

Resultados: Tras su expresión hepática, todo el IA circulante en plasma se encuentra contenido en lipoproteínas de alta densidad (HDLs). Consistente con el papel central que juega el hígado en el metabolismo de las HDLs, el tratamiento con pIA indujo mayor activación de los genes inducibles por interferón (ISGs) a nivel hepático que el tratamiento con pIFN o pALF. Además, el tratamiento con pIA no produce aparición de trombocitopenia ni leucopenia, e in vitro las HDLs que contienen IA no causan muerte linfocitaria dependiente de activación. En línea con estos datos, el tratamiento con IA activa la respuesta inmune de manera más intensa que pIFN o pALF. Esta activación desaparece en ratones deficientes del receptor de HDLs, el scavenger receptor class B tipo I (SR-BI), sugiriendo una interacción entre SR-BI y el receptor de IFN α esencial para su mayor inducción de respuesta celular citotóxica.

Conclusiones: El anclaje de IFN α a Apo A-I es un medio eficiente de promover dianización hepática al IFN, potenciar su actividad inmunoestimuladora, y reducir la toxicidad hematológica.

P-155. EFFECT OF THE YEAST CELL WALL-DERIVED MANNAN ON COLONIC PRODUCTION OF CYTOKINES IN A MODEL OF EXPERIMENTAL DSS-INDUCED COLITIS IN MICE

D. Gozalbo Flor, A. Yáñez Boyer, M.P. Falomir Llorens, M.L. Gil Herrero y C. Murciano Camps

Departamento de Microbiología y Ecología, Universitat de València, Burjassot, Valencia.

Objectives: Fungal ligands, including the cell wall-associated mannan, are recognized by Pathogen Recognizing Receptors (PRRs, such as TLRs) that play a significant role in homeostasis and protection of the gastrointestinal (GI) mucosa. Our aim was

to determine the usefulness of mannan as a treatment for the inflammatory response of the GI tract in a murine model of experimentally induced colitis.

Material and methods: C57BL/6 mice were given 3% dextran sulphate sodium salt (DSS) ad libitum in drinking water to induce experimental acute and sublethal colitis. Protection assays were performed by oral administration of soluble yeast mannan starting either after or during the DSS treatment. The in vitro production of cytokines (IL-6, IL-10 and TNF- α) was measured in colon segments of selected mice, either in the presence or absence of mannan.

Results: In mice with experimental acute or sublethal colitis, no statistically significant differences were found between mannan treated mice and controls, both for mortality and loss of weight. The in vitro production of cytokines by segments of colon, from both healthy mice and mice with induced colitis, was not significantly altered by the addition of mannan. In addition, oral administration of mannan increased the in vitro secretion of cytokines by colon segments from mice with acute colitis.

Conclusiones: The results indicate that yeast mannan does not show any protective effect in our model of experimentally DSS-induced colitis in immunocompetent mice.

Supported by Project PI080556 (Instituto de Salud Carlos III, Ministerio de Ciencia e Innovación, Spain).

P-156. EFECTO INMUNOMODULADOR DE DISTINTOS CLONES DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES SOBRE PBMC HUMANAS

P. Martínez Peinado, M.I. Arribas García de León, E. Roche Collado, J.A. Reig Macià, M. García Irles y J.M. Semper Ortells

Departamento de Biotecnología, División de Inmunología. Universidad de Alicante. Instituto de Bioingeniería, Universidad Miguel Hernández, Elche, Alicante.

Introducción: Estudios previos muestran que las células madre mesenquimales (MSC) son capaces de modular la respuesta inmune de diferentes poblaciones leucocitarias, mediante mecanismos aun por dilucidar. En el presente estudio analizamos el efecto inmunomodulador de cinco clones diferentes de MSC obtenidas de lipoaspirados humanos.

Objetivos: 1. Identificar el fenotipo de membrana y el perfil de producción de citocinas Th1/Th2 de cada clon. 2. Valorar el efecto modulador de los clones sobre la proliferación de PBMCn (co-cultivos).

Material y métodos: Citometría de flujo (CF: EPICS XL, Coulter; Facscalibur, BD) e inmunofluorescencia directa para el fenotipo de membrana. Las citocinas mediante CF y técnicas del CBA (BD) y Flow-cytomix (Labclinics). La proliferación mediante CF y técnica del CFSA (Sigma).

Resultados: Los clones muestran diferentes intensidades de autofluorescencia (espectro de emisión de FITC) y de expresión de CD90 y CD105, siendo negativos para CD34 y CD45. Todos muestran una secreción espontánea y post-estimulación (LPS o PMA+ionomicina), de cantidades altas/muy altas de IL6 e IL-8 y ligeras/moderadas de IL-1 β y TNF- α . Dos de los clones muestran además secreción ligera de IL-12 e INF- γ , y dos secreción ligera de IL-10 y/o IL-4. Los resultados preliminares de los cocultivos muestran una ligera disminución de la proliferación linfocitaria con alguno de los clones estimulados con LPS y/o LPS+PHA.

Conclusiones: El perfil Th1/Th2 de cada clon puede influir en su capacidad para modular distintas poblaciones leucocitarias en mayor o menor grado, y ello puede tener un enorme interés desde el punto de vista clínico.

P-157. ESTUDIO COMPARATIVO DEL TRATAMIENTO CON GAMMAGLOBULINA EN DIFERENTES ENTIDADES CLÍNICAS Y PREPARADOS COMERCIALES

S. Sánchez Ramón, D. Butnaru, D. Oliver Miñarro, J. Gil Herrera, D. Alecsandru, C. Esteban Caballero, J. Navarro Caspistegui y E. Fernández-Cruz Pérez

Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.

Introducción: En la actualidad disponemos de diversos preparados de gammaglobulina de administración intravenosa (GGIV) o subcutánea (GGSC), que permiten decidir el preparado más conveniente para cada paciente.

Métodos: Presentamos 106 pacientes evaluados durante 6 años (inmunodeficiencias primarias, IDP, 47 pacientes, inmunodeficiencias secundarias, 27 y fallo gestacional recurrente de causa aloinmune, 32).

Resultados: 65 pacientes (61%) comenzaron tratamiento con GGIV 5% (Flebogamma®); 36 (33,9%) con GGIV 10% (Privigen®) y 5 (4,7%) con GGSC (Vivaglobin®). La eficacia según variables clínicas fue similar para todos los preparados. Siete pacientes con IDP y trombocitopenia autoinmune no presentaron brotes desde el inicio del tratamiento con GGIV. Hasta un 42% de los pacientes refirieron efectos adversos leves con GGIV: cefalea (24%); 11% astenia; 10% sensación distérmica, por igual en ambos preparados de GGIV; menos frecuentes con la GGSC (1; 20%). Efectos adversos moderados en un 4% de los pacientes con Flebogamma® (cefalea intensa, sensación de opresión precordial). Dos pacientes (1,8%) presentaron reacciones severas (1 shock anafiláctico con Flebogamma®, 1 cuadro presincopal con Privigen®). De 65 pacientes en Flebogamma®, 13 se cambiaron a Privigen® debido al menor volumen y tiempo de infusión y a cefalea intensa (2) y progresión de insuficiencia renal (1). Un paciente en tratamiento con Privigen® se cambió a Flebogamma® debido a mala tolerancia. El paciente que presentó shock anafiláctico se cambió a Vivaglobin, con excelente tolerabilidad.

Conclusiones: La diversidad de preparados de GG nos permite personalizar el manejo considerando la tolerancia, la comorbilidad, la pluripatología y la disponibilidad de tiempo de cada paciente.

P-158. SEGUIMIENTO INMUNOLÓGICO DE POBLACIONES CELULARES EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES TRATADOS CON FOTOAFÉRESIS EXTRACORPÓREA

A. Soriano Martínez¹, A. Rus Merchán¹, A. Marín Sánchez¹, I. Lozano Ramos¹, A. Teniente Serra¹, M. Blanco García¹, A. Bosch Llobet², D. Castellà Cahíz³, R. Pujol Borrell¹, E. Martínez Cáceres¹ y E. Ruiz Ortiz de Arrizabaleta¹

¹BST, Laboratorio Inmunología (LIRAD), Hospital Germans Trias i Pujol, Badalona. ²BST, Hospital de Sant Pau, Barcelona. ³BST, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

Introducción: La fotoaféresis extracorpórea (ECP) es una terapia inmunomoduladora basada en el efecto pro-apoptótico del 8-metoxi-psolareno activado con UVA sobre PBMC obtenidas mediante aféresis y reinfundidas posteriormente. Se utiliza como terapia de segunda-tercera elección en enfermedad inyerto contra huésped (EICH) crónica/aguda y en enfermedades autoinunitarias refractarias a tratamientos convencionales. Sigue una pauta definida por ciclos, cuya frecuencia dependerá de la patología y respuesta terapéutica. El incremento del % LTreg y niveles bajos de LB inmaduros, se han relacionado con una buena respuesta al tratamiento.

Objetivos: Definir marcadores en sangre periférica que nos permitan monitorizar la respuesta terapéutica a la ECP.

Material y métodos: Pacientes con EICH crónica/aguda (n = 6) y enfermedad de Crohn (n = 2). Muestras analizadas pre-tratamiento y a diferentes ciclos (0/5/6/7/8/9/12/15/18/20/22/26/28/29). Estudio subpoblaciones celulares: LT (CD4+, CD8+, CD3+CD4-CD8-, CD3+CD4+CD8+, CD25+, CD69+, HLA-DR+), LB, NK, LTreg (CD4+CD25highCD127low/-FOXP3+), LB inmaduros (CD19+CD21+), pDC (CD4+HLA-DR+BDCA2+), cDC (CD4+HLA-DR+BDCA1+) por citometría de flujo, en sangre total.

Resultados: Cuatro pacientes con EICH presentaron linfopenia marcada, lo cual impidió la valoración de DCs y LB inmaduros. No se encontraron diferencias en LT, LB y NK a lo largo del tratamiento. Respecto a LTreg, 4 pacientes con buena respuesta clínica presentaron valores basales superiores y/o incrementaron en % con el tratamiento; un paciente con mala respuesta presentó disminución marcada de este parámetro.

Conclusiones: De confirmarse en una serie más amplia, la determinación seriada del % LTreg en pacientes tratados con ECP podría ser un parámetro útil de respuesta terapéutica aplicable al seguimiento de esta terapia.

LINFOCITOS T

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

P-159. CAMBIOS MORFOLÓGICOS INDUCIDOS POR LIGANDOS DEL COESTIMULADOR ICOS (INDUCIBLE COSTIMULATOR, CD278) EN LINFOCITOS T: VÍAS MOLECULARES IMPLICADAS

Y. Acosta Ampudia, G. Ojeda Villaroya, P. Portolés Pérez y J.M. Rojo Hernández

Departamento de Medicina Celular y Molecular, Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.

Objetivos: Los ligandos de miembros de la familia de CD28 como CD28, CTLA-4, o ICOS inducen alargamiento celular y polimerización de actina en linfocitos T dependiente de la asociación de PI3-cinasas de clase IA a un motivo YxxM del dominio citoplásico. ICOS se expresa en células T activadas y sus ligandos en epitelio activado, con un papel potencial en la adhesión/migración de linfocitos. Nos proponemos analizar algunas vías y moléculas potencialmente implicadas en este fenómeno.

Material y métodos: Incubamos células de la línea de linfocitos T SR.D10 sobre cubreobjetos recubiertos con ligandos de ICOS (anticuerpos, proteínas de fusión ICOSL-Ig). Así se induce elongación celular y cambios en el citoesqueleto de actina, como aparición de microespículas o filopodios.

Resultados: Empleando inhibidores específicos o siRNA observamos que el alargamiento de linfocitos T CD4+ICOS+ y los cambios en el citoesqueleto de actina inducidos por ICOS son dependientes de la actividad de la isoforma catalítica p110α de PI3-cinasa, pero no de p110β, p110γ o p110δ. Asimismo se inhibe por transfección de dominantes negativos de Vav, Rac1 y cdc42, pero no de RhoA. También se bloquean con inhibidores de la tirosina cinasa Lck o de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK) pero no por inhibidores de Akt (PKB).

Conclusions: La PI3-cinasa p110 α es esencial en los cambios morfológicos inducidos por ICOS, que dependen de la actividad de Vav, Rac1 y cdc42, pero no de PKB o Rho. Se comparan estos datos con los de otras moléculas de la familia de CD28.

P-160. ANALYSIS OF IN VITRO EFFECTS OF THE CCR5 INHIBITOR MARAVIROC ON HUMAN T LYMPHOCYTES FUNCTIONALITY

H. Arberas Eguílez, A. Crespo Guardo, M.E. Bargalló Mares, M.J. Maleno Martínez, M. Calvo, J.L. Blanco Arévalo, F. García Alcaide, J.M. Gatell Artigas y M. Plana Prades

Hospital Clínic de Barcelona. Fundació Clínic; IDIBAPS, Barcelona.

Introduction: Treatment with Maraviroc (MVC) induces an immunological benefit independent of HIV load suppression. Few data from in vitro effects on T-cell homeostasis have been described. The objective of this work was to analyze the in vitro effects of MVC on some human T-lymphocytes functions.

Methods: PBMC from both HIV+ (n = 21) and HIV- (n = 24) were used in the presence of different concentrations of MVC. Cell viability was determined by trypan blue exclusion and a viability kit. CCR5 T-cell expression was measured by Flow Cytometry. T-cell proliferation in response to polyclonal-inducing stimuli was determined by LPR and CFSE-staining. Spontaneous and chemokine-induced chemotaxis was measured by transwell migration assays.

Results: Cell viability was unaffected with MVC doses ranging from 10 nM to 100 μ M, but further analysis with a viability kit demonstrated that high doses of MVC raises mortality in activated T-cells. MVC increases CCR5 surface expression in activated T-cells. At 100 μ M MVC inhibits T-cell proliferation around 20-60% depending on the stimuli used. These results were further confirmed using CFSE-staining, which also demonstrated that affects both CD8+ and CD4+ T-lymphocytes proliferation only at high concentrations. MVC inhibits induced T-cell migration in a dose-dependent way.

Conclusions: Our data showed that at therapeutic concentrations MVC was not toxic for lymphocytes and affects T-cell migration. At high doses, MVC inhibits partially the polyclonal T-cell proliferation. These results support the additional immunologic effects of MVC on human T-lymphocytes functions beyond the pure antiviral effect suggesting that MVC might have a potential role inhibiting HIV-associated chronic inflammation and activation.

P-161. DRP1 MODULATES T CELL RECEPTOR SIGNALING AT THE IMMUNE SYNAPSE

F. Baixaulí Celda, N.B. Martín-Cófreces, G. Morlino, Y.R. Carrasco, C. Calabria- Linares, E. Veiga, J.M. Serrador y F. Sánchez-Madrid

Instituto de Investigación Sanitaria de la Princesa, Madrid. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid. Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.

Immune cells form specialized structures that favor transient cell-cell communication at the interface between antigen-presenting cells and T lymphocytes known as Immune Synapse (IS). T cell receptors (TCRs) gather at this site and are surrounded by adhesion receptors that form the peripheral supramolecular activation complex (pSMAC). Polarization of the cytoskeleton toward the IS involves polymerization of actin, which together with myosin, forms a contractile ring important for TCR

concentration at the central SMAC (cSMAC). The microtubule-organizing center is also re-oriented and regulates the secretory and Golgi apparatus redistribution favoring polarized secretion and endocytic recycling of receptors. Using a combination of imaging, genetic and biochemical approaches we have addressed the molecular mechanism driving mitochondrial positioning at the IS and the role of mitochondria in IS organization and TCR signaling. We found that the mitochondrial fission factor dynamin-related protein 1 (Drp1) docks at mitochondria and regulates mitochondria relocation near the actin-rich ring of the pSMAC. Mitochondrial redistribution was abolished by Drp1 silencing, expression of the phosphomimetic mutant Drp1S637D, and the Drp1 specific inhibitor mdivi-1. Confocal reconstructions of the IS in Drp1-silenced cells showed decreased myosin light chain phosphorylation and a scattered distribution of the CD3/ TCR. Using time-lapse confocal microscopy, we detected an enhanced mitochondrial depolarization and Ca²⁺ upon conjugation with APCs. Furthermore, ERK and PLCgamma phosphorylation as well as IL-2 production were increased in Drp1-silenced T cells. Our results strongly suggest that Drp1-dependent mitochondrial positioning and activity regulates TCR signal strength and T cell activation by fueling cSMAC assembly at the IS.

P-162. EVALUACIÓN IN VITRO DE LA FUNCIÓN INMUNOREGULADORA DE LINFOCITOS T GAMMA-DELTA EN INDIVIDUOS SANOS Y AFECTOS DE ENFERMEDAD DE BEHÇET

A. Clemente Ximenis, C. Crespí Bestard, A. Cambra Conejero, L. Pallarés Farreres, A. Juan Mas, N. Matamoros Flori y M.R. Julià Benique

Servicio de Inmunología; Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Son Espases, Palma de Mallorca. Servicio de Reumatología, Hospital Son Llàtzer, Palma de Mallorca.

Objetivos: Los linfocitos T gamma-delta (Tgd) CD8+ están aumentados en Enfermedad de Behçet (EB). Esta subpoblación funciona como T reguladora en modelos experimentales, infiltrados tumorales humanos y linfocitos intraepiteliales de celíacos. En este trabajo estudiamos la función reguladora "in vitro" de los Tgd CD8+/CD8- en EB e individuos sanos (IS).

Métodos: Aislamiento de las subpoblaciones celulares de sangre periférica mediante citómetro sorter. Se estudia la expresión de Vdelta1/Vdelta2 en Tgd. Evaluación del efecto de los Tgd CD8+/CD8- sobre la proliferación de linfocitos efectores (CD4+CD25- marcados con carboxifluoresceína) en cocultivo. Las células se incuban con un estímulo subóptimo (1 μ g anti-CD3/ml fijado a placa) definido a partir de ensayos de supresión con CD4+CD25+. Cuantificación (mediante CBA) de IFN γ /TNF α /IL-4/IL-2/IL-10/IL-17 y TGF β -1 en sobrenadantes de cultivo puro o cocultivo de subpoblaciones T con estímulo subóptimo o supraóptimo (+1,25 ng anti-CD28 \pm 20U IL-2/ml). Determinación de la expresión membranal, postactivación, de LAP-TGF β , molécula asociada a función supresora.

Resultados: La contribución de Vdelta1 en Tgd CD8+ es mayor en EB. Al contrario que en CD4+CD25+, no observamos efecto supresor de los Tgd CD8+/CD8-. El porcentaje de Vdelta1 o la adición de IL-2 no modifican los resultados. Ambas subpoblaciones Tgd son eficientes productoras de IFN γ /TNF α y poco productoras de IL-17/IL-2/IL-10/IL-4 y TGF β -1. El efecto del cocultivo sobre las CD4+CD25- no repercute significativamente en su patrón o cantidad de citoquinas secretadas. LAP-TGF β es indetectable en los Tgd.

Conclusiones: No confirmamos que los linfocitos Tgd periféricos tengan función supresora "in vitro" ni en IS ni en EB.

P-163. IDENTIFICACIÓN DE NUEVOS REGULADORES DE LA TIMOPOYESIS HUMANA: PAPEL DE LOS MIRNAS DURANTE EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS T

M.J. García León, M. García Peydró, S. González García, P. Fuentes, R. Garzón y M.L. Toribio

*Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, CSIC-UAM, Madrid.
Division of Hematology and Oncology, Department of Medicine,
The Ohio State University, Columbus, EE.UU.*

Los microRNAs (miRNAs) desempeñan un importante papel regulador en diversos procesos biológicos. Existen evidencias de que la regulación de la expresión de miRNAs específicos (miR-223, miR-181 y miR-150) es un evento crucial en la hematopoyesis y en la diferenciación de los linfocitos T y B. En este estudio, hemos analizado la posible función de los miRNAs en la regulación post-transcripcional de la diferenciación T humana. Para ello, hemos utilizado muestras primarias de timo humano y selección inmunomagnética de poblaciones intratímicas representativas de estadios madurativos concretos, en las que se ha analizado su perfil de expresión de miRNAs en microarrays contenido 345 sondas para miRNAs humanos. El estudio, realizado en colaboración con el Servicio de Microarrays de la Ohio State University, ha permitido identificar patrones selectivos de expresión de miRNAs vinculados a determinados estadios intratímicos humanos o a procesos madurativos críticos, como la restricción al linaje linfoidal, la especificación del linaje T, la expansión intratímica, la selección beta y la selección positiva/negativa. En total se han identificado 20 miRNAs con variación significativa a lo largo de todo el proceso del desarrollo intratímico y 23 miRNAs específicos de los diferentes estadios madurativos. Del total de miRNAs significativamente relevantes se han seleccionado 9 para su validación por PCR cuantitativa utilizando sondas comerciales específicas, por mostrar las variaciones de expresión más significativas en estadios cruciales del desarrollo intratímico y considerando una primera aproximación a sus posibles dianas mediante los algoritmos TargetScan, PicTar y miRanda. Los resultados preliminares obtenidos abren una nueva vía de estudio para el análisis de la función específica de miRNAs particulares, mediante experimentos de ganancia y pérdida de función en progenitores intratímicos humanos.

P-164. ESTUDIO DEL PAPEL DESEMPEÑADO POR LA ACTIVIDAD ÓXIDO NÍTRICO SINTASA EN LA LOCALIZACIÓN Y ACTIVACIÓN DE PKC-THETA EN LOS LINFOCITOS T

A. García Ortiz, S. Ibiza Martínez y J.M. Serrador Peiró

Centro Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.

Introducción: El óxido nítrico (NO) participa en la homeostasis vascular, la transmisión del impulso nervioso y la respuesta inmune. Los linfocitos T expresan eNOS y producen NO en respuesta a antígeno, desempeñando un papel en la respuesta inmune adaptativa.

Objetivos: Estudiar el efecto de la actividad NOS en la organización de la Sinapsis Inmune (SI), así como en la ruta de señalización desencadenada tras la activación de los linfocitos T. Trataremos también de analizar su posible función en la diferenciación de los linfocitos T hacia fenotipos Th1 y Th2.

Material y métodos: Utilizamos técnicas de microscopía confocal de fluorescencia, western-blot y micro-arrays, sobre células Jurkat CH7C17 control o que expresaban eNOS-GFP o un mutante defectivo G2A. Como células presentadoras de antígeno (APC) se emplearon células Raji.

Resultados: Hemos encontrado que la actividad eNOS en la SI provoca la dispersión de CD3 y de la Protein Kinasa C-θ (PKC-θ), así como una reducción de la polimerización de actina en dicho compartimento intercelular. Además, hemos detectado mayor fosforilación de PKC-θ en linfocitos T activados que sobreexpresan eNOS-GFP respecto a células control G2A-GFP.

Conclusiones: Estos estudios sugieren que el NO producido por eNOS en los linfocitos T activados regula la organización y activación de PKC-θ en la SI por un mecanismo dependiente de actina. En la actualidad, estamos estudiando las posibles modificaciones post-traduccionales (nitrosilación, nitración, glutationilación) implicadas en dicho mecanismo, así como su repercusión en los procesos de diferenciación de los linfocitos T.

P-165. TRANSFER OF MICRORNAs SHUTTLED BY EXOSOMES DURING IMMUNE SYNAPSIS

C. Gutiérrez Vázquez, M. Mittelbrunn Herrero, C. Villarroya Beltri, F. Sánchez Cabo y F. Sánchez Madrid

Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid. Instituto de Investigación Sanitaria Princesa, Madrid. Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid.

The Immune Synapse (IS) is a highly organized structure formed between T cell and antigen presenting cell (APC) during antigen presentation. Transmembrane and membrane-associated molecules are reorganized at the T cell-APC contact site as well as the cytoskeleton and several communication processes take place in terms of receptors interaction and signalling. Moreover, the IS has been recently proposed as a focal point for both exocytosis and endocytosis. Exosomes are small vesicles of endocytic origin that contain proteins and RNA including microRNA (miRNA). MiRNAs are small RNA molecules that down-regulate gene expression by preventing the translation of specific mRNA. MiRNAs are emerging as important regulators of the immune system. We have investigated whether there is a transfer of exosomes containing microRNA during IS. Our results show that exosomes produced by T and B cell lines, and primary dendritic cells (DCs) contain specific microRNA repertoires. We have demonstrated that the multivesicular bodies of Jurkat T cells, the cellular compartments from which exosomes will arise, relocate to the immune synapse formed with Raji B cells in a superantigen dependent manner. Moreover, CD63+ exosomes are transferred to the Raji recipient cell and so do the microRNAs overexpressed in the Jurkat cells. Our work supports a novel mechanism of cellular communication involving the IS as a device for intercellular unidirectional transfer of exosomes and microRNAs from the T cell to the APC.

P-166. AUMENTO DEL RATIO DE CÉLULAS T CD8+ EM/CM COMO MARCADOR CANDIDATO PARA RECHAZO AGUDO EN TRASPLANTE RENAL

M. López Hoyos, D. San Segundo Arribas, M. Gago, G. Fernández Fresnedo, I. Beares Gómez, M. González Paz, J.C. Ruiz San Millán, M. San Martín Serra, C. Santa Cruz y M. Arias Rodríguez

Servicio de Inmunología; Servicio de Nefrología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla-IFIMAV, Santander.

Introducción: En trasplante de órganos sólidos, el rechazo agudo es un evento en el que las células T juegan un papel central. En los últimos años, hay un interés especial en el estudio de las células T memoria al demostrarse su presencia en los receptores de trasplante mediante diferentes mecanismos (reactividad cruzada, sensibilización...). El papel de las células T memoria en

el rechazo agudo ha sido demostrado en modelos experimentales, y aún existen muy pocos datos en trasplante humano. Además, no hay datos del número de células T memoria en trasplante renal.

Objetivos: Evaluar si existen diferencias en el número de células T efectoras de memoria en pacientes trasplantados renales a los que se les realiza una biopsia debido a un deterioro en la función del injerto con sospecha de rechazo.

Métodos: Se incluyeron 25 pacientes trasplantados renales que tuvieron un empeoramiento en la función del injerto durante los primeros 6 meses post-trasplante y a los que se les realizó una biopsia para confirmar el diagnóstico de rechazo agudo (RA). Se recogieron muestras sanguíneas de los pacientes cuando se ingresaron para la realización de la biopsia y antes del tratamiento específico. Se midieron mediante citometría de flujo los niveles de células T naïve, centrales (CM) y efectoras (EM) de memoria tras tinción con anticuerpos monoclonales específicos.

Resultados: Se diagnosticaron de rechazo agudo 18 pacientes (1 borderline, 6 humorales, 10 celulares y 1 paciente con rechazo celular y humoral), 3 pacientes de nefrotoxicidad, 3 de nefropatía crónica del trasplante y uno quedó sin diagnóstico definido. No se observaron diferencias en el número de células T CM o EM CD3+ ni CD4+ en sangre de los pacientes trasplantados con respecto al desarrollo o no de un rechazo agudo (ratio EM/CM CD3+ cél T: 1,35 en RA vs 0,99 en pacientes sin RA, pNS; ratio EM/CM CD4+ cél T: 0,81 en RA vs 0,51 en pacientes sin RA, p NS). Sin embargo, se observó un aumento en el ratio de células T EM/CM CD8+ en los pacientes que fueron diagnosticados de rechazo agudo tras biopsia ($4,4 \pm 3,3$) comparado con el grupo de pacientes en los que no se confirmó evento de rechazo agudo ($1,9 \pm 1,1$, $p = 0,0094$). Aunque los pacientes con diagnóstico de rechazo celular tienen una tendencia a mostrar un mayor ratio de células T EM/CM CD8+ que los pacientes con rechazo humorral, no se observaron diferencias significativas.

Conclusiones: La presencia de un ratio aumentado de células T EM/CM CD8+ apunta a un mayor riesgo de rechazo agudo diagnosticado tras biopsia. Para establecer este parámetro como biomarcador predictor de rechazo agudo se necesitan estudios.

P-167. EFECTO INMUNOMODULADOR DE DIVERSAS FRACCIONES CELULARES DE BIFIDOBACTERIUM BIFIDUM 13195

P. López Suárez, I. González Rodríguez, B. Sánchez García, M. Gueimonde Fernández, A. Margolles Barros y A. Suárez Díaz

Departamento de Microbiología y Bioquímica de Productos Lácteos, Instituto de Productos Lácteos de Asturias, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (IPLA-CSIC), Oviedo. Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo.

Objetivos: Estudios previos revelaron que células dendríticas derivadas de monocitos (Mo-DCs) maduradas en presencia de *Bifidobacterium bifidum* 13195 eran capaces de inducir la polarización de linfocitos CD4+ vírgenes a células Treg, por lo que investigamos la fracción celular de esta cepa responsable de dicho efecto, así como su papel en la integridad del endotelio intestinal.

Material y métodos: Diversas fracciones celulares de *B. bifidum* 13195 se cultivaron con Mo-DCs para estudiar su capacidad de maduración mediante análisis de expresión de CD86 y HLA-DR. Despues, dichos Mo-DCs se co-cultivaron con linfocitos CD4+CD45RA+, analizándose la inducción de células Treg/Th mediante cuantificación de los niveles de IFNg, IL-10, IL-17 y TNFa y del porcentaje de linfocitos CD4+CD25high/

CD127low/Foxp3+ por fluorocitometría. Finalmente, analizamos la proliferación de células HT29 en presencia de dos subfracciones de la envoltura celular, solubles en metanol o cloroformo, mediante cuantificación de la incorporación de bromouracilo.

Resultados: *B. bifidum* 13195 se dividió en cinco fracciones (citoplasma, membrana, envoltura celular, proteínas superficiales mayores o menores de 3KDa). Todas las fracciones fueron capaces de madurar Mo-DCs, aunque mostraron variabilidad en su capacidad para diferenciar células Treg, siendo la fracción de membrana la más eficiente induciendo células CD25high/CD127low/Foxp3+. El análisis de las citocinas producidas por linfocitos CD4+CD45RA+ confirmó estos resultados, de manera que co-cultivos con Mo-DCs estimuladas con la fracción de membrana presentaron mayores ratios IL-10/IFNg e IL-10/TNFa. Finalmente, la subfracción de envoltura celular soluble en metanol indujo proliferación dosis-dependiente de colonocitos.

Conclusiones: La fracción de membrana de *B. bifidum* 13195 es capaz de inducir activación de Mo-DCs conduciendo la polarización de linfocitos T vírgenes hacia células reguladoras, mientras que la envoltura celular podría contribuir a la integridad de la mucosa intestinal.

P-168. INHIBICIÓN DE STAT 3 Y JAK 2 EN LA MODULACIÓN DE LA RESPUESTA A SUPERANTÍGENOS

E.F. Mateus Medina, A. Ruiz Tarragò, C. Benaiges, S. Vidal y C. Juárez Rubio

Inmunología Experimental, Institut de Recerca, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.

La vía JAK/STAT está involucrada en los mecanismos de generación de células Treg en los modelos de superantígenos. Para analizar el papel de los factores JAK/STAT en la generación de células Treg, hemos utilizado inhibidores de JAK2 y de la fosforilación de STAT3 en un modelo de shock séptico y en un modelo tolerogénico de ratón para el superantígeno SEB. A los 90 minutos post inyección hemos analizado la expresión y la activación de STAT1, STAT3, SOCS1, SOCS3, PIAS1 y PIAS3 por Western Blot y por otro lado la producción de citocinas en suero, IFNg e IL10, por ELISA. La inyección intraperitoneal del inhibidor de STAT3 en el modelo tolerogénico que es caracterizado por niveles elevados de IL10 y bajos de IFNg, provoca el aumento de los niveles de IFNg sin modificar los niveles de IL-10. Aunque los ratones no mueren, presentan signología clínica. A diferencia del anterior, el modelo de shock séptico se caracteriza por niveles elevados de IFNg y niveles bajos de IL10 y la muerte del ratón antes de las 96h. Sin embargo, ratones que reciben una inyección intraperitoneal del inhibidor de JAK2, sobreviven.

P-169. IMPLICACIÓN DE ICOS EN LA HOMEOSTASIS DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES

M. Montes Casado, G. Ojeda Villarroya, E. Pini Neder-Vivot, J.M. Rojo Hernández y P. Portolés Pérez

Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

Introducción: ICOS es un coestimulador inducible que se expresa en células T activadas y en algunas subpoblaciones linfoideas; está implicado en respuestas inmunes y autoinmunes por su papel en señalización, diferenciación y control de la inflamación.

Objetivos: Analizar la importancia de ICOS en la homeostasis inmune de subpoblaciones linfoides.

Métodos: Análisis comparativo mediante citometría de subpoblaciones linfoides de ratones ICOS-ko y normales a lo largo del tiempo; estudios funcionales sobre poblaciones purificadas, apoptosis y análisis de expresión génica mediante arrays de genoma completo.

Resultados: Los ratones ICOS-ko presentan una disminución de células Treg Foxp3+, con una mayor sensibilidad a apoptosis, pero sin defectos funcionales. Durante el envejecimiento aumenta la proporción de células Treg y de memoria CD4+CD44+, especialmente ICOS+, pero se mantiene la disminución de células Foxp3+ en ratones ICOS-ko. Los animales ICOS-ko presentan también un descenso en el porcentaje de células NK presentes en bazo, con posibles alteraciones en la producción de citoquinas, la degranulación y los marcadores de actividad citotóxica. El análisis genómico de células NK de ratones ICOS-ko y normales revela diferencias en varios genes cuya importancia funcional estamos investigando.

Conclusiones: Las diferencias en la proporción de poblaciones linfoides y su funcionalidad en ratones ICOS-ko pueden ser determinantes en la distinta sensibilidad de estos animales a procesos inflamatorios (mayor sensibilidad a EAE, mayor resistencia a artritis inducida) y reflejan la importancia de ICOS en la homeostasis inmune. Los resultados obtenidos en el estudio de inmunosenescencia pueden reflejar el aumento de la sensibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes en individuos ancianos.

P-170. MORFOLOGÍA Y FUNCIÓN DEL SISTEMA INMUNITARIO: UN EJEMPLO DE DOCENCIA INTEGRADA

J.R. Palacio Cornide, M. Martí Ripoll, R. Rabanal Prados y M. Pumarola Batlle

Facultad de Veterinaria, Instituto de Biotecnología y Biomedicina, Universidad Autónoma de Barcelona.

En los programas docentes existe un notable grado de solapamiento en parte de los contenidos de diversas asignaturas. Ante esta situación, los profesores suelen plantear los temas coincidentes desde el punto de vista de su propia disciplina. La innovación de docencia integrada propuesta en este trabajo la llevan a cabo los profesores de las asignaturas de Histología y de Inmunología. Esta propuesta docente se imparte unificando clases prácticas de ambas asignaturas y tiene como objetivos: Primero, impartir conjuntamente la anatomía y función de los principales órganos del sistema inmunitario. Segundo, ofrecer una visión dinámica en relación con la respuesta inmunitaria, en la que se integran la estructura y la función de los órganos primarios y secundarios durante la maduración y durante la generación de las células efectoras frente a patógenos. Durante la clase práctica se genera una interacción en la que los diferentes puntos de vista de los profesores de las áreas contribuyen a un enfoque multidisciplinar del conocimiento impartido. La evaluación se ha realizado a través de encuestas. La valoración de los alumnos sobre esta actividad docente ha sido altamente positiva. Esta innovación docente se propone como modelo en aquellas asignaturas que comparten parte del temario, y solamente se requiere de la voluntad del profesorado para realizar una docencia más flexible e integradora a lo largo del curso académico. Queremos señalar que el alumno percibe que las asignaturas no son independientes y, lo que es más importante, que su aprendizaje se hace interrelacionando conceptos, y no estudiándolos por separado.

P-171. TOPOGRAPHICAL DISTRIBUTION AND CHARACTERIZATION OF EPITHELIAL CELLS AND INTRAEPIHELIAL LYMPHOCYTES IN THE HUMAN OCULAR MUCOSA

R. Reinoso Tapia, R. Martín Sanz, M. Calonge Cano, M. Martino Sanz, M.E. Mateo, R. Blanco Salado, C. Martín Alonso y A. Corell Almuzara

Instituto de Oftalmobiología Aplicada (IOBA), Valladolid.
Departamento de Inmunología, Universidad de Valladolid.

Objectives: The aim of this study was to investigate the relative proportion of intraepithelial lymphocytes (IELs), apoptotic cells and proliferative capacity in three different topographical regions of the normal human conjunctiva.

Material and methods: Superior tarsal, superior bulbar and inferior tarsal-bulbar-fornical conjunctival cells were collected by brush cytology (BC) from 63 healthy donors. Immunophenotype, viability, and proliferative capacity of the BC-recovered cells were analyzed by flow cytometry.

Results: Flow cytometry analysis showed higher levels of IELs, CD3+ T cells and CD8+ T cells in both upper tarsal and bulbar conjunctiva than in the inferior tarsal-bulbar-fornix, where the CD19+ B cells were increased. For all zones, two different cell populations, differentiated by cell size and complexity (cytoplasmic granularity), were present in the apoptosis assay. The more complex cells were reduced within the inferior tarsal-bulbar-fornix when compared with the superior bulbar and tarsal areas. Less complex cells were more predominant in the inferior conjunctiva and were mainly alive. The proliferative capacity of the conjunctival epithelium was significantly higher in the superior tarsal and inferior fornical conjunctivas than in superior bulbar conjunctiva.

Conclusions: These findings suggest that each topographical zone from normal human conjunctiva has a unique profile of immunophenotype, viability, and cell proliferation that could be related to a differentiated regional functionality.

P-172. POBLACIÓN T CLONAL EN INMUNODEFICIENCIA COMÚN VARIABLE

S. Sobre Casas Poliche, I. Hidalgo Izaguirre, A. de Andrés Martín y J. Castañer Alabau

Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

Objetivos: Presentar el caso de una paciente con diagnóstico de IDVC con asociación a patología autoinmune (Artritis Reumatoide y síndrome seco) que desarrolla una población T clonal.

Caso clínico: Mujer 67 años con diagnóstico de Inmunodeficiencia común variable en tratamiento con IGIV, 25 g/cuatro semanas, desde 2004 (niveles de IgG al diagnóstico: 273 mg/dl). Antecedentes de hipotiroidismo en tratamiento sustitutivo y patología autoinmune: artritis reumatoide y síndrome de Sjögren (ANA: 1/80, anti-Ro y anti-La positivos). La analítica objetiva niveles protectores de IgG. La paciente no presentó complicaciones infecciosas desde el inicio del tratamiento con IGIV. Se realiza estudio de citometría de flujos en sangre periférica, donde se detecta una población T clonal con el siguiente fenotipo: CD4+, CD56+, CD3low+, DR+; esta población reprende el 10% de los linfocitos, además de la linfopenia de células B con franca disminución de los linfocitos B de memoria. Cociente CD4/CD8: 3,4.

Conclusiones: Los procesos linfoproliferativos son complicaciones descritas en la inmunodeficiencia común variable, por lo que en pacientes con enfermedades autoinmunes que tienen una activación constante de linfocitos T, es importante realizar un estrecho seguimiento citométrico por el riesgo de desarrollar poblaciones clonales.

P-173. RELATIONSHIP BETWEEN CD45RO AND CD26 MAB-STAININGS ON THE CELL SURFACE OF HUMAN BLOOD CD4 T LYMPHOCYTES

R. Varela Calviño, M. Imbernón Piedra, J.E. Viñuela Roldán y O.J. Cordero Santamaría

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Universidad de Santiago de Compostela, A Coruña. Unidad de Inmunología, Laboratorio Central, Hospital Clínico Universitario de Santiago de Compostela, A Coruña.

Objectives: The RO isoform of the protein tyrosine phosphatase (PTP) CD45 has been typically used as a surface marker of effector/memory T cells. It has been reported that CD26, the dipeptidyl-peptidase (DPP-IV) enzyme, is up-regulated and associated with CD45RO in the memory/effector CD4 T cells. In this work, this diagnosis has been reevaluated.

Material and methods: Expression levels of CD26 and CD45RO on CD4 T cells was evaluated by FACS analysis. Whole blood from healthy donors was stained for CD4, CD26 and CD45RO and expression level of these markers determined using a FACSCalibur flow cytometer and CELLQuest Software (BD Biosciences). Monoclonal antibodies were from BD or Immunostep (Salamanca).

Results: Our results shows that a) individuals with differentiated values in anti-CD45RO and anti-CD26 staining did not match up in total lymphocytes neither in the CD4 population; b) a slight negative correlation was found between percentages of RO and CD26 positive cells; c) most important, while CD4 RA cells (including CD45RO low-expression cells), are basically CD26+ cells, CD26 expression is much lower in the CD4 CD45RO population, which is enriched in CD26 negative cells.

Conclusions: On the contrary to the most established idea, we show that naïve T cells are CD26+ and the description of CD26 as an activation antigen (IT94) should be tempered because, although an overexpressing CD26high population was found, the presence of a CD4+CD45RO+CD26- subset suggests a tight regulation of the CD26 gene with the dynamics of the immune system activity.

P-174. MECHANISMS AND FUNCTION OF EXOSOMAL MICRORNA TRANSFER AT THE IMMUNE SYNAPSE

C. Villarroya Beltri, M. Mittelbrunn Herrero, C. Gutiérrez Vázquez y F. Sánchez Madrid

Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares, Madrid. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.

We have previously described that during the immune synapse exosomes harbouring microRNAs are transferred in a unidirectional way from the T cell to the APC. By using haemagglutinin (HA)-loaded CH7C17 cells overexpressing miR-335 conjugated to Hom-2 antigen presenting cells, here we show that this transfer is peptide antigen-specific. We have also demonstrated that levels of transferred microRNAs correlate with levels of exosomal proteins such as CD63 acquired by recipient cells. Moreover, inhibition of exosome secretion by targeting proteins implicated in the exosome release pathway as the Rab GTPase Rab27a and nSMase2 by RNA interference or with pharmacological inhibitors, impairs both exosome and microRNAs transfer. In contrast, transfer of exosomes occurred normally from Hrs-interfered T cells in agreement with previous studies that demonstrated that the ESCRT system is unnecessary for the release of exosomes and microRNA. The exosome-mediated transfer has been further confirmed for endogenous microRNAs on primary SEE-specific T lymphocytes. Moreover, we have demonstrated the ability of microRNAs to regulate gene expression at

the recipient cell with 3'UTR reporter constructs. In summary, we establish that exosome transfer is the mechanism by which immune cells exchange microRNAs upon the immune synapse. Our work shed light on the mechanisms and physiological relevance of microRNA-loaded exosomes transfer during immune synapse.

VACUNAS

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

P-175. IDENTIFICACIÓN DE ÁREAS INMUNOGÉNICAS EN PROTEÍNAS VIRALES

C.M. Díez Rivero y P.A. Reche Gallardo

Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

Objetivos: La localización de áreas inmunogénicas tiene una gran relevancia en el desarrollo de inmunoterapias antígeno-específicas y el diseño de vacunas. En este estudio hemos analizado la distribución de los epítopos T CD8 en las proteínas virales tratando de encontrar zonas inmunogénicas.

Material y métodos: De las bases de datos EPIMHC, Immuneepitope y Los Alamos se recogieron los epítopos T CD8 empeados en el análisis, 338 procedentes del virus de la inmunodeficiencia humana (VIH), 218 del virus de la hepatitis C (VHC) y 44 del virus influenza A (VIA). Todos ellos son péptidos de 9 aminoácidos restringidos por moléculas MHCI y han sido identificados en el transcurso de la infección. La herramienta RANKPEP se empleó para predecir la distribución de distintas moléculas MHCI. Utilizando un test χ^2 , comparamos la localización de estos epítopos T CD8 virales con una distribución aleatoria de los péptidos, teniendo en cuenta la longitud y el grado de conservación de cada una de las proteínas.

Resultados: El análisis de la distribución muestra que los epítopos no están homogéneamente distribuidos, sino que se localizan principalmente en las proteínas estructurales y en regiones cercanas a un ORF (Open Reading Frame). Asimismo, esta distribución de epítopos tampoco está relacionada con la distribución de los sitios de unión a moléculas MHCI predichos.

Conclusiones: Se deben privilegiar los antígenos estructurales y las regiones cercanas al ORF en los esfuerzos encaminados a la identificación de epítopos y el desarrollo in silico de las correspondientes vacunas.

P-176. EFECTOS EN VIABILIDAD Y MIGRACIÓN CELULAR DEBIDOS A NANOPARTÍCULAS ÓXIDO-METÁLICAS

T. Lozano Fernández, M. Peleteiro Olmedo, M. Rey Rey y A. González Fernández

Centro de Investigaciones Biomédicas (CINBIO), Inmunología, Universidad de Vigo.

Introducción: El uso de diversas nanopartículas óxido-metálicas en distintos productos comerciales como protectores solares está ampliamente extendido en la actualidad. Sin embargo, el efecto de dichas Nps sobre el sistema inmune no está del todo aclarado, por lo que es importante estudiar sus potenciales efec-

tos inmunotóxicos, y descartar que puedan generar procesos tales como alergia, toxicidad, o inflamación.

Objetivos: Analizar los efectos que diversas nanopartículas (Nps) óxido-metálicas provocan en la viabilidad celular, activación de complemento y en la respuesta migratoria de células T frente a estímulos quimiotácticos.

Material y métodos: Se utilizaron diversas líneas celulares humanas y varios tipos de NPs óxido-metálicas: CeO₂ de Evonik Degussa, TiO_x y FeOx de PlasmaChem. Ensayos de citotoxicidad: mediante la técnica Quick cell se realizaron estudios dosis-dependiente para evaluar la potencial toxicidad de las Nps. Ensayo de activación de complemento: se utilizó un pool de plasma humano en presencia o ausencia de nanopartículas y la fragmentación del factor C3 se analizó mediante western blot. Ensayos de quimiotaxis: se utilizó la técnica Transwell con células Jurkat incubadas con las Nps. El índice de migración se estableció mediante la fórmula: (Nº células compartimento inferior)/(Nº células compartimento inferior + Nº células compartimento superior) x 100.

Resultados: Las Nps no mostraron toxicidad a bajas dosis ni activaron las cascadas del complemento. A dosis altas, las Nps de Ce fueron las únicas que indujeron toxicidad en distintos tipos celulares. Las Nps de CeO₂ parecen disminuir la respuesta quimiotáctica de los linfocitos T, mientras que las de TiO producen un ligero aumento de la migración celular (no estadísticamente significativo). Las Nps de FeOx no indujeron cambios con respecto al control.

Conclusiones: Las Nps a las dosis testadas no muestran efectos inmunotóxicos destacables.

P-177. VALORACIÓN DEL PAPEL INMUNOSUPRESOR DEL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA EN INFECCIONES AGUDAS

V.M. Molina Hernández, M.A. Risalde Moya,
M. Pedrera Mazarro, F. Romero Palomo, P.J. Sánchez Cordón
y J.C. Gómez Villamandos

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas,
Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.

La diarrea vírica bovina (DVB) es una enfermedad de distribución mundial, que produce importantes pérdidas económicas en la ganadería bovina, causando un cuadro inmunosupresor que aumenta la susceptibilidad de infecciones secundarias. Los mecanismos que el virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) emplea en su acción inmunosupresora siguen siendo objeto de debate. Con el fin de profundizar en el estudio de la alteración de la respuesta inmune en una infección aguda causada por el vDVB, se valoraron a nivel sistémico los cambios numéricos de distintas poblaciones celulares inmunocompetentes, expresión de diferentes citoquinas, la respuesta de las principales proteínas de fase aguda (PFAs), así como la respuesta de anticuerpos desarrollada. Los resultados muestran en la primera fase del es-

tudio una marcada leucopenia transitoria, caracterizada por un descenso en el número de linfocitos (CD4+, CD8+, γδ+ y B) y monocitos, coincidiendo con el inicio de los signos clínicos de enfermedad y la aparición de viremia. En este periodo se observó un aumento de TNF-α, INF-γ, IL-1 e IL-12, no detectándose cambios en la producción de IL-4 e IL-10, constatándose una respuesta Th1 y la funcionalidad de la respuesta inmune celular. Los cambios en los niveles de PFAs se evidenciaron entorno al 9 dpi, coincidiendo con una recuperación de los síntomas clínicos y valores numéricos de leucocitos, así como un descenso de la viremia.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia P09-AGR-4671 de la Junta de Andalucía.

P-178. ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DEL VIRUS DE LA DIARREA VÍRICA BOVINA EN LA RESPUESTA INFLAMATORIA FREnte A INFECCIONES SECUNDARIAS

M.A. Risalde Moya, V.M. Molina Hernández,
M. Pedrera Mazarro, F. Romero Palomo, P.J. Sánchez Cordón
y J.C. Gómez Villamandos

Departamento de Anatomía y Anatomía Patológica Comparadas,
Facultad de Veterinaria, Universidad de Córdoba.

El virus de la diarrea vírica bovina (vDVB) se considera el principal factor predisponente para la aparición de infecciones secundarias en el ganado bovino, desconociéndose las estrategias utilizadas por este virus para facilitar la instauración de agentes concomitantes. Así, el objetivo de nuestro trabajo fue estudiar la respuesta inmune establecida en animales inoculados con el vDVB frente a una infección secundaria de origen vírico (hespesvirus bovino 1.1, HVB-1.1), estableciendo las posibles alteraciones que pudiesen inducir a una protección inadecuada ante el agente secundario. Para ello, analizamos la respuesta de células inmunocompetentes, citoquinas, proteínas de fase aguda y anticuerpos en terneros coinfectados, valorando las diferencias con respecto a animales inoculados solamente con HVB-1.1. Según nuestros resultados, los animales que sufrieron DVB mostraron una alteración en el perfil de citoquinas tras la infección por HVB-1.1, lo que produjo una exacerbación de la respuesta inflamatoria y el desarrollo de un cuadro clínico y lesional de mayor intensidad que los animales sanos ante infecciones secundarias. Además, los animales inoculados con el vDVB presentaron una alteración en los mecanismos citotóxicos encargados de frenar la diseminación de agentes patógenos, como el HVB-1, facilitando la distribución orgánica de este virus. En cambio, el vDVB no alteró el desarrollo de una respuesta humoral específica frente al HVB-1.1 con respecto a animales sanos inoculados con este agente.

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto de Excelencia P09-AGR-4671 de la Junta de Andalucía.