

# Inmunología

Publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología  
www.inmunologia.org

© Copyright 2004

ERGON CREACIÓN S.A.

Reservados todos los derechos. Ninguna parte de esta publicación puede ser reproducida, transmitida en ninguna forma o medio alguno, electrónico o mecánico, incluyendo fotocopias, grabaciones o cualquier sistema de recuperación de almacenamiento de información, sin la autorización por escrito del titular del Copyright. Publicación trimestral.

ERGON CREACIÓN S.A.

Arboleda 1,  
28220 Majadahonda (Madrid)  
Publicación autorizada por el  
Ministerio de Sanidad como  
Soporte Válido: Ref. N° 288  
ISSN: 0213-9626  
Depósito legal: M-53681-2002



Arboleda 1,  
28220 Majadahonda (Madrid)  
Telf: 91 636 29 30  
Fax: 91 636 29 31  
e-mail: ergon@ergon.es

## TARIFAS DE SUSCRIPCIONES

Miembro SEI:	Gratuitos
Médicos:	42,07 euros
MIR y Estudiantes:	30,05 euros
Organismos y empresas:	66,11 euros
Ejemplar suelto atrasado:	17 euros
Precio extranjero:	200 \$

Incluida en las base de datos EMBASE,  
Índice Médico Español e IBECS.

## COMITÉ DIRECTOR

F. Lozano (Barcelona), Director Ejecutivo, B. Alarcón (Madrid), D. Alarcón-Segovia (México), A. Ferreira (Santiago de Chile), M. Fresno (Madrid), M. López-Botet (Barcelona), J.A. López de Castro (Madrid), A. Nieto (Montevideo), I. Melero (Pamplona), R. Pujol-Borrell (Barcelona), J.M. Rojo (Madrid), F. Sánchez-Madrid (Madrid).

## COMITÉ EDITORIAL

J. Alberola-Ila (Pasadena), A. Alcover (París), R. Alvarez (Murcia), M. Alvarez de Mon (Madrid), P. Aparicio (Murcia), J. Aramburu (Barcelona), C. Ardavin (Madrid), A. Arnaiz-Villena (Madrid), A. Bootello (Madrid), L. Borche (Montevideo), J.A. Brieva (Cádiz), E. Carosella (París), A.C. Carrera (Madrid), E. Cuadrado (San Sebastián), C. Cuturi (Nantes), A. de la Hera (Madrid), M. del Val (Madrid), G. Dighiero (París), J. Egido (Madrid), P. Engel (Barcelona), G. Ercilla (Barcelona), T. Español (Barcelona), A. Ezquerro (Madrid), E. Fernández-Cruz (Madrid), G. Fontán (Madrid), T. Gallart (Barcelona), R. García Delgado (Madrid), F. Garrido (Granada), J. Gaviñón (La Habana), M.L. Gaspar (Madrid), A. Gayá (Palma de Mallorca), C. Gelpí (Barcelona), E. Gómez de la Concha (Madrid), R. González-Amaro (San Luis Potosí), A. González-Fernández (Vigo), C. Gutiérrez (Oviedo), J.C. Gutiérrez-Ramos (Boston), D. Jaraquemada (Barcelona), C. Lahoz (Madrid), Z. Layrisse (Caracas), F. Leyva-Cobián (Santander), C. López-Larrea (Oviedo), M. López-Cabrera (Madrid), M. López-Trascasa (Madrid), A. Madrigal (Londres), R.A. Margni (Buenos Aires), J. Martínez-Laso (Madrid), E. Martínez-Naves (Madrid), N. Matamoros (Palma de Mallorca), F. Merino (Bilbao), F. Mollinedo (Salamanca), I. Moneo (Madrid), A. Núñez-Roldán (Sevilla), M. Ortiz de Landázuri (Madrid), L. Ortiz Ortiz (México), M. E. Patarroyo (Bogotá), J. Peña-Martínez (Córdoba), J.M. Redondo (Madrid), J.R. Regueiro (Madrid), S. Rodríguez de Córdoba (Madrid), J.L. Rodríguez-Sánchez (Barcelona), P. Rubinstein (New York), J. Sancho (Granada), M. Santamaría (Córdoba), L. Santos-Argumedo (México), A. Silva (Madrid), R. Solana (Córdoba), J.L. Subiza (Madrid), M.L. Toribio (Madrid), J.L. Vicario (Madrid), C. Vilches (Madrid), R. Vilella (Barcelona), J. Vives (Barcelona), J. Yagüe (Barcelona), A. Zapata (Madrid).

## SECRETARÍA EDITORIAL

M. Bayo, Servei d'Immunologia, Hospital Clínic, Villarroel 170, 08036 Barcelona, España. Tel: +34 934 544 920; Fax: +34 934 518 038; E-mail: mbayo@medicina.ub.es

## SECRETARÍA DE REDACCIÓN

Maria Rosa Sarrías i Fornés

# Inmunología

Publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología  
www.inmunologia.org



## SUMARIO

Vol. 24, Supl. 1, Mayo 2005

<b>PROGRAMA CIENTÍFICO</b> . . . . .	70	<b>Sesión 6: Tumores</b> . . . . .	102
<b>COMUNICACIONES ORALES</b> . . . . .	81	<i>Moderadores: Francisco Ruiz Cabello (H.U. Virgen de Las Nieves, Granada), Ignacio Melero Bermejo (Clínica Universitaria Pamplona)</i>	
<b>Sesión 1: Células T</b> . . . . .	81	<b>Sesión 7: Citoquinas y señalización</b> . . . . .	106
<i>Moderadores: Africa González (Univ. de Vigo), Jesús Merino (Univ. de Cantabria)</i>		<i>Moderadores: Ignacio Moneo (Hospital Carlos III, Madrid), Marcos López Hoyos (H.U. Marqués de Valdecilla, Santander)</i>	
<b>Sesión 2: Autoinmunidad y genes</b> . . . . .	84	<b>Sesión 8: MHC</b> . . . . .	110
<i>Moderadores: Francisco Lozano (Hospital Clinic, Univ. Barcelona), Javier Martín (Inst. López Neyra, CSIC, Granada)</i>		<i>Moderadores: Rafael Solana (H. Univ. Reina Sofía, Univ. de Córdoba), Carlos López Larrea (Hospital Central de Asturias)</i>	
<b>Sesión 3: MHC y trasplantes</b> . . . . .	88	<b>Sesión 9: Inmunidad innata y presentación de antígeno</b> . . . . .	114
<i>Moderadores: José Luis Vicario (Centro de Transfusiones, Madrid), Rafael González (Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba)</i>		<i>Moderadores: Miguel López Botet (Univ. Pompeu Fabra, Barcelona), Dolores Jaraquemada (Univ. Autónoma Barcelona)</i>	
<b>Sesión 4: Autoinmunidad y tolerancia</b> . . . . .	93	<b>Sesión 10: Inmunodeficiencias secundarias</b> . . . . .	117
<i>Moderadores: Cándido Juárez (Hospital Univ. Sant Pau, Barcelona), Francisco J. García-Cozar (Hosp. Puerto Real, Univ. de Cádiz)</i>		<i>Moderadores: Ana M<sup>a</sup> García Alonso (H.U. Arrixaca, Murcia), Margarita López Trascasa (H.U. La Paz, Madrid)</i>	
<b>Sesión 5: Inmunodeficiencias y alergia</b> . . . . .	98		
<i>Moderadores: M<sup>a</sup> Cruz García Rodríguez (H. Univ. La Paz, Madrid), Ignacio J. Molina (Univ. de Granada)</i>			

# Inmunología

Publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología  
www.inmunologia.org



## SUMARIO

Vol. 24, Supl. 1, Mayo 2005

<b>POSTERS</b> .....	121	<b>Sesión 6: Tumores</b> .....	156
<b>Sesión 1: Células T</b> .....	121	<i>Moderadores: Francisco Ruiz Cabello (H.U. Virgen de Las Nieves, Granada), Ignacio Melero Bermejo (Clínica Universitaria Pamplona)</i>	
<i>Moderadores: Africa González (Univ. de Vigo), Jesús Merino (Univ. de Cantabria)</i>		<b>Sesión 7: Citoquinas y señalización</b> .....	162
<b>Sesión 2: Autoinmunidad y genes</b> .....	133	<i>Moderadores: Ignacio Moneo (Hospital Carlos III, Madrid), Marcos López Hoyos (H.U. Marqués de Valdecilla, Santander)</i>	
<i>Moderadores: Francisco Lozano (Hospital Clinic, Univ. Barcelona), Javier Martín (Inst. López Neyra, CSIC, Granada)</i>		<b>Sesión 8: MHC</b> .....	167
<b>Sesión 3: MHC y trasplantes</b> .....	137	<i>Moderadores: Rafael Solana (H. Univ. Reina Sofía, Univ. de Córdoba), Carlos López Larrea (Hospital Central de Asturias)</i>	
<i>Moderadores: José Luis Vicario (Centro de Transfusiones, Madrid), Rafael González (Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba)</i>		<b>Sesión 9: Inmunidad innata y presentación de antígeno</b> .....	172
<b>Sesión 4: Autoinmunidad y tolerancia</b> .....	139	<i>Moderadores: Miguel López Botet (Univ. Pompeu Fabra, Barcelona), Dolores Jaraquemada (Univ. Autónoma Barcelona)</i>	
<i>Moderadores: Cándido Juárez (Hospital Univ. Sant Pau, Barcelona), Francisco J. García-Cozar (Hosp. Puerto Real, Univ. de Cádiz)</i>		<b>Sesión 10: Inmunodeficiencias secundarias</b> .....	180
<b>Sesión 5: Inmunodeficiencias y alergia</b> .....	148	<i>Moderadores: Ana M<sup>a</sup> García Alonso (Murcia), Margarita López Trascasa (Madrid)</i>	
<i>Moderadores: M<sup>a</sup> Cruz García Rodríguez (H. Univ. La Paz, Madrid), Ignacio J. Molina (Univ. de Granada)</i>		<b>Índice de Autores</b> .....	186

# Inmunología

Publicación oficial de la Sociedad Española de Inmunología  
www.inmunologia.org



## PROGRAMA CIENTÍFICO

### MARTES, 10 DE MAYO

- 15:00 Recogida de documentación
- 16:00-17:00 **Taller de Autoinmunidad** (Sala Julio Romero de Torres)  
**Coordinadores:** *Rosa Julia*, H.U. Son Dureta (Palma de Mallorca) e *Ingeborg Wichmann*, H.U. Virgen del Rocío (Sevilla)
- Taller de MHC** (Sala Ramírez de Arellano)  
**Coordinadora:** *Cristina González Roig*, H.U. Infanta Cristina (Badajoz)
- 17:00-18:00 **Taller de Citometría** (Sala Julio Romero de Torres)  
**Coordinadores:** *Félix García*, Centro Regional de Transfusiones (Madrid), *María Gil*, Hospital Gregorio Marañón (Madrid)
- Taller de Inmunoquímica** (Sala Ramírez de Arellano)  
**Coordinadores:** *Juan José Rodríguez Molina*, *Julia Sequí Navarro*, *Luisa M<sup>a</sup> Villar Guimerans*, Hospital Gregorio Marañón (Madrid), *Cándido Juárez Rubio*, Inmunología, Hospital Sant Pau (Barcelona)
- 20:00 **Cóctel de Bienvenida del Excmo. Ayuntamiento de Córdoba en el Alcázar de los Reyes Cristianos**

### MIÉRCOLES, 11 DE MAYO

- 9:00-11:00 **Simposio** (Salón de Actos)  
**Síndrome de inmunodeficiencia adquirida\***  
**Coordinador:** *José Peña*, H.U. Reina Sofía, Córdoba
- **Funcionalidad del sistema inmune tras terapia antirretroviral.** *M. Ángeles Muñoz*, H.U. Gregorio Marañón, Madrid.
  - **¿Puede inducir el tratamiento antirretroviral un efecto de tolerancia inmunológica?** *Antonio Rivero*, H.U. Reina Sofía, Córdoba.
  - **Respuesta discordante al tratamiento antirretroviral de alta potencia.** *Manuel Leal*, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.



## PROGRAMA CIENTÍFICO

---

- **Vacunación terapéutica con células dendríticas.** *Teresa Gallart.* Hospital Clinic. Barcelona.
- **¿Cuándo tendremos una vacuna contra el VIH?** *José Esparza.* Fundación GATES. Seattle. EE.UU.

\*Reconocimiento de interés Docente-Sanitario por la Red SIDA (Fis).

11:00-11:30

**Café**

11:30-12:30

**Conferencia Plenaria (Salón de Actos)**

**Células T reguladoras: una clave para el mantenimiento de la homeostasis inmunológica.**

*María Grazia Roncarolo*

12:30-14:00

**Comunicaciones Orales Sesión 1: Células T (Sala Julio Romero de Torres)**

**Moderadores:** *J. Merino* (Santander), *A. González* (Universidad de Vigo)

**Comunicaciones Orales Sesión 2: Autoinmunidad y genes (Sala Ramírez de Arellano)**

**Moderadores:** *J. Martín* (Granada), *F. Lozano* (Barcelona)

**Aula de Formación: células dendríticas (Salón de Actos)**

**Células dendríticas humanas: subtipos y abordajes experimentales para su estudio**

**Coordinador:** *Ángel L. Corbí.* CIB, CSIC, Madrid

- **Caracterización funcional de células dendríticas derivadas de monocito.** *Amaya Puig-Kröger.* CIB, CSIC, Madrid
- **Uso de las células dendríticas derivadas de monocitos como modelo para el estudio de la migración y la apoptosis *in vitro*.** *José Luis Rodríguez-Fernández.* CIB, CSIC, Madrid
- **Obtención y análisis de células dendríticas de sangre periférica.** *Paloma Sánchez-Mateos.* Hospital Gregorio Marañón. Madrid

14:00-15:30

**Almuerzo**

15:30-17:30

**Simposio (Salón de Actos)**

**Inmunodeficiencias primarias**

**Coordinadora:** *Nuria Matamoros.* H.U. Son Dureta. Palma de Mallorca

- **REDIP 2005.** *Nuria Matamoros.* H.U. Son Dureta. Palma de Mallorca
- **Las inmunodeficiencias primarias hoy.** *Nuria Matamoros.* H.U. Son Dureta. Palma de Mallorca
- **Inmunodeficiencias primarias: una historia y varias clasificaciones.** *Gumersindo Fontán.* H.U. La Paz. Madrid
- **Inmunodeficiencias funcionales de fagocitos.** *J. Carlos Rodríguez Gallego.* Hospital Negrín. Gran Canaria
- **Breaking central tolerance in primary immune deficiency.** *Luigi Notarangelo.* Hospital Pediátrico de Brescia. Universidad de Brescia, Italia

**Simposio (Sala Ramírez de Arellano)**

**Rafer**

- **Estudio de anticuerpos anti-HLA en trasplante renal.** *Rafael Solana.* Hospital Reina Sofía de Córdoba
- **Aplicación de los diferentes métodos de detección de anticuerpos anti-HLA en trasplantes.** *Manolo Muro.* Hospital Virgen de la Arrixaca de Murcia



## PROGRAMA CIENTÍFICO

---

- **Pruebas cruzadas por citometría de flujo y especificidades CDC y Luminex de los sueros del Taller de HLA 2005.** *Carlos Muñoz.* Hospital General Universitario de Alicante
- **Valor de la determinación de anticuerpos anti-HLA en un rechazo agudo humoral sin pérdida de injerto.** *Abelardo Caballero.* Hospital Carlos Haya de Málaga

18:00

Visita a Medina Azahara

### JUEVES, 12 DE MAYO

9:00-11:00

**Simposio (Salón de Actos)**

**Trasplantes**

**Coordinadora:** *Rocío Álvarez.* H.U. Virgen Arrixaca. Murcia

- **Sistemas menores de histocompatibilidad y trasplante alogénico de precursores hematopoyéticos.** *José Luis Vicario, G. Ercilla.* Centro Regional Transfusiones. Madrid
- **Factores moleculares y celulares que condicionan la aceptación de injertos hepáticos.** *Alfredo Minguela.* H.U. Virgen Arrixaca. Murcia
- **Current role of HLA Compatibility and presensitization in organ transplant.** *Gerhard Opelz.* Heidelberg. Alemania

11:00-11:30

**Café**

11:30-12:30

**Conferencia Plenaria (Salón de Actos)**

**Sistema de redes de investigación del IS Carlos III: inmunología**

*Francisco Gracia*

12:30-14:00

**Comunicaciones Orales Sesión 3: MHC y trasplantes (Sala Ramírez de Arellano)**

**Moderadores:** *J.L. Vicario* (Madrid), *R. González* (Córdoba)

**Comunicaciones Orales Sesión 4: Autoinmunidad y tolerancia (Sala Julio Romero)**

**Moderadores:** *C. Juárez* (Barcelona), *F. García-Cózar* (Cádiz)

**Simposio Becton & Dickinson (Salón de Actos)**

**Aplicaciones del ensayo multiplex en diferentes áreas de la inmunología**

- **CBA Flex Set. Cuantificación simultánea de hasta 72 parámetros por citometría de flujo.** *Rosario Luque Fernández.* Departamento de Aplicaciones BD Biosciences España
- **Ensayo Multiplex en el laboratorio de inmunología clínica. Su aplicación a estudios de inflamación, citocinas y quimioquinas en inmunodeficiencias primarias.** *Carlos Rodríguez Gallego.* Adjunto Servicio de Inmunología. Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria

14:00-15:30

**Almuerzo**

15:30-17:00

**Comunicaciones Orales Sesión 5: Inmunodeficiencias y alergia (Salón de Actos)**

**Moderadores:** *M.C. García* (Madrid), *I.J. Molina* (Granada)

**Comunicaciones Orales Sesión 6: Tumores (Sala Julio Romero de Torres)**

**Moderadores:** *F. Ruíz Cabello* (Granada), *I. Melero* (Pamplona)



## PROGRAMA CIENTÍFICO

---

**Simposio Workshop Palex (Sala Ramírez de Arellano)**

**Sistema ALEGRIA: ELISA para autoinmunidad en concepto monotest**

- **Presentación sistema Alegria Orgentec. Principales reactivos adaptados al nuevo analizador.** *Sebastian Kubsch.* Product Manager Orgentec Diagnostika GmbH
- **Características de funcionamiento del sistema Alegria. Adaptación al laboratorio de autoinmunidad.** *Ana Guergué.* Product Manager Palex Medical SA

17:00-17:30 **Café**

17:30-18:30 **Conferencia Plenaria (Salón de Actos)**  
**Papel de la inmunología en medicina transfusional.**  
*Marcela Contreras*

18:30 **Asamblea Plenaria de la SEI (Salón de Actos)**

### VIERNES, 13 DE MAYO

9:00-11:00 **Simposio (Salón de Actos)**  
**Autoinmunidad y tolerancia**  
**Coordinador:** *Manuel Santamaría.* H.U. Reina Sofia. Córdoba

- **Tolerancia materno-fetal.** *Enrique García Olivares.* H.U. San Cecilio. Granada
- **Mecanismos de inducción de tolerancia periférica.** *Francisco García-Cózar.* H.U. Puerto Real (Cádiz)
- **Alteraciones de los mecanismos vía TLR en procesos inflamatorios crónicos.** *Silvia Vidal.* H.U. Sant Pau (Barcelona)
- **Implicaciones en autoinmunidad de alteraciones en la supervivencia linfocitaria.** *Ramón Merino.* U. de Cantabria (Santander)
- **Mecanismos de destrucción de la mucosa intestinal en celiaquía.** *Bana Jabri.* Universidad de Chicago. EE.UU.

11:00-11:30 **Café**

11:30-12:30 **Conferencia Plenaria (Salón de Actos)**  
**Papel de los receptores NK en inmunidad.** *Lewis L. Lanier*

12.30-14.00 **Comunicaciones Orales Sesión 7: Citoquinas y señalización (Sala Julio Romero de Torres)**  
**Moderadores:** *M. López Hoyos (Santander), I. Moneo (Madrid)*

**Comunicaciones Orales Sesión 8: MHC (Sala Ramírez de Arellano)**  
**Moderadores:** *C. López Larrea (Oviedo), R. Solana (Córdoba)*

**Aula de Formación: Terapia génica (Salon de Actos)**  
**Terapia génica en inmunodeficiencias primarias y otras enfermedades monogénicas**  
**Coordinador:** *I. Molina*

- **Desarrollos y problemas actuales en inmunoterapia génica para enfermedades malignas.** *I. Melero.* Clínica Universitaria, Pamplona

14:00-15:30 **Almuerzo**



## PROGRAMA CIENTÍFICO

---

- 15:30-17:00 **Comunicaciones Orales Sesión 9: Inmunidad innata y presentación de antígeno**  
(Sala Julio Romero de Torres)  
**Moderadores:** *D. Jaraquemada* (Barcelona), *M. López-Botet* (Barcelona)
- Comunicaciones Orales Sesión 10: Inmunodeficiencias secundarias** (Sala Ramírez de Arellano)  
**Moderadores:** *A. García Alonso* (Murcia), *M. López Trascasa* (Madrid)
- 22:00 **Cena de Clausura**



## SESIÓN 1: CÉLULAS T

**Moderadores:** Africa González (Univ. de Vigo),  
Jesús Merino (Univ. de Cantabria)

**CARACTERIZACIÓN DE CTLs pp65 ESPECÍFICOS ESTIMULADOS *IN VITRO* EN INDIVIDUOS JÓVENES Y ANCIANOS.** *De la Rosa O, Peralbo E, Pita ML, Gayoso I, Casado JG\*, Peña J, Tarazona R\*, Solana R. Depto. Biología celular, Fisiología e Inmunología. Secc. Inmunología. H.U. Reina Sofía. Universidad de Córdoba (Córdoba). \*Depto. de Fisiología e Inmunología. Secc. Inmunología, Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura (Cáceres).*

**Introducción:** Se ha demostrado que el compartimento CD8 de la población linfocitaria es la mayor diana de la Inmunosenescencia. Existen dos posibles alteraciones que guardan una estrecha relación: La disminución de la población Naive por un lado y la expansión de la población CD28 negativa por otro. Dichas alteraciones podrían deberse a un efecto homeostático o bien estar dirigido por estimulación antigénica persistente, que daría lugar a un cúmulo de expansiones oligoclonales como consecuencia de la generación de células específicas con características efectoras/citotóxicas. Así, el objetivo del presente estudio fue caracterizar las alteraciones asociadas al envejecimiento en la población de células CD8 específicas frente al péptido inmunodominante CMV pp65<sub>495-503</sub> y su estudiar comportamiento en un modelo de expansión específica *in vitro*.

**Resultados:** Mediante el uso de pentámeros específicos frente pp65<sub>(495-503)</sub> se caracterizó fenotípicamente la población de CTLs-pp65 específicos en PBMCs de individuos jóvenes y ancianos sanos antes y después de estimular con dicho péptido. Los resultados mostraron que individuos ancianos presentaban un incremento significativo de células pp65 específicas y un incremento de la población CD28-CD27. La expresión de NK-Rs fue similar en jóvenes y en ancianos a excepción de CD244 que estaba incrementado en ancianos. Tras estimular con pp65 ON, las PBMCs de individuos ancianos presentaban mayor número de células productoras de IFN- $\gamma$ . A los 15 días de expansión se observó tanto en individuos jóvenes como en ancianos un aumento significativo en la frecuencia de células específicas así como un descenso en el porcentaje de CD27. No se encontraron cambios significativos en los porcentajes de CD28. Dado que CMV es el mayor generador de expansiones oligoclonales en individuos ancianos, podríamos postular que estas CTLs pp65 específicas estarían incluidas en la población de células T CD8+CD28-, NKR+ efectora /citotóxica que se encuentra incrementada en ancianos y que participarían en la defensa inmune contra HCMV.

**MODIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN DE INTERLEUQUINAS POR Crry/p65: PAPEL EN LA INDUCCIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS.** *Pini E, de Ojeda G, Jiménez-Periañez A, Rojo JM\*, Portolés P. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid) y \*Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC (Madrid).*

En los últimos años ha suscitado un gran interés una nueva subpoblación de células T CD4+: las células T reguladoras (Treg), debido a su gran potencial terapéutico en inmunopatologías, rechazo de trasplantes, y en los mecanismos de inmunosupresión de distintos patógenos. Se han descrito distintos subtipos de Treg de acuerdo con su fenotipo secretor de ILs, su mecanismo de acción inmunosupresora y el sistema de estudio. Varios de los subtipos median su función a través de la secreción de linfoquinas supresoras como IL10 o TGF $\beta$ .

Crry/p65 es una molécula de membrana de amplia expresión en células de ratón que tiene una doble funcionalidad: Por un lado regula la deposición de factores de complemento C3 y C4 sobre la propia célula. En segundo lugar, hemos descrito recientemente que Crry potencia las señales emitidas por el complejo TCR/CD3, y genera señales típicamente coestimuladoras incluyendo la fosforilación de JNK y p38, existiendo una fracción de Crry que se encuentra presente en "rafts" de membrana facilitando así su participación en la señalización intracelular.

Además, la coestimulación mediada por anticuerpos que reconocen Crry produce un aumento de la proliferación y de la secreción de ILs de fenotipo Th2, incrementando particularmente la secreción de IL10 a partir de linfocitos normales T CD4+. Por estas razones hemos analizado la capacidad de Crry de influir en la diferenciación *in vitro* de células T CD4+ hacia fenotipos supresores, productores de IL10, con capacidad para inhibir la respuesta de otras células T.

Uno de los problemas que presenta el estudio de células Treg es la dificultad para mantenerlas *in vitro* por su baja capacidad de proliferación. Hemos aprovechado la fuerte capacidad coestimuladora de proliferación generada por el Ab anti-Crry P3D2 para obtener células T CD4+ diferenciadas *in vitro* hacia poblaciones secretoras de IL-10 en número suficiente para poder ser utilizadas en ensayos de supresión.

Hemos puesto a punto las condiciones óptimas de tiempo de cultivo, intensidad de estímulo y coestímulo, presencia de interleuquinas añadidas y/o otros coestimulos para producir diferenciación *in vitro* de linfocitos T CD4+ hacia poblaciones productoras de IL-10. La tinción intracelular de estas células reveló que el coestímulo mediado por Crry incrementa el número de células productoras de IL-10 y de IL-4; indicando que el incremento de estas ILs en el sobrenadante de cultivo coestimulados a través de Crry se debe a un aumento del número de células secretoras.

Las poblaciones obtenidas *in vitro* en cultivos coestimulados por anti-Crry son capaces de suprimir la respuesta proliferativa de poblaciones CD4+CD25- (respondedoras) activadas por anti-CD3. Esta supresión es mayor que la obtenida en cultivos control realizados en presencia de células no coestimuladas.

Estos resultados sugieren la importancia de las moléculas coestimuladoras en el control de la respuesta inmune y la posible relación entre la inmunidad innata y la adquirida a nivel de los reguladores de complemento.

## REGULACIÓN DE LA RESISTENCIA DE CÉLULAS T A LA APOPTOSIS MEDIADA POR TRAIL. *Morales JC, Ruiz-Ruiz C. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.*

**Introducción:** El ligando de muerte TRAIL es un agente promotor en terapia antitumoral, ya que induce apoptosis selectivamente en células tumorales y no presenta toxicidad vía sistémica en modelos animales. Las células T, activadas o en reposo, parecen ser resistentes a la muerte inducida por este ligando, aunque los mecanismos en los que se basa dicha resistencia no se conocen con exactitud. También las células tumorales a menudo presentan diferentes mecanismos de resistencia frente a la apoptosis mediada por TRAIL de manera que se ha realizado un gran esfuerzo en la búsqueda de estrategias combinadas capaces de potenciar la acción de TRAIL sobre dichas células tumorales.

**Objetivos:** Estudiar la resistencia a TRAIL de células T en diferentes estados de activación y su posible regulación mediante el uso de agentes que modulan la sensibilidad a dicho ligando en modelos tumorales.

**Métodos:** La inducción de apoptosis se determinó mediante análisis por citometría de flujo del porcentaje de células hipodiploides tras tinción con yoduro de propidio. La activación y los niveles de caspasas, así como la expresión de otras proteínas implicadas en apoptosis, se analizó mediante western-blot. La expresión de los receptores de TRAIL en la membrana celular se determinó mediante citometría de flujo.

**Resultados y Conclusiones:** Las células T de sangre periférica, tanto en reposo como activadas, son resistentes a la apoptosis mediada por TRAIL. En ambas situaciones, las células T presentan bajos niveles de receptores pro-apoptóticos para TRAIL mientras que la expresión del receptor señuelo TRAIL-R4 es mayor, sobretodo en células T activadas, lo que podría jugar un papel importante en la resistencia de estas células a TRAIL. Utilizando diferentes agentes que regulan la sensibilidad de células tumorales a la acción de TRAIL, tales como drogas genotóxicas, inhibidores del proteosoma o inhibidores de NF- $\kappa$ B, observamos que muchos de estos tratamientos inducen muerte celular en linfocitos T aunque sólo la inhibición de NF- $\kappa$ B es capaz de sensibilizar a las células T en reposo y activadas a la muerte mediada por TRAIL. Estos datos sugieren que ciertas terapias combinadas de TRAIL, utilizadas para potenciar sus efectos sobre células tumorales, pueden también sensibilizar a las células T a la acción de este ligando de muerte.

## ACTIVACIÓN DE MAP KINASAS ERK1/2 VÍA CD6. *Ibáñez A, Far-nós M, Gimferrer I, Serra-Pagés C, Vives J, Lozano F. Servei d'Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut Clínic d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona.*

**Introducción:** CD6 es una glicoproteína de membrana tipo I perteneciente a la superfamilia de receptores SRCR (Scavenger Receptor Cystein Rich). CD6 se expresa en timocitos, linfocitos T maduros y linfocitos B1a (CD5+), así como en algunas regiones del cerebro. Existen algunas evidencias de que CD6 participaría en los procesos de activación y diferenciación linfocitaria y de que CD6 actuaría como una molécula accesoria capaz de transmitir señales co-estimuladoras en células T maduras. No obstante, la vía de señalización intracelular utilizada por CD6 es actualmente poco o nada conocida.

**Objetivo:** Analizar la vía de señalización de CD6 en linfocitos T, centrándonos en la participación de cascada de activación de las MAP cinasas ERK1/2.

**Resultados:** La estimulación de linfocitos de sangre periférica o de líneas celulares T (HUT-78) con distintos AcMos anti-CD6 (SPV-L14.2, 161.8 y MAE1-C10) induce la activación de ERK1/2 con un pico máximo a los 60 min. Dicha activación se produce en presencia de inhibidores de PI3K (LY294002), pero no en la de inhibidores de MEK1/2 (U0126) o de tirosincinasas Src (PP1). La activación de ERK1/2 vía CD6 no se observó en células T Jurkat deficientes en la expresión de la tirosincinasa lck (JCAM), así como del complejo TCR/CD3 (JRT3-T3.5). Ensayos de transfección con genes reporteros (luciferasa) demostraron que la estimulación vía CD6 activa los factores de transcripción FOS y AP-1.

**Conclusión:** Nuestros datos indican que la vía de señalización de CD6 incluye la activación de las MAP cinasas ERK1/2 de una forma dependiente de tirosincinasas.

## PAPEL DE H-RAS Y N-RAS EN EL DESARROLLO Y FUNCIÓN DE LAS CÉLULAS T. *Pulgar M, Iborra S, Soto M, Santos E\*, Alarcón B, Fernández E. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid.\*Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca.*

**Introducción:** La familia de proteínas Ras engloba proteínas con actividad GTPasa que intervienen en la transmisión de señales desde receptores de membrana. Estudios previos han demostrado que las proteínas Ras participan en la transmisión de señales iniciadas por el receptor de las células T (TCR) y que la inhibición de las mismas origina un bloqueo en el desarrollo de las células T en el timo. La estrategia utilizada en dichos estudios no permitía distinguir la contribución individual de cada una de las diferentes isoformas de Ras.

**Objetivos:** Determinar la relevancia individual de H-Ras y N-Ras en el desarrollo y función de las células T.

**Métodos:** a) Estudio del desarrollo de las células T y de la señalización a través del TCR en ratones deficientes para H-Ras o N-Ras. b) Infección de ratones deficientes en H-Ras o N-Ras con parásitos *Leishmania major*.

**Resultados:** La ausencia de H-Ras o N-Ras no altera el desarrollo de las células T en el timo. La señalización a través del TCR no es afectada por la carencia de H-Ras o N-Ras en células T inmaduras o maduras. Sin embargo, los ratones deficientes no son capaces de curar las lesiones producidas por la infección con *L. major*, lo que se correlaciona con una mayor parasitemia y con un mayor título de anticuerpos IgG1 frente al parásito.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren que H-Ras y N-Ras no son requeridos para el desarrollo de las células T en el timo. Sin embargo, la carencia de dichas isoformas supone una mayor susceptibilidad frente a la infección por *L. major*. Aunque aún no ha sido identificado el proceso responsable de esta mayor susceptibilidad, la deficiencia en H-Ras o N-Ras se asocia con el mantenimiento de una respuesta de tipo Th2, opuesta a la necesaria para un eficiente control de la infección por *L. major*.

## CARACTERIZACIÓN COMPARATIVA DEL COMPLEJO TCR $\alpha\beta$ /CD3 EN LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup>. *Rossi NE<sup>1</sup>, Pulgar M<sup>2</sup>, Fernández E<sup>2</sup>, Ramírez C<sup>1</sup>, Rodríguez-López RM<sup>1</sup>, Gómez del Moral M<sup>1</sup>, Toribio ML<sup>3</sup>, Alarcón B<sup>2</sup>, Regueiro JR<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco, Madrid. <sup>3</sup>Centro Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid.*

**Introducción:** Nuestros resultados anteriores indicaban que existen diferencias conformacionales o topológicas específicas de linaje en el complejo TCR/CD3 de los linfocitos T $\alpha\beta$  CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> humanos maduros.

**Objetivos:** Nos proponemos confirmar estos hallazgos en otras especies (ratón y primates) y explorar posibles razones bioquímicas para las diferencias detectadas, entre las que favorecemos: glicosilación o distribución topológica diferencial.

**Metodología:** La topología del complejo TCR/CD3 se analizó por citometría de flujo de 3 colores en linfocitos CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>+</sup> primarios de donantes sanos con consentimiento informado, ratones y primates, tratados o sin tratar, utilizando anticuerpos CD3- o TCR-específicos. La importancia de la glicosilación se analizó utilizando inhibidores específicos de la N-glicosilación como la tunicamicina. Las balsas lipídicas se desorganizaron con metil beta ciclodextrina. El análisis inmunohistoquímico, se llevó a cabo sobre fragmentos de timo congelados obtenidos con consentimiento informado durante cirugía cardíaca de niños de entre 1 y 3 años.

**Resultados y Conclusiones:** El barrido epitópico del TCR-CD3 en linfocitos T primarios normales con una amplia batería de mAb demostró que a diferencia del resto, RW2-8C8 tenía mejor los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que los CD4<sup>+</sup>. En ratón y primates se confirma plenamente lo obtenido en humano (en ratón: KT3 se comporta como RW2-8C8, 2C11 como UCHT1; en primates SP34 se comporta como UCHT1), además hemos extendido el estudio a tejidos linfoides de ratón (ganglio, bazo) y en ratones deficientes de CD3 $\gamma$ . En timo humano no observamos diferencias en la distribución del epítipo reconocido por RW2-8C8 y Leu-4. SK7 (pero no UCHT1, OKT3 y MEM-57) reconoce un epítipo dependiente de N-glicosilación (sensible a tunicamicina) en CD4<sup>+</sup> pero no en CD8<sup>+</sup>. La tinción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con RW2-8C8 era más dependiente de la integridad de las balsas lipídicas que en los CD4<sup>+</sup>. Además, hemos observado mediante diluciones y citometría comparativa que la afinidad de RW2-8C8 por los linfocitos CD8<sup>+</sup> cae más rápidamente que por los CD4<sup>+</sup>, mientras que la de UCHT1 lo hace al revés, lo que refuerza la idea de que reconocen complejos conformacionalmente distintos.

Dichas diferencias pueden ser importantes para las interacciones en cis durante el reconocimiento de antígeno y la transducción de señales por los linfocitos T, y podrían explotarse con fines terapéuticos linaje-específicos, bien para atenuar los excesos de la respuesta inmunitaria comunes a las enfermedades autoinmunes, aloinmunes (rechazo de injertos) y alérgicas, o bien para estimularla en enfermedades infecciosas o tumorales.

**DINÁMICA DE LA INTERNALIZACIÓN DEL COMPLEJO pre-TCR HUMANO.** *Navarro MN, Álcover A, Toribio ML.* Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Madrid.

La expresión del complejo pre-TCR humano durante el desarrollo de los linfocitos T es uno de los principales puntos de regulación de dicho proceso.

La expresión de este complejo está restringida a una ventana temporal muy estrecha durante la diferenciación T y a unos niveles muy bajos en la membrana (entre 50-100 veces menos que los complejos TCR $\alpha\beta$  convencionales).

Estos datos, junto con el potencial oncogénico que posee este receptor, apuntan a un estrecho control de los niveles de expresión en superficie, puesto que carece de un ligando que pueda regular su señalización.

Datos generados en nuestro laboratorio demostraron que el complejo pre-TCR humano se internaliza y se degrada de forma constitutiva, en ausencia de estímulo, exhibiendo un comportamiento similar a los complejos TCR activados. Esta propiedad reside en el tallo intracitoplásmico de la cadena pre-TCR $\alpha$  (pT $\alpha$ ).

Nuestro objetivo ha sido el estudio dinámico del proceso de transporte intracelular que conduce al complejo pre-TCR desde la membrana hasta los lisosomas.

Para ello hemos seguido la internalización del complejo pre-TCR con anticuerpos específicos contra la cadena pT $\alpha$  mediante microscopía confocal, disecionando su paso por distintos orgánulos intracelulares (endosomas tempranos y lisosomas) mediante su colocalización con marcadores específicos de dichos orgánulos.

Estos datos se han complementado con estudios sobre la dinámica del complejo en la superficie celular mediante citometría de flujo.

Esta nueva aproximación experimental nos ha permitido determinar que el transporte intracelular del complejo pre-TCR es mucho más rápido del descrito anteriormente para el complejo TCR, puesto que la velocidad de llegada a los lisosomas es entre 6-8 veces mayor para el pre-TCR.

Este tipo de estudios nos proporciona una nueva herramienta para estudiar la cascada de señalización, iniciada por la cadena pT $\alpha$ , que controla este proceso (estudio del papel del citoesqueleto, Src quinasas, proteínas adaptadoras como CMS y Cin85, etc...).

La rápida degradación que sufre el complejo pre-TCR tras su expresión en la membrana apoya la hipótesis de la existencia de una autorregulación de los niveles de expresión y por tanto, de la señalización, imprescindible para asegurar el correcto paso al siguiente estadio madurativo y el control del potencial oncogénico de este receptor.

**INCREASED CD38 EXPRESSION, LIPID RAFT OCCUPANCY AND ALTERED CD4:CD8 RATIO IN T CELLS UPON MITOGENIC STIMULATION.** *Pavón EJ<sup>1</sup>, Muñoz P<sup>1</sup>, Raya-Álvarez E<sup>2</sup>, Callejas-Rubio JL<sup>2</sup>, Navarro-Pelayo F<sup>2</sup>, Ortego-Centeno N<sup>2</sup>, Zubiaur M<sup>1</sup>, Sancho J<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Departamento de Biología Celular e Inmunología. Instituto de Parasitología y Biomedicina. CSIC. Armilla (Granada). Spain. <sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas. Hospital Clínico San Cecilio. Granada. Spain.

**Introduction:** We have previously demonstrated that in T cells CD38 is constitutively associated with lipid rafts. Furthermore, CD38 in rafts is able to initiate and propagate several activating signaling pathways, possibly by facilitating critical associations within other raft subsets, per example LAT rafts, via its capacity to interact with Lck and CD3 $\zeta$ .

**Objectives:** In this study we have determined whether there is a relationship between CD38 expression on T cells, its distribution in different membrane microdomains, and T cell activation.

**Methods:** Rafts and non-raft fractions were isolated by sucrose gradient ultracentrifugation upon lysis of purified T cells in Brij 98 at 37°C (isolated by negative selection using magnetic beads). Purified T cells were analyzed for surface expression of CD3, CD4, CD8, CD38, and GM1 by single or double-staining using FITC-, or PE-labeled anti-CD3, anti-CD4, anti-CD8, anti-CD38 mAbs, and Cholera Toxin subunit B (CTB), in the relevant combinations.

**Results:** The data show that mitogenic stimulation of normal resting T cells with PHA in the presence of IL-2 induced increased CD38 expression and its translocation into lipid rafts. This may be associated

with an augmentation in the proportion of the plasma membrane adopting a lipid raft structure, as judged by the increased expression of the raft marker GM1 on the cell surface, and the distinct expansion of the CD38<sup>+</sup>GM1<sup>+</sup> T cells. Moreover, PHA-stimulated normal T cells had a significantly reduced CD4:CD8 ratio compared with that of *ex vivo* T cells ( $P = 0.0052$ ), which was caused by a significant reduction in the percentage of CD4<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.0145$ ), and an increase in the percentage of CD8<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.0156$ ).

**Conclusions:** Increased expression of CD38 in floating rafts from activated normal T cells may modulate TCR signaling by providing or sequestering signaling molecules to the engaged TCR.

**COMPARATIVE PROTEOMICS ANALYSIS OF REGULATORY CD4CD25<sup>+</sup> CELLS VERSUS MEMORY AND NAIVE T CD4 T CELL POPULATIONS.** *Marti M, Costa M, Xufre C, Codina E, Alvarez I, Canals F, Jaraquemada D. Unitat d'Immunologia e Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona, Spain. \*Proteomics Service, Vall d'Hebron Research Institute, Vall d'Hebron Hospital, Barcelona, Spain.*

CD4CD25<sup>+</sup> T cells are naturally occurring regulatory T cells that have a role in the regulation of autoimmune responses by preventing destructive self reactivity in the periphery. These cells are defined by their expression of high levels of IL-2 receptor  $\alpha$  chain (CD25). They also express other markers such as CD122, CTLA4 and GITR, although neither of them is exclusive of this cell population. The only marker so far that appears to be specific of Tregs is FoxP3, a transcription factor involved in the regulation of their development and function. However, being a nuclear factor, FoxP3 can not be used to purify and isolate this very small population of cells.

In the absence of a specific surface marker, we have begun a systematic proteomics approach that may eventually lead us to the definition of a more comprehensive profile of the specific proteome of these cells and identify molecules that can be used for the isolation of the Treg population.

CD4<sup>+</sup> T cells from healthy donors' PBMC were sorted in three population, according to their expression level of CD25: CD25<sup>+</sup>, CD25<sup>+</sup> and CD25<sup>-</sup>, that respectively correspond to Tregs, memory-effector CD4 T cells and CD4 naïve T cells. The regulatory phenotype of the CD25<sup>+</sup> sorted population was confirmed by the high expression of FoxP3 by real time PCR. The sorted T cell populations from 4 control blood samples were analysed by 2D-gels and comparative proteomics using the Ettan-DIGE system. This technique allows the separation of two proteomes in the same gel by labelling samples with different fluorescent dyes, thus reducing the gel-to-gel variation frequently found in conventional 2D-gel electrophoresis for proteomics analysis. In addition, the DIGE system allows quantification of the protein expression by using an internal standard labelled with a third dye and thus comparative statistics can be applied. Results from the first analysis have revealed differences in protein expression by the three cell populations. 54 spots showing significant expression differences ( $p < 0.05$ ) were found, of which 44 could be picked up from the gel for MALDI-Tof-Tof mass spectrometry sequencing. Two-by-two comparison between the three populations yielded 27 spots that were significantly increased in CD25<sup>+</sup> vs CD25<sup>-</sup> and 13 that were decreased, 11 and 7 respectively in CD25<sup>+</sup> vs CD25<sup>+</sup> and 19 and 3 in CD25<sup>+</sup> vs CD25<sup>-</sup>. At a first glance, the differentially expressed proteins that are increased in the CD25<sup>+</sup> population belong to three groups: cytoskeleton proteins, proteins that

protect from apoptosis and signalling proteins. Although no evidence of specificity have been found, the data so far suggest that resting CD25<sup>+</sup> cells have a activation phenotype that may be related to their standing capacity of regulating effector cell function.

*Funded by FIS PI02113 and the Eurothymaide Project.*

**ACTIVIDAD ANTIPROLIFERATIVA SOBRE CÉLULAS T DE EXOPOLISACÁRIDOS SULFATADOS PRODUCIDOS POR MICROORGANISMOS HALÓFILOS MODERADOS.** *Mata JA<sup>1</sup>, Quesada E<sup>1</sup>, Molina JP. <sup>1</sup>Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia y <sup>2</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.*

Los microorganismos halófilos moderados crecen en concentraciones de ClNa comprendidas entre el 3 y el 15%. En estos hábitats salinos hemos identificado recientemente nuevas bacterias (*Halomonas maura*; *Halomonas anticariensis*; *Halomonas ventosae*, etc) productoras de exopolisacáridos, que están compuestos fundamentalmente por distintos carbohidratos (homopolisacáridos; heteropolisacáridos; ácidos urónicos, etc.) así como distintos sustituyentes orgánicos e inorgánicos, entre los que se encuentran de manera excepcional los grupos sulfato. No obstante, el grupo de bacterias halófilas descrita por nosotros producen en todos los casos exopolisacáridos sulfatados. Se ha descrito previamente que determinados grupos sulfato tienen actividad moduladora de la proliferación en distintos tipos celulares. En este trabajo, hemos evaluado la actividad sobre la proliferación celular de 4 heteropolisacáridos (B100; FP34; N12 y Maurano) con distintos grados de sulfatación. La actividad moduladora de la proliferación de estos heteropolisacáridos fue evaluada mediante un ensayo de MTT en células Jurkat y CEM a 24, 48 y 72 horas de cultivo. Los polímeros nativos, con una composición de entre el 3-7% de grupos sulfato, fueron utilizados a concentraciones entre 500 y 0,005  $\mu\text{g/ml}$ , usando como controles los propios polímeros a los que se había incrementado la proporción de grupos sulfato mediante el complejo piridina-S03 hasta un máximo del 27% así como estos mismos polímeros desulfatados mediante solvolisis en dimetil sulfoxido. De entre los polímeros analizados, el polímero nativo B100 producido por *Halomonas maura* inhibe en un efecto dosis-dependiente hasta en un 50% la proliferación de las células T analizadas, mientras que este porcentaje alcanza el 90% de inhibición de la proliferación en el caso del polímero B100 hipersulfatado. Los polímeros FP34, N12 y Maurano producen inhibiciones en torno al 50% del crecimiento de las células no tratadas. Por tanto, los exopolisacáridos producidos por bacterias halófilas moderadas pueden tener un importante papel en como inhibidores de la proliferación celular.

## SESIÓN 2: AUTOINMUNIDAD Y GENES

**Moderadores:** Francisco Lozano (Hospital Clinic, Univ. Barcelona), Javier Martin (Inst. López Neyra, CSIC, Granada)

**ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO FUNCIONAL DE PROTEIN TYROSINE PHOSPHATASE NON RECEPTOR 22 (PTPN22) CON ARTRITIS REUMATOIDE Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.** *Orozco G, Sánchez E, González-Gay MA, Torres B, Ortego N, Jiménez-Alonso J, Pascual-Salcedo D, Balsa A, de Pablo R, Núñez-Roldán A, González Escribano MF, Martín J. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Granada.*

**Objetivos:** Analizar la posible asociación entre el polimorfismo C1858T del gen *PTPN22* y la predisposición y la expresión clínica de dos enfermedades autoinmunes sistémicas, artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso sistémico (LES).

**Metodología:** Nuestra población a estudio consistió en 826 pacientes con AR, 338 pacientes con LES y 1036 individuos sanos. Todos los individuos fueron de origen español caucásico. El genotipaje del polimorfismo C1858T del gen *PTPN22* fue llevado a cabo mediante reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real, utilizando el ensayo de discriminación alélica 5' con sondas Taqman fluorescentes.

**Resultados:** La distribución global de genotipos en los pacientes con AR fue significativamente diferente de la de los controles ( $P=0.005$ , mediante test chi cuadrado con tablas de contingencia 2x3). Observamos una diferencia estadísticamente significativa en la distribución del alelo *PTPN22* 1858T entre individuos sanos (7.4%) y los pacientes de AR (10.4%) ( $P=0.001$ , odds ratio [OR] 1.45 [95% intervalo de confianza (95% IC) 1.15-1.83]). Además, los genotipos *PTPN22* 1858 C/T y T/T estaban presentes con una frecuencia mayor en pacientes de LES que en controles ( $P=0.02$ , OR 1.55 [95% IC 1.05-2.29]). También observamos diferencias cuando las frecuencias alélicas fueron comparadas, estando presente el alelo *PTPN22* 1858T con mayor frecuencia entre los pacientes de LES ( $P=0.03$ , OR 1.45 [95% IC 1.01-2.09]) que en los controles sanos.

**Conclusiones:** estos resultados sugieren que el alelo *PTPN22* 1858T podría conferir susceptibilidad a AR y LES en la población española.

**ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO FUNCIONAL DEL GEN DEL INTERFERON GAMMA CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD CELÍACA.** Rueda B<sup>1</sup>, Martínez A<sup>2</sup>, Mas-Fontao A<sup>2</sup>, Ortega E<sup>3</sup>, Fernández-Arquero M<sup>2</sup>, Urcelay E<sup>2</sup>, Gomez de la Concha E<sup>2</sup>, Martín J. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Granada, Spain. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid, Spain. <sup>3</sup>Servicio Pediatría, Hospital Clínico San Cecilio, Granada, Spain.

**Introducción:** La enfermedad celíaca (EC) es una enteropatía crónica de origen autoinmune que aparece en individuos genéticamente predisuestos tras la ingesta diaria de gluten. Se ha sugerido que genes fuera de la región HLA podrían contribuir en la susceptibilidad a EC. En la respuesta inmune generada frente al gluten se secretan un amplio espectro de mediadores proinflamatorios, siendo uno de los más relevantes el interferon gamma (IFN $\gamma$ ). Los pacientes celíacos presentan altos niveles de expresión de IFN $\gamma$  así como un elevado número de células T productoras de IFN $\gamma$ . En el intrón uno del gen del IFN $\gamma$  se describió un microsatélite consistente en un número variable de repeticiones CA que resultó tener relevancia funcional afectando a los niveles de expresión de IFN $\gamma$ .

**Objetivos:** Analizar la influencia del microsatélite funcional de IFN $\gamma$  en la susceptibilidad a EC.

**Pacientes y Métodos:** Se realizó un estudio familiar en el que se incluyeron 220 familias caracterizadas por la presencia de un hijo afectado de EC y un estudio caso-control en el que se incluyeron 330 pacientes celíacos y 499 controles. El tipaje del microsatélite CA se llevó a cabo mediante PCR combinada con tecnología fluorescente.

**Resultados y Conclusiones:** En el estudio familiar se observó que el alelo 124 bp (12 CA) asociado con una mayor producción de IFN $\gamma$  se transmitía de forma estadísticamente significativa a los hijos enfermos ( $P=0.006$ ;  $P_c=0.02$ ), mientras que el alelo 126 pb (13 CA) relaciona-

do con menor producción de IFN $\gamma$  mostraba la tendencia opuesta siendo preferentemente no transmitido a los hijos enfermos ( $P=0.006$ ;  $P_c=0.02$ ). Sin embargo, esta tendencia no se pudo confirmar con el estudio caso control a través del cual no se observó asociación directa de ninguno de los alelos del microsatélite con EC. Esto podría deberse a efectos de origen parental en el microsatélite CA, de hecho se comprobó que el alelo 126 bp era preferentemente no transmitido por los padres y no por las madres. Nuestros resultados sugieren que el microsatélite CA de IFN $\gamma$  podría jugar un papel relevante en la susceptibilidad a EC en nuestra población.

**ESTUDIO DEL MARCADOR CT60 (A/G) DEL GEN CTLA-4 EN PACIENTES ESPAÑOLES CON ARTRITIS REUMATOIDE.** Torres B<sup>1</sup>, Orozco G<sup>3</sup>, García A<sup>2</sup>, Núñez-Roldán A<sup>1</sup>, González-Escribano M<sup>1</sup>, Martín J. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Reumatología, HHUU Virgen del Rocío. SAS. Sevilla. <sup>3</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina "López Neyra". CSIC. Granada.

**Introducción:** La región cromosómica 2q33 se ha propuesto como zona de susceptibilidad a la artritis reumatoide (AR). Dentro de esta región se encuentra el gen CTLA-4 que se expresa en la superficie de células T activadas. La unión de la molécula a sus ligandos tiene un papel inhibitorio en la activación de células T, por lo tanto podría estar implicado en la susceptibilidad a la AR.

**Objetivos:** Estudiar la posible asociación del dimorfismo CT60 (A/G) localizado en la región 3'UTR del gen CTLA-4 con la susceptibilidad a la AR.

**Material y Métodos:** Contamos con un total de 433 pacientes diagnosticados de AR según los criterios de la ACR pertenecientes al H.U. Virgen del Rocío (Sevilla) y al Hospital Virgen de las Nieves de Granada y 398 controles sanos de la misma zona geográfica. Todos los individuos habían sido previamente tipados en DRB1.

El genotipaje del CT60 se llevó a cabo por dos métodos distintos, las muestras de Sevilla se genotiparon mediante PCR-RFLP utilizando la enzima de restricción NcoI y las de Granada mediante sondas TaqMan.

**Resultados:** No se observaron diferencias en la distribución de frecuencias genotípicas ni alélicas entre el grupo de pacientes y el grupo control. Tampoco se encontraron diferencias al separar a los pacientes de AR según la presencia/ausencia de epítipo HLA compartido.

**Conclusión:** El dimorfismo CT60 no parece estar implicado en la susceptibilidad a padecer AR en nuestro grupo de pacientes.

**LA COLITIS ULCEROSA CON MANIFESTACIONES ARTICULARES COMPORTE DETERMINANTES GENÉTICOS CON LA ARTRITIS REUMATOIDE.** Núñez C<sup>1</sup>, Alecsandru D<sup>1</sup>, Mendoza JL<sup>2</sup>, Urcelay E<sup>1</sup>, Fernández-Arquero M<sup>1</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>, Martínez A<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Servicio de Aparato Digestivo. Hospital Clínico San Carlos. Madrid

**Objetivos:** La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria intestinal de etiología desconocida que puede presentar diversas afectaciones extraintestinales, de las cuales las más frecuentes son las manifestaciones articulares. Es razonable pensar que estas características tengan una base genética, en la cual el MHC podría jugar un papel importante. Por tanto, nuestro objetivo en el presente estudio es deter-

minar el papel del gen HLA-DR y de los microsatélites TNF $\alpha$  en el desarrollo de las manifestaciones articulares en pacientes con colitis ulcerosa.

**Metodología:** Se estudió un total de 256 pacientes de CU, 84 con manifestaciones articulares y 172 sin tales manifestaciones. También se incluyeron 595 individuos sanos con fines comparativos. Todos los individuos fueron genotipados para los microsatélites TNF $\alpha$  y HLA-DR. El estudio de la posible influencia de ambos loci, en conjunto o individualmente, en el desarrollo de las manifestaciones articulares se llevó a cabo comparando las frecuencias fenotípicas entre ambos grupos mediante tests chi-cuadrado o el test exacto de Fisher cuando los valores esperados eran menores de 5. Se estimaron frecuencias haplotípicas empleando el programa Arlequin. La influencia de los alelos HLA-DRB1\*0103 y HLA-B27, factores cuya asociación a las manifestaciones extraintestinales era previamente conocida, ha sido particularmente considerada.

**Resultados:** El minihaplotipo TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5 aumenta la susceptibilidad a desarrollar manifestaciones articulares ( $p = 0,003$ ; OR = 2,39;  $p = 0,0003$ ; OR = 2,44 vs. controles). El locus HLA-DR no parece estar implicado por sí mismo en estas manifestaciones extraintestinales. Sin embargo, la frecuencia de los haplotipos DR1-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5, DR11-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5 y DR7-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5 es mucho mayor en los individuos con manifestaciones articulares que en el grupo de pacientes sin ellas ( $p = 3,9 \cdot 10^{-8}$ ;  $p = 1,1 \cdot 10^{-15}$  vs. controles). Estas asociaciones eran independientes de HLA-DRB1\*0103 y HLA-B27.

**Conclusiones:** El desarrollo de manifestaciones articulares en pacientes de CU parece estar influenciado por algún factor genético presente en los haplotipos DR1-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5, DR11-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5 y DR7-TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5. Dado que TNF $\alpha$ 6 $\beta$ 5 se ha asociado repetidamente a la artritis reumatoide, los resultados obtenidos en este trabajo apuntan hacia la existencia de un componente genético parcialmente común a ambas patologías.

**HLA-DRB1\*1501 Y SU HAPLOTIPO ANCESTRAL AH7.1 EN COLITIS ULCEROSA. MARCADORES GENÉTICOS DIFERENCIALES DE EXTENSIÓN DE LA ENFERMEDAD EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y NEERLANDESA.** **Alecsandru D<sup>1</sup>, de Vries B<sup>2</sup>, Nuñez C<sup>1,2</sup>, Martínez A<sup>1</sup>, Pena S<sup>2</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. <sup>2</sup>Laboratory of Immunogenetics, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam, Países Bajos

**Introducción y Objetivos:** estudios genéticos y epidemiológicos han proporcionado evidencia clara de la importancia de los factores genéticos en la predisposición a la enfermedad y en la patofisiología y características clínicas de la colitis ulcerosa. Los genes del complejo principal de histocompatibilidad son genes candidatos interesantes a causa de su papel en la respuesta inmune, pero las asociaciones encontradas han sido difíciles de replicar debido a la heterogeneidad clínica y genética de la enfermedad. Una de las asociaciones más controvertidas ha sido la del alelo DR2 y su principal subtipo DRB1\*1501. Este se encuentra en más del 50% de los individuos formando parte del haplotipo ancestral AH 7.1. Nuestro objetivo es determinar la influencia de dicho alelo dependiendo de su contexto haplotípico y de la extensión de la enfermedad, tanto en la población española como en la neerlandesa.

**Metodología:** en este estudio, hemos investigado la distribución de los alelos de TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , MICA e IKBL en relación con DRB1\*1501 en pacientes neerlandeses ( $n=177$ ) y españoles ( $n=325$ ) de colitis ulcerosa y en controles étnicamente pareados (115, y 595 respectivamente). Todos

los individuos fueron tipados genéricamente para HLA-DR y subtipados para DR2 mediante amplificación por PCR seguida de hibridación con sondas específicas de alelo. También tipamos tres microsatélites en la región central del MHC (TNF $\alpha$ , TNF $\beta$  y el polimorfismo transmembrar del gen MICA) mediante amplificación con primers marcados con fluorescencia seguida de electroforesis capilar, y el polimorfismo bialélico +738C/T en el gen IKBL mediante PCR específica de alelo seguida de electroforesis en gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

**Resultados:** el alelo HLA-DRB1\*1501 se asocia a pancolitis en la población neerlandesa (OR=2.33;  $p=0.007$ ) pero sólo en ausencia de los marcadores del AH7.1 incluyendo TNF $\alpha$ 11, b4 y MICA5, 1 ( $p=0.0003$ , OR=5.36). Por otra parte, el polimorfismo IKBL +738C/T no tiene un efecto general sobre la susceptibilidad o en la extensión en los pacientes neerlandeses con colitis ulcerosa. En cambio, en la población española no se encuentra asociación del alelo HLA-DRB1\*1501 con ninguna de las formas clínicas ni en ninguno de sus haplotipos, pero sí se observa una asociación de IKBL+738C (OR=3.93;  $p=2 \times 10^{-6}$ ) con la forma extensa de la enfermedad.

**Conclusiones:** pensamos que un factor indeterminado en el haplotipo ancestral AH7.1 neutraliza los efectos del alelo HLA-DRB1\*1501 en pacientes neerlandeses con pancolitis. Nuestro estudio muestra que los marcadores de susceptibilidad o de afectación clínica pueden variar de una población a otra, probablemente por una diferente prevalencia en ellas de los haplotipos ancestrales, lo que modifica el grado de desequilibrio de ligamiento entre los marcadores y las mutaciones etiológicas.

**PROTEINASE ACTIVATED RECEPTOR 1: UN NUEVO MARCADOR DIFERENCIAL DE COLITIS ULCEROSA.** **Martín MC, Mendoza JL, Díaz-Rubio M, Urcelay E, Gómez de la Concha E.** Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Objetivo:** los Proteinase Activated Receptors (PARs) juegan un papel importante en las respuestas desencadenadas por serinproteinasas, que los activan por escisión. Están acoplados a proteínas G para activar la transducción de señales para la traducción rápida de proteínas inflamatorias. PAR-1 es un modulador de apoptosis activado por trombina dependiente de PKC que podría colaborar en remodelación tisular en algunas enfermedades inflamatorias. La activación de PAR-1 y PAR-2 lleva a una marcada respuesta inflamatoria; sus antagonistas ejercen efecto protector al reducir la expresión de TNF $\alpha$  y  $\gamma$ IFN. El PAR-1 se halla aumentado en biopsias de colon de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal (IBD). Por todo esto parece que el PAR-1 está involucrado en la patogénesis de la IBD y nos propusimos comprobar si una mutación en el gen PAR-1 está relacionada con el aumento de susceptibilidad a la IBD en la población española.

**Materiales y métodos:** Se llevó a cabo un estudio caso-control con 300 pacientes CD (Crohn's Disease), 252 pacientes UC (Ulcerative Colitis) y 376 sujetos sanos de la misma población. Se testó un SNP intrónico (rs153311) con un ensayo TaqMan de PCR en tiempo real según las recomendaciones del fabricante (Applied Biosystems, C30607991\_10). El análisis estadístico de los resultados se realizó con SPSS 12.0 y Epiinfo 6.0.

**Resultados:** Se encontró que la frecuencia de mutación del SNP estaba significativamente aumentada en los pacientes de colitis ulcerosa (modelo dominante para el alelo de susceptibilidad:  $p=0.018$ , OR [95% CI]= 1.5 [1.05-2.14]), pero no en los de enfermedad de Crohn.

**Conclusión:** Este es el primer estudio de asociación que muestra un papel del gen PAR-1 en la etiología de la colitis ulcerosa.

**NUEVAS VARIANTES DE MASP2 DETECTADAS EN NORTEAFRICANOS Y SUBSAHARIANOS.** *Lozano F<sup>1</sup>, Suárez B<sup>1</sup>, Muñoz A<sup>2</sup>, Jensenius JC<sup>3</sup>, Mensa F<sup>1</sup>, Vives J<sup>1</sup>, Horcajada JP<sup>2</sup>.* <sup>1</sup>Servei d'Immunologia y <sup>2</sup>Malalties Infeccioses, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universidad de Barcelona, Barcelona. <sup>3</sup>Department of Medical Microbiology and Immunology, University of Aarhus, Aarhus.

**Introducción:** La vía de las lectinas de activación del sistema del Complemento se pone en marcha cuando determinados carbohidratos de la superficie de microorganismos son reconocidos por MBL (mannan-binding lectin) en asociación con MASP-2 (MBL-associated serine protease 2). Mutaciones en el promotor y en el exón 1 del gen *MBL2*, presentes en todas las poblaciones humanas, son responsables niveles séricos disminuidos de MBL y se asocian con un riesgo elevado de padecer procesos infecciosos. Recientemente, trabajos en población danesa han revelado la existencia de una mutación en el gen *MASP2* que introduce un cambio aminoacídico en su dominio CUB1 (Asp105Gly) y que se asocia con una disminución en los niveles séricos de MASP-2.

**Objetivo:** Analizar la incidencia de polimorfismos del exón 3 de gen *MASP2* tanto en población española como en población africana (árabe norteafricana y negra subsahariana) **Resultados:** El análisis por SBT (sequence-based typing) de polimorfismos de los genes *MBL2* y *MASP2* en un grupo de 65 Africanos (50 Norteafriicanos y 15 SubSaharianos) y 104 españoles permitió la identificación de tres nuevas variantes de *MASP2* que introducen cambios aminoacídicos en las posiciones 84 (Arg→Gln), 103 (Arg→Cys) and 111 (Pro→Leu) de la proteína madura (dominio CUB1). Ninguna de estas variantes se detectó en la población española analizada. La variante Arg84Gln se detectó en 4 de los 15 Subsaharianos pero en ninguno de los Norteafriicanos. Las variantes Arg103Cys y Pro111Leu se detectaron solo en Norteafriicanos (en 2 y 4 individuos, respectivamente). La variante Asp105Gly se detectó tanto en población española como entre norteafricanos (3 y 2 individuos, respectivamente), pero con una frecuencia inferior a la reportada en daneses (5.5%).

**Conclusión:** Tal y como sucede con los polimorfismos de *MBL2*, la marcada distribución geográfica de las nuevas variantes de *MASP2* podría ser la consecuencia de la adaptación a diferentes situaciones medioambientales.

**PREVALENCIA DE LA MUTACIÓN CUB1 DE LA SERÍN-PROTEASA-2 ASOCIADA A MBL (MASP-2) EN POBLACIÓN CANARIA Y PACIENTES CON DIVERSAS PATOLOGÍAS.** *García-Laorden MI, García-Saavedra A, Rodríguez de Castro F, Solé J, Rúa-Figueroa I, Domínguez Acosta A, Caballero A, Cárdenas M, Rodríguez-Gallego C.* *Servicios de Inmunología, Neumología, UMI y U. de Investigación. Hptal. Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín.*

**Introducción:** El complejo formado por la lectina de unión a manosa (MBL) y al menos dos serín-proteasas asociadas, MASP-1 y MASP-2, inicia la vía MBL-dependiente de activación del sistema del complemento. La MASP-2 actúa sobre los factores de complemento C4 y C2, generando la convertasa de C3 C4bC2b. Se ha descrito la existencia de una mutación en el gen de la MASP-2 en un paciente con episodios de infección e inflamación de repetición, así como hipocomplementemia.

**Objetivos:** Identificación de la prevalencia de la mutación CUB1 de MASP-2 para determinar su efecto en la defensa inmunológica y el desarrollo de enfermedad inflamatoria.

**Metodología:** Se analizó mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR) la mutación del exón 3 en el dominio CUB1 del gen de la MASP-2 en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES, N=130), neumonía comunitaria (NAC, N=210), y en pacientes con infecciones respiratorias de repetición (IRR, N= 61), así como en población general (N= 123).

**Resultados:** Se observó en población general una frecuencia de heterocigotos para la mutación en CUB1 de un 8.1%, no observándose ningún homocigoto mutado (frecuencia esperada 1/615 individuos). Tampoco se observó ningún homocigoto deficiente en los pacientes con LES, ni diferencias al comparar con el grupo control; sí se observó un aumento no significativo de individuos heterocigotos entre los LES que no presentaban anti-U1RNP respecto a los que sí los presentaban (11.9% vs 2.1%); lo mismo se observó respecto a anti-Ro/La (14% vs 3%). Tampoco en los pacientes con NAC ni sus controles se observaron individuos homocigotos mutados, ni diferencias significativas entre pacientes y controles; sí se encontró una distribución preferente de los heterocigotos hacia formas menos severas de NAC, aunque el tamaño muestral de los subgrupos no permite llegar a conclusiones. Entre los pacientes con IRR analizados sólo se observaron 3 individuos heterocigotos (4.92%) y ningún homocigoto mutado.

**Conclusiones:** A pesar de observarse una mayor frecuencia de individuos heterocigotos para la mutación en CUB1 del gen de la MASP-2 que la descrita recientemente en población danesa, no se encontró ningún homocigoto mutado. Aunque se aprecian pequeñas diferencias en cuanto a la distribución de los individuos heterocigotos en los subgrupos de autoanticuerpos en el LES o de severidad de la NAC, se requieren tamaños muestrales mayores para poder definir si existe o no una relación real entre la mutación CUB1 (MASP-2) y su papel en la infección y autoinmunidad.

*Financiación:* RedRespira (ISCiii-RTIC 03/11).

**UNA COMBINACIÓN DE ALELOS DRB1 Y TNF SE ASOCIA FUERTEMENTE CON LA ENFERMEDAD ATROSCLERÓTICA OCLUSIVA SEVERA.** *Mas A<sup>1</sup>, Martínez A<sup>1</sup>, Blanco E<sup>2</sup>, Moñux G<sup>2</sup>, Urcelay E<sup>1</sup>, Serrano FF<sup>1</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Cirugía Cardiovascular, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Introducción y Objetivos:** la enfermedad aortoiliaca oclusiva severa es una manifestación clínica de la arteriosclerosis periférica, cuya putativa etiología inflamatoria está influenciada por factores genéticos y ambientales. Estudios previos han analizado la relación entre esta enfermedad y los alelos del sistema HLA, destacándose su componente inflamatorio. Adicionalmente, algunos pacientes de artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria autoinmune, presentan disfunción endotelial asociada al alelo DRB1\*0404. Nuestro objetivo en el presente estudio fue evaluar el papel de los polimorfismos del gen DRB1 y de los microsatélites TNF $\alpha$  y TNF $\beta$  en la predisposición a sufrir aterosclerosis oclusiva severa.

**Metodología:** se incluyeron 104 pacientes con afectación aterosclerótica en el sector aortoiliaco y 504 controles, todos ellos tipados para HLA-DR y TNF $\alpha$ -TNF $\beta$  mediante PCR seguida de hibridación con sondas específicas de alelo o seguida de electroforesis capilar, respectivamente. Las muestras DR4 fueron tipadas en alta resolución con objeto de determinar su subtipo. Las frecuencias fenotípicas en la muestra enferma y en la muestra control sana se compararon mediante una prueba chi-cuadrado. Se empleó el algoritmo de expectación-maximización para estimar las frecuencias haplotípicas.

**Resultados.** Ninguno de los alelos de HLA-DR ni de TNF $\alpha$ / $\beta$  mostraba asociación significativa tras aplicar la corrección de Bonferroni. No obstante, el alelo DRB1\*0404 mostraba una ligera tendencia a la asociación (OR=2.18; p=0.05). Más aún, entre los individuos DRB1\*0404, era mucho más frecuente en enfermos (8 casos de 9) que en sanos (7 casos de 21) la aparición de la pareja de alelos TNF $\alpha$ 11 y TNF $\beta$ 4 (OR=16, p=0.007). La aparición conjunta de los alelos DRB1\*0404, TNF $\alpha$ 11 y TNF $\beta$ 4 ocurría mucho más a menudo en enfermos (8 de un total de 104) que en controles (7 de 504), un resultado aún más destacado cuando se comparaban frecuencias estimadas del haplotipo DRB1\*0404-TNF $\alpha$ 11 $\beta$ 4 (8 de 208 vs 4 de 1008; OR=10, p=0.00017).

**Conclusiones:** Nuestros datos sugieren que el haplotipo DRB1\*0404-TNF $\alpha$ 11-TNF $\beta$ 4 porta un gen que modula la predisposición a sufrir enfermedad cardiovascular oclusiva severa. Este haplotipo coincide en los tres marcadores estudiados con el haplotipo ancestral AH60.1, y ulteriores análisis poblacionales podrán precisar la ubicación aproximada en ese haplotipo del gen responsable de esta mayor predisposición a padecer aterosclerosis severa.

**LOS SUBTIPOS DE HLA-B27 DIFERENCIALMENTE ASOCIADOS CON LA ESPONDILITIS ANQUILOSANTE MUESTRAN UNA EXPRESIÓN SIMILAR EN SUPERFICIE DE CADENA PESADA LIBRE.** *Vázquez García MN, López de Castro JA. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC-UAM). Universidad Autónoma de Madrid, Facultad de Ciencias, Madrid, España.*

**Introducción.** La formación de homodímeros en superficie celular a partir de cadena pesada libre de HLA-B27, y su posible reconocimiento por células T autorreactivas, así como la disociación de HLA-B27 en la superficie celular y posterior deposición crónica de  $\beta$ 2-microglobulina en las articulaciones han sido propuestas como posibles mecanismos en la etiopatogénesis de la espondilitis anquilosante.

**Objetivo.** Estudiar si los subtipos de HLA-B27 reportados como diferencialmente asociados con la espondilitis anquilosante difieren en la expresión en superficie celular de forma correlacionable con la enfermedad.

**Metodología.** Se emplearon transfectantes de los subtipos de HLA-B27, asociados y no asociados a enfermedad, en dos líneas celulares, HMy2.C1R y T2. Se analizaron por citometría de flujo con los anticuerpos ME1 (específico de HLA-B27, B7 y B22), W6/32 (específico para un determinante monomórfico de HLA-A, B, C), BBM.1 (específico de  $\beta$ 2-microglobulina humana) y HC10 (específico para cadena pesada de HLA clase I). Las células fueron teñidas en presencia o ausencia de un ligando de HLA-B27, incubadas a 26 y/o 37°C en un medio libre de suero.

**Resultados.** En aquellas células linfoides en el que el complejo de carga de péptido se encuentra intacto, todos los subtipos, independientemente de su asociación a enfermedad, mostraron similares proporciones de cadena libre respecto del heterodímero, sugiriendo con esto una estabilidad en superficie similar en todos los casos. Si bien se alcanzó una sustancial reversibilidad de las cadenas pesadas disociadas, al agregar un ligando de HLA-B27, esta nunca fue del 100% ni tampoco hubo diferencias entre los subtipos. Este resultado es compatible con una formación similar de formas irreversibles de cadena pesada entre los subtipos diferencialmente asociados a enfermedad. En aquellas células carentes de TAP, tanto los subtipos asociados como los no asociados a enfermedad, expresaron a 26°C una población de heterodímeros que fue menos estable que aquella formada a 37°C. La expresión de heterodímero se incrementó en presencia de un péptido exógeno sin la con-

comitante disminución de cadenas pesadas libres de  $\beta$ 2-microglobulina, sugiriendo que en estas células y para todos los subtipos probados la mayoría de las cadenas pesadas libres disociadas en la superficie celular lo están de forma irreversible. A 37°C la expresión de cadenas pesadas libres de  $\beta$ 2-microglobulina en los transfectantes de T2 fue muy baja.

**Conclusión.** Los subtipos de HLA-B27 diferencialmente asociados con la Espondilitis Anquilosante son similares en extensión de disociación de la  $\beta$ 2-microglobulina y en su expresión de cadena pesada libre en superficie.

### SESIÓN 3: MHC Y TRASPLANTES

**Moderadores:** José Luis Vicario (Centro de Transfusiones, Madrid), Rafael González (Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba)

**HACIA LA AUTOMATIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS PARA TRASPLANTE. I: MEJORAS EN LAS FASES DE PERFUSIÓN, DIGESTIÓN Y PURIFICACIÓN EN GRADIENTE DE DENSIDAD.** *Briones R<sup>1</sup>, Miranda JM<sup>1</sup>, González-Molina M<sup>2</sup>, Navarro A<sup>3</sup>, Fernández Arcas N<sup>1</sup>, Caballero A<sup>1</sup>, Alonso A<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Nefrología y <sup>3</sup>Cirugía. Hospital Regional Universitario Carlos Haya.*

Tras décadas de intentos infructuosos de acercar el trasplante de islotes a la clínica como tratamiento de la diabetes tipo I, la publicación en el año 2000 del "protocolo de Edmonton" significó un avance importante y hoy se han trasplantado con éxito más de 300 pacientes en todo el mundo.

Los procedimientos quirúrgicos, de inmunosupresión y radiológicos están hoy bien establecidos pero es difícil imaginar la generalización de este proceso cuando el aislamiento de los islotes en el laboratorio requiere a 5 personas durante 8 horas en unas instalaciones estériles que superan el millón de € y en el que solamente uno de cada 3-4 aislamientos alcanza el número de islotes suficientes para trasplantar.

Ante esta perspectiva nuestro grupo ha iniciado un proyecto encaminado a reducir el aislamiento a 3 horas, realizado por 2 personas y en las instalaciones estándar de cualquier laboratorio en el que se realicen cultivos celulares.

Para la fase de perfusión se ha diseñado y manufacturado una cámara que permite acercarse a los 4°C, lo que garantiza la inactivación de las enzimas de digestión en esta fase, en comparación con cámaras previas que no permiten bajar de 14-15°C.

Igualmente se ha diseñado y manufacturado una cámara de digestión en la que se puede controlar la temperatura de forma independiente al flujo interno de la cámara.

Por último se ha diseñado y manufacturado un equipo para refrigerar mediante CO<sub>2</sub> líquido la procesadora de células Cobe lo que evita trabajar con ella en el interior de una cámara fría.

En su conjunto las modificaciones introducidas mejoran de forma significativa la calidad de los islotes obtenidos y disminuyen la laboriosidad del proceso de aislamiento.

**HACIA LA AUTOMATIZACIÓN DEL AISLAMIENTO DE ISLOTES PANCREÁTICOS PARA TRASPLANTE. II: AUTOMATIZACIÓN COMPLETA DE LA FASE DE DILUCIÓN.** *Briones R<sup>1</sup>, Miranda JM<sup>1</sup>, González-Molina M<sup>2</sup>, Navarro A<sup>3</sup>, Fernández Arcas N<sup>1</sup>, Caballero A<sup>1</sup>, Alonso A<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Nefrología y <sup>3</sup>Cirugía. Hospital Regional Universitario Carlos Haya.*



De las cuatro fases que componen el aislamiento de islotes pancreáticos en el laboratorio, perfusión, digestión, dilución y purificación, la de dilución es la más larga y tediosa, la que más operadores requiere y la que pone más en riesgo la esterilidad de los islotes.

En esta fase se arrastra de la cámara de digestión el digerido del páncreas haciendo pasar 8-10 litros de medio de cultivo que han de ser centrifugados varias veces con el fin de unificar el pellet de tejido digerido en un solo tubo. Esto implica múltiples salidas del preparado de las cabinas de flujo laminar, lo que compromete la esterilidad de los preparados. Además, todo el proceso ha de ser llevado a cabo a 4°C.

Dentro del proyecto global de reducir el aislamiento de 8 a 3 horas y con solo dos operadores, en vez de los 4-5 que se requieren actualmente, nuestro grupo ha desarrollado un equipo que automatiza totalmente este proceso.

Entre las ventajas que aporta están: a) El número de tubos de 250 ml a usar se reduce de 40 a 1. b) El número de operadores se reduce de 3-4 a 1, el equipo es totalmente automático. c) Los islotes no abandonan en ningún momento la cabina de flujo, lo que reduce el riesgo de contaminación. d) El control de temperatura es perfecto en todo el proceso:  $4 \pm 0.1^\circ\text{C}$ . e) Se reduce el tiempo de dilución en un 20%. f) Permite seleccionar el tamaño de las partículas retenidas en el sobrenadante. g) Los islotes no son sometidos a las distorsiones típicas de los procesos de centrifugación al quedar sometidos a la presión de la columna del líquido que descansa sobre el pellet. h) Evita uno de los mayores problemas del método tradicional, la agregación de los islotes y el tejido exocrino, lo que obliga a disgregarlos mecánicamente fracturando los islotes. i) No se forman pellets, los islotes se depositan en una monocapa sobre un área cientos de veces superior al área sobre la que descansa un pellet. j) El medio de cultivo usado en la dilución se puede hacer recircular hacia la cámara de digestión. Aunque este aspecto está actualmente en evaluación, esto permitirá reducir de forma drástica el volumen de medio de cultivo usado en esta fase. La calidad de los islotes obtenidos usando este equipo es netamente superior a los conseguidos con el método tradicional.

**ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE GENES REGULADOS POR HIF (HIPOXIA INDUCIBLE FACTOR) EN RIÑONES PARA TRASPLANTE DE DONANTES EN ASISTOLIA.** *Suela Rubio J<sup>1</sup>, Gómez del Moral M<sup>2</sup>, Campos Martín Y<sup>1</sup>, Gozalbo López B<sup>1</sup>, Meza N<sup>3</sup>, Sánchez Fructuosos A<sup>4</sup>, Núñez Peña JR<sup>5</sup>, Barrientos Guzmán A<sup>4</sup>, Martínez Naves E<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unidad de Inmunología, departamento de Microbiología I. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. <sup>3</sup>División de Hematopoyesis. Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas. Madrid. <sup>4</sup>Servicio de Nefrología. Hospital Clínico San Carlos. Madrid. <sup>5</sup>Coordinación de Trasplantes. Hospital Clínico San Carlos. Madrid.

**Introducción.** El procedimiento de la donación en asistolia (parada cardíaca) supone un tipo de isquemia caliente sobreañadida al método clásico de la donación de cadáver en muerte encefálica. Nuestros datos y los de otros grupos muestran que los órganos de donante en muerte encefálica tienen unos resultados a largo plazo comparables con los de donantes asistólicos. Sin embargo, a corto plazo, los injertos que provienen de donantes asistólicos sufren más necrosis tubular aguda y un retraso significativo en la función renal. Nuestra hipótesis

es que, al existir isquemia caliente, la hipoxia consecuente en el riñón durante esa isquemia podría inducir, por medio del factor inducible por hipoxia (HIF), la expresión de determinados genes capaces de condicionar el resultado del trasplante.

**Objetivos.** Estudiar la expresión de los genes regulados por HIF: CXCR4, SDF-1 (stromal derived factor) y VEGF (vascular endotelial growth factor) en el trasplante renal asistólico con respecto al trasplante renal de cadáver clásico.

**Metodología.** Se realizaron extracciones de mRNA de biopsias de riñones pretrasplante para comprobar patrones de expresión usando la técnica de RT-PCR semicuantitativa a tiempo real. Los grupos utilizados fueron biopsias de donantes de muerte encefálica (n=4) y biopsias de donantes en asistolia (n=11). Se compararon los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$ , CXCR4, VEGF y SDF-1 entre los diferentes grupos.

**Resultados.** Los donantes asistólicos expresaron 4,4 veces más mRNA de CXCR4 que los donantes de muerte cerebral, siendo esta diferencia estadísticamente significativa (p<0,05). La expresión de los genes SDF-1 y VEGF fue 1,5 veces superior en los asistólicos; estas diferencias no son significativas probablemente debido al bajo tamaño muestral. Los niveles de expresión de HIF-1 $\alpha$  no sufrieron cambios, como cabía esperar ya que HIF-1 $\alpha$  se regula fundamentalmente a nivel postranscripcional. Estos resultados indican que existe una sobreexpresión de CXCR4 en los riñones de donantes asistólicos comparados con los de muerte encefálica. La tendencia observada con la sobreexpresión de SDF-1 y VEGF deberá ser comprobada incrementando el tamaño muestral.

**PAPEL DE LA COMPATIBILIDAD HLA-C EN TRASPLANTE HEPÁTICO.** *Moya-Quiles MR<sup>1</sup>, Miras M<sup>2</sup>, Muro M<sup>1</sup>, Marín L<sup>1</sup>, Torío A<sup>1</sup>, Guerra N<sup>1</sup>, Campillo JA<sup>1</sup>, Montes-Ares O<sup>1</sup>, Botella C<sup>1</sup>, López-Álvarez R<sup>1</sup>, Sánchez-Bueno F<sup>3</sup>, Parrilla P<sup>3</sup>, Bermejo J<sup>4</sup>, Álvarez-López MR<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Medicina Digestiva, <sup>3</sup>Servicio de Cirugía y <sup>4</sup>Servicio de Anatomía Patológica. Hospital U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** La interacción de las moléculas HLA-C con las células NK apunta a un importante papel en las respuestas inmunes celulares. Estas moléculas han sido definidas como antígenos de trasplante con relevancia en trasplante no emparentado de progenitores hematopoyéticos, sin embargo su papel en trasplante hepático no está claramente definido.

**Objetivo.** Analizar el papel de la compatibilidad HLA-C en trasplante hepático.

**Metodología.** Se han estudiado muestras de DNA de 224 parejas donante/receptor hepático, clasificando los receptores en dos grupos, con rechazo agudo (n= 63) y sin rechazo agudo (n=161). El tipaje HLA-C se realizó mediante PCR-SSP y PCR-SSO.

**Resultados.** Al analizar la compatibilidad HLA-C se observa un aumento de la frecuencia de rechazo agudo al aumentar el n° de incompatibilidades tanto a nivel alélico como a nivel de epitopos Asn80/Lys80 aunque en ningún caso estos resultados fueron estadísticamente significativos. Sin embargo, al estratificar el análisis en base al fenotipo HLA-C del donante, observamos un aumento significativo de la frecuencia de rechazo agudo cuando el donante es de fenotipo HLA-C<sup>Asn80</sup>/HLA-C<sup>Lys80</sup> y el receptor es HLA-C<sup>Lys80</sup>/HLA-C<sup>Lys80</sup> (p=0.00209; Pc=0.00628).

**Conclusión.** Estos resultados indican que determinadas combinaciones HLA-C donante/receptor podrían aumentar el riesgo de recha-

zo agudo en trasplante hepático y apuntan a un posible papel de las células NK en este tipo de trasplante.

**REACCIÓN HEMOLÍTICA AGUDA TRANSFUSIONAL SECUNDARIA A ALOINMUNIZACIÓN HLA.** *Muro M, Palacios S\*, Moya R, Marín L, Botella C, Candela M\*, Minguela A, García-Alonso A, Álvarez R.* Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia. \*Servicio de Hematología y Hemoterapia, Hospital Morales Meseguer, Murcia.

**Introducción:** Las moléculas HLA pueden estar presentes en los eritrocitos y los anticuerpos dirigidos frente a ellas pueden ser problemáticos *in vitro*. Los anticuerpos Bg (anti-HLA) no son generalmente considerados con significado clínico en la práctica transfusional. Además, los anticuerpos HLA se encuentran frecuentemente en pacientes multitransfundidos y mujeres multiparas, aunque efectos clínicos adversos tales como reacciones hemolíticas transfusionales son raras.

**Objetivos:** En este trabajo, informamos de un caso de una mujer que experimentó una reacción transfusional hemolítica aguda intravascular debido a aloanticuerpos Bg. Existen otros 3 informes en la literatura donde se han aportado evidencias clínicas y de laboratorio de la destrucción de los hematíes transfundidos asociados con la presencia de aloanticuerpos anti-HLA.

**Caso clínico:** Una mujer de 68 años se admitió en nuestro hospital para evaluación de anemia refractaria con síntomas (debilidad, nivel de Hb 5.0 g/dL). Después de 3 unidades transfundidas, el paciente desarrolló inmediatamente una reacción hemolítica transfusional con fiebre, escalofríos, náuseas, orina oscura e ictericia. Test de ATG directo negativo con anti-IgG, eluido negativo y sin anticuerpos irregulares detectados. El ensayo del suero del paciente para anticuerpos RBC (alo o auto) mostró solamente anti-Bg. El screening de anticuerpos HLA por técnica CDC reveló anticuerpos anti-A11 y -B35, persistiendo tras tratamiento con DTT. No se identificaron otras causas para la reacción hemolítica ocurrida. Pruebas cruzadas (PC) por CDC del suero del paciente y las células T de los donantes fueron negativas excepto un donante que fue positivo (era A11 y B35). Por tanto, se realizó tipaje HLA del paciente, los 3 donantes RBC, marido e hijos. Los hijos y marido presentaron incompatibilidades para HLA-A11 y -B35 y las PC del paciente frente a ellos fueron positivas. Por tanto, la sensibilización fue causada por exposición previa a antígenos HLA paternos y posiblemente reactivados por el donante incompatible que era HLA-A11 y -B35. Una unidad RBC irradiada de un donante HLA-compatible (negativo para HLA-A11, y -B35) fue transfundida sin incidentes una semana después de la segunda admisión. El nivel Hb del paciente aumentó, llegó a ser asintomática, y descargada del Fe suplementario. Todas las unidades transfundidas desde entonces se han seleccionado por compatibilidad (ausencia de antígenos sensibilizantes), citometría de flujo negativa y PC CDC negativa, infusión de altas dosis de IVIGs y, al momento presente, la paciente esta asintomática (1 año de seguimiento). Recientemente, se han detectado otros 4 aloanticuerpos anti-A1, anti-B8, anti-K y anti-C, seleccionándose los donantes posteriores siendo también negativos para éstos.

**Conclusión:** Creemos que una investigación de aloanticuerpos anti-HLA debería realizarse en todos los pacientes que experimentan una reacción hemolítica transfusional cuando no se encuentren anticuerpos RBC específicos asociados a la etiología.

**LA MONITORIZACIÓN DE NIVELES DE IGG EN EL PERIODO PRE-TRASPLANTE PREDICE EL DESARROLLO DE INFECCIONES EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO.** *Sarmiento E, Rodríguez-Molina JJ, Fernández-Yáñez J, Palomo J, Muñoz P, Bouza E, Fernández-Cruz E, Carbone J.* Unidad de Inmunología Clínica, Servicio de Inmunología, <sup>1</sup>Servicio de Cardiología, <sup>2</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

**Introducción.** En estudios previos hemos demostrado que la presentación de hipogammaglobulinemia en el periodo post-trasplante cardiaco se asocia a un mayor riesgo de eventos infecciosos que potencialmente pueden poner en peligro la supervivencia del injerto, incluyendo la enfermedad por citomegalovirus. La identificación del riesgo de infección es del máximo interés en la inmunología del trasplante.

**Objetivos.** Establecer si existe asociación entre los niveles de inmunoglobulinas séricas medidos antes del trasplante cardiaco con la presencia de infecciones en el periodo post-trasplante.

**Pacientes y Métodos.** Se midieron los niveles basales de inmunoglobulinas en sangre mediante técnica de nefelometría en 66 pacientes que posteriormente fueron sometidos a trasplante cardiaco. 27 pacientes recibieron terapia de inducción con Daclizumab, MFM y prednisona (PDN) y 26 pacientes recibieron inducción con ATGAM, azatioprina y PDN. Definimos infección a los episodios infecciosos que requirieron tratamiento específico intravenoso en el periodo post-trasplante. Establecimos asociación estadística entre los niveles de inmunoglobulinas antes del trasplante y el desarrollo de eventos infecciosos (análisis de regresión de Cox).

**Resultados:** Los niveles de IgG en el periodo pre-trasplante tienen asociación significativa con la presencia de eventos infecciosos en el periodo post-trasplante. Por cada incremento de 100 mg/dl en el nivel de IgG antes del trasplante, el riesgo de tener infecciones disminuye un 24% (RR 0.76, IC95% 0.67-0.88, p<0.0001). Cuando estratificamos a los pacientes según la presencia de hipogammaglobulinemia IgG en el periodo pre-trasplante (definida como niveles menores de 750 mg/dl), los pacientes con hipogammaglobulinemia tuvieron 3 veces más riesgo de desarrollar infecciones (RH 3.68, IC95% 1.66-8.21, p=0.0014). Interesantemente cuando la estratificación se hace según el nivel de la mediana (1105 mg/dl), los pacientes con nivel inferior a la mediana tienen también más riesgo de tener infecciones, incluyendo un subgrupo de pacientes con nivel nefelométrico normal de IgG (RH 4.08, IC95% 1.63-10.17, p=0.0026).

**Conclusión:** La monitorización de niveles séricos de IgG en el periodo pre-trasplante cardiaco puede ser útil para la identificación del riesgo de desarrollo de infecciones en el periodo post-trasplante.

**EL ANTÍGENO MHC NO CLÁSICO DE CLASE I MICA SOLUBLE PROTEGE FRENTE EL DESARROLLO DE EPISODIOS SEVEROS DE RECHAZO EN EL TRASPLANTE CARDIACO.** *Suárez-Álvarez B<sup>1</sup>, López-Vázquez A<sup>1</sup>, Álvarez-López R<sup>2</sup>, Martínez-Borra J<sup>1</sup>, González S<sup>3</sup>, López-Larrea C<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unidad de Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Virgen de la Arrixaca. Murcia. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Oviedo.

La expresión de la MICA es inducida por situaciones de estrés e interacciona con el receptor celular NKG2D el cual activa a las células NK y co-estimula a las células de T CD8+. La secreción de MICA soluble (sMICA) por los tumores modula la inmunidad anti-tumoral media-

da por NKG2D. Esto apoya la implicación de sMICA en los mecanismos reguladores que pueden ocurrir durante el alotrasplante humano.

El objetivo de este estudio fue correlacionar los niveles de sMICA y el desarrollo de los episodios agudos severos del rechazo en pacientes en 32 pacientes seguidos durante el primer año después del trasplante. sMICA fue detectado en el suero de 21 pacientes (61.70%) entre 15 y 20 días después del trasplante. Veinte de estos pacientes (95.24%) no han tenido episodios de rechazo severo durante el primer año ( $p=0.0002$ ). En contraste, sMICA estaba prácticamente ausente en los pacientes que desarrollaron rechazo severo. Además, la expresión de NKG2D por la línea celular NKL se podía inhibir parcialmente después de la incubación con sueros con sMICA y este efecto fue inhibido en presencia de un anticuerpo anti-MICA. Por otra parte, la actividad citotóxica de esta línea contra un transfecto C1R-MICA también fue inhibida por estos sueros positivos para sMICA.

Los niveles de sMICA correlacionan con una incidencia reducida de rechazo agudo en el trasplante del corazón y pueden desempeñar un papel que dependa de la interacción de sMICA-NKG2D.

**ANÁLISIS DE LA MOLÉCULA HLA-G EN BIOPSIAS DE MIOCARDIO Y HLA-G SOLUBLE EN INDIVIDUOS TRASPLANTADOS DE CORAZÓN.** *Luque J<sup>1</sup>, Marín J<sup>1</sup>, Torres M<sup>6</sup>, Herencia C<sup>1</sup>, Cabeallo A<sup>1</sup>, Lozano JM<sup>1</sup>, González R<sup>1</sup>, Aumente MD<sup>1</sup>, López-Rubio F<sup>2</sup>, Arizón JM<sup>3</sup>, Álvarez R<sup>5</sup>, Peña J.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Anatomía-patológica, <sup>3</sup>Servicio de Cardiología, <sup>4</sup>Servicio Farmacia. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. <sup>5</sup>Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia. <sup>6</sup>Facultad de Ciencias, Universidad de Jaén.

**Introducción:** Se ha descrito que la molécula HLA-G está presente en suero y en biopsias de individuos trasplantados de corazón. Nuestro grupo investiga las posibles correlaciones entre los niveles de HLA-G en biopsias de miocardio procedentes de corazones trasplantados y los grados de rechazo que estos presentaron durante el primer año después del trasplante y por otro lado la posible influencia de las dosis inmunosupresoras administradas a estos pacientes en los niveles de HLA-Gs en suero.

**Métodos:** Se seleccionaron biopsias de 6 pacientes (Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba), suero de 16 pacientes (Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia) y suero de 2 pacientes monitorizados para comparar los niveles de CsA en sangre entre C2 y Co (H.U.R.S.), todos ellos trasplantados de corazón y con tratamiento inmunosupresor (CsA, Micofenolato, Corticoides). El análisis de la expresión de HLA-G en las biopsias se realizó por inmunohistoquímica utilizando el anticuerpo monoclonal anti-HLA-G (MEM-G/01, Exbio, Praga). El análisis de los niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 + HLA-G5 en suero fue realizado por la técnica de ELISA utilizando los anticuerpos monoclonales 5A6G7 (donado por E. Carosella, Paris) y MEM-G/09 (Exbio Praga) respectivamente.

**Resultados:** (i) Cuando los niveles de expresión de HLA-G en biopsias de corazón trasplantado fueron comparados con el grado de rechazo que éstas presentaban se encontró que los niveles de esta molécula decrecían al aumentar la intensidad del rechazo agudo. (ii) Por otra parte, al analizar los niveles de HLA-G soluble se encontraron dos patrones de expresión de ésta molécula, uno que representa al 50% de los pacientes caracterizado por unos niveles estables y bajos de HLA-G soluble, mientras que el otro patrón mostraba un incremento significativo de los niveles de HLA-G soluble en el primer mes, que después retornaba a niveles bajos y estables. (iii) En pacientes monitori-

zados para comparar los niveles CsA en sangre entre C2 y Co se observó un aumento de la expresión de HLA-G5+sHLA-G1 en C2.

**Conclusión:** Los niveles de expresión de HLA-G en biopsias de trasplante cardiaco parece estar inversamente relacionados con el grado de rechazo que presentan, encontrando los niveles más bajos de expresión de HLA-G en biopsias que presentan rechazo agudo 3A. Los niveles de HLA-G5 y sHLA-G1 en suero son significativamente más altos en C2 que los encontrados en Co.

**¿UNA NUEVA POBLACIÓN DE CÉLULAS PROGENITORAS DE LAS CÉLULAS ESTRELLADAS DEL HÍGADO?: PURIFICACIÓN, COMPORTAMIENTO EN CULTIVO Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENÉTICA.** *Loureiro J, Cortegano I, de Andrés B, Palacios B<sup>1</sup>, Stark L<sup>1</sup>, Gaspar ML, Marcos MAR<sup>1</sup>.* Departamento de Inmunobiología, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Madrid. <sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Cantoblanco, Madrid.

**Introducción:** A lo largo del desarrollo embrionario del hígado de ratón, los progenitores hepatoepiteliales bipotenciales (hepatocitos, colangiocitos) evolucionan en estrecho contacto con progenitores linfematopoiéticos, y se influyen mutuamente. En este proceso participan tanto interacciones celulares directas como ligandos solubles (EGF, HGF, OSM o VEGF). Estudios realizados en nuestro laboratorio describieron una nueva población (c-Kit<sup>duh</sup>CD45-TER119-) capaz de diferenciarse a hepatocitos y células biliares en el hígado embrionario de ratón a día 11 de gestación, con características de células tronco. Recientemente, y basándonos en la expresión combinada de diferentes integrinas, hemos identificado una subpoblación embrionaria que se transforma rápidamente *in vitro* a células con fenotipo migratorio, núcleo multilobulado y largas prolongaciones tipo neurita. Nuestra hipótesis de trabajo actual es que dichas células podrían representar los progenitores de las elusivas células estrelladas de Ito, ubicadas en los senos endoteliales del hígado y responsables, tras estímulos inflamatorios, de la fibrogénesis que aboca en cirrosis hepática. Su origen es completamente desconocido.

**Objetivos:** 1) Análisis cuantitativos de las proteínas de membrana expresadas *in vivo* y tras diferenciación *in vitro*. 2) Estudio de su evolución en diferentes condiciones (suspensión celular, Matrigel, proteínas de ECM (matriz extracelular), cultivos organotípicos) y en presencia de factores solubles. 3) Disección de sus programas genéticos específicos y patrones de proteínas expresadas, por estudios de inmunofluorescencia y microscopía confocal, así como RT-PCR a tiempo real.

**Metodología:** Citometría de flujo utilizando marcadores fenotípicos para caracterizar y purificar la población. Microscopía confocal para determinar la expresión de diferentes antígenos. RT-PCR para el análisis genético de la población. Cultivos de suspensiones celulares y organotípicos quiméricos con trazadores tipo GFP.

**Resultados:** La población expresa característicos patrones de integrinas (DX5, LFA-1, ICAM-1), las proteínas de citoesqueleto actina y tubulina (en sus prolongaciones) y es Albúmina (-) y E-cadherina (-) (no hepatocito o hepatoblasto). Asimismo, tanto "ex vivo" como tras cultivo, las células embrionarias expresan el Ag NeuN, específico de células del sistema nervioso.

**Conclusión:** Hemos revelado una pequeña subpoblación del hígado embrionario post-gastrulación que coexpresa proteínas típicas de linajes hematopoiético, endotelial y neural, que adquiere *in vitro* una morfología similar a células neuronales y que podría representar el

elusivo progenitor de las células estrelladas de Ito, quizás originadas en la cresta neural.

**EVALUACIÓN DEL ORIGEN DE LAS CÉLULAS MESENQUIMALES DE LA MÉDULA ÓSEA POST-TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS. ANÁLISIS PARALELO DEL QUIMERISMO HEMATOPOYÉTICO.** *Planelles D<sup>1</sup>, Mirabet V<sup>2</sup>, Sanz G<sup>3</sup>, Carbonell F<sup>4</sup>, Moscardó F<sup>3</sup>, Senent L<sup>3</sup>, Solves P<sup>5</sup>, Vila E<sup>1</sup>, Gómez J<sup>1</sup>, Granel R<sup>1</sup>, Montoro J<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unidad de Biología Molecular-Histocompatibilidad, <sup>2</sup>Banco de Tejidos, <sup>4</sup>Servicio de Inmunohematología y <sup>5</sup>Banco de Cordón Umbilical del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana, <sup>3</sup>Unidad de Trasplante de Médula, Hospital La Fe, Valencia.

**Introducción:** La población celular estrómic de la médula ósea contiene las llamadas "stem cells mesenquimales", progenitores inmaduros fundamentales para el desarrollo del microambiente medular adecuado para el crecimiento y maduración de las células hematopoyéticas y la reconstitución inmunológica. Experimentos de expansión *in vitro* han demostrado que estos precursores pueden acortar el tiempo de prendimiento del injerto tras el trasplante alogénico de progenitores hematopoyéticos (TAPH). Aunque desde hace dos décadas se viene debatiendo el origen de estas células "fibroblastoides" estrómicas post-TAPH, hoy en día todavía se desconoce si proceden del donante o del receptor.

**Objetivos:** Evaluar, mediante experimentos de expansión *in vitro*, el origen de los precursores mesenquimales de médula ósea en pacientes sometidos a TAPH y analizar, paralelamente, el estado del quimerismo hematopoyético.

**Pacientes y Métodos:** Los pacientes analizados habían sufrido TAPH de sangre de cordón umbilical (en su mayoría) o donante no emparentado. Las muestras de médula ósea fueron recogidas en diferentes momentos post-TAPH (desde el día +14 hasta 1 año después) y sometidas, por una parte, a expansión *in vitro* y, por otra, a análisis de quimerismo hematopoyético mediante PCR multiplex de *short tandem repeat-markers* y PCR-SSP y/o -SSO de los *loci* HLA que presentaban alguna disparidad entre donante-receptor. Para el cultivo celular, se efectuó una selección por gradiente de densidad o bien lisis de los hematíes con CINH<sub>4</sub>. A las 24h de la siembra, se retiraron las células no adherentes. Cuando las colonias crecieron suficientemente para realizar el subcultivo, se despegaron las células con tripsina. Una vez que este cultivo secundario alcanzó la subconfluencia, se despegaron de nuevo las células y se procedió a su análisis: por una parte, se determinó la expresión fenotípica por citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales frente a CD45, CD90 y CD105 y, por otra, se realizó un análisis de quimerismo. La evolución del cultivo se siguió, de forma rutinaria, con el microscopio invertido.

**Resultados y Conclusiones:** Nuestros resultados indican que, en las fases más tempranas tras el TAPH, el origen de la población de células mesenquimales es del receptor. Sin embargo, en fases más tardías, se detectan también de procedencia del donante, si bien dicha población es cuantitativamente inferior a la del receptor. En conclusión estos resultados sugieren que, tras el TAPH, las células mesenquimales del donante pueden prender en la médula ósea.

**QUE PROTOCOLO ADOPTAR NA DETERMINAÇÃO DE ANTICORPOS ANTI-HLA NO PÓS-TRASPLANTE RENAL.** *Sinde Monteiro M, Teixeira J, Osório E, Alves H.* Laboratório de HLA, Centro de Histocompatibilidade do Norte, Porto, Portugal.

**Introducción:** Os doentes transplantados renais que desenvolvem uma resposta humoral de anticorpos anti-HLA (Ac) apresentam uma menor sobrevida do enxerto e um risco aumentado de rejeição nomeadamente crónica.

**Objetivos:** Definir um protocolo mais alargado para a determinação dos Ac no pós transplante renal, de modo a melhorar a previsão dos fenómenos de rejeição e perda do enxerto.

**Pacientes y Métodos:** Estudamos 460 doentes submetidos a um 1º transplante renal desde Janeiro de 2000 até Fevereiro de 2005. Foi feita pesquisa de Ac no pós-TX, segundo o protocolo de rotina do nosso Serviço (1, 3 e 6 meses após TX). Para a determinação dos Ac utilizamos o método ELISA Latmix (One Lambda) e o Luminex Lifescreen (Tepnel Diagnostics). O estudo estatístico foi efectuado usando o teste do Qui-quadrado

**Resultados:** A população de 416 transplantados foi dividida em 2 grupos: A e B

	Sem Ac anti-HLA	Com Ac anti-HLA	Total
Mantêm o transplante (A)	391	27	418
Perderam o transplante (B)	22	20	42
Total	413	47	460

Com uma diferença entre os dois grupos estatisticamente significativa ( $p < 0,001$ ),  $OD = 13,2$ , fomos ver se os Ac detectados após a rejeição já estavam presentes nos primeiros 6 meses pós-TX.

Dos 42 doentes que perderam o transplante, 10 faleceram com o rim funcionante. Nos 32 doentes restantes detectamos Ac em 43% nos primeiros 6 meses, que passaram a ser 64% após rejeição.

Assim é de admitir que a diferença de 21% possa ter surgido no período que não foi objecto do nosso estudo (entre os 6 meses e o regresso à HD).

Verificou-se não haver diferenças estatisticamente significativas nos dois grupos A e B no que diz respeito ao sexo A-M295/F198 B-M26/F24 ( $p = 0,283$ ); dador cadáver/vivo ( $p = 0,926$ ), aos mismatches (HLA-A+B+DR) A-2,77 B-2,49; à idade do doente A-41,6anos (2-69) B-41,3anos (10-68); ao tempo de hemodiálise A-31 meses B-26meses.

**Conclusiones:** Sugerimos que o protocolo da determinação de anticorpos seja feita ao longo do tempo de sobrevida do enxerto todos os 6 meses e não somente no pós Tx imediato (1, 3 e 6 meses após TX). A detecção precoce dos Ac poderá levar à mudança dos protocolos imunossupressores contribuindo para o aumento da sobrevida do órgão transplantado.

**EFECTO DE LA COMPATIBILIDAD HLA EN LA SUPERVIVENCIA DEL INJERTO PULMONAR.** *Torío A, Borro J, Lemos C, Álvaro R, Rey C, de la Torre M, Formoso MJ, Couceiro R, Sánchez P, Alonso C.* S. Inmunología, <sup>1</sup>Cirugía Torácica, <sup>2</sup>Oficina Coordinación de Trasplantes. Complejo Hospitalario Universitario "Juan Canalejo". La Coruña.

**Objetivos:** La importancia de la compatibilidad HLA está claramente demostrada en varios tipos de trasplantes. En el caso del trasplante pulmonar existen diversos estudios multicéntricos que muestran resultados contradictorios. Nuestro objetivo fue estudiar el efecto de la compatibilidad HLA en la supervivencia del injerto pulmonar en un total de 125 trasplantes pulmonares consecutivos realizados en nuestro hospital.

**Metodología:** Para el tipaje HLA (-A, -B y -DR) se emplearon técnicas de PCR-SSP y -SSOP. Una vez excluidos los pacientes que falle-

cieron en la primera semana post-trasplante (n=7), trasplantados (n=3), y aquellas parejas donante-receptor en las que no fue posible determinar el tipaje HLA (n=6), se realizó el análisis estadístico de la supervivencia a 5 años mediante el programa SPSS, utilizando el método de Kaplan-Meier y el test log-rank.

**Resultados:** Encontramos un efecto significativo de la compatibilidad en la supervivencia al comparar los pacientes trasplantados con 2-3 incompatibilidades (con una tasa de supervivencia del 81%), respecto a los trasplantados con 4-5 (73%), y 6 incompatibilidades (41%) en HLA-A + B + DR (p=0.003). Analizando el papel de cada locus, también encontramos diferencias significativas en el caso del HLA-DR, demostrándose una mayor supervivencia en los pacientes trasplantados con una incompatibilidad sobre los trasplantados con dos incompatibilidades (80% vs 55%, p=0.005). Por el contrario, el análisis de la compatibilidad en HLA-A y -B no reveló diferencias estadísticamente significativas en la supervivencia del injerto a 5 años.

**Conclusiones:** Nuestros resultados muestran que la compatibilidad HLA, especialmente en el caso de clase II, parece tener un papel beneficioso en la aceptación del injerto pulmonar a largo plazo.

**PREVALENCIA DEL POLIMORFISMO C77G EN EL EXÓN 4 DEL GEN CD45 EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA.** *Álvarez Doval A, Rodríguez Sainz C, García Sánchez F, Alonso Nieto M, Díez Martín JL, Flores E, Sabin Domínguez P, Vica-rio Moreno JL, Fernández-Cruz E, Gil Herrera J. Servicios de Inmunología, Oncología y Unidad TMO, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón". Servicio de Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de CM. Madrid.*

CD45 es una glicoproteína transmembrana expresada en todos los leucocitos humanos. Diferentes isoformas generadas mediante *splicing* alternativo se asocian con la adquisición de memoria inmunológica (isoforma CD45RA sobre los linfocitos circulantes T *naive*, CD45RO en los linfocitos T maduros de memoria). El polimorfismo C77G en el exón 4 del gen CD45 produce un cambio de nucleótido sin cambios en la secuencia de aminoácidos. Sin embargo, C77G da lugar a un *splicing* anormal de la molécula, con persistencia de expresión de CD45RA sobre los linfocitos T memoria. Trabajos previos de nuestro grupo y otros han demostrado la asociación de C77G con enfermedades de base inmunológica.

**Objetivos:** Determinar la prevalencia del polimorfismo C77G de la molécula CD45 en pacientes sometidos a trasplante de médula ósea (TMO) como tratamiento de neoplasias linfoides y mieloides.

**Metodología:** 57 pacientes sometidos a TMO autólogo y 32 pacientes sometidos a TMO alogénico en el Hospital General Universitario "Gregorio Marañón". 517 donantes sanos del Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. Análisis de la coexpresión de CD45RA y CD45RO en linfocitos T circulantes por citometría de flujo de 3 colores (Becton&Dickinson). Amplificación del exón 4 del gen CD45 por PCR, purificación y secuenciación de los fragmentos amplificados (ABI 3100). Estadística: cálculo de las frecuencias simples en el grupo sano y de pacientes, y test  $\chi^2$  para el análisis de asociación.

**Resultados:** 4 pacientes, diagnosticados de mieloma (n=2), linfoma folicular (n=1) y linfoma de Hodgkin (n=1) presentaban un patrón anormal de *splicing*, 3 de ellos habían sido sometidos a TMO autólogo y 1 a TMO alogénico. En los 4 casos encontramos la mutación C77G. La prevalencia de este polimorfismo en el grupo de pacientes es de 4,49% (4/89), y de la población sana española es de 1,16% (6/517); la diferencia entre las frecuencias de ambos grupos es significativa ( $\chi^2$ : 5,2 p<0,04).

**Conclusiones:** Hay una mayor prevalencia de C77G en pacientes con neoplasias linfoides y mieloides sometidos a TMO respecto a la población sana española. Queda por determinar si la presencia de este polimorfismo implicaría diferencias en la susceptibilidad y/o comportamiento clínico de la patología de base o bien en la evolución post-trasplante de estos pacientes.

#### SESIÓN 4: AUTOINMUNIDAD Y TOLERANCIA

**Moderadores:** Cándido Juárez (Hospital Univ. Sant Pau, Barcelona), Francisco J. García-Cozar ( Hosp. Puerto Real, Univ. de Cádiz)

**ACELERACIÓN DE AUTOINMUNIDAD Y MODULACIÓN DE LA REGENERACIÓN INSULAR EN DIABETES TIPO 1 MEDIA-DA POR IFN $\beta$ .** *Planas R, Alba A, Carrillo J, Puertas MC, Ampudia R, Pastor X, Pujol-Borrell R, Domínguez O\*, Juan M, Verdaguer J, Vives-Pi M. Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD), Centre de Transfusió i Banc de Teixits (CTBT). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. \*Unidad de Genómica, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.*

La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de las células  $\beta$  pancreáticas, productoras de insulina. Existen evidencias indirectas de una posible asociación entre infecciones víricas y DT1. El interferón  $\beta$  (IFN $\beta$ ) es un IFN de tipo 1 producido tras una infección vírica y que se ha detectado en páncreas de pacientes diabéticos. Además, ratones transgénicos que expresan IFNs de tipo I en los islotes, desarrollan DT1.

**Objetivo:** Determinar el papel del IFN $\beta$  en la autoinmunidad contra la célula  $\beta$  en la DT1, a nivel de la alteración de la expresión de genes relacionados con la migración leucocitaria y con el daño tisular en dicha enfermedad.

**Metodología:** Para determinar cambios de expresión génica y proteica se han empleado microchips de cDNA y de proteína, analizando la expresión de quimiocinas, citocinas y otros genes probablemente implicados en la autoinmunidad contra las células productoras de insulina. Se ha realizado una estimulación *in vitro* de una línea celular NIT-1 con IFN $\beta$ . También se han estudiado los siguientes modelos murinos de diabetes autoinmune: el ratón NOD, que desarrolla DT1 de forma espontánea, y el modelo transgénico NOD RIP-HuIFN $\beta$ , que expresa IFN $\beta$  en las células  $\beta$  y presenta una DT1 acelerada y más agresiva que la cepa salvaje NOD.

**Resultados:** Las células  $\beta$ , bajo el estímulo de IFN $\beta$ , hiperexpresan genes (mRNA) de su propia vía de señalización (STAT1, NF $\kappa$ B, etc.), relacionados con la presentación antigénica (TAP-1, H2-DM $\beta$ , etc) y con la migración leucocitaria (CXCL10, VCAM-1, etc.). En el modelo experimental NOD RIP-HuIFN $\beta$  se detecta un aumento, respecto a su homólogo NOD, de la expresión proteica intrapancreática de quimiocinas y citocinas implicadas en la activación y migración de linfocitos T y NK, como CCL27, CCL5 e IL-12. En islotes de ratones NOD transgénicos sanos se detecta una hiperexpresión respecto a ratones NOD de la misma edad de genes de la familia Reg (*regenerating gene*), correlacionando con la hiperplasia insular asociada a IFN $\beta$  en este modelo. Las proteínas Reg son factores de crecimiento para las células  $\beta$  recientemente descritos como autoantígenos.

**Conclusiones:** El IFN $\beta$  puede potenciar la expresión de genes relacionados con el daño tisular, la migración leucocitaria y la regeneración en células  $\beta$  y en islote en modelos de diabetes autoinmune. Los

patrones de expresión modificados por IFN $\beta$  pueden proporcionar nuevos sustratos antigénicos y acelerar la DT1.

*Financiación:* Instituto de Salud Carlos III (PI020107)

**ESTUDIO DEL PAPEL FUNCIONAL DE CD69 EN UN MODELO DE ARTRITIS AGUDA INDUCIDA POR ANTICUERPOS ANTICOLÁGENO.** *Lamana A, Gómez M, Martínez del Hoyo G, Sancho D, Sánchez-Madrid F. Hospital Universitario de la Princesa, Madrid.*

CD69 es un receptor leucocitario que se induce tempranamente tras activación de forma transitoria en todas las células derivadas de la médula ósea excepto en los eritrocitos y que se detecta en pequeñas poblaciones de células T y B en tejidos linfoides periféricos de individuos sanos. Además, CD69 se expresa en infiltrados leucocitarios de varias enfermedades inflamatorias crónicas. Aún se desconoce el papel funcional de esta molécula así como sus posibles ligandos.

Las aproximaciones *in vitro* utilizando anticuerpos monoclonales anti-CD69 parecen indicar que CD69 se comporta como un receptor co-estimulador más que como una molécula propiamente inhibidora o activadora, a pesar de que esta co-estimulación podría variar dependiendo del contexto celular.

Para estudiar la relevancia fisiológica de CD69 se generaron ratones deficientes CD69 $^{-/-}$ . Debido a que CD69 se expresa persistentemente en los focos inflamatorios y a que el gen está localizado en una región que contiene loci de susceptibilidad para muchas enfermedades autoinmunes, se estudiaron modelos como la artritis inducida por colágeno (AIC). En este modelo se ha visto que CD69 desarrolla una forma exacerbada de la artritis con elevada respuesta de células T y B contra el colágeno. Esta exacerbación de la artritis está relacionada con la reducción de los niveles de TGF- $\beta$  en las articulaciones inflamadas, lo que sugiere que CD69 está actuando como molécula inmunoreguladora a través de la producción de TGF- $\beta$ .

También se ha estudiado el papel de CD69 en un modelo de artritis aguda inducida por anticuerpos monoclonales anti-colágeno II (AIAC). Se trata de un modelo de artritis mediada por granulocitos en el que los mecanismos reguladores de los linfocitos no están implicados, ya que se induce por la administración de una combinación de anticuerpos monoclonales anti-colágeno II exógenos y endotoxina (lipopolisacárido bacteriano, LPS). Los ratones deficientes en CD69 muestran valores de inflamación muy similares a los obtenidos en los ratones normales, en controversia con los datos publicados por Murata y col. (*International Immunology* 2003; 15(8): 987-992) en los que CD69 parecía proteger de la inducción de AIAC. Nuestros experimentos de inducción de artritis han sido corroborados utilizando grupos de ratones normales y ratones tratados con anticuerpos monoclonales anti-CD69 que disminuyen los niveles del receptor.

**CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  DE PACIENTES DE LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.** *López P<sup>1</sup>, Suárez A<sup>1</sup>, Gómez J<sup>2</sup>, Gutiérrez C<sup>1,2</sup>.* <sup>1</sup>Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias.

El objetivo de este trabajo es cuantificar la población de linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  presentes en pacientes de lupus eritematoso sistémico (LES) y analizar la posible existencia de diferencias fenotípicas y

funcionales con respecto a la misma población en adultos sanos. Para ello analizamos el fenotipo de los linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  de sangre periférica de 110 pacientes de LES no seleccionados y 55 controles. Mediante RT-PCR a tiempo real se cuantificaron los niveles de RNAM de marcadores de células Treg (Foxp3, GITR y CTLA-4) en 47 pacientes y 39 controles. La funcionalidad se analizó midiendo su actividad supresora de la proliferación de células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  autólogas estimuladas con células dendríticas. El tamaño y características de la población de células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  se correlacionó con el tratamiento y con las manifestaciones clínicas de la enfermedad. Encontramos que los pacientes de LES presentaban un porcentaje significativamente mayor de células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  que los controles. El análisis fenotípico de individuos sanos mostró que las células CD4 $^{+}$ CD25 $^{low}$  presentaban características de células efectoras/activadas mientras que los linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$  no expresaban marcadores de activación (CD69, CD30, CD154), tenían alta expresión de CD45RO y CTLA-4 intracelular y niveles disminuidos de CD4, todo ello características de los linfocitos Treg. Los linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$  de pacientes presentaban una expresión significativamente mayor de marcadores de activación y menor de CD45RO y CTLA-4 intracelular que los controles y también una menor expresión génica de GITR. Estos resultados sugieren que el incremento en el tamaño de la población de linfocitos CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$  en pacientes se debe a la presencia de células activadas más que a un incremento de las células Treg. No se detectaron correlaciones entre el tamaño de esta población y manifestaciones clínicas concretas pero sí una asociación positiva con el tratamiento con glucocorticoides. Este resultado podría ser debido a una expansión de las células Treg mediada por corticoides o a la presencia de células T activadas en los pacientes con tratamiento esteroideo debido a la mayor actividad de la enfermedad. La clasificación de los pacientes en dos grupos en función del tamaño de su población de células T CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$  indicó que los pacientes con un porcentaje por encima de la media presentaban una menor expresión génica de Foxp3 (en el límite de la significación) y una expresión significativamente mayor de marcadores de activación en su población de células CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$ , lo que sugiere que el incremento del tamaño de esta población, sobre todo en pacientes tratados con corticoides, se debe a la mayor presencia de células T activadas. La baja actividad supresora de los linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$  aislados de pacientes comparada con la observada en controles apoya esta hipótesis. En resumen, estos resultados indican que los pacientes de LES presentan un elevado porcentaje de linfocitos T CD4 $^{+}$ CD25 $^{high}$  con características fenotípicas y funcionales diferentes de las que presentan las células Treg, y sugieren que el incremento en el tamaño de esta población, significativamente mayor en pacientes tratados con esteroides, se debe a la presencia de células T efectoras activadas.

**LINFOCITOS T INFILTRADOS EN LA SINOVIA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE: SENSIBILIDAD A APO2Lr/TRAIL.** *Martínez-Lorenzo MJ\*, Anel A\*\*, Sáez-Gutiérrez B\*, Royo-Cañas M\*, Bosque A\*\*, Lasierra P\*, Larrad L\*.* <sup>\*</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa e Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza. <sup>\*\*</sup>Dpto. Bioquímica. Facultad Ciencias. Universidad de Zaragoza.

**Introducción:** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune con alta incidencia. Se caracteriza por la infiltración de linfocitos y macrófagos en la sinovia, además de hiperplasia. Se produce una disminución de la apoptosis en las células sinoviales, produciendo una res-

puesta inmune anómala, causando finalmente la erosión de la articulación afectadas. Aunque su diagnóstico es efectivo, su tratamiento se basa en agentes inmunosupresores con baja especificidad.

Algunos de los mecanismos de apoptosis que regulan el sistema inmune son el sistema Fas/FasL y el sistema APO2L/TRAIL y sus receptores. En relación con la apoptosis, estudios previos indicaron que los fibroblastos de la sinovia son sensibles a Fas. Otros estudios muestran que los linfocitos infiltrados no expresan FasL, aunque otros indican lo contrario.

**Objetivos:** Estudiar la expresión de marcadores de activación, HLA-DR y CD69 y del receptor de muerte Fas y su ligando FasL y APO2L/TRAIL en linfocitos T infiltrados en el líquido sinovial de pacientes con artritis reumatoide. Se ha analizado la sensibilidad a anticuerpos anti-Fas y APO2Lr/TRAIL usando como control linfocitos T infiltrados de líquido sinovial de pacientes con traumatismo.

**Metodología:** La expresión de proteínas en membrana e intracelular se analizó por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. La muerte celular se cuantificó mediante análisis de la exposición de fosfatidilserina por tinción con anexina V-PE. La actividad citotóxica de diferentes inductores apoptóticos se analizó por el método de Mosmann y azul Trypan.

**Resultados:** Se observó que los linfocitos T infiltrados de pacientes con AR tienen un fenotipo crónicamente activado con altos niveles de expresión de HLA-DR y CD69, al contrario que los linfocitos T infiltrados de pacientes con traumatismo leve o blastos T activados de sangre periférica. Los linfocitos T de pacientes con AR fueron insensibles a la regulación mediada por Fas/CD95. Sin embargo, APO2Lr/TRAIL fue capaz de inhibir el crecimiento celular de linfocitos T del líquido sinovial de pacientes con AR.

En los estudios de expresión de FasL y APO2L, se observó un aumento de expresión de ambos ligandos en pacientes con elevada infiltración de linfocitos. Se ha demostrado que ambos ligandos son secretados al exterior asociados a exosomas.

**Conclusiones:** La persistencia de linfocitos en la sinovia en pacientes con AR podría estar asociada a la resistencia a la regulación mediada por Fas/CD95. Sin embargo, APO2Lr/TRAIL induce inhibición de crecimiento en linfocitos T infiltrados en la sinovia. Estos resultados van a ser corroborados con estudios iniciados en conejos a los que se les inducirá artritis reumatoide y serán tratados con APO2Lr o asociado a exosomas.

*Financiación:* FUNDACION LAIR Y FIS.

**INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA MEDIANTE TERAPIA GÉNICA EN UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE.** *Eixarch H<sup>1</sup>, Espejo C<sup>2</sup>, Vidal F<sup>1</sup>, Garcés S<sup>2</sup>, Castillo M<sup>2</sup>, Montalban X<sup>2</sup>, Barquinero J.* <sup>1</sup>Centre de Transfusió i Banc de Teixits. <sup>2</sup>Unitat de Neuroimmunologia Clínica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.

**Introducción y objetivos:** La expresión de transgenes en el sistema hematopoyético (quimerismo molecular) está asociada generalmente a tolerancia inmunológica frente al transgen utilizado. Nuestro objetivo era inducir tolerancia en un modelo animal de esclerosis múltiple, la encefalomiелitis autoinmune experimental (EAE) mediante la expresión de un antígeno encefalitogénico en el sistema hematopoyético.

**Métodos:** Se diseñó un vector retroviral que contiene un constructo con la secuencia codificante para el péptido 40-55 de la glicoprote-

ína mielínica de los oligodendrocitos (MOG<sub>40-55</sub>) sustituyendo a la región CLIP de la cadena invariante murina (Ii), que denominamos IiMOG, junto a la secuencia codificante de la EGFP como marcador. Se generaron líneas celulares estables productoras del vector retroviral para la transducción de las células madre hematopoyéticas. Como control del trasplante se utilizó un vector que codifica únicamente para EGFP. Se usó como régimen de acondicionamiento a día -3 y -2 previos al trasplante una dosis de 20 mg/Kg de busulfán, dosis que permite un injerto detectable a largo plazo (>120 días) en la mayoría de los casos; posteriormente los ratones C57BL/6 se trasplantaron con 0.8-0.9x10<sup>6</sup> células hematopoyéticas. A los 21 días post-trasplante, los ratones se inmunizaron subcutáneamente con 200 µg de MOG<sub>40-55</sub> emulsificado en adyuvante completo de Freund y recibieron 500 ng de toxina pertussis a las 0 y 48h postinmunización (pi). Se valoró diariamente el curso clínico de la EAE. Los animales fueron sacrificados el día 30 pi y se realizó estudio del injerto y de diferentes variables clínicas.

**Resultados:** Observamos que los ratones trasplantados con la médula ósea transducida con el transgen IiMOG (5/13), estaban protegidos de desarrollar la EAE respecto a los grupos control [EAE (14/15) y EGFP(11/13);  $p=0,003$ ] y que sufrían una EAE menos grave en cuanto a la máxima puntuación clínica alcanzada [MOG<sub>40-55</sub>: 0,9 ± 1,5; EGFP (control de trasplante): 3,5 ± 1,7; EAE (control de enfermedad): 3,7 ± 1,0;  $p=0,000$ ] y a la puntuación clínica acumulada [MOG<sub>40-55</sub>: 8,2 ± 18,7; EGFP: 58,4 ± 29,2; EAE: 63,0 ± 27,5;  $p=0,000$ ]. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el grupo trasplantado con células que únicamente contenían el gen de la EGFP y el grupo de EAE. El acondicionamiento con busulfán no alteró el curso clínico de la enfermedad.

**Conclusiones:** La expresión de MOG<sub>40-55</sub> en el sistema hematopoyético murino induce tolerancia frente a este antígeno en el modelo de EAE. El protocolo utilizado para la inducción de tolerancia no modificó el curso clínico de la EAE por lo que se podría considerar una aproximación terapéutica segura.

**ESTUDIO DE LOS LIGANDOS NATURALES DE CLASE II EN TIROIDES AUTOINMUNES.** *Muixí L, Alvarez I, Carrascal M, Rupe-rez P, Abian J, Jaraquemada D.* Laboratori d'Immunologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

**Introducción:** Las células epiteliales endocrinas de órganos afectados por enfermedades autoinmunes específicas de órgano, como la enfermedad de Graves-Basedow, expresan de forma ectópica moléculas de clase II. Estas células son las dianas del daño tisular y se ha postulado que podrían estar involucradas en la presentación de autoantígenos a células CD4 interviniendo en el mantenimiento y/o regulación de la respuesta autoinmune "in situ". Los ligandos asociados a moléculas de clase II expresadas en células epiteliales en la enfermedad de Graves son hasta el momento desconocidos. Por todo esto la caracterización de los péptidos presentados por moléculas de HLA-DR en tejidos autoinmunes puede aportar información esencial y conducir al diseño de nuevas estrategias de terapia.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo es la identificación de péptidos naturales presentados por moléculas de HLA-DR de células foliculares de muestras de tiroides afectados por la enfermedad de Graves-Basedow.

**Métodos:** Los péptidos presentados por HLA-DR se han aislado mediante cromatografía de afinidad y la caracterización de los mismos se ha realizado con técnicas de espectrometría de masas; Mediante

MALDI-TOF se ha identificado las diferentes especies moleculares de cada una de las fracciones de cada muestra y la posterior secuenciación se ha realizado por nanoESI y por MALDI TOFTOF.

Muchos de los péptidos secuenciados de una de las muestras de tiroides, el TB448 se sintetizaron para realizar posteriormente ensayos de unión a MHC. Para estos ensayos se usaron BLS transfectadas con un alelo de DR, HLA-DR15 (DRB1\*1501) o HLA-DR51 (DRB5\*0101), del haplotipo DR2 expresado en el tiroides TB448.

**Resultados:** De los 6 tiroides analizados se ha obtenido un total de 65 secuencias. Por primera vez se ha conseguido secuenciar un péptido de la tiroglobulina, proteína conocida como uno de los principales autoantígenos en las enfermedades autoinmunes de la tiroides. Este péptido tiene capacidad *in vitro* de unirse a ambas moléculas del haplotipo DR2 expresado por TB448, DR15 y DR51, aunque se une de forma preferente con DR51. Hemos realizado también estudios de modelización mediante métodos de simulación molecular del péptido de la Tiroglobulina unido a los alelos DR15 y DR51, utilizando como punto de anclaje a P1 el residuo Leu<sup>732</sup>. En ambos casos la unión es favorable aunque se observan diferencias en el modo de interacción.

**ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TÍMICA EN PACIENTES CON AUTOINMUNIDAD TIROIDEA.** *Armengol MP, Fernández MA, Sabater L, Juan M, Pujol-Borrell R.* Institut per a la Recerca Biomèdica Germans Trias i Pujol. Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca I el Diagnòstic (LIRAD). Centre de Transfusions i Bank de Teixits (CTBT). Facultat de Medicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra.

El término Enfermedad Autoinmune del tiroides (AITD) incluye varias entidades clínicas, entre las que destacan la tiroiditis de Hashimoto (HT) y la enfermedad de Graves-Basedow (GD). En ambas se observa una infiltración linfocítica en la glándula compuesta por linfocitos T y B, DCs y FDCs que a menudo se estructuran como folículos linfoides funcionales. Con el propósito de estudiar la función tímica, la llegada específica al tiroides de linfocitos T recientes emigrantes tímicos (RTE) y la distribución de los RTEs en diferentes subpoblaciones de PBMCs de enfermos con AITD, hemos comparado el número de círculos de escisión del TCR (TREC) en células CD3+ de sangre periférica de enfermos e individuos sanos del mismo rango de edad. Asimismo hemos cuantificado el número de TRECs en células CD3+ intratiroidales (ITL) y en las de sangre periférica (PBMC) de los mismos pacientes. Las células T CD3+ se han purificado mediante separación celular (cell sorting) y los TRECs se han determinado mediante PCR a tiempo real en linfocitos T de PBMCs de donantes sanos (n=12), PBMCs de enfermos con AITD (n=15) y en ITLs de los mismos enfermos (n=10). Los resultados indican que el contenido de TRECs en periferia en individuos sanos y enfermos es similar aunque pueden encontrarse diferencias en algunos rangos de edad, que deben ser confirmadas con un mayor número de casos estudiados. La comparación entre TRECs en periferia y en la glándula en los enfermos con AITD indica que existen dos patrones: en la mitad de los individuos, el número de TRECs en ITLs es superior al correspondiente en PBMCs, mientras que en la otra mitad se observa un incremento de TRECs en las células T periféricas. Con el objetivo de evaluar la influencia de la proliferación de las células T en los niveles de TRECs, hemos medido la longitud relativa de los telómeros (relative telomere length (RTL)) en células B y T en pacientes con AITD (ITL y PBMC) y en controles (PBMC). En AITDs, la RTL en los linfocitos CD3+ infiltrantes es significativamente menor que en CD3+ de los correspondientes PBMCs

( $11.21 \pm 1.22$  vs.  $13.73 \pm 2.21$ ,  $p=0.0266$ , paired t test). Comparando CD3+ de periferia entre sanos y enfermos autoinmunes no se observan diferencias ( $13.73 \pm 2.21$  vs.  $13.02 \pm 1.06$ ,  $p=0.6165$ , t test). La RTL se ha determinado también a nivel de linfocitos B infiltrantes y circulantes. En los enfermos con AITD, las células CD19+ que infiltran los tiroides presentan unos niveles de RTLs superiores a los de las células B circulantes ( $17.69 \pm 2.70$  vs.  $15.06 \pm 1.53$ ;  $p=0.0260$ , paired t test), mientras que no existen diferencias entre individuos sanos y pacientes a nivel de PBMCs ( $15.06 \pm 1.53$  vs.  $15.13 \pm 2.13$ ;  $p=0.6669$ , t test). El conjunto de resultados sugeriría una proliferación de células CD3+ infiltrantes a nivel de la propia glándula o en ganglios linfáticos regionales, aunque no se puede por el momento descartar un "homing" selectivo de células T memoria al tiroides.

**ANTICUERPOS CONTRA PÉPTIDOS CON EL EPITOPO COMPARTIDO CITRULINADO EN ARTRITIS REUMATOIDE.** *Martínez MA, Delgado J, Díaz C, Vidal S, Juárez C, Rodríguez-Sánchez JL.* Servicio de Inmunología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

Citrulina en la secuencia es necesaria pero no suficiente para que un péptido deiminado sea reconocido por anticuerpos de pacientes con artritis reumatoide (A.R.). El espectro de péptidos citrulinados reconocidos por el suero de pacientes con A.R. varía de unos a otros pacientes. Dado que el denominado epítipo compartido, es una región rica en Argininas sin Prolinas que lo flanquean, y en consecuencia susceptible de citrulinarse, podría a través de dicha modificación posttranslacional jugar un papel fundamental en el desarrollo de la A.R. Varios enfoques que estamos llevando a cabo en nuestro laboratorio tratan de validar esta hipótesis.

En este trabajo presentamos el estudio preliminar de anticuerpos contra péptidos de 18 aa, correspondientes a las secuencias de los residuos 63—80 de los alelos conteniendo el epítipo compartido QRRAA, QKRAA y RRRAA y los mismos péptidos con cambios de Arginina por Citrulina, en diversas posiciones. Dichos péptidos fueron sintetizados por el grupo de Proteómica del Centro Nacional de Biotecnología. Los resultados que aquí recogemos hacen referencia, al estudio de autoanticuerpos, contra el péptido conteniendo la secuencia QCit-CitAA y su correspondiente no sustituido QRRAA, en el suero de 78 pacientes de A.R. El estudio ha sido realizado empleando una técnica de ELISA. Como controles para la optimización de la técnica hemos empleado el péptido denominado cfc6, que comprende los residuos 306-324 de la profilagrina con sustituciones de Argininas por Citrulinas en posiciones 312 y 314 y el mismo péptido sin dichas sustituciones. Contra dicho péptido habían sido descritos anticuerpos en el 48% de pacientes con A.R.

**Resultados:** Treinta y uno de los 78 sueros (40%) fueron positivos para el péptido citrulinado del epítipo compartido. Todos excepto uno eran positivos en el kit para anticuerpos anti CCP. Los sueros positivos pertenecían tanto a pacientes cuyos alelos DR tenían en su secuencia el epítipo compartido analizado (19) como los que no lo tenían (12). Además 10 sueros reconocían el péptido sin modificación de las Argininas, cinco pertenecían a los que reconocían además el mismo péptido citrulinado, y los otros cinco eran negativos para el citrulinado. Ninguno de los sueros humanos normales analizados, ni los pocillos de la placa no sensibilizados con péptido fueron positivos.

**Conclusiones:** La secuencia de epítipo compartido citrulinado analizado en este estudio, es un sustrato reconocido por algunos sueros de pacientes de A.R., con una sensibilidad casi similar a la del pép-



tido cfc6. Los sueros positivos no parece que lo sean porque la respuesta de anticuerpos haya sido establecida específicamente contra dicho péptido presente en el DR, ya que pacientes sin dicha secuencia también fueron positivos. La respuesta frente al péptido sin modificar, esto es con sus Argininas, parece específica de algunos pacientes y aparentemente no guarda relación con los que reconocen el mismo citrulinado, ya que hay sueros que reconocen el uno y no el otro. En cualquier caso el análisis de la respuesta T frente a dichos péptidos por parte de los pacientes con A.R. esperamos nos den claves que sirvan para explicar el significado del epitopo compartido y los anti CCP, en la patogenia de la A.R.

**HLA-DR, ANTI PÉPTIDO CITRULINADO, ANTI ARGINIL DEIMINASA Y EROSIONES EN ARTRITIS REUMATOIDE.** López M, Martínez MA, Delgado J, Juárez C, Vidal S, Díaz C, De la Calle O, Rodríguez-Sánchez JL. Servicio de Inmunología. Hospital de Sant Pau. Barcelona.

El denominado epitopo compartido hace referencia a las secuencias QKRAA, QRRAA, RRRRAA, presentes en posiciones 70-74 de diversos alelos DR, y han sido correlacionadas positivamente con la Artritis reumatoide. Anticuerpos anti péptidos citrulinados (CCP), son considerados, el marcador serológico más específico y sensible para el diagnóstico de dicha entidad. La citrulinación es un proceso postraducional, catalizado por la enzima peptidil-arginil deiminasa (PAD). Para analizar posibles correspondencias entre estos elementos y algunos aspectos clínicos de la A.R. hemos desarrollado el siguiente estudio.

1) Tipaje por técnicas de alta resolución de los alelos de 83 pacientes diagnosticados de A.R. según ARA. Las frecuencias se comparan con las correspondientes a 941 individuos seleccionados al azar.

2) Estudio de anti CCP en los mismos 83 pacientes, con dos kits, uno de ellos de reciente generación.

3) Estudio con técnica de ELISA de anticuerpos anti PAD 2, en 76 de los 83 pacientes.

**Resultados:** 45 de los 83 pacientes (54%), tenían al menos un alelo con epitopo compartido *versus* un 29% en la población general. Tanto en los pacientes con A.R. como en la población general con alelos con epitopo compartido (E.C.), el 90% de ellos pertenecían a los que tienen la secuencia QRRAA. Por otra parte, alelos definidos como protectivos para la A.R. como el 0701, 1201, 1301 y 1501, estaban presentes en el 50% de la población general *versus* el 24% de las A.R., siendo la diferencia más significativa para el 0701, 30% *versus* 13%.

En relación a los anti CCP, con el kit de primera generación el 65% fueron positivos mientras que con el de reciente generación lo fueron el 84%. Doce de los 14 nuevos positivos lo fueron a títulos inferiores a 50 u (esto es, de los positivos los más bajos de la serie). Anti PAD 2 fue detectado en los sueros de A.R. con una sensibilidad de 22,3% y una especificidad de 96,7%.

**Conclusiones:** Se confirma la mayor frecuencia de alelos con epitopo compartido en A.R. que en la población general. A nivel de alelos con E.C. el 0101 es el más frecuentes y sus diferencias entre A.R. y población general las más significativas 24% *versus* 11%. Estos datos nos hacen pensar que no solo el epitopo compartido sino el propio alelo, puede jugar un papel en la susceptibilidad para A.R. De significado son también las diferencias a nivel de 0701 como alelo protector. Por otra parte el 88% (40 de 45) de los pacientes con E.C. presentaban anticuerpos contra CCP. Mientras que los E.C. negativos, 30 de 38 (79%) fueron positivos para anti CCP. Aquí hay que hacer la salvedad de que 10 de los 30 positivos lo eran a títulos bajos.

En relación a los anti PAD 2, aunque la especificidad es aparentemente buena, la sensibilidad es baja y no permite realizar correlaciones. Posiblemente otras isoformas, concretamente PAD 3 de procedencia humana, pueda incrementar la sensibilidad de manera importante. En relación a las correlaciones clínicas, para los mismos tiempos de evolución los sueros con títulos más elevados de anti CCP, se correlacionan con mayor grado de erosiones.

**APROXIMACIÓN EXPERIMENTAL PARA LA INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA EN EL RATÓN NOD MEDIANTE EL QUIMERISMO MOLECULAR.** Pastor X, Eixarch H, Alba A, Carrillo J, Puertas MC, Planas R, Ampudia R, Pujol-Borrell R, Vives-Pi M, Barquinero J, Verdaguer J. Unitat d'Immunologia - LIRAD (CTBT) Hospital Universitari Germans Trias i Pujol (Badalona)/ Unitat de Diagnòstic i Teràpia Molecular - CTBT Hospital Universitari Vall d'Hebron (Barcelona).

La cepa de ratón NOD (Non Obese Diabetic) desarrolla espontáneamente una forma de diabetes autoinmune similar en muchos aspectos a la diabetes mellitus tipo 1 humana, caracterizada por una destrucción masiva de las células  $\beta$  pancreáticas productoras de insulina, mediada principalmente por linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos (CTLs). En estudios previos se ha comprobado que la expresión transgénica del TCR de un clon representativo de dichos CTLs (8.3-TCR) en ratones NOD (ratones 8.3-NOD) acelera dramáticamente la evolución de la enfermedad. Además, al tratar ratones NOD con el péptido NRP-A7, un mimetopo agonista reconocido por el 8.3-TCR, se induce resistencia al desarrollo de la diabetes por un mecanismo de delección de los CTLs indicando que los CTLs capaces de reconocer NRP-A7 son claves en el desarrollo de la enfermedad.

**Objetivo.** El objetivo del estudio es inducir tolerancia a largo plazo mediante el quimerismo molecular de distintos péptidos agonistas para el 8.3-TCR en el sistema hematopoyético murino, y conocer qué tipo(s) de célula(s) presentadora(s) de antígeno es(son) responsable(s) de esta tolerancia. Nuestro primer objetivo ha sido el diseño y la construcción de vectores retrovirales portadores de la secuencia para la expresión de los péptidos NRP (péptido agonista con secuencia muy similar a la del NRP-A7, pero con menor afinidad para el 8.3-TCR), NRP-A7, IGRP<sub>206-214</sub> (-Islet Glucose-6-Phosphatase catalytic subunit Related Protein- antígeno nativo reconocido por el 8.3-TCR) o TUM (péptido control irrelevante), y el análisis de la capacidad de las células trasplantadas de generar los distintos linajes hematopoyético capaces de expresar de forma estable los péptidos recombinantes.

**Metodología:** se han transducido líneas celulares con vectores retrovirales recombinantes para conseguir líneas que expresen los péptidos comentados en el contexto del MHC de clase I, y se ha valorado la funcionalidad del sistema *in vitro* mediante el análisis del repertorio peptídico presentado por H-2K<sup>d</sup> por espectrometría de masas, y del reconocimiento del complejo péptido/K<sup>d</sup> por el 8.3-TCR mediante ensayos de citotoxicidad. Para determinar la capacidad de injertar de los animales receptores y hacer un seguimiento de la reconstitución hematopoyética multilínea a partir de las células transducidas se ha trasplantado médula ósea transducida con los vectores retrovirales correspondientes a hembras NOD de 5 semanas irradiadas letalmente (9 Gy).

**Resultados:** el péptido recombinante se encuentra en el repertorio del MHC de clase I, y es reconocido de forma eficiente en el contexto de las moléculas de clase I de H-2K<sup>d</sup> por el 8.3-TCR. Además,

en animales trasplantados se observa reconstitución multilinaje a partir de las células transducidas.

**Conclusiones:** Se han desarrollado vectores retrovirales capaces de transducir eficientemente células de médula ósea murina con las secuencias correspondientes a nuestros péptidos de interés (NRP, NRP-A7, IGRP<sub>206-214</sub> o TUM); las células transducidas expresan los péptidos eficientemente en el contexto de moléculas del MHC de clase I; las células de médula ósea murina transducidas tienen capacidad de repoblación *in vivo* y de generar los distintos linajes hematopoyéticos; se han desarrollado las herramientas y modelos necesarios para abordar los experimentos *in vivo* que confirmen o descarten la hipótesis planteada.

## SESIÓN 5: INMUNODEFICIENCIAS Y ALERGIA

**Moderadores:** M<sup>a</sup> Cruz García Rodríguez (H. Univ. La Paz, Madrid), Ignacio J. Molina (Univ. de Granada)

**LAS SECUENCIAS INMUNOESTIMULADORAS DE ADN PREVIENEN LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL Y EL FENOTIPO ALÉRGICO EN UN MODELO MURINO DE INFLAMACIÓN PULMONAR ALÉRGICA.** *Conejero Hall L<sup>1,2</sup>, Higaki Y<sup>1,2</sup>, Baeza ML<sup>1</sup>, Rubio M<sup>1</sup>, Varela-Nieto P<sup>2</sup>, Zubeldía JM<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Hospital General Universitario Gregorio Marañón; <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas "Alberto Sols".

**Introducción:** Estudios previos han demostrado la capacidad de las secuencias inmunoestimuladoras de ADN (ISS-ODNs) que contienen motivos de CpG, de ser potentes estimuladores del sistema inmune innato y de la producción de citoquinas Th1. En la patogenia de las enfermedades alérgicas se objetiva un incremento específico de la respuesta Th2, siendo aún desconocidos los mecanismos inmunológicos reguladores de estas enfermedades.

**Objetivos:** Estudiar, en un modelo murino de inflamación bronquial alérgica, el posible efecto preventivo de la co-administración de ISS-ODN y las proteínas del polen de olivo (olea) previa a la inducción de sensibilización.

**Metodología:** Se emplearon ratones Balb/c que se distribuyeron en diferentes grupos de inmunización: olea, olea con ISS-ODN, ISS-ODN y salino. Posteriormente, fueron sensibilizados al polen de olivo. Se recogieron muestras séricas semanalmente para medir los niveles de inmunoglobulinas. Se realizaron pruebas de función pulmonar mediante pletismografía corporal total, y, tras el sacrificio, se estudió el grado de infiltración celular y la producción de moco en la vía aérea pulmonar. Finalmente, se cultivaron los esplenocitos para cuantificar mediante ELISA la producción de citoquinas en los sobrenadantes tras estímulo específico.

**Resultados:** La administración conjunta de ISS-ODN y olea antes de la sensibilización produce cambios significativos tanto en los parámetros funcionales como en los inmunológicos: a) Se observa una significativa reducción en la producción de IgE específica frente a olea ( $p=0.05$ ); b) Se detectaron niveles más elevados de IgG2a, IFN- $\gamma$  e IL-18 ( $p<0.05$ ); c) Se redujo la producción de moco y la infiltración celular en el parénquima pulmonar; d) Las pruebas de función pulmonar demostraron una disminución de la hiperreactividad bronquial a metacolina ( $p<0.05$ ).

**Conclusión:** La inmunización con ISS-ODN y olea, recibida previamente a la sensibilización, evita el desarrollo del fenotipo alérgico

en nuestro modelo murino de inflamación bronquial alérgica. Esta aproximación experimental puede ser una nueva estrategia para la prevención de las enfermedades alérgicas.

**LA COEXPRESIÓN DE BTK NORMAL Y MUTADA EN MODELOS CELULARES DE ALX NO PRODUCE EFECTO DOMINANTE NEGATIVO.** *Pérez De Diego R, Bolland S, Ferreira A, Fontán G, García Rodríguez MC.* Servicio de Inmunología. Hospital Universitario La Paz, Madrid.

**Introducción:** La agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX) se produce por mutaciones en el gen que codifica para la Btk (tirosina quinasa de Bruton); un pequeño porcentaje de los pacientes tienen mutaciones missense que les permite la expresión de proteína mutada.

**Objetivo:** Estudiar si la coexpresión de proteína normal y mutada puede producir efecto dominante negativo en el modelo celular DT40.

**Material y métodos:** En nuestra serie de 46 familias de ALX, 7 pacientes expresan niveles normales de proteína mutada. Se generan dichas mutaciones mediante mutagénesis dirigida en los vectores pApu-ro y pSGT, que posteriormente son transfectados por electroporación. Los clones son seleccionados por resistencia a puomicina en células DT40 wt y DT40 deficiente en Btk. Se realizan Western blot de Btk para detectar la presencia de proteína. Se miden los niveles de calcio mediante citometría de flujo con los marcadores Fluo-4 y Fura Red. Y se realizan estudios de actividad quinasa estimulando las células con Anti-IgM y realizando Western blot de Anti-Fosfo-Tyr223-Btk.

**Resultados:** La transfección del gen mutado en células DT40 Btk no corrige los niveles de Calcio tras estimulación con Anti-IgM, mientras que el gen normal si lo hace. La coexpresión de proteína normal y mutada no produce en ningún caso efecto dominante negativo que afecte a la señal de calcio en respuesta a Anti-IgM, incluso con niveles de expresión de Btk mutada muy elevados.

**Conclusiones:** Nuestro estudio se centra en analizar que tipo de mutaciones serían potencialmente tratables en un futuro mediante terapia génica. Para ello usamos un modelo celular, el linfoma B de pollo DT40, cuya respuesta a la vía Anti-IgM-BCR por ausencia de Btk es similar a humanos. Para ello hemos reproducido las mutaciones encontradas en nuestros pacientes en modelos celulares observando que en aquellos que no expresan proteína, la inserción del gen normal permite una recuperación de los niveles de Ca y de expresión de Btk. Y en aquellos pacientes que expresan proteína hemos observado que no existe efecto dominante negativo.

**INHIBICIÓN DE LA INFLAMACIÓN CRÓNICA DE LAS VÍAS RESPIRATORIAS Y DE LA REMODELACIÓN PULMONAR MEDIANTE EL TRATAMIENTO CON EL GEN DE LA GALECTINA-3 EN UN MODELO MURINO DE ASMA CRÓNICO.** *López F<sup>1</sup>, Del Pozo V<sup>1</sup>, Miguel T<sup>2</sup>, Sastre B<sup>1</sup>, Seoane C<sup>1</sup>, Civantos E<sup>1</sup>, Llanes E<sup>1</sup>, Baeza ML<sup>3</sup>, Palomino P<sup>1</sup>, Cárdbaba B<sup>1</sup>, Gallardo S<sup>1</sup>, Manzarbeitia F<sup>2</sup>, Zubeldía JM<sup>3</sup>, Lahoz C<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Patología, Fundación Jiménez Díaz, Madrid. <sup>3</sup>Servicio de Alergología, Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

**Objetivo:** El asma es una de las enfermedades crónicas más frecuentes en los niños y de una ascendente incidencia en los adultos.

Estudios previos realizados en nuestro laboratorio, en un modelo experimental de asma agudo, han demostrado que la instilación de un plásmido que contiene el gen de la Galectina-3 (Gal-3), produce una reducción del infiltrado celular en pulmón así como una mejoría en los parámetros fisiopatológicos pulmonares agudos, en un modelo de ratas.

Dado que el asma es una enfermedad crónica con tendencia a la remodelación de las vías aéreas, era urgente comprobar si el tratamiento ensayado previamente también es efectivo en un modelo de asma crónico murino con características similares al asma humano.

**Metodología:** La inflamación aérea crónica fue inducida mediante la administración intranasal de ovalbúmina (OVA) durante un periodo de doce semanas. En el grupo de ratones tratados, el gen de la Gal-3 se administró mediante instilación intranasal de un plásmido conteniendo dicho gen. La hiperrespuesta bronquial a metacolina se midió en sucesivas semanas del estudio. Las células obtenidas mediante lavados broncoalveolares, fueron utilizadas para estudios citométricos.

La expresión del gen de Gal-3 y citocinas Th2 en el pulmón, se analizaron en los diferentes grupos de estudio mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Además se realizó un análisis histológico pulmonar mediante las tinciones Hematoxilina-Eosina, PAS y Tricrómica de Mason. También se cuantificó el colágeno pulmonar mediante el método del Sircol.

**Resultados:** Nuestros resultados demuestran que a las doce semanas en los ratones no tratados aparecen signos de cronicidad del asma como son la alteración de los parámetros pulmonares, aumento de la fibrosis y remodelación de las vías aéreas. Por el contrario, el tratamiento con el plásmido que contiene el inserto del gen Gal-3, produce una disminución en el porcentaje de eosinófilos pulmonares ( $5.18 \pm 0.8$  vs.  $11.65 \pm 3$ ,  $p < 0.05$ , comparando el grupo tratado frente al control positivo) así como una normalización en la hiperrespuesta bronquial a metacolina (% de Penh a la dosis de 48 mg/ml de metacolina, es  $345 \pm 56$  en los animales tratados frente a  $780 \pm 150$  en el grupo control positivo,  $p < 0.001$ ). Además en el grupo de ratones tratados con el plásmido con el gen Gal-3, se observa una evidente mejoría de la fibrosis pulmonar y de la secreción mucosa bronquial, junto con una reducción significativa en la cuantificación del colágeno pulmonar ( $8.49 \pm 3$  vs.  $42.96 \pm 12$ ,  $p < 0.001$ ).

**Conclusiones:** El tratamiento con el plásmido que contiene el gen de GAL-3 que inhibe el gen de la interleucina 5 (IL-5), es muy útil no solo en la prevención de la reacción asmática aguda sino que también es una terapia novedosa en el tratamiento del asma crónico, con excelentes resultados en la reducción de la eosinofilia pulmonar, hiperrespuesta bronquial y remodelación pulmonar.

**PÉRDIDA O MODULACIÓN DE CD2 EN LINFOCITOS T DE SANGRE PERIFÉRICA ASOCIADA A INMUNODEFICIENCIA Y DERMATITIS DE CONTACTO CRÓNICA.** *Pruneda L<sup>1</sup>, Asensi V<sup>2</sup>, Tricas L<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Central de Asturias (HUCA).

**Historia clínica:** Paciente varón de 28 años de edad ha presentado meningitis debida a *Cryptococcus neoformans*. Trabaja en un taller de metal y tiene dermatitis crónica de contacto por intolerancia al níquel y cromo, cuya primera manifestación apareció hace 10 años como consecuencia de una prótesis metálica para curar una fractura de tibia y peroné que fue retirada un año después. Desde entonces, presenta lesiones cutáneas pruriginosas en extremidades inferiores, más extensas en la pierna tratada, extremidades superiores y tronco. Ha recibido trata-

miento durante los últimos 10 años con corticoesteroides vía IM. En estas lesiones se cultivó *Mycobacterium kansasii* hace 2 años.

**Evaluación inmunológica:** Serología HIV negativa. Cuantificación de inmunoglobulinas, C3, C4 y CH50 normal. Linfopenia severa. Reducción importante del porcentaje y del valor absoluto de linfocitos T CD3+ (41%) y linfocitos T CD4+ (4%). Ausencia de expresión de CD2 en linfocitos T CD3+. También fracasan en formar rosetas con hemáties de carnero. No presenta respuesta proliferativa al estimular con antígenos (extracto de *Candida albicans* y toxoide tetánico+diftérico) ni con anticuerpo monoclonal anti-CD3 soluble e inmovilizado. Sin embargo, las respuestas proliferativas a anticuerpo anti-CD3 añadiendo coestimulación con anti-CD28, al estímulo con fitohemaglutinina y con IL2 no están bloqueadas.

Aunque se va a estudiar la expresión de CD2 en linfocitos T de sangre periférica de la familia, el hecho de que esta inmunodeficiencia no se haya manifestado hasta la edad adulta, sugiere pensar que la modulación de CD2 en linfocitos T puede ser adquirida, y quizás relacionada con la reacción de hipersensibilidad tipo IV desencadenada por la intolerancia a níquel y cromo. En la literatura, hemos encontrado dos casos clínicos descritos que presentan linfocitos T CD3+ CD2- en sangre periférica, con etiología desconocida.

**POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DE LOS GENES TNF- $\alpha$ , IL-10 AND TGF- $\beta$  GENES Y SUS INTERACCIONES GÉNICAS EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA HIPERSENSIBILIDAD FRENTE A LA FOSFOLIPASA A<sub>2</sub> DEL VENENO DE APIS MELLIFERA.** *Sánchez-Velasco P<sup>1</sup>, Ruiz de Alegría C<sup>1</sup>, Antón E<sup>2</sup>, López-Hoyos M<sup>1</sup>, Jerez J<sup>1</sup>, Ausín-Ortega F<sup>1</sup>, Leyva-Cobián F<sup>1</sup>.* Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Alergología, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Santander

La hipersensibilidad debida a la picadura de abeja es una entidad clínica de importancia debido a la mortalidad producida. Se han definido químicamente varios de los antígenos responsables y los péptidos capaces de unirse a determinadas moléculas MHC-II. En un estudio reciente hemos demostrado que la hipersensibilidad al antígeno fosfolipasa A<sub>2</sub> de veneno de abeja (bvPLA<sub>2</sub>) se asocia significativamente con la presencia de determinados alelos del MHC-II (DRB1\*0101, DRB1\*0103, DQA1\*0101 y DQB1\*0501) y el haplotipo DRB1\*0103-DQA1\*0101-DQB1\*0501. Por otra parte, está establecido que la regulación de la IgE, la eosinofilia, la proliferación de las células cebadas y la activación de los linfocitos T, está mediada por citocinas. En esta comunicación se presenta un estudio de los polimorfismos de los promotores TNF- $\alpha$  y de otras citocinas (IL-10, TGF- $\beta$ ) y las interacciones génicas entre ellos, en pacientes alérgicos para bvPLA<sub>2</sub> y su comparación con individuos normales seleccionados en la misma localidad geográfica. Se razonó que como el gen para TNF- $\alpha$  se localiza en el cromosoma 6, podría definirse un haplotipo extendido que se asociase con riesgo a hipersensibilidad a la picadura de abeja. Los resultados obtenidos establecen una relación significativa entre la presencia del alelo C en el codón 10 y en el codón 25 del TGF- $\beta$ 1 ( $p < 0.0001$ ) y del alelo A del TNF- $\alpha$ (-308) ( $p < 0.000056$ ) con hipersensibilidad a bvPLA<sub>2</sub>. La significación estadística es aún mayor cuando se considera el genotipo AA del TNF- $\alpha$ (-308) ( $p < 0.00000001$ ). Existe también correlación estadística significativa cuando se estudian las interacciones génicas entre los genes de linfocinas: TNF- $\alpha$ (A/G) con TGF- $\beta$ (C/T) ( $p < 0.001$ ); TGF- $\beta$ (G/C) ( $p < 0.01$ ); IL-10(G/A) ( $p < 0.02$ ); IL-10(A/G) ( $p < 0.0005$ ); IL-10(C/T) ( $p < 0.0005$ ) e IL-10(C/A) ( $p < 0.0005$ ).

**DEFICIENCIA DE MBL (LECTINA UNIDORA DE MANOSA), DE SU FUNCIÓN ACTIVADORA DEL COMPLEMENTO VÍA LECTINAS Y SU ASOCIACIÓN CON LA NEUMONÍA NEUMOCÓCICA.** Pérez-Castellano M<sup>1</sup>, Payeras A<sup>2,4</sup>, Peñaranda M<sup>2</sup>, Pujalte F<sup>1</sup>, Vidal J<sup>1</sup>, Riera M<sup>2</sup>, Milà J<sup>1</sup>, Matamoros N<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio Inmunología, <sup>2</sup>Servicio Medicina Interna, <sup>3</sup>Urgencias Medicina. Hospital Universitari Son Dureta, <sup>4</sup>Hospital Son Llàtzer. Palma de Mallorca, Illes Balears.

Los polimorfismos del gen MBL ("mannose-binding lectin") se asocian con niveles bajos de proteína en sangre y con ello se produce una alteración de la activación del complemento por la vía de las lectinas y un aumento del riesgo de infecciones. Hay estudios escasos y conflictivos sobre la infección por *Streptococcus pneumoniae* y la deficiencia de MBL.

**Objetivo:** Estudiar la relación existente entre las variaciones genotípicas de MBL, sus niveles en suero y su capacidad para activar el complemento en pacientes con infección por *Streptococcus pneumoniae*.

**Metodología:** Se han estudiado 80 individuos con neumonía neumocócica (con bacteriemia y sin bacteriemia) confirmada por la positividad del cultivo de esputo o hemocultivo, descartándose aquellos individuos con VIH u otra enfermedad concomitante grave, y una muestra de 90 individuos de población sana. Se ha realizado el genotipado del promotor y exón 1 de la MBL por PCR-SSP. Se han estudiado durante la infección aguda y en situación basal (post infección), sus niveles en suero mediante ELISA (AntibodyShop®.Denmark) y su capacidad para activar el complemento vía lectinas mediante ELISA con manosa fijada en fase sólida (Wielisa® Wieslab AB.Sweden). El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y chi-cuadrado. En todos los casos se usó un nivel de significación estadística de P<0.05.

**Resultados:** El genotipo A/0 es más frecuente en aquellos pacientes que presentan neumonía sin bacteriemia en comparación con el grupo control y los pacientes con neumonía con bacteriemia (53% vs 36) no alcanzando significación estadística (ns).

Los niveles de MBL son significativamente más altos en aquellos individuos que presentan infección que en el grupo control para el mismo genotipo de MBL: A/A (media ± ES): 4325 ± 350.6 ng/ml vs 3030 ± 282 (P<0.001); YA/0 (media ± ES): 1077 ± 125.6 ng/ml vs 529.3 ± 114.6 (P<0,01), no existiendo diferencias en el grupo XA/0. Los niveles de MBL durante la fase aguda de la enfermedad son significativamente más altos que en estado basal. (P=0.022). La capacidad de activar el complemento vía lectina también es significativamente superior en la fase aguda (P=0.0003), no modificándose la capacidad de activar el complemento vía clásica, ni alterna.

**Discusión:** MBL se comporta como una proteína de fase aguda. Nuestros resultados sugieren que aunque los polimorfismos de la MBL tienen un papel en la mayor susceptibilidad en la neumonía neumocócica, se requieren factores adicionales para ser clínicamente relevante su deficiencia.

**LECTINA UNIDORA DE MANOSA (MBL). CORRELACIÓN ENTRE POLIMORFISMOS GENÉTICOS, CONCENTRACIÓN SÉRICA Y FUNCIONALIDAD DE LA ACTIVACIÓN DEL COMPLEMENTO VÍA LECTINAS.** Pérez-Castellano M, Pujalte F, Muñoz-Saá I, Cambra A, Escobar D, Milà J, Matamoros N. Servicio Inmunología. Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca. Illes Balears.

La proteína unidora de manosa (MBL, mannose-binding lectin) es un componente del sistema inmunológico innato con una función acti-

vadora del complemento por la vía de las lectinas. Algunos polimorfismos en la región promotora, y en el exón 1 del gen de la MBL dan lugar a niveles bajos de proteína en sangre. También producen una alteración de la función opsonofagocitaria que se asocia clínicamente con un mayor riesgo de infecciones. Apenas existen estudios que correlacionen las variaciones alélicas del gen MBL, su concentración proteica en sangre y la función activadora del complemento. Datos de importancia en estudios clínicos.

Se ha estudiado una muestra de 200 individuos adultos seleccionados al azar. El genotipado se realizó mediante PCR-SSP, tanto del exón 1 como del promotor. Los cuatro haplotipos observados del promotor (LXP, LYP, LYQ, HYP) están en desequilibrio de unión con los alelos del exón 1 (denominando "A" al alelo salvaje y "0" al mutado). Se han clasificado los individuos según el genotipado en: YA/YA, YA/XA, XA/XA, YA/0, XA/0, 0/0. Posteriormente, con el fin de evitar grupos de tamaño reducido, se nombran de una manera abreviada como A/A total (YA/YA, YA/XA, XA/XA), YA/0, XA/0, 0/0. Se ha medido la concentración de MBL en suero mediante ELISA (AntibodyShop®.Denmark) y la activación del complemento vía lectinas mediante ELISA con manosa fijada en fase sólida (Wielisa® Wieslab AB. Sweden).

El análisis estadístico se realizó mediante ANOVA de una vía y el coeficiente de correlación no paramétrico de Spearman. En todos los casos se usó un nivel de significación estadística de P < 0.05.

Se observan diferencias estadísticamente significativas (P<0.01) entre los niveles de MBL de los individuos con genotipo YA/YA en comparación con YA/0, XA/0 y 0/0, y también entre YA/XA con YA/0, XA/0 y 0/0 (P<0.001). No se observan diferencias en los niveles de MBL entre individuos con genotipado XA/XA vs YA/0. Existe una buena correlación (r = 0.8; P<0.001) entre niveles de MBL en suero y su capacidad para activar el complemento vía lectinas, así como, entre los distintos genotipos y su capacidad de activar el complemento (A/A vs YA/0 P<0.001, A/A vs XA/0 P<0.001, YA/0 vs XA/0 P<0.05).

A pesar del gran rango de los valores de activación del complemento, sesgado a favor de los valores bajos, no se han observado individuos con niveles normales-altos de MBL y baja función activadora del complemento vía lectinas, que debieran corresponder posiblemente a alteraciones en las proteínas asociadas a MBL (MASP).

**DEFICIENCIA PARCIAL DE IFN $\gamma$ R1. DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO.** Cárdenas MP<sup>1</sup>, García-Laorden MP<sup>1</sup>, Álvarez-Santana MC<sup>1</sup>, García-Saavedra AD<sup>1</sup>, Santiago E<sup>1</sup>, Francés A<sup>2</sup>, Domínguez-Acosta AR<sup>1</sup>, Rodríguez-Gallego JC<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Insular, Las Palmas de Gran Canaria.

La susceptibilidad mendeliana a infección por micobacterias puede ser debida, entre otras anomalías genéticas, a la deficiencia de IFN $\gamma$ R1. La forma más frecuente es el déficit parcial autosómico dominante. El déficit completo es debido a mutaciones que impiden la expresión del receptor o la unión a su ligando. Se ha descrito una familia con déficit parcial autosómico recesivo. Tras la estimulación con IFN $\gamma$ , en el proceso de señalización, se fosforila el Stat-1, el cual posteriormente dimeriza y se trasloca al núcleo, induciendo la expresión génica.

Se realizaron diversos estudios dirigidos al diagnóstico de 3 pacientes, pertenecientes a 2 familias, no emparentadas. Los pacientes presentaban infecciones diseminadas por micobacterias y en al menos uno de ellos se observó la formación de granulomas bien estructurados

(tipo I). En concreto, se analizó la fosforilación de STAT-1 mediante citometría de flujo en respuesta a dosis crecientes de IFN $\gamma$ , datos que se compararon con el marcaje en membrana del receptor del IFN $\gamma$ , la producción de TNF $\alpha$  en respuesta a LPS y LPS + IFN- $\gamma$  y la expresión de CD64 a dosis crecientes de IFN $\gamma$ .

Los tres pacientes presentan una mutación T188G, Val63Gly, en el sitio de unión del receptor al IFN $\gamma$ . Los niveles de fosforilación de Stat-1 fueron reducidos tras estimulación con bajas concentraciones de IFN $\gamma$ , mientras que a concentraciones altas aumentaban y eran normales en respuesta a IFN $\alpha$ , en comparación con controles sanos.

La fosforilación de Stat-1 y la inducción de CD64, en respuesta a IFN $\gamma$  son muy sensibles para detectar alteraciones en la respuesta a IFN $\gamma$ , incluso en deficiencias parciales con sólo un defecto moderado.

**Financiación:** Red-Respira ISCiii-RTIC-03/11 e Instituto Canario de Investigación del Cáncer ISCiii RTICCC-C03/10.

**ESTUDIO DE MUTACIONES EN EL GEN AIRE EN PACIENTES CON SOSPECHA DE SÍNDROME POLIGLANDULAR AUTOINMUNE TIPO I.** *Delgado Cerviño E<sup>1</sup>, Álvarez Doforno R<sup>1</sup>, González Casado P<sup>2</sup>, Martínez López MM<sup>2</sup>, Salcedo Moreno C<sup>1</sup>, Gracia Bouthelier R<sup>2</sup>, Fontán Casariego G<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital La Paz (Madrid). <sup>2</sup>Servicio de Endocrinología, Hospital La Paz (Madrid).

**Introducción:** El Síndrome Poliglandular Autoinmune tipo I (APS-1) es una enfermedad autosómica recesiva debida a mutaciones en el gen AIRE (Autoimmune Regulator), que se localiza en el cromosoma 21. El diagnóstico clínico se suele caracterizar por la aparición de al menos dos de los siguientes criterios: candidiasis mucocutánea crónica, hipoparatiroidismo autoinmune y/o insuficiencia adrenal primaria autoinmune. Además pueden presentarse otros procesos autoinmunes como hepatitis, oncodistrofia, diabetes mellitus tipo 1, tiroiditis, hipopituitarismo. Se han descrito al menos 45 mutaciones distintas no existiendo relación genotipo/fenotipo.

**Objetivos:** Se realiza estudio inmunológico y genético de 4 pacientes con sospecha de APS-1.

**Pacientes:** *Caso 1*, niña de 11 años (consanguinidad de 2º grado) con hipoparatiroidismo, cuadro malabsortivo de dudosa etiología y hepatitis autoinmune; *Caso 2*, paciente de sexo femenino de 17 años, con hepatitis autoinmune, hipoparatiroidismo autoinmune, anticuerpos antitiroideos con función tiroidea normal, candidiasis mucocutánea, distrofia ungueal y bronquiolitis obliterante de origen incierto, a la espera de trasplante pulmonar; *Caso 3*, varón de 15 años con candidiasis mucocutánea, ferropenia, linfopenia y onicomycosis en manos, y hepatitis autoinmune; *Caso 4*, niña de 14 años con amenorrea primaria (posible hipogonadismo gonadotropo), pancitopenia y hepatitis autoinmunes, espondililistesis S1-S2, procesos diarreicos de 3-4 días de duración, fenómeno de Raynaud, hipotiroidismo central e hiperglucemia secundaria a tratamiento inmunosupresor.

**Materiales y métodos:** Estudio inmunológico. Estudio genético: a partir de ADN genómico, realizando amplificación por PCR de los 14 exones y las regiones intrónicas adyacentes y posterior secuenciación.

**Resultados:** *Estudio genético:* en el *caso 1* encontramos una deleción de 13 pares de bases. Se trata de un punto caliente, en el exón 8 descrito al menos en 51 pacientes, la mayoría en Gran Bretaña. No encontramos mutación en los demás casos.

**Conclusión:** El Síndrome Poliglandular Autoinmune es una enfermedad heterogénea. Existen diversas series en las que no se encuen-

tra mutación en el gen AIRE, por lo que deben existir otros genes implicados que será necesario estudiar.

**HETEROGENEIDAD GENÉTICA Y CLÍNICA EN LOS TRASTORNOS AUTOINFLAMATORIOS ASOCIADOS A CRIOPIRINA (CAPS).** *Yagüe J<sup>1</sup>, Aróstegui JP<sup>1</sup>, Rius F<sup>1</sup>, Plaza S<sup>1</sup>, Vives J<sup>1</sup>, Argüelles F<sup>2</sup>, González-Enseñat MA<sup>3</sup>, Modesto C<sup>4</sup>, Antón J<sup>5</sup>, García-Consuegra J<sup>6</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Centro de Diagnóstico Biomédico CDB. Hospital Clínic. Barcelona. <sup>2</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Virgen de la Macarena. Sevilla. <sup>3</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Sant Joan de Deu. Barcelona. <sup>4</sup>Servicio de Reumatología Pediátrica. Hospital de la Vall d'Hebron. Barcelona. <sup>5</sup>Servicio de Reumatología Pediátrica. Hospital Sant Joan de Deu. Barcelona. <sup>6</sup>Servicio de Reumatología Pediátrica. Hospital "La Paz" Madrid.

**Introducción:** La proteína criopirina ha sido relacionada con la vía de transducción de señales pro-inflamatorias debido a su papel en la regulación de la activación del factor de transcripción NF $\kappa$ B. La criopirina esta relacionada desde el punto de vista estructural con la proteína pirina/marenostrina – responsable de la FMF- por la presencia del dominio pirina dentro de la secuencia de aminoácidos. Está codificada por el gen denominado *CIAS1/PYPAF1/NALP3*, que mapea en la región 1q44. Mutaciones en este gen son responsables de un grupo de síndromes autoinflamatorios denominados CAPS –Cryopyrin-Associated Periodic Syndromes-, que recientemente han sido incluidos en el grupo VII de Inmunodeficiencias en la última clasificación de la IUIS.

**Objetivos:** En la presente comunicación presentamos los estudios del gen *CIAS1/PYPAF1/NALP3* en 12 pacientes afectados de síndromes autoinflamatorios asociados a criopirina, pertenecientes a 7 familias españolas, y se valora el tratamiento con terapia biológica inmunomoduladora de estas patologías.

**Pacientes y Métodos:** Se incluyen en este estudio 8 pacientes que presentaban un cuadro clínico compatible con FCAS/FCU pertenecientes a tres familias no relacionadas. En una de ellas, con individuos de 4 generaciones afectadas. En una cuarta familia se estudio una paciente afecta por el síndrome CINCA / NOMID, sin historia familiar de enfermedad. Una quinta familia con un paciente afecto de Muckle-Wells. Adicionalmente, se analiza un caso inicialmente diagnosticado de Artritis Idiopática Juvenil con afectación sistémica y finalmente un caso no filiado de síndrome Autoinflamatorio recurrente.

En todos ellos se realiza el estudio mutacional de los genes asociados a los diversos SHFP mediante la amplificación por PCR de cada uno de los exones y su posterior secuenciación. Así mismo se realiza el seguimiento de las diversas terapias mediante el análisis de los valores de reactantes de fase aguda.

**Resultados y Conclusiones:** Se analiza la gran variabilidad genotípica y fenotípica asociada al gen *CIAS1*. Se pone de manifiesto la existencia de síndromes asociados no filiaados y finalmente se valoran los efectos terapéuticos de la terapia biológica inmunomoduladora en el tratamiento de los CAPS.

**ANÁLISIS DE SEGURIDAD BIOLÓGICA EN TERAPIA GÉNICA DEL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.** *G<sup>a</sup> Toscano M<sup>1</sup>, Frecha C<sup>2</sup>, Martín F<sup>2</sup>, Molina JF<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. <sup>2</sup>IPB "López Neyra". CSIC. Granada.

El síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia causada por la inactivación total o parcial de la actividad de la

proteína WASP debido a mutaciones en su gen. Los pacientes tienen defectos funcionales en la práctica totalidad de las células del sistema inmune y en la actualidad no existen tratamientos efectivos. Esto hace de WAS una enfermedad ideal para su tratamiento mediante estrategias de terapia génica. El objetivo final de estas estrategias es la modificación genética de células hematopoyéticas pluripotenciales del paciente para que expresen el gen funcional de WASP. Se han desarrollado diversos vectores oncoretrovirales y lentivirales capaces de expresar el gen WAS en progenitores murinos y humanos. Asimismo, se ha demostrado la capacidad de estos vectores de rescatar el fenotipo sano tanto en modelos celulares como en animales. Sin embargo, no se han estudiado los efectos de una posible sobre-expresión de WASP en células del sistema inmune ni una expresión ectópica del gen en células no-hematopoyéticas. En este trabajo se muestran evidencias de que la sobre-expresión de WASP producida por transducción con vectores lentivirales no produce fenómenos de toxicidad en las células hematopoyéticas incluso cuando son transducidas con un alto número de vectores. Incrementos muy elevados en la concentración de vector producen toxicidad debido a componentes del vector e independientes de la proteína expresada dado que el efecto es equivalente en vectores que expresan GFP ó WASP. De la misma manera, la expresión de WASP en células no-hematopoyéticas no afecta a la capacidad proliferativa de las células primarias analizadas (endoteliales y foliculares dendríticas). Estos datos indican que los vectores lentivirales expresando WASP tienen unos altos niveles de seguridad biológica, dado que la sobre-expresión de la proteína terapéutica no tiene efectos deletéreos detectables.

## SESIÓN 6: TUMORES

**Moderadores:** Francisco Ruiz Cabello (H.U. Virgen de Las Nieves, Granada), Ignacio Melero Bermejo (Clínica Universitaria Pamplona)

**ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE LA CADENA CD3 $\zeta$  DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.** López Santalla M\*, Valeri Lozano AP\*, Aguilera Montilla N\*, Pérez Blas M\*, Gutiérrez A\*\*, Lasa I\*\*, García Sancho L\*\*, Granell FJ\*\*, Martín Villa JM\*. \*Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. \*\*Servicio de Cirugía General y Digestivo. Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA), Alcalá de Henares. Madrid.

El cáncer es causado por el crecimiento progresivo de la progenie de una célula transformada, lo que da lugar a la expresión de proteínas alteradas que constituyen dianas antigénicas para la respuesta inmunitaria del huésped. El sistema inmune posee varios mecanismos para intentar frenar el avance tumoral pero el tumor puede escapar a este control por varias vías.

**Objetivos:** Considerando las distintas alteraciones previamente descritas por nuestro grupo (expresión de la cadena CD3 $\zeta$ , movilización de calcio y apoptosis/necrosis) en líneas de linfocitos T infiltrantes de tumor inmortalizados con un virus linfotrópico, (*Herpesvirus saimiri*, HVS) obtenidos a partir de pacientes con cáncer gástrico, nos propusimos 1) estudiar líneas de linfocitos T de sangre periférica de pacientes con adenocarcinoma gástrico 2) estudiar el patrón de expresión de la cadena CD3 $\zeta$  y 3) secuenciar el promotor del gen de esta cadena.

**Metodología:** Se realiza la transformación con HVS de linfocitos T aislados a partir de sangre periférica o de muestras de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico. El análisis de la expresión de la cadena CD3 $\zeta$ , los estudios de movilización de calcio y los estudios de apoptosis y necrosis celular se realizaron por citometría de flujo. El estudio del patrón de expresión de la cadena CD3 $\zeta$  se llevo a cabo por microscopia confocal y el estudio del promotor de la cadena zeta se hizo a partir de la secuenciación del amplificado obtenido a partir de DNA genómico por PCR, usando cebadores específicos, previamente descritos.

**Resultados:** Las líneas de linfocitos T de sangre periférica de los pacientes con cáncer gástrico mostraron una menor expresión de la cadena CD3 $\zeta$  (MFI 152,9 vs 114,6) y una defectuosa movilización de calcio en respuesta a CD3, que no fueron debidas a una mayor tasa de apoptosis o necrosis celular. El patrón de expresión de CD3 $\zeta$  fue el mismo en pacientes que en controles. Finalmente, no se encontró ninguna diferencia en la secuencia del promotor entre pacientes y controles.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos revelan que las líneas T de sangre periférica de pacientes muestran defectos en la expresión de la cadena CD3 $\zeta$  y en la transducción de señales, lo que facilitaría la posibilidad del tumor de escapar de la respuesta inmunitaria. El hecho de que el defecto se encuentre en líneas crecidas *in vitro* sugiere que es inherente a las células T y no a factores solubles producidos por el tumor.

**EXPRESIÓN HETEROGÉNEA DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I Y DE QUIMIOCINAS EN DIFERENTES METÁSTASIS ESTABLECIDAS DE UN PACIENTE CON MELANOMA METASTÁSICO.** Méndez Vales R, Rodríguez Ruiz T, Cantón Robles J, B. Del Campo Alonso A, Schadendorf D\*, Ruiz-Cabello Osuna F, Garrido F. \*Universidad Hospital Mannheim, Alemania. Servicio Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

Existen numerosas evidencias experimentales de cómo el sistema inmune ejerce una presión selectiva para seleccionar clonas tumorales con baja inmunogenicidad. Entre los cambios que suceden, la presentación de un fenotipo alterado en la expresión de los genes HLA es frecuentemente observada. También los tumores adquieren propiedades que tienden a inmunosuprimir el desarrollo de las respuestas inmunitarias, y favorecer la angiogénesis. Nosotros hemos caracterizado las alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I en seis metástasis provenientes de un paciente con melanoma maligno metastásico. El paciente (UKRV-mel 20) fue tratado con células tumorales antólogas transducidas con el gen de la IL-12. El tipaje HLA del paciente fue A02011, A0204, B40011 B3801 and Cw\*03. Todas las líneas celulares estudiadas (UKRV-mel20b, UKRV-mel20c, UKRV-mel20d, UKRV-mel20e, UKRVmel20f and UKRVmel20g) fueron derivadas de metástasis asincrónicas. En la línea UKRV-mel 20f se observó una LOH que afectaba a un haplotipo HLA entero detectada por análisis de marcadores de microsatélite. El resto de las líneas no mostraron alteraciones. En cambio, si se detectaron diferencias para el patrón de quimiocinas IP-10, I-TAC, RANTES, MCP-1, VEGF $\alpha$  y TGF $\beta$ . Interesantemente la línea con LOH pudo inmunoseleccionarse, porque de hecho es en la que se detectó mayor producción de quimiocinas proinflamatorias. Estos resultados apoyan la inmunoección de los tumores en el sentido de que las distintas clonas pueden adquirir características genotípicas y fenotípicas que favorecen el escape a la respuesta inmune.

**LA SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS B LEUCÉMICAS *IN VITRO* AUMENTA POR EL COCULTIVO CON LINFOCITOS T ACTIVADOS POLICLONALMENTE.** Sánchez MA<sup>1</sup>, Villaruel M<sup>1</sup>, Hernández A<sup>1</sup>, Díaz D<sup>1</sup>, Barcenilla H<sup>1</sup>, Acuña ML<sup>1</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Reyes E<sup>1</sup>, Monserrat J<sup>1</sup>, García-Suárez J<sup>1</sup>, Burgaleta C<sup>2</sup>, Álvarez de Mon M<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Unidad mixta CSIC-Dpto. de Medicina U.A.H. <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

**Introducción:** Las células B leucémicas se caracterizan por tener una gran supervivencia *in vivo*, no obstante cuando estas células son dispuestas *in vitro* rápidamente sufren apoptosis. Esto sugiere que existe un microambiente *in vivo* que es difícil de mantener *in vitro* y que provoca la elevada y rápida muerte de las células B en cultivo. Por otra parte las células de la leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) tienen una baja expresión de moléculas coestimuladoras que dificultan la activación de los linfocitos T que reconozcan los antígenos presentados por ellas.

**Objetivos:** Estudiar el efecto de la estimulación policlonal de linfocitos T en la supervivencia de los linfocitos B *in vitro*.

**Materiales y Métodos:** Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica de varios pacientes con leucemia linfática crónica y fueron cultivados durante 16 días en medio completo con y sin estímulo policlonal; micropartículas recubiertas de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. A distintos tiempos, a través de citometría de flujo de 4 colores, se procedió a realizar enumeración de linfocitos T y B en cultivo y se caracterizó la expresión de marcadores de activación en las células B leucémicas.

**Resultados:** El número de células B leucémicas que sobreviven tras 16 días de cultivo es significativamente superior en aquellas situaciones en las cuales se dispuso el estímulo policlonal de linfocitos T. La adición de micropartículas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 produce además un aumento significativo en el número de células B que expresan moléculas coestimuladoras CD80 y CD86. Los linfocitos T activados policlonalmente con dichas micropartículas modifican la expresión de los marcadores de células leucémicas CD23, CD21, CD5 y CD38, produciendo un aumento en la expresión de estos marcadores en el momento de mayor proliferación de linfocitos T.

**Conclusión:** La estimulación policlonal de linfocitos T *in vitro* mediante micropartículas recubiertas con anti-CD3 y anti-CD28 se muestra como un método eficaz para lograr el aumento de la supervivencia de linfocitos B leucémicos *in vitro* e inducir en ellos la expresión de marcadores de activación.

**LAS CÉLULAS B LEUCÉMICAS EN PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC-B) SON LISADAS POR LINFOCITOS T AUTÓLOGOS ESTIMULADOS CON MICROPARTÍCULAS RECUBIERTAS CON ANTI-CD23 Y ANTI-CD28.** Sánchez MA<sup>1</sup>, Villaruel M<sup>1</sup>, Hernández A<sup>1</sup>, Díaz D<sup>1</sup>, Barcenilla H<sup>1</sup>, Acuña ML<sup>1</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Reyes E<sup>1</sup>, Monserrat J<sup>1</sup>, García-Suárez J<sup>1</sup>, Burgaleta C<sup>2</sup>, Álvarez de Mon M<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Unidad mixta CSIC-Dpto. de Medicina U.A.H. <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

**Introducción:** Diversos trabajos han demostrado el uso eficaz de linfocitos T activados *in vitro* en la terapia contra diversos tumores. En pacientes linfodeplecionados la reinfusión de linfocitos T antileucémicos generados *in vitro* permitiría un rápido crecimiento de dicha población y el dominio del repertorio inmune en dichos pacientes por la progenie de los linfocitos T antileucémicos reinfundidos.

**Objetivo:** Desarrollar nuevos métodos en la generación de linfocitos T efectores antileucémicos para su uso en terapia celular adoptiva.

**Material y Métodos:** Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica de individuos sanos así como de pacientes con leucemia linfática crónica. Posteriormente fueron cultivados durante 6 y 24h en medio completo con y sin micropartículas recubiertas de anti-CD23 y anti-CD28 en diferentes proporciones. Después del cultivo se procedió al marcaje con anticuerpos monoclonales y 7-aminoactinomicina-D (7AAD) para determinar el número de células apoptóticas en cultivo y poder determinar el porcentaje de lisis específica que se obtiene en cada condición.

**Resultados:** El porcentaje de células B que son positivas para el marcaje de 7AAD es significativamente mayor en las situaciones en las cuales se disponen micropartículas recubiertas de anti-CD23 y anti-CD28 en comparación con las condiciones control (medio sin micropartículas y micropartículas sin anticuerpos). El porcentaje de lisis específica observada en los cultivos de los pacientes es altamente significativo en comparación con los cultivos de los controles sanos donde no se observa ninguna actividad de lisis específica contra las células B autólogas normales. Se han optimizado las condiciones de generación de linfocitos T autólogos con capacidad citotóxica mediante micropartículas recubiertas de anticuerpos.

**Conclusión:** El uso de micropartículas recubiertas de anti-CD23 y anti-CD28 se muestra como un método eficaz en la generación *in vitro* de células T antileucémicas susceptibles de ser usadas en una terapia celular adoptiva. Los datos de los controles demuestran que en éstos los linfocitos T no lisan las células B autólogas normales, lo que contrasta con la actividad citotóxica de los linfocitos T de los pacientes con LLC-B contra las células leucémicas.

**LA EXPRESIÓN DE CXCR3 COMO FACTOR PRONÓSTICO EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA-B.** Ocaña E, Delgado L, Campos-Caro A, Brieva JA. Servicio de Inmunología, Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

**Introducción.** La leucemia linfática crónica B (LLC-B), es la leucemia más frecuente en adultos en el mundo occidental. Se caracteriza por la expansión monoclonal de linfocitos B CD5+ CD23+ con baja expresión de inmunoglobulina de superficie de carácter monoclonal en sangre periférica, los cuales pueden infiltrar diferentes órganos como médula ósea, ganglios, hígado o bazo. La enfermedad presenta un curso clínico heterogéneo, de manera que algunos pacientes sobreviven durante muchos años sin necesidad de tratamiento y otros progresan rápida y agresivamente requiriendo tratamiento inmediato y produciéndose la muerte del paciente en un breve periodo de tiempo. Las células de LLC-B expresan el receptor de quimiocina CXCR3, el cual se ha descrito fundamentalmente en linfocitos T Th1 y en una pequeña población de linfocitos B, aunque el papel de este receptor en estos últimos no es del todo conocido.

**Objetivos.** El objetivo del trabajo fue evaluar la expresión de CXCR3 como factor pronóstico en LLC-B.

**Materiales y Métodos.** Se recogieron diferentes parámetros clínicos de 61 pacientes diagnosticados de LLC-B (edad, hemoglobina, leucocitos, linfocitos, plaquetas, estadio de Rai, patrón de infiltración medular). Se analizó la expresión de CXCR3 mediante citometría de flujo y RT-PCR. Se analizó la secuencia de IgVH para determinar el nº de mutaciones en las diferentes muestras. Además se realizaron dos

ensayos funcionales para analizar el comportamiento de las células de LLC-B; ensayos de quimiotaxis mediante sistemas "transwell" para evaluar la capacidad migratoria y ensayos de adhesión a placa previamente tratadas con fibronectina. Para el análisis de los datos se utilizó el programa estadístico SPSS.

**Resultados.** La expresión de CXCR3 difería entre los distintos pacientes incluidos en el estudio, de manera que había pacientes cuyas células expresaban altos niveles de CXCR3, mientras que en otros la expresión era baja. Se planteó la posibilidad de que la expresión de CXCR3 estuviera relacionada con algunos parámetros clínicos y se observó que los pacientes con baja expresión de CXCR3 se encontraban en estadio III-IV de Rai y presentaban patrón de infiltración medular difuso, ambos relacionados con peor pronóstico de la enfermedad. Cuando se analizó el número de mutaciones en IgVH, se observó que el número de mutaciones era significativamente menor en los pacientes con menor expresión de CXCR3, lo cual también se había relacionado en la bibliografía con una peor evolución de la enfermedad. No se encontró correlación con el resto de los parámetros analizados. Para evaluar si realmente la baja expresión de CXCR3 se asociaba con peor pronóstico de la enfermedad, se realizó el test estadístico de Cox, para ver si existía alguna relación entre la expresión de CXCR3 y muerte, obteniéndose diferencias significativas, lo cual indicaba que la expresión baja de CXCR3 se asociaba con la muerte del paciente. Al realizar los ensayos funcionales de quimiotaxis y adhesión, se observó que las células con baja expresión de CXCR3 presentaban menor capacidad quimiotáctica y mayor capacidad de adhesión, lo cual refleja el diferente comportamiento de las células que expresan diferentes niveles de CXCR3. Además las células tumorales obtenidas de la médula ósea y los ganglios, no expresaban CXCR3 y mostraban elevada adhesividad.

**Conclusiones.** La expresión de CXCR3 en LLC-B puede ser utilizado como factor pronóstico de la enfermedad. La baja expresión del receptor de células obtenidas de territorios infiltrados, y su mayor adhesividad puede indicar que la expresión de CXCR3 actúa como regulador negativo de la capacidad invasora del tumor.

**REGULACIÓN POR FACTORES SOLUBLES DE LA MOLÉCULA DE ADHESIÓN CD29 EN CÉLULAS PLASMÁTICAS NORMALES Y MALIGNAS.** *García-Trujillo JA, Villarrubia N, Sádaba MC, Rodríguez-Martín E, Villar LM, Bootello A, Roldán E. Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.*

**Objetivos:** Resultados previos de nuestro grupo han demostrado que las células plasmáticas (CP) expresan la forma activada de la integrina  $\beta 1$  (CD29), reconocible por anticuerpos específicos (clon HUTS-21). En el presente trabajo estudiamos su regulación por factores solubles, tanto en CP normales como malignas.

**Metodología:** Se analizaron aspirados de médula ósea (MO) procedentes de pacientes diagnosticados de gammapatía monoclonal (mieloma múltiple y gammapatía monoclonal de significado incierto) y de pacientes con aspirados sin alteraciones significativas. Las células se lavaron con PBS en exceso de volumen y se incubaron en placas de cultivo (1 hora, temperatura ambiente) con plasma medular y/o diversos factores solubles ( $MnCl_2$  y VCAM-1 (CD106) recombinante). Tras la incubación, las células fueron procesadas para su análisis mediante citometría de flujo; la expresión en CP de la forma activada de CD29 se determinó mediante la unión de anticuerpos anti-CD29 (clon HUTS-21) marcados con ficoeritina.

**Resultados:** Tras lavar las células de MO se observó un importante descenso de los niveles de expresión de la forma activada de CD29, que se recuperaron en su mayor parte tras añadir el plasma de MO previamente retirado. La adición de EDTA al plasma impidió esta recuperación, lo que sugiere que este efecto está mediado, al menos en parte, por cationes divalentes. De hecho, se observó una regulación positiva del epitopo de activación, dosis-dependiente, con concentraciones crecientes de  $Mn^{++}$ . La respuesta fue similar en CP monoclonales y policlonales. Sin embargo, en casos de expresión basal muy disminuida de CD29 activado (generalmente asociados a la presencia extramedular de CP tumorales), las células respondieron muy débilmente a la estimulación con  $Mn^{++}$ . Este hecho parece ser debido a defectos intrínsecos de las CP, y no a un déficit de factores estimuladores en el microambiente de la MO propia, ya que la incubación con plasma heterólogo de MO normal tampoco consiguió restablecer niveles comparables a los habituales. De manera análoga, la incubación con CD106 (ligando de CD29/CD49d), aumentó la expresión de la forma activada, observándose también un efecto dosis-respuesta.

**Conclusiones:** La expresión de la forma activada de CD29 en CP de MO es dependiente del efecto de al menos dos factores del plasma: cationes divalentes y CD106 soluble. Dicha regulación es efectiva tanto en CP monoclonales como policlonales. En caso de CP tumorales con niveles *in vivo* muy bajos de la forma activada de CD29, un defecto intrínseco de las mismas parece responsable de la refractariedad al efecto estimulador de ambos factores.

**A TRANSPLANTABLE eGFP+ MESENCHYMAL TUMOR REJECTED BY THE COMBINED ACTION OF T AND NK CELLS.** *Arina A<sup>1</sup>, Huarte E<sup>1</sup>, Murillo O<sup>1</sup>, Tirapu I<sup>1</sup>, Alfaro C<sup>1</sup>, Azpilikueta A<sup>1</sup>, González-Aseguinolaza G<sup>1</sup>, Sarobe P<sup>1</sup>, Lasarte JJ<sup>1</sup>, Raulet D<sup>2</sup>, Melero I<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA) y Clínica Universitaria, Universidad de Navarra, Pamplona (Spain). <sup>2</sup>Department of Molecular and Cell Biology and Cancer Research Laboratory, University of California, Berkeley, California, (USA).

In a set of intraperitoneal tumors raised with methylcholanthrene in eGFP transgenic mice, a transplantable retroperitoneal sarcoma was obtained. Subcutaneously injected cell suspensions progressed in Rag 1<sup>-/-</sup> mice but had a heterogeneous behaviour in syngeneic C57BL/6 mice. Tumor cell clones with high intensity of eGFP expression tended to be rejected in a fashion dependent on NK, CD4+ and CD8+ lymphocytes, while variants of low eGFP expression tended to progress as lethal tumors in immunocompetent mice. NKT cells were dispensable for antitumor effects as shown in CD1<sup>-/-</sup> mice, in contrast to the activity of IFN $\gamma$ , that was found to be crucial by *in vivo* treatment with neutralizing antibodies. However, rejections in IFN $\gamma$ R<sup>-/-</sup> mice indicate that critical effects of IFN $\gamma$  take place at the malignant cell level. The direct involvement of eGFP in the rejection was ruled out since (i) escape variants with high level of eGFP progressed in C57BL/6 mice, (ii) eGFP is non immunogenic in C57BL/6 background neither for CD4 nor for CD8 T lymphocytes, and (iii) eGFP transgenic mice (tolerant for eGFP) display similar features of tumor grafting as compared to wild type mice. Experiments performed in (C57BL/6 x BALB/c) F1 mice show that the performance of activated semiallogeneic NK cells surpasses autologous NK cells at controlling the progressing variants. In fact, intratumoral but not intravenous injection of activated semiallogeneic NK cells display local activity against subcutaneous established tumors. NK recognition of tumor cells was at least partially mediated by NKG2D.



**UN EXTRACTO DE CALÉNDULA CON ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA MUESTRA *IN VITRO* INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO DE LINEAS TUMORALES.** Jiménez E, Paco L, Salaya G, Schanoski A, Martínez M, García-Lora A, Garrido F. *Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.*

El extracto vegetal de *Caléndula Officinalis L (Asteraceae)* obtenido por medio de un nuevo proceso de extracción, muestra un incremento de la proliferación de PBLs humanos. Hemos analizado su acción sobre el crecimiento de diferentes líneas tumorales *in vitro*.

Durante 48-96 horas se pusieron en cultivo una amplia variedad de líneas tumorales humanas y murinas con diferentes concentraciones del extracto. Después de este tiempo se cuantificó la incorporación de BrdU y se realizó el recuento de las células usando Trypan Blue. Se han realizado ensayos del ciclo celular usando incorporación de BrdU y marcaje de 7-amino-actinomicina D por citometría de flujo. Se analizó la apoptosis mediante anexina-V y caspasa 3.

Se realizó un estudio dosis-respuesta y los resultados mostraron una inhibición directa del crecimiento *in vitro* de las líneas tumorales estudiadas que ronda entre un 71% a un 100% dependiendo del tipo tumoral. También se ha observado que las células tratadas con el extracto presentan un aumento del porcentaje de células en fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> y una disminución de las células en la fase S. Los análisis de apoptosis mostraron en algunos de los casos un aumento de las células apoptóticas.

Este extracto de caléndula al mostrar una actividad inmunomoduladora y una inhibición del crecimiento *in vitro* de líneas tumorales, es un buen candidato como agente en el tratamiento contra el cáncer.

**UTILIDAD DE LA DETECCIÓN INMUNOCITOQUÍMICA DE CÉLULAS TUMORALES EN SANGRE DE ENFERMOS DE CÁNCER DE MAMA COMO MÉTODO PREDICTIVO DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO.** Campos M<sup>1</sup>, Serrano MJ<sup>1</sup>, Sánchez-Rovira P<sup>3</sup>, Delgado-Rodríguez M<sup>2</sup>, Warleta F<sup>1</sup>, Ruiz J<sup>1</sup>, Gaforio JJ<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Área de Inmunología. <sup>2</sup>Área de Medicina Preventiva y Salud Pública. <sup>3</sup>Dpto Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén. Complejo Hospitalario Ciudad de Jaén.

**Objetivo:** Disponer de un método simple, poco invasivo para el enfermo, que pueda repetirse de forma periódica, y que nos permita predecir de forma precoz la respuesta al tratamiento quimioterápico en los enfermos de cáncer de mama.

**Metodología:** Estudio prospectivo de un total de 91 enfermos de cáncer de mama (24 pacientes metastásicos, 42 pacientes adyuvantes y 25 pacientes neoadyuvantes), a los que se les administra tratamiento quimioterápico. La progresión clínica es evaluada por los médicos oncólogos y se correlaciona con la posible presencia de células tumorales en la sangre de los enfermos. La detección de células tumorales circulantes en sangre (ctc) se efectuó de la siguiente forma: se extrae 10 mililitros de sangre periférica a cada enfermo; centrifugamos la muestra en doble gradiente de Ficoll; enriquecimiento y separación positiva de la muestra mediante marcaje inmunomagnético (MACS, Miltenyi Biotec); citocentrifugación y visualización inmunocitoquímica de células Citoqueratin positivas (CK+).

**Resultados:** Tras el tratamiento aparecen, pacientes que tienen ctc (ctc+): 12/20 en el grupo de metastásicas, 7/15 en el grupo neoadyuvante y 14/29 en las adyuvantes. En cuanto a la respuesta clínica de los pacientes al tratamiento, hay pacientes que presentan una respuesta parcial (RP)

y otros una respuesta completa (RC). Exactamente: en el grupo de metastásicas 14/24 pacientes tienen una RP, (8/14 pacientes con RP son ctc+) y 10/24 una RC (5/10 pacientes con RC son ctc+). En el grupo neoadyuvante 15/25 pacientes presentan RP (7/15 son ctc+) y 10/25 tienen una RC al tratamiento (2/10 ctc+). Y en las adyuvantes 5/42 pacientes presentan una RP (2/5 son ctc+) y 37/42 tienen una RC (11/37 son ctc+).

**Conclusiones:** Los resultados previos aquí expuestos sugieren que la detección de células tumorales circulantes en sangre periférica mediante la utilización de doble gradiente de sedimentación, separación inmunomagnética y detección de células CK+ mediante inmunocitoquímica puede ser un buen método de detectar de forma precoz la respuesta al tratamiento quimioterápico.

**RESULTADOS PRELIMINARES DEL TRATAMIENTO CON VACUNAS IDIOTÍPICAS EN PACIENTES CON LINFOMA FOLICULAR.** Pastor F, Rodríguez-Calvillo M, López Díaz de Cerio A, Zabalegui H, Soria E, Melero I, Sánchez-Ibarrola A, Bendandi M, Inogés S. Área de Terapia Celular y Servicio de Inmunología, CUN. Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA). Universidad de Navarra.

El linfoma folicular es una neoplasia que permanece incurable a pesar de los tratamientos estándar de quimioterapia y radioterapia. Actualmente la inmunoterapia activa con vacunas idiotípicas se presenta como una alternativa esperanzadora para el tratamiento de pacientes con dicha enfermedad. Las vacunas idiotípicas utilizadas hoy en día para ensayos clínicos se clasifican en dos categorías: las que se administran como proteínas solubles y las que se administran como secuencias de DNA. Actualmente en nuestro centro se está llevando a cabo un protocolo de vacunación de pacientes con linfoma folicular en primera recaída con idiotipo tumoral conjugado con KLH (Id-KLH).

**Objetivos:** Se pretende analizar la respuesta clínica y su correlación con las respuestas inmune (celular y humoral) y molecular en el grupo de pacientes con linfoma folicular tratados con vacunación idiotípica en primera recaída. Se trata ya de la casuística más numerosa en el mundo.

**Material y métodos:** En este estudio se ha valorado la respuesta inmune específica inducida en todos los pacientes que han completado el calendario vacunal:

- La respuesta inmunológica humoral se ha medido mediante la determinación de anticuerpos específicos contra el idiotipo tumoral y de anticuerpos específicos contra KLH.
- La respuesta inmunológica celular se ha determinado mediante el estudio de la producción de citoquinas, ensayos de proliferación frente al idiotipo tumoral y cuantificación de la presencia de CTL (linfocitos T citotóxicos) específicos para el idiotipo y la célula tumoral.

También se ha valorado la respuesta molecular mediante determinación del reordenamiento bcl-2 asociado a la traslocación t(14; 18) y se está estudiando la posible correlación existente entre la respuesta clínica, la respuesta inmunológica y la respuesta molecular.

Por último, se está comparando en todos los casos la duración de la respuesta completa obtenida tras el tratamiento previo de primera línea y la obtenida tras la aplicación de este esquema de inmunoterapia en el momento de la primera recaída.

**Resultados:** Hasta el momento se ha completado el calendario vacunal en 14 pacientes y en todos ellos se ha analizado la respuesta celular y /o humoral y la presencia de enfermedad mínima residual. Se presentarán los resultados obtenidos hasta el momento.

**DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA DE CLASE I ENTRE LAS METÁSTASIS EN PROGRESIÓN Y REGRESIÓN EN UN PACIENTE CON MELANOMA TRAS INMUNOTERAPIA.** *Cabrera T, Romero JM, Lara E, Real LM\*, Maleno I, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. \*Neocodex, Departamento de Genómica Estructural, Sevilla.*

Las células tumorales pueden perder de forma parcial o total la expresión de moléculas HLA de clase I durante su progresión, pérdidas que favorecerían el escape de estas células a la inmunovigilancia mediada por linfocitos T. Sin embargo, existe muy poca información sobre el patrón de expresión de moléculas HLA de clase I en diferentes metástasis de un mismo paciente. Presentamos los patrones de expresión de seis metástasis de melanoma de un paciente inmunizado con una vacuna de células tumorales autólogas, estas metástasis presentaron diferentes respuestas a este tratamiento. Las seis metástasis eran subcutáneas y se extrajeron del paciente tras la inmunoterapia, tres de ellas estaban en regresión (evaluadas mediante PET) y las otras tres estaban progresando. Los estudios de inmunohistoquímica, con W6/32 y anti- $\beta$ 2m, revelaron que las tres metástasis en regresión eran fuertemente positivas para estos anticuerpos, mientras que las tres en progresión mostraron una positividad muy débil. Los resultados obtenidos se confirmaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real, el estudio se realizó utilizando microdissección de nidos tumorales y cuantificación de los niveles de ARN mensajero de  $\beta$ 2m y cadena pesada de HLA de clase I. Se obtuvieron diferencias significativas en los niveles de transcripción de estos genes entre los dos tipos de metástasis, siendo muy bajos en las metástasis en progresión al compararlos con los niveles de las metástasis en regresión.

También, se estudiaron los niveles de transcripción para los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico TAP-1, TAP-2, LMP-2, LMP-7 y tapasina, los resultados que obtuvimos no mostraban diferencias entre los dos grupos de metástasis.

**ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DEL EXTRACTO DE *TABEBUIA AVELLANEDAE* Y DE LA BETA-LAPACHONA. EFECTO SOBRE EL CRECIMIENTO DEL TUMOR DE EHRlich.** *Arruda VA<sup>1</sup>, Tudela JP<sup>2</sup>, Subiza JL<sup>2</sup>, Queiroz MLS<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Fisiopatología Médica, Facultad de Ciencias Médicas, UNICAMP, Campinas, SP, Brasil. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.*

**Introducción:** Los productos naturales son objeto de numerosos estudios por sus posibles usos terapéuticos en diversas enfermedades. *Tabebuia avellanedae* es un árbol proveniente de las regiones tropicales de América del Sur y del Amazonas. Su corteza se utiliza por sus actividades: analgésica, antiinflamatoria, antireumática, inmunoestimuladora, antibacteriana, antifúngica y antineoplásica. Esta actividad se debe a la presencia de taninos, saponinas, flavonoides y naftoquinonas (como lapachol y  $\beta$ -lapachona). La  $\beta$ -lapachona posee algunas propiedades que llaman la atención, en especial su capacidad para inhibir el crecimiento de tumores *in vivo* (como el sarcoma de Yoshida y el carcinoma de Walker), y también de bacterias y tripanosomátidos (*Trypanosoma cruzi*).

**Objetivos:** Estudiar los efectos inmunomodulador y antitumoral del extracto de *Tabebuia avellanedae*. Comparar estos efectos con los de la  $\beta$ -lapachona.

**Métodos:** Se estudió un grupo de ratones normales y de ratones portadores del Tumor de Ehrlich, tratados por vía oral con el extracto de *Tabebuia avellanedae* (50 ó 200 mg/kg) o por vía intraperitoneal

con la  $\beta$ -lapachona (1 mg/kg). Se valoraron los niveles de anticuerpos de clase IgA, IgM, IgG totales, así como aquellos reactivos frente las células de Ehrlich (ELISA y citometría de flujo), la actividad de las células NK (liberación de  $^{51}\text{Cr}$ ), el progreso de la masa tumoral y la supervivencia de los animales. También se estudió el efecto del tratamiento con el extracto en la actividad linfoproliferativa (ELISA) y los niveles de las citoquinas IL-1, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (ELISA).

**Resultados y Conclusiones:** El crecimiento del tumor de Ehrlich es menor en aquellos animales que fueron tratados con el extracto respecto a los que no fueron tratados. Este tratamiento, aumenta los niveles de anticuerpos de clase IgM en ratones normales, incluyendo los que reconocen la superficie de las células del tumor de Ehrlich; no modifica la actividad NK basal pero sí restituye la actividad NK en los ratones portadores del tumor. Por último, estimula la actividad linfoproliferativa, tanto en animales normales como portadores del tumor de Ehrlich.

## SESIÓN 7: CITOQUINAS Y SEÑALIZACIÓN

**Moderadores:** Ignacio Moneo (Hospital Carlos III, Madrid), Marcos López Hoyos (H.U. Marqués de Valdecilla, Santander)

**VÍNCULOS MOLECULARES ENTRE LOS SISTEMAS HEMOSTÁTICO E INFLAMATORIO EN MODELOS SENSIBLES Y RESISTENTES A ENTOTOXEMIA.** *Mota RA<sup>1</sup>, Corral J<sup>2</sup>, Monreal Y<sup>1</sup>, Hernández-Espinosa D<sup>2</sup>, Arcas F<sup>2</sup>, Miñano A<sup>2</sup>, Parrilla P<sup>1</sup>, Vicente V<sup>2</sup>, Yélanos J<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca". <sup>2</sup>Centro Regional de Hemodonación. <sup>3</sup>Departamento de Bioquímica, Biología Molecular B e Inmunología. Universidad de Murcia.*

La sepsis, principal causa de muerte entre pacientes hospitalizados, es el resultado de una respuesta inmune aguda y sistémica frente a la infección bacteriana. Esta respuesta se caracteriza por la expresión de numerosos mediadores inflamatorios y la activación de la cascada de la coagulación. A pesar del vínculo entre coagulación e inflamación durante el proceso séptico, hasta la fecha no se sabe con exactitud si la hipercoagulabilidad asociada a la sepsis es relevante en el curso clínico de la misma o la consecuencia de una respuesta inflamatoria sistémica. Para tratar de responder a esta cuestión, hemos estudiado la evolución de diferentes parámetros hemostáticos (antitrombina, plaquetas y deposición de fibrina), inflamatorios (IL-6 y TNF- $\alpha$ ) y las características histológicas de hígado y pulmón en ratones sensibles y resistentes a dos modelos de endotoxemia: Inyección letal de LPS y peritonitis inducida por punción celiaca. La resistencia al proceso séptico se logró mediante bloqueo genético (ratones KO) o farmacológico (PJ34) de la proteína nuclear PARP-1. Esta proteína está involucrada en la regulación a nivel nuclear de la ruta de señalización mediada por NF- $\kappa$ B que conduce a la expresión de mediadores inflamatorios. El 90% de los ratones con bloqueo de PARP-1 sobreviven a la inyección de dosis letales de LPS, mientras que sólo el 10% de los ratones silvestres consiguen superar la sepsis inducida por LPS. Sin embargo, en ambos modelos de sepsis, la endotoxemia produjo una alteración hemostática severa y similar en todos los grupos de ratones con reducción severa de niveles y función anticoagulante de antitrombina, trombopenia relevante y deposición intensa pero transitoria de fibrina en hígado y pulmón. En contra, el aumento de marcadores pro-inflamatorios y la infiltración celular, especialmente la mediada por células mononucleares, era significativamente mayor en el grupo de ratones silvestres que en los dos grupos resistentes a la sepsis. Nuestros datos

sugieren una fuerte activación de la coagulación durante la endotoxemia, pero independiente de la respuesta inflamatoria. Sin embargo, la coagulación intravascular diseminada asociada a la sepsis no parece afectar a la supervivencia, que parece tener más relación con la infiltración de células mononucleares. Estos datos son concordantes con los resultados de diferentes tratamientos anticoagulantes en sepsis, que previenen las anomalías hemostáticas pero no aumentan la supervivencia. El bloqueo de PARP-1 u otras terapias dirigidas a reducir la respuesta de la células monocleares pueden resultar útiles en el tratamiento de los procesos sépticos.

**REGULACIÓN PROTEOLÍTICA DE STAT6 POR AGENTES ALQUILANTES.** Zamorano J, Pérez-G. M, Borrega P, Rivas MD, Cortés JR. Unidad de Investigación, H. San Pedro de Alcántara. Cáceres.

El factor de transcripción STAT6 tiene un papel muy importante en la respuesta celular a la IL-4. Su activación está estrechamente regulada por quinasas, fosfatasa, lipasas y recientes evidencias indican que también por proteasas. El objetivo inicial de este estudio fue determinar el efecto de inhibidores de proteasas en la regulación de STAT6. Entre todos los inhibidores analizados, sorprendentemente TPCK, un inhibidor de serin proteasas, bloqueaba la activación de STAT6 por la IL-4. Interesantemente, esta inhibición se correlacionaba con la pérdida de STAT6 mediada por una proteasa sensible a AEBSEF. Aunque TPCK es un inhibidor de proteasas de amplio espectro, los datos encontrados indicaban que la pérdida de STAT6 estaba mediada por su actividad alquilante. Así, STAT6 contiene residuos cisteína cuya reactividad fue demostrada usando compuestos alquilantes biotinilados que fueron capaces de precipitar STAT6. Además, N-acetilcisteína, que reacciona con TPCK, y N-etilmaleimida, que compite por grupos -SH, inhibían la pérdida de STAT6 inducida por TPCK. El hecho de que STAT6 se encontró asociado con hsp90 sugirió que TPCK podría alterar esta interacción, favoreciendo la degradación de STAT6. Esto fue sostenido por herbimicina A, un inhibidor de hsp90, que indujo la degradación de STAT6 por un mecanismo similar a TPCK. Esta regulación proteolítica de STAT6 fue compartida por otros agentes alquilantes como la mecloretamina que también provocaba la pérdida de STAT6. Interesantemente, STAT6 desaparecía rápidamente en PBMC de enfermos diagnosticados de cáncer de mama tratados con ciclofosfamida. Esta pérdida de STAT6 se mantuvo durante todo el tratamiento. Dado el papel importante de STAT6 en el cáncer de mama, es posible que el efecto beneficioso de la ciclofosfamida esté mediado, al menos en parte, a través de la regulación proteolítica de STAT6.

Este trabajo está financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria: FIS 01/0157, FIS 99/3082 y Junta de Extremadura 2PR01C015.

**LA PROTEÍNA VIRAL A238L INHIBE LA EXPRESIÓN DEL FACTOR DE NECROSIS TUMORAL (TNF- $\alpha$ ) MEDIANTE UN MECANISMO DEPENDIENTE DE LOS COACTIVADORES TRANSCRIPCIONALES CBP/p300.** Granja AG, Nogal ML, Hurtado C, Carrascosa AL, Salas ML, Fresno M, Revilla Y. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" (C.S.I.C.-U.A.M.). Universidad Autónoma de Madrid, 28049 Madrid, Spain.

**Objetivos:** Previamente hemos descrito la capacidad de la proteína viral A238L para inhibir la actividad de los factores transcripcionales NFAT y NF $\kappa$ B. El objetivo del presente trabajo consiste en anali-

zar las consecuencias de esta inhibición sobre la expresión de la citoquina TNF- $\alpha$ , así como el mecanismo molecular implicado.

**Metodología:** La regulación del TNF- $\alpha$  durante la infección viral ha sido demostrada mediante el uso de mutantes de delección en los cuales se ha eliminado el gen A238L del genoma viral. La generación de células T Jurkat transfectadas establemente con A238L nos ha permitido identificar los elementos reguladores del promotor de TNF- $\alpha$  involucrados en la activación del gen tras la estimulación de las células con ésteres de forbol (PMA) e ionóforo de calcio (Ion) y el control que sobre los mismos ejerce la proteína viral.

**Resultados:** A238L redujo notablemente la síntesis de ARN mensajero y la producción de proteína TNF- $\alpha$  tanto durante la infección viral como cuando se expresa en un sistema heterólogo de linfocitos T estimulados. Hemos corroborado que el elemento de respuesta a AMP cíclico (CRE) y el sitio  $\kappa$ 3 en el promotor humano del TNF- $\alpha$  son los responsables de la activación génica en linfocitos T, demostrando que A238L inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  a través de estos sitios de reconocimiento en el ADN. Esta inhibición fue revertida parcialmente por los factores transcripcionales NFAT, NF $\kappa$ B-p65 y c-Jun. Además, presentamos evidencia de que A238L inhibe la expresión de TNF- $\alpha$  modulando la transactivación de NFAT, NF $\kappa$ B-p65 y c-Jun mediante un mecanismo que implica la actividad de CBP y p300, ya que la sobre-expresión de estos coactivadores transcripcionales recupera completamente la actividad del promotor de TNF- $\alpha$ .

**Conclusiones:** A238L inhibe la activación transcripcional del promotor humano de TNF- $\alpha$  mediante el bloqueo de la transactivación de los factores transcripcionales NFAT, NF $\kappa$ B-p65 y c-Jun, de una manera dependiente de la actividad de los coactivadores CBP y p300. Estos resultados establecen un nuevo mecanismo molecular utilizado por una proteína viral para modular TNF- $\alpha$  y representan una estrategia de evasión muy eficiente para controlar la respuesta inflamatoria.

**CONTROL DE LA MORFOLOGÍA Y LA RESPUESTA QUIMIO-TÁCTICA MEDIADO POR EL FACTOR INTERCAMBIADOR DE NUCLEÓTIDOS VAV.** Cruz-Adalia A, Vicente-Manzanares M, Martín-Cofreces N, Cabrero JR, Sánchez-Madrid F. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España.

Las proteínas Rho GTPasas controlan diversos aspectos de la polaridad y migración celular, entre ellos, la reorganización del citoesqueleto en respuesta a un estímulo extracelular. Las Rho GTPasas son activadas por factores intercambiadores de nucleótidos de guanina (GEFs), ya que inducen la liberación de GDP y por tanto, desplazan el equilibrio hacia el estado activado de las Rho GTPasas unido a GTP. El papel de las GEFs en la regulación de la respuesta celular frente a estímulos extracelulares durante la migración celular es una etapa crítica en este proceso. Nuestro grupo ha analizado la activación y localización subcelular de un GEF denominado Vav-1 en linfocitos de sangre periférica humana estimulados con la quimioquina SDF-1 $\alpha$ . Vav pertenece a la familia Dbl de factores intercambiadores de GTP y se compone de tres genes diferentes. Vav-1 se expresa en células hematopoyéticas mientras que Vav-2 y Vav-3 tienen un patrón de expresión más amplio.

Hemos demostrado que se produce una fuerte activación de Vav-1 y su redistribución a estructuras subcelulares asociadas a motilidad tras estimular linfocitos humanos de sangre periférica con la quimioquina SDF-1 $\alpha$ . Además presenta una evidencia bioquímica del reclutamiento de Vav-1 a la membrana, donde interacciona transitoriamente con el receptor de SDF-1 $\alpha$  CXCR4.

La sobreexpresión de un dominante negativo de Vav inhibe la polarización, la polimerización de actina y la migración leucocitaria. Por otra parte, hemos comprobado que la polarización y migración mediada por SDF-1 $\alpha$  fueron inhibidas por la sobreexpresión de un mutante activado de Vav pero en este caso mediante un mecanismo molecular diferente.

Como conclusión, nuestros datos demuestran que la proteína Vav en linfocitos ejerce un papel muy importante en la transmisión de la señal migratoria a través del receptor de quimioquina CXCR4.

**EWI-2 SE ASOCIA DIRECTAMENTE A LAS PROTEÍNAS ERM. CONEXIÓN DE LA WEB DE TETRASPANINAS CON EL CITOESQUELETO DE ACTINA.** *Sala-Valdés M, Sánchez-Madrid F, Yáñez-Mó M. Servicio de Inmunología. Hospital de La Princesa. Madrid.*

Recientemente se ha descubierto una nueva familia de proteínas, dentro de la superfamilia de las inmunoglobulinas, denominada EWI por presentar en su parte extracelular el dominio exclusivo Glu-Trp-Ile (EWI). Esta familia esta compuesta por cuatro miembros, EWI-2/PGRL, EWI-F/CD9P-1, EWI-3 y EWI-101. Está descrito que tanto EWI-2 como EWI-F se asocian directamente a las tetraspaninas CD9 y CD81, de forma específica y estable. Por tanto, estas dos proteínas están incluidas dentro de los microdominios que las tetraspaninas, junto con otras moléculas, como las integrinas, forman en la membrana plasmática. A través de estos microdominios, las tetraspaninas regulan procesos tales como migración y adhesión celular. Con el objetivo de encontrar un papel funcional para estas dos proteínas EWI, abordamos el estudio de su posible interacción con las proteínas adaptadoras, ERMs. Ezrina-Radixina y Moesina (ERM) conectan el citoesqueleto de actina con determinadas proteínas de membrana, cuya característica en común es la presencia de residuos básicos que dan a su dominio citoplásmico una carga neta positiva. Por otra parte, las ERMs también son capaces de reclutar proteínas de señalización que dan lugar a la activación de cascadas de señales intracelulares.

Mediante estudios de inmunofluorescencia observamos que las proteínas EWI se localizan subcelularmente en las mismas estructuras que las ERMs. Éstas son, en células de linaje linfocitario polarizadas, los urópodos celulares, y en células adherentes, la parte más apical de las mismas: microvilli y microespículas celulares. Mediante técnicas de microscopía confocal se demostró que ambas proteínas, EWIs y ERMs, colocalizan en dichas estructuras. Los experimentos de bioquímica y ensayos de unión proteína-proteína demostraron que las proteínas EWI se asocian *in vivo* con las ERMs, pero sólo EWI-2, que presenta un dominio citoplásmico compuesto por 10 aminoácidos, la mayoría de ellos de carácter básico, se asocia directamente a ellas.

Por tanto, EWI-2 podría desempeñar un papel importante en la señalización de los complejos de tetraspaninas/integrinas a través de su conexión, vía ERMs, con el citoesqueleto de actina.

**LA APOPTOSIS DE PROGENITORES DE LINFOCITOS B INDUCIDA POR INTERFERÓN NO ES MEDIADA POR AIF.** *Rubio I, Martín N, Sánchez-Pérez M, Góngora R. Inmunología, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca.*

**Objetivos:** La mayoría de los progenitores B que inician su desarrollo en la médula ósea mueren por un proceso de apoptosis. Nos-

otros hemos descrito un mecanismo de apoptosis inducido por interferón tipo I (IFN $\beta$ ), en el cual la proteína Daxx, es esencial. No obstante, todavía desconocemos la posible interacción de esta proteína (considerada un represor de transcripción), con las vías de apoptosis intrínseca y extrínseca, y en último término con la muerte celular de estas células. La sobreexpresión de bcl-2 es protector en este mecanismo de apoptosis que además parece ser independiente de la activación de caspasas. Este comportamiento es característico también de la vía efectora por AIF (factor inductor de apoptosis), una proteína mitocondrial que viaja al núcleo en apoptosis induciendo degradación del ADN. Por lo tanto, estudiamos el comportamiento de AIF durante el fenómeno de apoptosis, así como su posible interacción con Daxx.

**Métodos:** Progenitores B de ratón fueron tratados con IFN $\beta$  y se estudió en ellos la expresión y localización de AIF y otras proteínas mediante western blot e inmunocitoquímica y microscopía confocal. La integridad nuclear se monitorizó por tinción de ADN con DAPI. Cambios en la permeabilidad mitocondrial se detectaron por tinción con JC1.

**Resultados:** No se observó una obvia colocalización de Daxx y AIF en el núcleo en respuesta a la apoptosis inducida por IFN. Mientras que la tinción con JC1 indica la liberación de metabolitos mitocondriales en una hora, nunca se llega a detectar un transporte importante de esta proteína al núcleo, mientras que sus niveles totales fueron inalterados. Asimismo la degradación nuclear es un efecto tardío en este proceso de apoptosis.

**Conclusiones:** Aunque nuestros resultados no excluyen la participación de AIF en este mecanismo de apoptosis, su importancia no parece ser significativa, ya que de hecho, la mayor parte de la proteína no viaja al núcleo. El mecanismo efector de apoptosis debe ser mediado seguramente por la regulación de la expresión génica de otros genes por Daxx.

**PAPEL DEL SISTEMA CXCR4/CXCL12 EN EL ALOJAMIENTO DE LOS LINFOCITOS QUE INFILTRAN LA PARED ARTERIAL EN LOS ANEURISMAS DE AORTA ABDOMINAL (AAA).** *Ocaña E<sup>1</sup>, Bohórquez JC<sup>2</sup>, Pérez-Requena J<sup>3</sup>, Brieva JA<sup>1</sup>, Rodríguez C<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Cirugía Vascul y <sup>3</sup>Anatomía Patológica. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

**Introducción:** Los AAA son una patología cardiovascular común cuya rotura tiene una mortalidad global superior al 50%. En la histología es característica la destrucción de la capa media y la existencia de infiltrados inflamatorios en las capas media y adventicia. Hay evidencias de una etiología inflamatoria de los AAA y de un papel patogénico de los infiltrados. En trabajos previos analizamos los infiltrados de los AAA encontrando que estaban formados por linfocitos con características específicas.

**Objetivos:** Estudio del mecanismo implicado en el reclutamiento de los linfocitos infiltrantes de la pared aórtica en los AAA, analizando el papel del Sistema de quimiocinas y sus receptores (Q/RQ).

**Pacientes y Métodos:** Se estudiaron 25 pacientes con AAA de los que se obtuvieron muestras de aorta y de sangre periférica. También se estudiaron 2 muestras de aorta sana. Se realizaron estudios sobre la población mononuclear infiltrante purificada y estudios inmunohistoquímicos sobre las muestras de aorta. Se analizó la expresión de RQ de las familias CCR y CXCR mediante citometría de flujo. Se realizaron ensayos de quimiotaxis frente a CXCL12 y se analizó la expresi-

sión de CXCL12 mediante técnicas inmunohistoquímicas y de inmunofluorescencia y análisis con microscopía confocal.

**Resultados y Conclusiones:** Los linfocitos T infiltrantes expresaban el perfil de RQ: CXCR4+, CCR7-, CCR2-, CCR3-, CCR9-, CXCR5-, CXCR3+/-, CCR5+/- . Los linfocitos B infiltrantes eran CXCR4+, CCR7-, CCR2-, CCR3-, CXCR5+/-, CXCR3+/-, CCR5+/- . CXCR4 se expresaba con alta intensidad en la totalidad de los linfocitos T y B de AAA, por lo que se realizaron ensayos de quimiotaxis frente a CXCL12, que mostraron que los linfocitos de AAA migraban en respuesta a CXCL12. Además dicha migración se inhibía cuando se bloqueaba CXCR4, indicando que la migración era específica de CXCR4. A continuación se analizó la expresión de CXCL12 en la aorta en AAA y en aorta sana. En AAA, CXCL12 se expresaba en gran cantidad en la capa adventicia en células localizadas en contacto con los linfocitos infiltrantes, con aspecto morfológico de células de estroma. En aorta sana sólo se detectaban escasos fibroblastos CXCL12+ en las capas medias y adventicia. A continuación se analizó la naturaleza de las células productoras de CXCL12 mediante inmunotinciones. Las células CXCL12+ eran CD45-, DR-, CD14-, CD106+, lo que sugiere que son células de estroma de tipo fibroblasto. Estos resultados indican que el sistema CXCR4/CXCL12 está implicado en el alojamiento de los linfocitos en la pared arterial de los AAA y que las células productoras de CXCL-2 son células del estroma de la aorta de los AAA.

**LA EXISTENCIA DE UN HAPLOTIPO TT PARA LO GENES DE LA IL-1 $\alpha$ (-389), IL-1 $\beta$ (-511) E IL-1R(1970) SE ASOCIA SIGNIFICATIVAMENTE CON SUSCEPTIBILIDAD PARA UN RECHAZO TEMPRANO DE INJERTOS RENALES.** *Sánchez-Velasco P<sup>1</sup>, Rodríguez-Calabia E<sup>2</sup>, García-Astudillo LA<sup>1</sup>, Ausín-Ortega F<sup>1</sup>, Arias M<sup>2</sup>, Leyva-Cobián F<sup>1</sup>.* Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Nefrología, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Santander.

Aunque una buena compatibilidad entre donante y receptor basada en la tipificación de los genes HLA mejora la supervivencia del injerto, el rechazo del mismo continúa siendo un importante problema clínico y actualmente no hay ningún procedimiento analítico capaz de predecirlo adecuadamente. El propósito de este estudio ha sido identificar factores genéticos de riesgo. Se ha escogido un panel amplio de citocinas, puesto que estas representan moléculas que intervienen comunicando distintos tipos de células, las modifican y todas ellas forman una malla que está regulada de forma muy precisa. En 298 trasplantes renales (114 habían sufrido un rechazo agudo durante el primer año y 184 lo habían sufrido posteriormente o no presentaron episodio de rechazo) se han analizado 48 polimorfismos de diversas citocinas, todas ellas de significativa importancia teórica en trasplante. El análisis estadístico de los datos obtenido no demostró asociaciones significativas entre los polimorfismos de los genes de la IL-4, IL-12, INF- $\gamma$ , TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2, IL-6 e IL-10 y la incidencia de rechazo agudo postrasplante. En cambio, si se obtuvieron correlaciones positivas de significancia estadística para los siguientes genotipos: IL-1 $\alpha$ (-389), genotipo TT asociado a rechazo agudo y genotipo CC asociado a protección (p<0,0005); IL-1 $\beta$ (-511), genotipo TT asociado a rechazo agudo y genotipo CC asociado a protección (p<0,0005); IL-1 $\beta$ (-3962), genotipo TT asociado a rechazo agudo y genotipo CC asociado a protección (p<0,002); IL-1R(-1970), genotipo TT asociado a rechazo agudo y genotipo CC asociado a protección (p<0,0005) e, inversamente, IL-1RA(-111), geno-

tipo CC asociado a rechazo agudo y genotipo TT asociado a protección (p<0,001). El papel de los polimorfismos de las citocinas en la evolución del trasplante no está aclarado. No obstante, el efecto neto de los tres miembros de la familia de los genes de la IL-1 controla la respuesta inflamatoria. La IL-1 causa relajación vascular, aumenta la adherencia de los linfocitos y los neutrófilos al endotelio y -en base a estos resultados- está implicada en la inmunobiología del rechazo. Finalmente, ya que la IL-1 representa una diana potencial de los tratamientos esteroideos, la identificación temprana de los pacientes con determinados genotipos, permitiría su mejor clasificación para tratamientos anti-rechazo más agresivos, incluyendo el tratamiento con IL-1RA.

**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE: EFECTO DE SALICILATOS EN LA FUNCIÓN DE NFAT.** *Aceves M<sup>1</sup>, Dueñas A<sup>2</sup>, Gómez C<sup>1</sup>, San Vicente E<sup>2</sup>, Sánchez Crespo M<sup>1</sup>, García-Rodríguez C<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Instituto de Biología y Genética Molecular (CSIC-UVA), Valladolid. <sup>2</sup>Hospital Clínico Universitario, Valladolid.

**Introducción:** El factor nuclear de células T activadas, NFAT, es un factor de transcripción citoplasmático que al ser activado por calcineurina, una fosfatasa dependiente de calcio y calmodulina, se traslada al núcleo en donde se une a promotores de genes de citoquinas claves en las respuestas inmune e inflamatoria. Su actividad se inhibe por ciclosporina A (CsA) y FK506, inmunosupresores ampliamente usados para evitar el rechazo de trasplantes. Los salicilatos son agentes anti-inflamatorios de uso común cuya acción farmacológica se ha atribuido recientemente no solo a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, sino también a la interferencia de otras vías de señalización como NF-kappaB y AP-1. El objetivo de nuestro estudio ha sido investigar tanto el efecto de salicilatos y derivados trifluorometilados en la función de NFAT como su mecanismo de acción.

**Métodos:** Se realizaron experimentos de transactivación con diferentes genes reporteros de NFAT, tanto dependientes (IL-2) como independientes (IL-3, GAL4-NFAT1-415, GAL4-NFAT1-4) de la unión cooperativa de AP-1. Con objeto de estudiar el mecanismo de acción de salicilatos en la cascada de activación de NFAT, se estudió su efecto en el estado de fosforilación de NFAT mediante Western blot, su efecto en la localización subcelular de NFAT mediante inmunocitoquímica, y su efecto en la unión de a DNA mediante ensayos de retardo en gel.

**Resultados y Conclusiones:** Los experimentos de transactivación indican que los salicilatos inhiben la actividad transcripcional mediada por NFAT, siendo mas potentes los derivados trifluorometilados. Además se observó sinergia de inmunosupresión de salicilatos en presencia de dosis subóptimas de CsA. Estos resultados son de gran interés por la posible aplicación terapéutica en el tratamiento de rechazo de trasplantes, pues el uso conjunto con salicilatos trifluorometilados permitiría disminuir la dosis y consecuentemente los efectos secundarios indeseados de CsA. En cuanto al mecanismo de acción, nuestros resultados indican que los salicilatos modulan la función de NFAT de modo diferente a CsA, pues no modifican ni el estado de fosforilación de NFAT ni su localización subcelular aunque si inhiben la unión de NFAT a DNA. El siguiente paso será profundizar en el estudio del mecanismo de acción de salicilatos analizando su posible efecto en el reclutamiento de los coactivadores transcripcionales CBP/p300 y su interacción con NFAT, así como su posible interferencia en las vías de activación de NFAT independientes de CsA que implican a las quinasas Cot y PKC $\zeta$ .

**INTERLEUKIN-12 AND INTERLEUKIN-18 HAVE A SYNERGISTIC EFFECT ON THE PRODUCTION OF INFLAMMATORY CHEMOKINES BY MONOCYTES AND MACROPHAGES IN VITRO.** *Coma G, Peña R, Rosell A, Clotet B, Bofill M. Fundació IrsiCaixa. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona.*

Upon pathogen recognition, macrophages and dendritic cells produce interleukin-12 (IL-12) and IL-18, two cytokines that have a synergistic effect on the differentiation and production of interferon gamma (IFN- $\gamma$ ) by Th1 cells. The aim of this study was to investigate whether these cytokines could also induce the production of chemokines by monocytes and macrophages as inflammatory chemokines play an important role in the recruitment of leukocytes at sites of inflammation.

Monocytes, purified by negative selection using magnetic beads separation (Stemcell Technologies INC, Vancouver, BC Canada), and broncho alveolar macrophages were cultured in the presence of IL-12, IL-18, IL-12 combined with IL-18 (IL-12/IL-18) or IFN- $\gamma$  for 7 days. Culture supernatants were collected and analysed for the presence of the following chemokines: CCL-2, CCL-3, CCL-4, CCL-5, CXCL-8, CXCL-9 and RANTES (BD Biosciences, Cowley, Oxford UK).

Stimulation with IL-12/IL-18 induced the production of CXCL-8 (15 ng/ml versus 2 ng/ml in unstimulated monocytes) whilst IFN- $\gamma$  induced 10 fold higher levels of CXCL-8 than IL-12 and IL-18. CXCL-9 reached levels of 125 ng/ml under IL-12/IL-18 stimulation while in presence of IFN- $\gamma$  we could only detect 2 ng/ml. In the same way, CXCL-10 was highly increased in cultures with IL-12/IL-18 where the levels of this chemokine reached 66 ng/ml, 100 fold higher than the levels reached by IFN- $\gamma$  stimulation. We observed a production of CCL-2 2 fold higher under IFN- $\gamma$  conditions than under IL-12/IL-18. In all these cases, chemokine levels obtained adding IFN- $\gamma$  or combining IL-12 with IL-18 were significantly higher than those obtained of unstimulated monocytes or with IL-12 or IL-18 on their own. We could not detect CCL-3, CCL-4 or CCL-5 in any of the cultures.

In contrast, in broncho alveolar lavage fluid macrophages cultures, we observed a spontaneous production of chemokines (CXCL-8: 25 ng/ml, CXCL-9: 10 ng/ml, CXCL-10: 2 ng/ml and CCL-2: 32 ng/ml). Nevertheless, there was a small increase in the levels of these cytokines in the presence of IL-12 or IL-18 on their own but not as high as in the presence of both cytokines (CXCL-9: 291 ng/ml, CXCL-10: 181 ng/ml and CCL-2: 556 ng/ml). Finally, IFN- $\gamma$  stimulated cultures produced 2 fold and 7 fold less CXCL-9 and CXCL-10 but twice as much CCL-2 when compared to IL-12/IL-18 stimulated cultures.

In conclusion, IL-12 and IL-18 may play an important role in inflammatory reactions as they can induce the production of inflammatory, angiogenic and angiostatic chemokines by macrophages.

## SESIÓN 8: MHC

**Moderadores:** Rafael Solana (H. Univ. Reina Sofía, Univ. de Córdoba), Carlos López Larrea (Hospital Central de Asturias)

**LOS ALELOS Y HAPLOTIPOS HLA TURCOS RESPALDAN LA PERTENENCIA DE LOS TURCOS AL SUSTRATO GENÉTICO MEDITERRÁNEO MÁS ANTIGUO.** *Serrano Vela JJ, Diller S, Oguz F, Moscoso J, Zamora J, R-A-Cachafeiro JJ, Martínez Laso J, Carin M, Arnaiz-Villena A. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid. <sup>1</sup>Dep. Molecular Biology, Istanbul Medical Faculty, Estambul (Turquía).*

**Objetivos:** Por primera vez se comparan los genes HLA turcos con los de poblaciones europeas y asiáticas, para comprobar la composición genética de la población turca actual.

**Metodología:** Se han determinado las frecuencias de los alelos HLA-A, HLA-B y HLA-DRB1 en la población turca a partir de 700 individuos. Las comparaciones con otras poblaciones se han realizado mediante el cálculo de distancias genéticas, dendrogramas Neighbor-Joining (NJ) y análisis de correspondencia. Se estudian haplotipos extendidos.

**Resultados:** La población turca queda englobada dentro del grupo de poblaciones mediterráneas y de Oriente Medio, estando algo más alejada de los asiáticos: concretamente de los túvulos de los Montes Altai (lugar de donde proceden las lenguas turcas), coreanos, japoneses, mongoles y chinos. Los turcos pueden ser considerados por tanto uno de los grupos genéticos más antiguos del mediterráneo (junto con los iraníes, cretenses, macedonios, armenios, argelinos, etc.).

**Conclusiones:** Se puede concluir que la migración turca hacia Anatolia fue más relevante desde el punto de vista cultural (lingüístico) que genético, y no implicó una entrada relativamente importante de población asiática respecto a la población ya existente.

**ESTUDIO DE LOS GENES HLA EN CUBANOS Y SU RELACIÓN CON AMERINDIOS, EUROPEOS Y AFRICANOS.** *Zamora J, Alegre R, Martínez Laso J, Suárez J, Moscoso J, Serrano Vela JJ, Vargas Alarcón G, R-A-Cachafeiro JJ, Arnaiz-Villena A. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid. <sup>1</sup>Laboratorios Betera, La Habana (Cuba). <sup>2</sup>Central American University, Mexico DF (Mexico).*

**Objetivos:** Las islas del Caribe, incluida Cuba, fueron pobladas primeramente por amerindios Arawaks y después por Taínos. Los conquistadores españoles provocaron la extinción de casi la totalidad de la población amerindia después de 1492. Los europeos introdujeron en Cuba esclavos negros procedentes de África Central. El objetivo del presente trabajo es estudiar el origen de los cubanos actuales y determinar el grado de mezcla étnica de la población cubana actual utilizando los genes HLA.

**Metodología:** Se han estudiado los genes HLA utilizando técnicas serológicas y genéticas. Las comparaciones con otras poblaciones incluyen el cálculo de distancias genéticas, la construcción de dendrogramas Neighbor-Joining (NJ) y análisis de correspondencia, y la estimación de haplotipos extendidos.

**Resultados:** Se han encontrado rasgos genéticos HLA claramente afro-europeos, mientras que apenas se han detectado características HLA amerindias.

**Conclusiones:** Se concluye que la merma de la población amerindia fue muy grande después de 1492.

**ORIGEN DE LOS AMERINDIOS TARAHUMARAS DE MÉJICO SEGÚN SUS GENES HLA.** *Moscoso J, García-Ortiz JE<sup>1,3</sup>, Ramírez-Sandoval L<sup>2,3</sup>, Rangel-Villalobos H<sup>3</sup>, Maldonado-Torres H<sup>4</sup>, Cox S<sup>4</sup>, García-Sepúlveda CA<sup>4</sup>, Figueroa LE<sup>2,3</sup>, Marsh SGE<sup>4</sup>, Little AM<sup>4</sup>, Madrigal JA<sup>4</sup>, Arguello JR<sup>1</sup>, Arnaiz-Villena A. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid. <sup>1</sup>Universidad Autónoma de Coahuila (Méjico). <sup>2</sup>Centro de Investigación Biomédica de Occidente (Méjico). <sup>3</sup>Universidad de Guadalajara (Méjico). <sup>4</sup>Anthony Nolan Research Institute (Reino Unido).*

**Objetivos:** Los amerindios Tarahumara viven en los Estados de Chihuahua y de Durango al norte de Méjico. Hablan una lengua Nahua (Azteca) amerindia perteneciente a la familia Pima-Cora. El objetivo es estudiar el origen y comparar genéticamente a los amerindios Tarahumaras con otras poblaciones.

**Metodología:** En este estudio se han obtenido los tipajes de alta resolución de los alelos HLA-A, -B, -DRB1 y -DQB1 y también se han caracterizado los haplotipos extendidos de esta población. Los datos resultantes se han comparado con los de poblaciones del resto del mundo mediante dendrogramas Neighbor-Joining (NJ), análisis de correspondencia y haplotipos extendidos.

**Resultados:** Los Tarahumaras se muestran más cercanos genéticamente a los Aymaras (del altiplano boliviano y peruano) y a los vecinos indios Terena (de las tierras bajas de Brasil y Paraguay), que geográfica y lingüísticamente están más separados de los Tarahumaras que de otras poblaciones amerindias (mejicanas). También se observa que todos los amerindios representan un grupo aislado del resto de poblaciones mundiales (incluidos los norteamericanos Na-Dene y Eskimos, y los Siberianos).

**Conclusiones:** Estos resultados confirman una complejidad imprevisible en los patrones migratorios Amerindios y la falta de correlación entre genes y lenguas.

#### LA MOLÉCULA MR1 SE ACUMULA EN VESÍCULAS INTRACELULARES Y PUEDE LLEGAR A SUPERFICIE CELULAR A 26°C.

**Gozalbo López B<sup>1</sup>, Gómez del Moral M<sup>2</sup>, Campos Martín Y<sup>1</sup>, Suela Rubio J<sup>1</sup>, López Núñez M<sup>1</sup>, Setién Baranda EF<sup>3</sup>, Martínez Naves E<sup>1</sup>.**  
<sup>1</sup>Unidad de Inmunología, <sup>2</sup>Dpto. Biología Celular, Facultad de Medicina U.C.M., Madrid. <sup>3</sup>Unidad de Epigenética, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid.

**Introducción:** MR1 es una molécula de la familia HLA de clase Id codificada en el cromosoma 1q25.3. Las moléculas MR1 restringen el desarrollo y posiblemente la respuesta de los linfocitos MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells), que son CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup> y se caracterizan por poseer un TCR invariante V $\alpha$ 7.2J $\alpha$ 33. Su función parece estar relacionada con la flora comensal intestinal y la producción de IgA. El ligando presentado por MR1 a estas células es desconocido. Los escasos datos disponibles hasta la actualidad parecen indicar que MR1 no se expresa en superficie de células transfectadas, posiblemente porque carezca del ligando adecuado para hacerlo. Las moléculas HLA de clase I clásicas deprivadas de péptidos (por ejemplo en ausencia de TAP) se acumulan en el interior del retículo endoplásmico. En estas células es posible la expresión de las moléculas HLA de clase Ia en superficie celular tras su incubación en condiciones de baja temperatura (26°C).

**Objetivo:** Estudiar la localización intracelular de MR1. Comprobar si MR1 sale también a la superficie en condiciones de baja temperatura.

**Metodología:** Hemos utilizado los siguientes anticuerpos monoclonales frente a antígenos humanos: BBM1.1 (frente a  $\beta$ 2-microglobulina ( $\beta$ 2m)), W6/32 (anticuerpo pan-HLA de clase I, que reconoce HLA-Ia y HLA-Ib pero no a MR1) y M2 (frente al péptido sintético FLAG, SIGMA) y antisueros de conejo frente a MR1 humano generados en nuestro laboratorio. También usamos las siguientes líneas celulares: NS0-MR1-FLAG (mieloma no secretor de ratón) y C1R-MR1-FLAG (línea linfoblastoide humana), ambas transfectadas con el cDNA de la molécula soluble MR1-FLAG humana y MR1.221 (línea linfoblastoide humana LCL 721.221 transfectada con el cDNA de MR1 humano completo).

**Resultados:** Mediante diversos estudios de expresión proteica (citometría de flujo, inmunoprecipitación, Western-blot) hemos observado que MR1, tanto en su forma soluble como completa queda retenido en el interior de las células humanas. Mediante técnicas de inmunofluorescencia hemos observado su acumulación en vesículas intracelulares cuya naturaleza estamos tratando de determinar. Por otra parte, MR1 expresado en las células NS0 de ratón es secretado al exterior celular. La proteína secretada por estas células ha sido purificada y está siendo utilizada para generar anticuerpos y en la identificación del ligando.

Nuestra hipótesis es que MR1 no llega a la ruta exocítica en las células humanas porque queda retenida por chaperonas al carecer de péptido. Sin embargo en ratón estas chaperonas no serían capaces de unirse a MR1 humano o bien presentarían ligando, por lo que llega a la ruta exocítica y se secreta. Consecuentemente con esta hipótesis hemos realizado experimentos cultivando las células humanas transfectadas con MR1 a 26°C. Nuestros datos basados en experimentos de citometría de flujo sugieren que MR1 podría llegar a la superficie celular en células cultivadas a 26°C, de forma similar a lo que ocurre con las moléculas HLA de clase Ia.

#### ANÁLISIS DE LA REGULACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DEL PROMOTOR DEL GEN MICB HUMANO. **Rodríguez-Rodero S, Fdez-Morera JL, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, González S, López Larrea C.** Unidad de Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.

MICB es un ligando del receptor NKG2D, expresado mayoritariamente por células NK, linfocitos T  $\gamma\delta$ , y linfocitos T CD8<sup>+</sup> citotóxicos. La inducción de expresión de MICB está implicada en la inmunovigilancia de células infectadas por virus, patógenos intracelulares y la tumorigenesis. Los mecanismos de regulación no se conocen por lo que el objetivo de este trabajo fue analizar los mecanismos implicados en la regulación de este gen.

Para estudiar la expresión de este gen determinamos su inicio de transcripción y clonamos su región promotora de (+67/-509) a partir de líneas homocigotas específicas para los alelos de MICB más frecuentes MICB0101, 01021, 01031, 0104, 0105, 0106. El análisis de estas secuencias reveló que el promotor de MICB es polimórfico ya que presenta tres variantes que incluyen una delección (TTagGG/TTGG) en la posición -66 y tres transversiones G/C localizados en las posiciones +16/-341/-408 respectivamente. Estos cambios también estaban presentes en nuestra población, encontrándose la delección en homocigosis en el 8.57% de los individuos y en heterocigosis en el 36.75%.

Para estudiar el efecto que tenían estos polimorfismos sobre la actividad transcripcional de MICB, subclonamos los diferentes promotores, en un plásmido *reporter* y estudiamos su actividad transcripcional mediante la transfección en líneas celulares (HeLa, Caco-2, A375 y GMR). Los promotores de MICB fueron capaces de inducir la transcripción de manera tejido-específica observándose que aquellas variantes que presentaban la delección disminuían más de 8 veces la actividad transcripcional ( $p < 0.05$ ). Concordantemente la expresión de MICB a nivel de RNA también estaba notablemente disminuida en aquellas líneas homocigotas que presentaban la delección.

Para estudiar la contribución relativa de cada polimorfismo sobre la actividad transcripcional construimos 6 mutantes individuales para cada una de las mutaciones. Los datos obtenidos sugieren que la delección (-66), junto con al cambio puntual localizado en la posición -408, son

los responsables del descenso de transcripción (71% y 75% respectivamente) observado en algunas de las variantes del promotor de MICB.

Mediante ensayos EMSA y de competición se observó que existen complejos unidos específicamente a las cajas CCAAT y Myb localizadas en la región -66 del promotor. Se comprobó además una alteración de la unión de estos complejos cuando dicha región era mutada en la variante del promotor que presentaba una mayor actividad transcripcional. Estos resultados sugieren su posible implicación en la diferencia de actividad observada entre las variantes del promotor de MICB encontradas.

**LAS COMBINACIONES DE LOS GENES KIR Y HLA-B CONFIEREN RIESGO ADICIONAL A HLA-B27 AL DESARROLLO DE ESPONDILITIS ANQUILOPOYÉTICA.** López-Larrea C<sup>1</sup>, Blanco-Gelaz MA<sup>1</sup>, Torre-Alonso JC<sup>2</sup>, Bruges Armas F, Suárez-Alvarez B<sup>1</sup>, Pruneda L<sup>1</sup>, Couto AR<sup>3</sup>, González S<sup>4</sup>, López-Vázquez A<sup>1</sup>, Martínez-Borra J. <sup>1</sup>Unidad de Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>2</sup>Unidad de Reumatología. Hospital "Monte Naranco". Oviedo. <sup>3</sup>Immunogenetic Service, Hospital Santo Espirito de Angra do Heroismo, Azores, Portugal.

**Objetivo:** Los receptores Ig-like de las células NK (KIR) y los loci HLA son altamente polimórficos, y las moléculas de clase I interactúan y activan los receptores especificados por los genes KIR de la superficie de la célula. Examinamos si la combinación de los genes KIR3DS1/3DL1 en concierto con los genotipos HLA-B27 está relacionada con susceptibilidad a espondilitis anquilopoyética (EA).

**Métodos:** Muestras de DNA de 228 individuos positivos para HLA-B27 (126 pacientes con EA y 102 controles sanos) de una población caucásica fueron examinadas. Todos fueron tipados para HLA-B y KIR (3DS1 y 3DL1).

**Resultados:** Nuestros resultados demuestran que adicionalmente a B27, el alelo KIR3DS1 se asocia a EA (62.6% en pacientes con EA, 35.2% en controles sanos,  $p=0.0001$ ;  $OR=2.8$ ). También observamos que la combinación los genotipos de KIR3DS1 y de B27 que llevaban el epitopo HLA-B Bw4-I80 en posición trans era mayor los pacientes con EA que en los controles HLA-B27 (29.3% en pacientes con EA vs. 13.7 en controles sanos;  $p=0.008$ ;  $OR=2.61$ ). Este efecto fue encontrado solamente en ausencia del gen inhibidor 3DL1 ( $p=0.02$ ;  $OR=5.75$ ). Sin embargo, la presencia del gen inhibidor KIR3DL1 conjuntamente con los genotipos de B27/HLA-B Bw4-I80 tienen un efecto altamente protector contra el desarrollo de EA (22.2% en pacientes con EA, 36.2% en los controles sanos HLA-B27;  $p=0.03$ ). Este efecto fue encontrado en ausencia del gen activador KIR3DS1 ( $p=0.00001$ ;  $OR=7.86$ ).

**Conclusiones:** La presencia de KIR3DS1 o de KIR3DL1 conjuntamente con los genotipos HLA-B27s/ HLA-B Bw4-I80 pueden modular el desarrollo de EA. La susceptibilidad a EA podría estar determinada en parte por el equilibrio entre genotipos activadores e inhibidores de KIR-HLA.

**ELECTROFORESIS CAPILAR DE AMPLIFICADOS PCR APLICADOS AL ESTUDIO DE MICROSATÉLITES.** León AJ, León VJ<sup>1</sup>, Corral R<sup>1</sup>. Lab. De Pediatría e Inmunología. Universidad de Valladolid. <sup>1</sup>Servicio de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca.

La lectura de los amplificadores por PCR-SSP para el estudio de microsatélites se efectúa habitualmente por electroforesis en geles de poliacrilamida al 8-16%. Esta técnica presenta una serie de inconvenientes

derivados de los requerimientos propios del tamaño de los amplicones, esto es que, para detectar con toda seguridad diferencias de 20 bases se requiere un gel al 8%, asimismo para diferencias de 6 bases se debe utilizar un gel de 16%, necesitando en los casos de duda repetir la prueba con los geles más adecuados a su tamaño.

Hay que considerar que el tiempo empleado en preparar los geles, cargarlos con las muestras a ensayar y duración de la electroforesis supone una cuota importante del tiempo del personal del laboratorio.

Todo ello nos ha inducido a analizar una posible alternativa para automatizar el análisis de estos productos de la PCR mediante el empleo de electroforesis capilar, que admite amplio rango de número de bases y otras ventajas derivadas de la misma como es la automatización mediante el empleo de muestreadores.

**Material y Métodos:** 10 muestras de ADN procedentes de sujetos sanos fueron extraídas mediante salting-out y llevadas a una concentración de 100ng/ul. Se empleó un kit de tipaje por PCR-SSP de los microsatélites, D4S243, D9S162, IFNA, D9S171, D9S747. Efectuándose los ensayos según las especificaciones del Genome Pub Med, los amplicones se depositaron en el muestreador automático de un equipo de electroforesis capilar Beckman PACE MDQ, graduando las condiciones del equipo mediante el kit eCAP ds DAN Beckman, a un rango de 72-1300 bp, con un capilar de 47 cm, a 20°C y un voltaje de 9.4 Kv para producir un campo de 200 V/cm y 100 uA. Paralelamente los amplicones fueron analizados mediante electroforesis en poliacrilamida

**Resultados:** Los amplificadores de cada microsatélite, al ser analizados mediante electroforesis capilar, revelaron patrones electroforeticos cualitativamente similares, variando cuantitativamente en alguno de los picos, entre sujetos. Permittiendonos establecer patrones electroforeticos individuales para cada microsatélite, similar a los obtenidos al analizarlos con poliacrilamida. El empleo de la electroforesis capilar permite asimismo un importante ahorro de tiempo y reactivos.

**DRB1 EN LA POBLACIÓN DE MADRID. FRECUENCIA ALÉLICA, SECUENCIA CODIFICANTE COMPLETA Y ASOCIACIÓN HAPLOTÍPICA DE DRB1\*030102, \*0306, \*0406, \*040701, \*0408, \*1111, \*1327, \*1356, \*1411, \*1446, \*1503, \*1504, \*0806, \*0813, Y \*0818. DESCRIPCIÓN DE NUEVOS ALELOS.** Balas A, Fernández B, Aviles MJ, Alonso-Nieto M, Zarapuz L, Blanco L, Rodríguez MA, García-Sánchez F, Vilches C, Vicario JL. Histocompatibilidad. Centro de Transfusión de Madrid.

En los últimos años se han creado una gran cantidad de registros de donantes de progenitores hematopoyéticos tanto de médula ósea/sangre periférica como de unidades de sangre de cordón umbilical. Este hecho ha supuesto la realización del tipaje HLA a un gran número de donantes y unidades de cordón de diferentes poblaciones. En el presente trabajo presentamos datos del tipaje del gen DRB1 mediante SBT de una población de 1.511 unidades de cordón umbilical que forman parte del banco de cordón de la Comunidad de Madrid.

Los datos de frecuencia demostraron ser similares a los previamente publicados para otras poblaciones españolas y mediterráneas, con DRB1\*0701 y DRB1\*030101 como alelos más frecuentes en nuestra población. Dentro de los subtipos de DRB1\*04 se obtuvieron datos de frecuencia equivalentes para los alelos DRB1\*040101, \*0402, \*040301, \*0404 y \*0405, encontrándose aunque en una frecuencia mucho menor los subtipos DRB1\*0406, \*040701, \*0408, \*0410 y \*0411. Asimismo, se observaron frecuencias esperadas para los subtipos de DRB1\*01, \*11, \*12, \*13, \*14, \*08, \*15 y \*16.



La secuenciación de este gran número de muestras permitió la caracterización de la región codificante completa del gen DRB1 de alelos no completamente caracterizados previamente. Para ello se realizó una amplificación específica de los grupos alélicos DRB1\*01, \*03/\*11/\*13, \*15/\*16, \*08, y \*04/\*07 utilizando primers situados en regiones 5'UT y 3'UT. De esta forma se obtuvo la secuencia codificante completa de los siguientes alelos DRB1: DRB1\*0406, \*040701, \*0408, \*0411, \*030102, \*0306, \*1327, \*1356, \*1111, \*1115, \*1411, \*1446, \*0806, \*0813, \*0818, \*1503, y \*1504. La secuenciación de estos alelos no demostró variaciones a las secuencias esperadas excepto para el gen DRB1\*0406. La secuenciación de dos individuos portadores del gen \*0406 demostró una mutación puntual en el exon 3 respecto a la previamente caracterizada. Asimismo se determinó el haplotipo de clase II en el que se encuentran estos alelos la mayoría de ellos de baja frecuencia en nuestra población.

Por otro lado, del presente estudio se obtuvo la caracterización de dos alelos nuevos con variaciones en el exon 2 y comprendidos dentro de los grupos alélicos DRB1\*07 (\*0709) y \*01.

**ESTRATEGIA DE TIPIFICACIÓN DE HLA-B27 MEDIANTE LA COMBINACIÓN DE UN MÉTODO DE EXTRACCIÓN DE DNA DIRECTO Y PCR A TIEMPO REAL.** *Faner R, Bernaus O, Ambrós C, Llop C, Milla V, Bové M, Pujol-Borrell R, Martínez E, Palou E, Juan M, Herrero MJ.* Laboratorio de Inmunología (LIRAD)-CTBT. HUGTiP. Badalona (Barcelona).

**Introducción:** El antígeno HLA-B27 está fuertemente asociado a un gran número de enfermedades reumáticas incluyendo la espondilitis anquilosante y la artritis reactiva. Su tipificación es de gran importancia en el diagnóstico de estas patologías ya que el 90% de estos pacientes es B27 positivo. Convencionalmente la tipificación se ha realizado mediante técnicas serológicas (Citotoxicidad Dependiente de Complemento, Citometría de Flujo), debiéndose confirmar la positividad por biología molecular (diversas variantes de la PCR). La introducción de la técnica de PCR a tiempo real con sondas donador-aceptor (FRET) puede ser un método de confirmación rápido, simple y fiable.

**Objetivo:** Valorar el método de PCR a tiempo real como técnica confirmatoria de los valores positivos obtenidos en el screening de HLA-B27 mediante Citometría de Flujo.

**Pacientes y Métodos:** Se analizaron un total de 669 muestras mediante screening por Citometría de Flujo (AcMo Beckton Dickinson®). Las muestras dudosas o positivas se confirmaron mediante PCR-SSP (cebadores que amplifican el exón 2) y mediante PCR a tiempo real (fluorotipificación-FRET en coamplificación de B27 y beta globina, como control de la reacción). La extracción de ADN para la PCR-SSP fue realizada mediante el uso de columnas de Quiagen® mientras que de las muestras utilizadas en la PCR a tiempo real se planteó obtener el DNA a partir de 100 µl de sangre lisada con cloruro amónico e incubada a 95°C 15 min.

**Resultados:** De las 669 muestras analizadas, un total de 71 (10,6%) necesitaron confirmación (dudosas y positivas) que fue llevada a cabo por los dos métodos comentados: PCR-SSP y PCR a tiempo real. En cada técnica la extracción de DNA se realizó de manera diferente tal y como se ha mencionado anteriormente. Los resultados obtenidos por ambos métodos han sido idénticos, mostrando una concordancia del 100% en la confirmación de la citometría (dudosos y positivos)

**Conclusión:** Consideramos que para la tipificación del antígeno HLA-B27, la combinación de un método de extracción de DNA sen-

cillo y de bajo coste como el descrito, junto con el uso de la PCR a tiempo real para la amplificación genérica de B27, constituyen una estrategia económica, rápida y robusta a desarrollar en laboratorios donde se procesa gran número de muestras.

**ANÁLISIS DEL REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A CLASE I EN CÉLULAS DE CARCINOMA HEPATOCELULAR.** *Álvarez P, Muixí L<sup>1</sup>, Carrascal M<sup>2</sup>, Canals F<sup>3</sup>, Abián J<sup>3</sup>, Jaraquemada D<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unitat d'Immunologia e Institut de Biotecnologia i Biomedicina, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, Barcelona. <sup>2</sup>Unitat de Proteòmica UAB-CSIC, Barcelona. <sup>3</sup>Servei de Proteòmica, Institut de Recerca, Hospital Vall d'Hebron, Barcelona.

Las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC, HLA en humanos) presentan péptidos derivados del catabolismo proteico a los linfocitos T citotóxicos. Dichos péptidos pueden provenir de proteínas endógenas y unirse a las moléculas HLA de clase I que los presentan a los linfocitos T CD8<sup>+</sup>, generalmente citotóxicos (CTLs), o de proteínas degradadas en la ruta endocítica que se unen a las moléculas de HLA de clase II y se presentan a los linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los repertorios peptídicos asociados a las moléculas de HLA son en sí una muestra del proteoma expresado en una célula. Se han llevado a cabo múltiples estudios describiendo el repertorio asociado a distintos alelos de HLA, la mayoría en células linfoides. A partir de estos datos se han podido identificar los motivos de anclaje de los péptidos a los diferentes alelos. Sin embargo, el uso exclusivo de células linfoides podría haber generado un sesgo en la descripción de las proteínas parentales de las que provienen los péptidos asociados a cada alelo, ya que en otros tipos celulares el proteoma puede variar.

La inducción de respuestas autólogas de CTLs contra los tumores es uno de los métodos utilizados en la inmunoterapia tumoral. Para ello, se necesita la identificación de los elementos específicos de la respuesta, es decir, el antígeno, el péptido reconocido y el alelo de HLA al que se asocia. La identificación masiva de ligandos naturales de HLA específicos de células tumorales sería de gran utilidad a la hora de diseñar estrategias de inmunoterapia.

En este trabajo se ha llevado a cabo un estudio exhaustivo de los ligandos peptídicos asociados a las moléculas de HLA de clase I en la línea de carcinoma hepatocelular SK-Hep-1, con dos objetivos principales: analizar si el origen de los péptidos asociados a clase I en una célula no linfoide es similar al descrito previamente para células linfoides y, en segundo lugar, tratar de encontrar de forma directa posibles candidatos peptídicos como dianas de CTLs en pacientes con cáncer.

Se han identificado 115 péptidos asociados a HLA de clase I, lo que supone el mayor número de ligandos asociados a clase I en una línea celular no linfoide descrito hasta el momento. La distribución celular de las proteínas parentales es similar a las descritas en células linfoides, aunque podría haber diferencias alelo-dependientes. Entre el 20 y el 30% de las proteínas generadoras de ligandos están relacionadas con tumores. Los datos apuntan a la posibilidad de usar estos ligandos en cócteles peptídicos para generar respuestas de CTLs.

*Financiado por: SAF2003-08843-C02-00ç*

**BASES INMUNOQUÍMICAS DE LA ASOCIACIÓN DE HLA-B14 Y HLA-B27 A ESPONDILITIS ANQUILOSANTE.** *Merino E, Monserrat V, López de Castro JA.* Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (UAM-CSIC), Madrid.

**Introducción.** HLA-B27 está fuertemente asociado a un grupo de enfermedades reumáticas designadas colectivamente como espondilitis anquilosante (EA) en poblaciones africanas subsaharianas en las que HLA-B27 está prácticamente ausente y la frecuencia de EA es muy baja. B\*1403 se ha encontrado sólo en estas poblaciones y difiere de B\*1402, un subtipo no asociado a EA, únicamente en la posición 156.

Recientemente se ha descrito la asociación de HLA-B\*1403 con espondilitis anquilosante (EA) en poblaciones africanas subsaharianas en las que HLA-B27 está prácticamente ausente y la frecuencia de EA es muy baja. B\*1403 se ha encontrado sólo en estas poblaciones y difiere de B\*1402, un subtipo no asociado a EA, únicamente en la posición 156.

**Objetivos.** 1) Analizar el grado de similitud entre los repertorios peptídicos constitutivos de B\*1402, B\*1403 y B\*2705.

2) Secuenciar péptidos compartidos y no compartidos, para identificar las características estructurales diferenciales entre ligandos de alotipos asociados diferencialmente a enfermedad (B\*1402/B\*1403) e identificar ligandos comunes de B\*1403 y B\*2705.

3) Determinar el grado de solapamiento antigénico entre los alotipos asociados a EA (B\*1403 y B\*2705), y entre los dos subtipos de HLA-B14 asociados diferencialmente a esta enfermedad (B\*1402 y B\*1403).

**Métodos.** Los estudios de solapamiento peptídico se hicieron mediante el aislamiento de los *pools* peptídicos unidos a HLA-B\*1402, B\*1403 y B\*2705, fraccionamiento por HPLC y análisis comparativo mediante técnicas de espectrometría de masas.

Para determinar el grado de similitud antigénica de los diferentes subtipos, se enfrentaron en ensayos de citotoxicidad, CTLs monoclonales alorreactivos con células diana transfectadas con HLA-B\*1402, B\*1403 o B\*2705.

**Resultados y Conclusiones.** B\*1402 y B\*1403 presentan un solapamiento peptídico substancial, aunque menor de lo esperado, *a priori* de la gran similitud estructural entre las dos moléculas. Sin embargo, al analizar las secuencias de los péptidos diferenciales entre ambos subtipos, se ven residuos de anclaje definidos para cada uno de ellos, que podrían explicarse en su totalidad por el efecto de la mutación.

B\*1403 y B\*2705 tienen un solapamiento peptídico muy bajo pero se han podido identificar y secuenciar ligandos comunes entre estos dos alotipos.

El solapamiento antigénico, estimado como porcentaje de clones de CTLs que presentan reacción cruzada, es similar al grado de solapamiento peptídico. Esto sugiere que péptidos comunes tienden a ser presentados con características antigénicas similares por los distintos alotipos.

**APROXIMACIÓN DEL TIPAJE BASADO EN LA SECUENCIACIÓN (SBT) PARA LA IDENTIFICACIÓN COMPLETA DE ANTÍGENOS LEUCOCITARIOS HUMANOS (HLA) DE CLASE I POR ALTA RESOLUCIÓN, ABORDAJE PARA LA CARACTERIZACIÓN DE NUEVOS ALELOS.** *Alonso-Nieto M, García-Sánchez F, Balas A, Zarpuz-Fraile L, Blanco L, Vicario JL. Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de Madrid.*

**Objetivo:** 1) Desarrollo de un protocolo de SBT para HLA clase I (loci A/B/C), mediante el cual se resuelvan los problemas encontrados en la secuenciación convencional, tales como ambigüedades debidas a polimorfismos fuera de los exones 2, 3 y 4, y ambigüedades por complementación.

2) Desarrollo de un protocolo para la secuenciación completa de los genes HLA de clase I (loci A/B/C), para su aplicación en la descripción de nuevos alelos.

#### **Metodología:**

- Puesta a punto de la amplificación del gen completo de HLA de clase I, locus específica HLA-A/B/C (longitud ≈3500pb).

- Diseño y validación de primers de secuenciación para los exones 2, 3 y 4 en las dos direcciones.

- Diseño y validación de primers de secuenciación dirigidos a zonas polimórficas fuera de los exones 2, 3 y 4.

- Diseño y validación de primers específicos de alelos o de grupos de alelos para resolver ambigüedades por complementación.

- Diseño y validación de primers para secuenciar el gen completo HLA de clase I para la descripción de nuevos alelos.

**Resultados:** Se han estudiado más de 150 muestras aplicando este nuevo protocolo. En un primer paso se obtiene información analizando los exones 2, 3 y 4.

Aproximadamente el 50% de estas requieren la secuenciación de zonas fuera de los exones 2, 3 y 4, para discriminar ambigüedades en las que aparecen alelos nulos, alelos de baja expresión o alelos con cambios aminoacídicos fuera de estos exones (exones 1, 5, 6 y 7).

En el caso de las ambigüedades por complementación los primers específicos de alelo/s diseñados han sido:

HLA-A\*01, 02, 0205, 03, 24, 26.

HLA-B\*07, 08, 15, 18, 38/39, 40, 4, 51.

HLA-Cw\*01, 03, 04, 05/08, 0701, 07, 12/16.

Su utilización ha permitido resolver todas las ambigüedades encontradas, aplicándose en más del 70% de las muestras (A y/o B y/o C).

Se han descrito 8 nuevos alelos de los que se ha secuenciado el gen completo, 2 HLA-A (1 nulo), 4 HLA-B y 2 HLA-C.

**Conclusiones:** La utilización de este nuevo protocolo de secuenciación ha permitido el tipaje de alta resolución sin ambigüedades de todas las muestras analizadas.

El estudio completo tanto de intrones como de exones en los nuevos alelos es relevante para poder definir la causa por la que se producen alelos nulos, para poder desarrollar primers específicos de alelos que permitan la resolución de las ambigüedades por complementación, y conocer su origen molecular.

#### **SESIÓN 9: INMUNIDAD INNATA Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO**

**Moderadores:** Miguel López Botet (Univ. Pompeu Fabra, Barcelona), Dolores Jaraquemada (Univ. Autónoma Barcelona)

**FK506 (TACROLIMUS) MAY DIFFERENTLY AFFECT INNATE AND ADAPTATIVE RESPONSES INDUCED BY PLASMACYTOID DENDRITIC CELLS.** *Naranjo M, Cos J, Ocaña L, Pujol-Borrell R, Borràs FE, LIRAD-CTBT. Institut d'Investigació Germans Trias i Pujol, Barcelona.*

Immunosuppressive agents (IA) are routinely used to reduce allograft rejection upon organ transplantation. However, the use of these agents may also favour bacterial and viral infections. FK506 (Tacrolimus) is a widely used IA that inhibits T cell proliferation and also affects the function of other cell types, like dendritic cells. Plasmacytoid dendritic cells (PDCs) are key effectors of innate and adaptative immunity and are the main source of type I interferons upon viral infection. The effect of FK506 on PDCs has not been investigated.

**Objective:** Therefore, our aim was to evaluate whether this IA may modulate PDCs' function *in vitro*.

**Methods:** PDCs were isolated from healthy blood donors, cultured in the presence of FK506 in different conditions and activated with CpG.

**Results:** CpG activation resulted in the up-regulation of HLA-DR and co-stimulatory molecules (CD80 and CD86) in control experiments. The addition of FK506 did not substantially modify these results. However, when PDCs were incubated with IL3 and FK506 (FK-pre-treated PDCs) for 48 h before activation, and then stimulated with CpG, the surface expression of co-stimulatory molecules on PDCs was significantly reduced compared to controls. Accordingly, FK-pre-treated PDCs induced a less potent allostimulation on naïve T cells. Interestingly, T lymphocytes responding to FK-pre-treated PDCs' allostimulation showed a dramatically reduced capacity to produce IFN gamma. In contrast, the production of IFN alpha by PDCs was not altered by the FK pre-treatment.

**Conclusions:** Taken together, these results indicate that FK506 could differently affect the innate and adaptative responses induced by PDCs. Further experiments are needed to clarify their role upon viral challenge and especially the functional state of PDCs in patients treated with different IA for long time periods.

#### DESARROLLO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS PLASMATICOIDES A PARTIR DE PROGENITORES DE TIMO HUMANO. *Martín Gayo E, Toribio García ML. Centro de Biología Molecular "Severo Ochoa". Madrid.*

En el timo humano están presentes dos tipos de células dendríticas (DCs): DCs mieloides y DCs plasmacitoides. Estudios previos de nuestro laboratorio habían demostrado que los progenitores más inmaduros de timo pueden generar DCs mieloides en respuesta a GMSCF, SCF, IL6, IL7 e IL1 $\alpha$ . Sin embargo, en estas condiciones, no se observaba generación de DCs plasmacitoides. Nuestro objetivo ha sido identificar condiciones de cultivo capaces de soportar la generación de DCs plasmacitoides a partir de los progenitores de timo humano. Para ello, se aislaron progenitores CD34<sup>++</sup> por medio de técnicas de inmunoselección magnética, y se cultivaron con distintas citoquinas que se han implicado recientemente en el desarrollo de DCs plasmacitoides extra-tímicas, como el FLT3L y TPO, en presencia o ausencia de la línea estromal murina OP-9. Tras 5-8 días de cultivo en presencia de FLT3L, IL7, SCF y TPO, se observó una generación mayoritaria de DCs mieloides, pero por primera vez, fuimos capaces de detectar generación de una población minoritaria (nunca superior al 12%) de DCs plasmacitoides. Cuando los cultivos se realizaron en presencia de FLT3L, IL7 y la línea OP9, se observó una generación de DCs plasmacitoides mucho más eficiente, llegando a representar hasta un 50% del cultivo a día 8. En estos cultivos, también se observó generación de DCs mieloides, aunque en proporciones menores. Por tanto, nuestros datos demuestran que los progenitores de timo humano son capaces de generar DCs plasmacitoides, lo que supone que estas células se generan *in situ* en el timo a partir de progenitores multipotenciales.

El desarrollo de este sistema experimental nos ha permitido abordar el posible origen ontogénico de las DCs plasmacitoides y su relación con las DCs mieloides. Nuestros resultados indican que el sistema de diferenciación descrito permite la generación a tiempos cortos de cultivo (día 3) de una población que coexpresa los receptores para las citoquinas IL3 y GMSCF, específicos de los linajes de DCs plasmacitoides y mieloides respectivamente. Actualmente, estamos realizando experimentos de sorting para definir los potenciales de diferen-

ciación de dicha población y determinar si se trata de un progenitor bipotencial de DCs.

#### CARACTERIZACIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS QUE APARECEN EN SANGRE TRAS UNA INMUNIZACIÓN CON TOXOIDE TETÁNICO. *González-García I, Brieva JA. Servicio de Inmunología, Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

**Introducción.** Las células plasmáticas (CP) son la fase final de diferenciación de los linfocitos B, dedicadas masivamente a la producción de anticuerpos. Nuestro conocimiento sobre las CP se basa fundamentalmente en experimentos *in vitro* o en modelos animales, ya que son muy escasos los estudios *in vivo* en CP. En este trabajo se caracterizan las CP humanas que aparecen en sangre periférica (SP) tras una vacunación con toxoide tetánico (Tet) como estímulo específico.

**Objetivos.** Estudiar las CP humanas que se inducen en la sangre periférica de individuos inmunizados con Tet analizando los siguientes aspectos: cinética de aparición y presencia en sangre, producción de inmunoglobulinas (Ig), caracterización fenotípica, apoptosis, capacidad de proliferación y respuesta a IL-6.

**Metodología.** Se estudian las CP de SP de voluntarios a distintos tiempos tras la inmunización con Tet. Mediante el marcaje con AC monoclonales fluorescentes, y marcaje intracelular de Tet-FITC, se estudia por citometría de flujo (CF) la aparición de las CP específicas y no específicas (CP-Tet<sup>+</sup> y CP-Tet<sup>-</sup>, respectivamente), y el tiempo que permanecen en SP, así como su fenotipo. Se emplea la técnica de ELISPOT para confirmar los datos de CF sobre el número de CP que aparecen y permanecen en SP. La producción de Ig se cuantifica mediante ELISA. La apoptosis de las CP se estudia mediante el análisis de anexina-V, y su capacidad de proliferación, por la técnica de incorporación de bromodeoxiuridina (BRDU).

**Resultados.** El nº de CP totales de SP aumentan 4 veces 6 días después de la inmunización con Tet. Las CP-Tet<sup>+</sup> aumentan 100 veces en ese tiempo, y representan la mitad de las CP presentes a día 6. Hacia el día 10 las CP-Tet<sup>+</sup> desaparecen, y al día 30, las CP totales vuelven al nº pre-boost. Las CP-Tet<sup>+</sup> y las CP-Tet<sup>-</sup> difieren en varios aspectos. Las CP-Tet<sup>+</sup> muestran mayor expresión de DR, CD138 y CD62L, y son similares en cuanto a CD45 y CD95 y Vs38C, IgG y kappa intracelular. Asimismo, CP-Tet<sup>+</sup> muestran mayor capacidad proliferativa, y permanecen en mayor nº viables *in vitro*, debido, posiblemente, a su mayor capacidad proliferativa y de resistencia a apoptosis. Las CP-Tet<sup>+</sup> producen activamente IgG-tet, y esta actividad se incrementa en presencia de IL-6 y fibronectina (FN). La CP-Tet<sup>-</sup> secretan esencialmente IgG, pero esta actividad no aumenta con IL-6.

**Conclusiones.** La inmunización induce la aparición y aumento en la SP de al menos dos tipos de CP. Las CP-Tet<sup>+</sup> son inducidas por el Ag, producen IgG-tet, son altamente proliferantes y dependientes de IL-6. Las CP-Tet<sup>-</sup>, son menos resistentes a apoptosis y menos sensibles a IL-6.

#### EL RECEPTOR DE QUIMIOQUINAS CCR7 REGULA LA QUIMIO-TAXIS Y LA VELOCIDAD MIGRATORIA EN CÉLULAS DENDRÍTICAS ACTIVANDO MÓDULOS DE SEÑALIZACIÓN QUE SON MODULADOS DE MANERA INDEPENDIENTEMENTE. *Riol-Blanco I, Sánchez-Sánchez N, Torres A, Tejedor A, Corbi AL, Sánchez-Mateos P, Rodríguez-Fernández JL. Centro de Investigaciones biológicas. Madrid.*

El receptor de quimioquinas CCR7 es necesario para dirigir a las células dendríticas (CDs), hacia los ganglios linfáticos secundarios donde estas células participan en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa. A pesar de la importancia de este receptor para la respuesta inmune, se son poco conocidos los mecanismos moleculares por los cuales CCR7 regula las funciones de las CDs. Puesto que, aparte de la quimiotaxis, CCR7 también regula la velocidad migratoria en las CDs. Hemos investigado las vías de señalización dependientes de CCR7 que regulan la quimiotaxis y la velocidad migratoria de las CDs. Encontramos que aunque CCR7 regula a las enzimas PI3K/Akt, sin embargo, sorprendentemente, estos dos moléculas no regulan ni la quimiotaxis ni la velocidad migratoria de las CDs. CCR7 regula la quimiotaxis, pero no la velocidad migratoria, a través de la proteína Gi y las MAPKs (ERK, p38 y JNK). CCR7 regula la velocidad migratoria, pero no la quimiotaxis, a través de las moléculas Rho, PYK-2 y cofilina. La segregación de los módulos de señalización que regulan la quimiotaxis y la velocidad migratoria de las CDs puede permitir una mejor modulación de la respuesta quimiotáctica dependiente de CCR7 en estas células.

**PU.1 REGULA LA ACTIVIDAD DE LA REGIÓN REGULADORA PROXIMAL DEL GEN DE DC-SIGN. Domínguez Soto A, Puig Kroger A, Vega MA, Corbi A. Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC, Madrid)**

DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific ICAM-3 Grabbing Nonintegrin) es una lectina tipo C expresada en células dendríticas mieloides y en ciertas poblaciones de macrófagos que media captura antigénica y participa en interacciones intercelulares con linfocitos T-naive y células endoteliales. Numerosos microorganismos patógenos (incluyendo HIV y *Mycobacterium*) se unen a DC-SIGN para acceder a células dendríticas, evadiendo así la respuesta inmune. Nuestros resultados indican que PU.1 controla la actividad basal y tejido-específica de la región reguladora del gen de DC-SIGN, mediante la ocupación *in vivo* de dos elementos *Ets*. La integridad de estos elementos es precisa para las acciones cooperativas de PU.1 con otros factores de transcripción como Myb y RUNX sobre la actividad del promotor de DC-SIGN. Mediante estudios bioquímicos y de perfil génico hemos comprobado que DC-SIGN y PU.1 se expresan de forma coordinada durante la maduración de células dendríticas y en la activación de macrófagos, tanto por vía clásica como alternativa. Además la reducción de los niveles celulares de PU.1 mediante siRNA provoca una disminución de los niveles de DC-SIGN. Todos estos resultados indican que PU.1 está implicado en la expresión mieloides específica de DC-SIGN.

**LA INFECCIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MACRÓFAGOS POR LEISHMANIA INFANTUM INDUCE EXPRESIÓN DE CD1D Y CONFIERE RESISTENCIA A LA LÍISIS POR CÉLULAS NK AUTÓLOGAS. Campos-Martín Y, Colmenares M\*, López-Núñez M, Gozalbo-López B, Suela J, Martínez-Naves E. Dpto. Inmunología, Facultad de Medicina de la U.C.M, Madrid. \*Dpto. Estructura y función de proteínas. Centro de Investigaciones Biológicas. Madrid.**

El sistema CD1 codifica varias proteínas pertenecientes a la familia MHC de clase I "no clásicas". Las moléculas CD1 presentan lípidos a los linfocitos T y también pueden inhibir la actividad citotóxica de las células NK. Existen dos grupos de moléculas CD1: las de grupo I:

CD1-a,-b y -c presentan lípidos bacterianos a células T. Las de grupo II: CD1d presentan antígenos ( $\alpha$ -GalCer e iGb3) a células NKT. Recientemente se ha descrito que el parásito intracelular *Leishmania donovani* puede inhibir la expresión de moléculas CD1 del grupo I en las células dendríticas que infectan. Por otra parte se ha descrito que en humanos las células NK lisan las células dendríticas inmaduras autólogas, mientras que las células dendríticas maduras son resistentes a la lisis mediada por NKs. En ratón se ha descrito que las células NKT son cruciales para controlar las infecciones por *Leishmania major* en sus estadios iniciales. Por otra parte se ha descrito que algunas células NKT son activadas durante la infección con *Leishmania donovani* y que estas células reconocen el antígeno lipídico Lipofosfoglicano (LPG) procedente de *Leishmania* y presentado por las moléculas CD1d.

**Objetivo:** Estudiar el efecto de la infección por *Leishmania infantum* en células dendríticas y macrófagos humanos, su expresión de CD1d y el reconocimiento de éstas por células NK autólogas.

**Metodología:** Las células dendríticas y macrófagos fueron obtenidas a partir de monocitos procedentes de "buffy coat" de donantes sanos, diferenciándose mediante cultivo con GM-CSF e IL4, o GM-CSF respectivamente. La expresión de CD1d y de otras moléculas (CD1a, HLA-I, CD80 y HLA-II) se midió por citometría de flujo 48 horas después de la infección.

Las células dendríticas y macrófagos fueron infectados con las dos formas de *Leishmania infantum* (promastigote y amastigote), así como células tratadas con extractos antigénicos de las formas promastigote y amastigote de *Leishmania* y con lipofosfoglicano (LPG). Se realizaron ensayos de citotoxicidad, con células NK autólogas (CD56+CD3-) activadas con IL2, utilizándose como dianas las células dendríticas y macrófagos autólogos.

**Resultados:** La infección por *Leishmania infantum* produce un ligero incremento en la expresión de CD1a, HLA-I, HLA-II y CD80, que se pudiera definir como un grado parcial de maduración de las células dendríticas. Además la infección con *Leishmania infantum* induce un incremento significativo de la expresión de CD1d.

Las células NK autólogas CD56+CD3- activadas con IL2 mataron eficientemente tanto a las células dendríticas inmaduras como a la macrófagos diferenciados con GM-CSF. Sin embargo las células dendríticas y macrófagos infectados con *Leishmania infantum* fueron resistentes a la lisis por las células NK. Esta inhibición también se observa cuando las células dianas son cultivadas en presencia de LPG o con extractos antigénicos de *Leishmania infantum*.

**DC-SIGN: RELACIONES ENTRE ESTRUCTURA Y FUNCIÓN. Serrano-Gómez D, Leal JA, Lasala F, Delgado R, Muñoz-Fernández MA, Corbí AL. Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.**

**Introducción:** Dendritic Cell-Specific ICAM-3-Grabbing Non-Integrin (DC-SIGN, CD209) es una lectina tipo C presente en células dendríticas y algunas poblaciones de macrófagos. Su expresión es dependiente de IL-4. Estructuralmente es una proteína tipo II que consta de dominio citoplásmico, región transmembrana, cuello (formados por una serie de dominios repetidos) y dominio lectina. Se han descrito múltiples isoformas de DC-SIGN (generadas por *splicing* alternativo) que se diferencian en el dominio citoplásmico, presencia o no de región transmembrana, longitud del cuello o secuencia de aminoácidos del dominio lectina. Sin embargo no se han determinado sus características estructurales ni su relevancia funcional. DC-SIGN reconoce estructuras azucaradas tanto en ligandos endógenos (ICAM-2 e ICAM-3)

como exógenos (VIH, *Mycobacterium tuberculosis*, amastigotes de *Leishmania*...). Recientemente hemos descrito que DC-SIGN media la unión e internalización de conidios de *Aspergillus fumigatus* (responsable de un gran porcentaje de las infecciones nosocomiales por hongos oportunistas en pacientes inmunodeprimidos) por células dendríticas y macrófagos.

**Objetivos:** Determinar relaciones entre la estructura y la función de DC-SIGN, mediante el análisis de isoformas que se expresan naturalmente en células dendríticas derivadas de monocitos.

**Metodología:** Se obtuvo una colección de isoformas de DC-SIGN por RT-PCR a partir de mRNA de células dendríticas derivadas de monocitos que se caracterizó estructural y funcionalmente mediante técnicas de biología molecular, celular y bioquímica.

**Resultados y Conclusiones:** El número y disposición de dominios repetidos del cuello de las distintas isoformas de DC-SIGN determina la capacidad de multimerización de la molécula y modula la interacción de DC-SIGN con sus ligandos. Nuestros resultados sugieren que la expresión de diferentes isoformas de DC-SIGN permite aumentar el rango de PAMPs (Pathogen Associated Molecular Patterns) azucarados reconocidos por células dendríticas y macrófagos. La presencia de isoformas similares en otros PRR (Pattern Recognition Receptors) tipo lectina sugiere la existencia de un mecanismo que incrementa el espectro de reconocimiento de antígenos sin necesidad de aumentar el número de receptores.

**DIFERENTE DISTRIBUCIÓN DEL PROTEASOMA E INMUNOPROTEASOMA Y DE LAS MOLÉCULAS DEL COMPLEJO DE CARGA PEPTÍDICO TAP Y TAPASINA EN RELACIÓN A LA EXPRESIÓN DE AIRE (AutoImmune REgulator) EN LOS PRINCIPALES TIPOS DE CÉLULAS MEDULARES ESTROMALES TÍMICAS.** *Ferrer-Francesch X, Alvarez I, Colobran R, Llop C, Armengol MPA, Martínez-Cáceres E, Pujol-Borrell R. Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnostiques (LIRAD), Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).*

**Introducción:** La expresión en el timo del Factor de Transcripción AIRE como responsable de la expresión promiscua de numerosos autoantígenos diana en enfermedades autoinmunes mayoritariamente en células epiteliales medulares (mTEC), pero también en menor grado en las células dendríticas (DCs) ha reafirmado el papel del timo en la inducción de tolerancia central a autoantígenos neuroendocrinos de expresión tisular restringida. Por otra parte, diferencias en el procesamiento y presentación de antígeno han sido propuestas para la vía exógena de presentación de antígeno en los diferentes linajes de células estromales tímicas.

**Objetivos:** Caracterizar la expresión de las principales moléculas de la vía endógena de procesamiento de antígeno: del proteasoma, inmunoproteasoma, y las chaperonas TAP y Tapasina en los principales tipos celulares supuestamente responsables de la selección negativa de los timocitos, en relación a la expresión de AIRE en esta célula.

**Métodos:** Se procesaron glándulas tímicas perinatales para la obtención de secciones de tejido y de preparaciones celulares de linajes epitelial medular (mTEC) y mieloide, células dendríticas y macrófagos, mediante digestión enzimática y purificación inmunomagnética y FACS. El estudio de estas moléculas se abordó mediante inmunotransferencia e inmunofluorescencia sobre las distintas preparaciones.

**Resultados y Conclusiones:** Los resultados obtenidos sugieren un uso preferente del inmunoproteasoma respecto al proteasoma por

parte de las mTEC respecto a las DC. Se ha observado asimismo una mayor expresión del TAP y Tapasina en las DC respecto de las mTEC. Esta expresión diferencial en estos dos tipos celulares, de las principales moléculas de la vía de procesamiento y presentación de antígeno por el HLA de clase I, sugieren diferencias cuantitativas y cualitativas en el espectro de péptidos propios presentados por ambos tipos celulares. Asimismo y en el contexto de la expresión promiscua de autoantígenos promovida por el factor de transcripción AIRE, principalmente en las mTEC, sugieren una posible complementariedad de estos dos linajes celulares en la función tolerizadora de los timocitos autoreactivos.

## SESIÓN 10: INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS

**Moderadores:** Ana M<sup>a</sup> García Alonso (H.U. Arrixaca, Murcia), Margarita López Trascasa (H.U. La Paz, Madrid)

**MODULACIÓN DE LA CAPACIDAD FUSOGÉNICA DEL VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (VIH-1) POR LAS TETRASPANINAS PRESENTES EN LA CÉLULA DIANA.** *Gordón-Alonso M, Barreiro O, Yañez Mo M, Valenzuela A, Sancho D, Alvarez S, Muñoz-Fernández MA, Sánchez-Madrid F. Hospital Universitario de La Princesa (Madrid).*

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH-1) es capaz de transmitirse por varias vías, escapando del sistema inmunológico del individuo infectado. Este virus está recubierto de membrana, por lo que para infectar necesita fusionar su membrana con la de la célula diana, introduciendo la nucleocápside en el citoplasma celular. Se han postulado distintos modelos sobre el mecanismo de fusión que utiliza este virus. Actualmente se cree que el complejo proteico de la envuelta del virus (compuesto por dos subunidades: gp120 y gp41) es el responsable del anclaje y fusión de ambas membranas. Este complejo reconoce la molécula celular CD4, y los co-receptores de quimiocinas CCR5 o CXCR4.

Este mecanismo explica la entrada del virus en la célula, y la fusión célula-célula (formación de sincitios). Esta última forma de transmisión del virus entre células infectadas y células no infectadas, gracias a la presencia de complejos gp120-gp41 en la membrana de las células infectadas, permite al virus escapar de la respuesta inmune humoral.

Aunque se sabe muy poco sobre el mecanismo de fusión, este proceso requiere del contacto íntimo entre ambas membranas. Por tanto, la presencia de estructuras proteicas preformadas en la membrana de la célula diana podría influir en la eficacia del proceso de fusión viral. En la membrana celular existen, de hecho, microdominios organizados con conjuntos específicos de proteínas asociadas entre sí. La alteración de estos microdominios afecta a procesos celulares como la transducción de señales, la migración, la adhesión celular al sustrato, etc.

Las tetraspaninas comprenden una familia de proteínas integrales que atraviesan cuatro veces la membrana celular y establecen microdominios proteicos especializados mediante interacciones no covalentes. Las tetraspaninas están implicadas en la presentación antigénica, la fusión esperma-oocito, la fusión de células musculares, la transmisión de ciertos virus por ambas estrategias de infección.

Nuestro trabajo demuestra que el silenciamiento específico de la expresión de las tetraspaninas CD9, y CD81 favorece la transmisión del virus por fusión célula-célula, mientras que el de la tetraspanina

CD151 dificulta este proceso. La reducción de la expresión en membrana de estas proteínas no afecta al nivel de expresión de CD4, CCR5 y CXCR4, aunque quizás sí afecte a su organización precisa en la superficie celular. Las tetraspaninas estudiadas se reclutan a la zona de contacto intercelular, donde también se encuentran CD4, CCR5 y CXCR4 (tanto en las células HeLa como en líneas linfoides, y tanto en células silenciadas como en células sin tratar).

Actualmente se están realizando experimentos de infección con partículas virales libres sobre células linfoides con la expresión de sus tetraspaninas alterada (bien por sobreexpresión, o bien por silenciamiento).

**LA ENZIMA HISTONA DESACETILASA 6 REGULA LA INFECCIÓN POR EL VIH-1.** *Barrero-Villar M<sup>1</sup>, Valenzuela-Fernández A<sup>1</sup>, Ursa A<sup>1</sup>, Gordón-Alonso M<sup>1</sup>, Muñoz-Fernández MA<sup>2</sup>, Sánchez-Madrid F<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de La Princesa, Madrid, España. <sup>2</sup>Departamento de Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid, España.

**Introducción:** El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es el agente etiológico del Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). El VIH de tipo 1 (VIH-1) infecta principalmente células CD4+ como linfocitos T, monocitos y células dendríticas, a nivel de los órganos linfoides y las mucosas de las regiones de entrada viral. La infección por VIH-1 necesita de una primera interacción de alta afinidad entre las glucoproteínas de la envuelta (Env) del virus, gp41/gp120, con el receptor CD4 y requiere, además, su asociación con receptores de quimiocinas, principalmente, CCR5 y CXCR4, denominados correceptores. El correceptor utilizado por el VIH-1 determina el tropismo de la cepa viral. En consecuencia, los virus que utilizan el receptor CCR5 se denominan R5 trópicos y los que utilizan CXCR4, X4 trópicos.

**Objetivos:** Nuestra hipótesis de trabajo consiste en que los componentes asociados al citoesqueleto que intervengan en la regulación del estado dinámico de la membrana plasmática, podrían afectar la formación del poro de fusión y, en consecuencia, la capacidad fusogénica e infecciosa del VIH. El objetivo de este trabajo ha consistido en el estudio del efecto de la actividad tubulina desacetilasa de la enzima Histona Desacetilasa 6 (HDAC6) en la capacidad fusogénica e infecciosa del VIH-1. HDAC6 se localiza exclusivamente en el citoplasma, y a través de su actividad tubulina desacetilasa regula la dinámica de membrana favoreciendo la migración linfocitaria y afecta a la señalización y organización de los antígenos CD3 y LFA-1, durante la sinapsis inmunológica.

**Resultados:** La proteína gp120 de la Env del VIH-1 induce la acetilación de  $\alpha$ -tubulina en células permisivas CXCR4+/CD4+, en los tiempos estimados para la entrada viral, reclutándose a las zonas de codistribución CD4/CXCR4 generadas por el VIH-1. La sobre-expresión de la enzima funcional HDAC6 evita la acetilación de  $\alpha$ -tubulina y su redistribución a las zonas de asociación CD4/CXCR4, e inhibe la infección y fusión celular mediados por la Env del VIH-1 independientemente del tropismo viral, sin afectar a la expresión de los receptores CD4, CXCR4 y CCR5, y su codistribución mediada por VIH-1. Por el contrario, el silenciamiento de la HDAC6 endógena, o la inhibición de su actividad tubulina desacetilasa favorece fuertemente la fusión e infección celular mediada por la Env del VIH-1.

**Conclusiones:** Los resultados obtenidos demuestran que la enzima HDAC6 regula la infección por VIH-1 afectando a la capacidad fusogénica de la Env viral.

**UN NUEVO FACTOR ANTIVIRAL ANTI-VIH ES SECRETADO POR CÉLULAS T NO ACTIVADAS QUE EXPRESAN UNA FORMA MODIFICADA DE CD4 Y ESTAN INFECTADAS CON VIH.** *Zaldívar I, Muñoz-Fernández MA, Alarcón B, San José E.* Centro de Biología Molecular S.O. Madrid.

**Objetivos:** Estudio del efecto inhibitorio de una quimera de CD4 (CD4 $\epsilon$ 15) que se retiene en el retículo endoplásmico y su posible aplicación en protocolos de terapia génica.

**Métodos:** Distintas líneas celulares y linfocitos de sangre periférica de donantes sanos fueron transducidos con distintos vectores retrovirales bicistrónicos con el gen marcador EGFP. Se ensayó la susceptibilidad a la infección con distintos aislados virales. La caracterización de las partículas virales que se forman en presencia de CD4 $\epsilon$ 15 fue analizada por microscopía electrónica y Western Blot.

**Resultados:** La expresión de CD4 $\epsilon$ 15 en células T inhibe la formación de partículas virales infecciosas y la formación de sincitios. Sorprendentemente la replicación de VIH fue fuertemente inhibida aún cuando solo una fracción del cultivo (10%) fue transducida con CD4 $\epsilon$ 15. Este resultado indica que las células que expresan CD4 $\epsilon$ 15 producen un efecto protector en las células no transducidas. Este efecto bystander *en trans* está mediado por un factor soluble secretado al sobrenadante del cultivo por las células que expresan CD4 $\epsilon$ 15 y están infectadas con VIH, como se demostró en experimentos en "transwell".

**Conclusión:** La expresión de CD4 $\epsilon$ 15 podría ser de gran utilidad en protocolos de terapia génica, debido a que inhibe la replicación de VIH por dos mecanismos diferentes. En primer lugar la presencia de CD4 $\epsilon$ 15 bloquea un paso tardío en el ciclo del virus: el procesamiento de gp160 a las glicoproteínas maduras gp120 y gp41. En segundo lugar las células que expresan la quimera y están infectadas con VIH producen un factor soluble que protege a las células no transducidas. La identificación de ese factor soluble podría abrir nuevas alternativas a las terapias actuales contra el virus VIH.

**ESTUDIO DE ISOFORMAS Y POLIMORFISMOS DE CD209 PRESENTES EN LA POBLACIÓN GENERAL Y EN PACIENTES DE HIV.** *Sierra-Filardi E, Serrano-Gómez D, Puig-Kröger A, Colmenares M, Muñoz-Fernández MA, Corbí AL.* Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC, Madrid.

**Introducción:** DC-SIGN (CD209, Dendritic Cell-specific ICAM-3-grabbing nonintegrin) es una molécula transmembranal de tipo II de la familia de las lectinas de tipo C que consta de un dominio lectina seguido de un "cuello" con 8 dominios repetidos de 23 aminoácidos, y un corto dominio citoplásmico. Aparece en membrana de células dendríticas y macrófagos activados por la vía alternativa como un tetrámero merced a interacciones intermoleculares establecidas por la región del cuello. Funcionalmente actúa como molécula de adhesión, receptor de antígenos y receptor de patógenos. El dominio lectina media todas las interacciones descritas hasta la fecha, sin embargo el papel funcional de la región del cuello aún no se ha abordado. Existen múltiples isoformas de DC-SIGN generadas por procesamiento alternativo del mRNA cuya presencia en la población general y en individuos con diferente susceptibilidad a la infección por HIV no está aún determinada.

**Objetivos:** Caracterización funcional de la región del cuello de DC-SIGN. Determinación de la variabilidad genética y del nivel de

expresión de DC-SIGN existente en la población, y su posible correlación con la progresión de la infección por HIV.

**Metodología:** El mutante de delección DC-SIGN  $\Delta$ Lec se obtuvo mediante PCR la forma salvaje DC-SIGN 1A. Tras clonar en el vector de expresión pCDNA3.1, se transfectó de manera estable en células Jurkat, para llevar a cabo ensayos de unión a patógenos (*Leishmania*, *A. fumigatus*). También se caracterizó por ensayos de "Western-blot" su capacidad de multimerización. La existencia de polimorfismos asociados a la susceptibilidad a la infección por HIV está siendo evaluada mediante PCR sobre DNA genómico de individuos expuestos a HIV y que difieren entre sí en el grado de progresión de la enfermedad.

**Resultados y Conclusiones:** El dominio lectina es necesario para la unión a patógenos y para la multimerización de DC-SIGN. Se presentarán los polimorfismos identificados hasta la fecha y se discutirá su posible implicación funcional.

**GENERACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE A gp120 UTILIZANDO COMPLEJOS POLIETILENIMINA-ADN.** *Rodrigo-Garzón M<sup>1</sup>, Berraondo P<sup>1</sup>, Crettaz J<sup>1</sup>, Ochoa L<sup>1</sup>, Vera M<sup>1</sup>, Lasarte JJ<sup>1</sup>, Vales A<sup>1</sup>, Van Rooijen N<sup>2</sup>, Ruiz J<sup>1</sup>, Prieto J<sup>1</sup>, Zuluita J<sup>1</sup>, González-Aseguiolaza G<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>División de Hepatología y Terapia Génica, Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA), Universidad de Navarra, Pamplona, España. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

**Introducción.** La generación de linfocitos T CD8<sup>+</sup> secretores de IFN- $\gamma$  y de anticuerpos neutralizantes, son piezas claves en la prevención de la transmisión y en la erradicación de la infección por el VIH. Las vacunas génicas (DNA desnudo) son capaces de inducir tanto respuestas humorales como celulares frente a los antígenos del VIH en ratón, sin embargo, la magnitud y eficacia de estas respuestas en ensayos clínico, hasta el momento, ha sido baja.

**Objetivos.** Nuestro objetivo es el desarrollo de métodos que mejoren la respuesta inmune obtenida tras vacunación génica mediante su vehiculización utilizando el polímero catiónico polietilimina. Así mismo, se analizaron los posibles mecanismos implicados en la inducción de la respuesta inmune.

**Métodos.** Concretamente en este trabajo se ha analizado la capacidad de los complejos formados por el polímero catiónico, polietilimina (PEI), y un plásmido portador del gen que codifica la glicoproteína 120 de la envoltura del VIH (PEI-gp120), para inducir respuestas celulares y humorales antígeno-específicas. Analizamos la respuesta CD8 mediante ELISPOT y la respuesta humoral mediante ELISA. Tras la administración del PEI-gp120, se midieron los niveles en suero de la citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$ . También comprobamos si la inmunización con PEI-gp120 era capaz de proteger frente a la infección por el virus vaccinia recombinante que expresaba dicho antígeno, administrado por vía sistémica o a través de la mucosa. Por otro lado, se analizó la toxicidad hepática derivada de la administración de los complejos mediante análisis de los niveles de transaminasa en suero.

**Resultados y Conclusiones.** Tras administrar por vía intravenosa distintas cantidades de los complejos PEI-pGp120 a ratones Balb/c, comprobamos que tanto la respuesta inmune celular como humoral eran dosis dependiente. La dosis óptima de los complejos era una relación N/P de 4 y 100 microg de DNA. La administración de dosis mayores se asociaba a la elevación de transaminasas y menor respuesta inmune. Comprobamos que a las pocas horas de la administración de los

complejos se producía una elevación de la concentración en suero de IL-12 e IFN- $\gamma$  producidos por macrófagos, y que eran esenciales para la generación de la respuesta inmune. Por último, la inmunización con PEI-gp120 protegía a los ratones de la infección por vaccinia administrado tanto por vía intraperitoneal como intranasal.

**INCREMENTO DE RESPUESTAS ESPECÍFICAS T FRENTE AL VIH-1 DURANTE LA INTERRUPCIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN INDIVIDUOS VIH-1+ TRATADOS CON UNA VACUNA TERAPÉUTICA VIH-1 (REMUNE): IMPACTO SOBRE LA CARGA VIRAL.** *Navarro J, Valor L, Santamaría B, Carbone J, Rodríguez-Sainz C, Gil J, Moreno S, Clotet B, Bouza E, Podzamczak D, Rubio R, Ocaña I, Viciano P, Maradona JA, Gómez-Jiménez V, Camino I, Aristimuño C, Calvo P, Alvarez-Doval A, González-Lahoz J, Fernández-Cruz E.* Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.

**Objetivos:** Determinar si pacientes que habían demostrado en un estudio previo (STIR-2102) el control del VIH-1 al recibir la vacuna terapéutica REMUNE (REM) junto a terapia antirretroviral (ART), eran capaces de mantener el control de la carga viral (CV) en ausencia de ART y si esta interrupción del tratamiento (IT) podría influir sobre otras variables inmunovirológicas.

**Métodos:** REMIT es un estudio prospectivo, aleatorizado, doble ciego, de interrupción (IT) del tratamiento antirretroviral (ART), que incluyó 39 pacientes que participaron en STIR-2102 con carga viral (CV) <2000 copias/ml, y células CD4<sup>+</sup> >500 células/ $\mu$ l durante los últimos 12 meses. Estos pacientes fueron aleatorizados al grupo REM (n=21) o placebo (IFA) (n=18) y definidos como grupo inmunizado doble ciego (IDB). Durante las 48 semanas del estudio, se administró REM/IFA y se evaluaron parámetros inmunovirológicos cada tres meses. En paralelo fueron estudiados 19 pacientes que interrumpieron ART voluntariamente (grupo comparativo observacional, OPC).

**Resultados:** El grupo REM tuvo un aumento significativo en el % de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria central (CD45RA-CD62L<sup>+</sup>) entre el día 0 y la semana 48 (p=0.005 y p=0.004 respectivamente). Una baja CV en la semana 48 se asoció a niveles altos de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria central [r=(-)0.371, p=0.026 y r=(-) 0.422 (0.01)] y con respuestas linfoproliferativas (LPR) altas a antígenos VIH-1 [r=(-)0.618, p<0.001] en el grupo IDB, pero no en el grupo OPC. Tanto el grupo REM como el IFA mostraron alta LPR frente a antígenos HIV-1 comparados con el OPC (REM=14.440  $\pm$  3.896; IFA=11.115  $\pm$  2.918; OPC=3.945  $\pm$  1.385 cpm; p=0.03 y p=0.04). La vacunación terapéutica durante la IT, incrementó las respuestas T efectoras frente a antígenos VIH-1, como se observa por ELISpot en la semana 48 en el grupo REM comparado con los grupos IFA y OPC (REM =1.205  $\pm$  377; IFA=420  $\pm$  65; OPC=57  $\pm$  19 spots/10<sup>6</sup> CMSP). En esta línea, también se observaron incrementos en las respuestas T CD8<sup>+</sup> específicas frente a gag en el grupo REM, comparado con los grupos IFA y OPC (REM=2.747  $\pm$  497; IFA=1.238  $\pm$  136; OPC=202  $\pm$  46 spots/10<sup>6</sup> CMSP). Esta respuesta muestra una fuerte correlación negativa con la CV.

**Conclusiones:** Estos resultados sugieren que la inmunización de larga duración con REM puede inducir un aumento de las respuestas T específicas frente al VIH-1 que impactan sobre la CV. La administración continua de inmunógeno VIH-1 durante la IT expande respuestas inmunes que podrían controlar la CV en ausencia de ART.

**IMPACTO DE LA VARIABILIDAD VIRAL SOBRE EL NIVEL, FENOTIPO Y FUNCIÓN DE CÉLULAS CD8+ ESPECÍFICAS FRENTE A UN PÉPTIDO DE LA PROTEÍNA GAG EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VIH Y SIN TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL.** *López M, Soriano V, Lozano S, González-Lahoz J, Benito JM. Hospital Salud Carlos III. Madrid.*

**Introducción:** El papel de la respuesta de células CD8 (CTL) en el control de la replicación viral VIH es controvertido. Se han propuesto las mutaciones de escape inducidas por presión de selección inmune, como uno de los mecanismos que contribuyen a la ineficacia de las CTL para el adecuado control de la replicación. Para estudiar este aspecto, hemos empleado complejos tetraméricos para analizar el nivel, fenotipo, y función de CTLs específicas de Gag, y hemos estudiado la variabilidad de la secuencia de p17 empujando el score de entropía de Shannon, en un grupo e pacientes con infección crónica y sin tratamiento antiretroviral.

**Métodos:** Se han incluido 31 pacientes VIH+ HLA-A0201+ (A2+) y 10 pacientes HLA-A02- (A2-). Se ha empleado el complejo tetramérico SL9-HLAA0201 junto con los anticuerpos CD8, CD45RA y CD27 para estudiar el nivel y fenotipo de las células CD8+ tetrámero positivas (Tet+). Se ha usado un ensayo de producción de  $\gamma$ -IFN para medir la capacidad de producción de esta citoquina por la células Tet+. Se ha realizado secuenciación de la proteína p17 a partir de DNA proviral extraído de células mononucleares de sangre periférica (CMSP). Se ha calculado el score de entropía de Shannon (H) para cada residuo dentro de SL9 así como para las regiones flanqueantes de dicho epítipo.

**Resultados:** Los niveles de carga viral (CV) y contajes de CD4 fueron similares en los dos grupos de pacientes (A2+ and A2-). La variabilidad media de los residuos de SL9 fue similar en ambos grupos, así como el porcentaje de pacientes con cambio de aminoácido (aa) en dicho epítipo. El 52% de los pacientes A2+ tenían niveles detectables de células Tet+, con una media de  $0.6\% \pm 0.7$ . Sólo el 7% de estas células expresaba un fenotipo efector y la capacidad de producción de  $\gamma$ -IFN fue muy variable. Tanto la variabilidad como la prevalencia de cambio de aa fue mayor en el grupo de pacientes A2+ sin células Tet+ comparados con aquellos que sí tenían dichas células. Además en el grupo de pacientes con células Tet+, aquellos con la mutación Y79F dentro de SL9 tendían a tener niveles más bajos de células Tet+ ( $p=0.09$ ). No se encontró ninguna asociación entre la existencia de cambio de aa en SL9 y el estadio de diferenciación ni con la capacidad de producción de  $\gamma$ -IFN de las células Tet+. Un análisis similar de las regiones flanqueantes no reveló diferencias de variabilidad entre los grupos de pacientes estudiados.

**Conclusiones:** Estos resultados apoyan la existencia de presión de

selección inmune sobre el epítipo SL9 así como el papel de las mutaciones de escape en la evasión de la respuesta inmune por el virus.

**POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE IL-4 (IL-4A) INFLUYEN EN LA SUSCEPTIBILIDAD A LA INFECCIÓN POR VIH Y SU PROGRESIÓN HACIA SIDA.** *Soriano A<sup>1</sup>, Gallart T<sup>1</sup>, García F<sup>1</sup>, Nomdedéu M<sup>1</sup>, de Lazzari E<sup>1</sup>, Rodríguez C<sup>2</sup>, Barrasa A<sup>2</sup>, Lorenzo JF<sup>3</sup>, del Romero J<sup>2</sup>, Plana M<sup>1</sup>, Miró JM<sup>1</sup>, Gatell JM<sup>1</sup>, Lozano F<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Hospital Clinic Universitari de Barcelona-IDIBAPS. Barcelona. <sup>2</sup>Centro Médico Sandoval. Madrid. <sup>3</sup>Hospital "La fe". Valencia.

**Introducción:** La progresión hacia SIDA se asocia con predominio de respuesta tipo Th2, y la IL-4, la citocina Th2 más paradigmática, disminuye la expresión de CCR5 y aumenta la de CXCR4, los dos principales co-receptores del VIH.

**Objetivos:** Investigar si los polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en *IL-4RA* influyen en la susceptibilidad-resistencia a la infección por VIH y su progresión hacia SIDA.

**Metodología:** Se analizó mediante PCR y secuenciación el SNP I50V en el exon 5 y los haplotipos de seis SNPs en el exon 12 (E375A, C406R, S411L, S478P, Q551R and V554I) en 30 individuos VIH+ no progresores de larga duración (NP), 36 progresores típicos, 55 individuos altamente expuestos pero no infectados (ENI) sexuales (n=25) y hemofílicos (n=30, hepatitis C +), y 97 controles normales. Todos los individuos eran Caucásicos y ninguno era homocigoto para CCR5'32).

**Resultados:** El alelo V50 (60%) y la homocigosidad V50 (44%,  $p=0.006$ ) estaban sobre-representados en los NP con respecto a los otros grupos (alelo V50<44% y homocigosidad V50 $\leq$ 28%). El haplotipo mas frecuente (Fr) de los SNPs del exon 12 predominaba en todos los grupos (>65%), pero la proporción de los haplotipos infrecuentes (In) estaba incrementada en los individuos infectados (NP+TP), especialmente en aquellos infectados via parenteral (35.3%) que eran la mayoría (51 de 64), así como en los ENI-Sexuales, en comparación con los HC (20.4%) y ENI-Hemofílicos (20.4%) ( $p=0.009$ ). En comparación con los HC (38.2%) y ENI-Hemofílicos (26.6%), los ENI-Sexuales presentaban también un incremento de los genotipos FrIn+InIn (60.9%) ( $p=0.039$ ). Los genotipos concordaban con el equilibrio de Hardy-Weinberg.

**Conclusiones:** Los SNPs de *IL-4RA* han sido muy estudiados en la alergia por IgE, pero este es el primer estudio en el contexto de la infección por VIH. Los datos sugieren que la homocigosidad V50 se asocia con la progresión lenta, mientras que los haplotipos infrecuentes de los SNPs del exon 12 se asocian con protección frente a la infección por vía sexual y susceptibilidad a la infección por vía parenteral.



## SESIÓN 1: CÉLULAS T

**Moderadores:** Africa González (Univ. de Vigo),  
Jesús Merino (Univ. de Cantabria)

1. **APOPTOSIS EN LINFOCITOS DE PACIENTES CON ENFERMEDADES NEURODEGENERATIVAS CRÓNICAS.** *Mestre M, Calopa M\*, Bas J, Buendía E. Servei d'Immunologia, \*Servei de Neurologia, Hospital Universitari de Bellvitge. Barcelona. Cataluña.*

**Introducción:** La muerte neuronal por apoptosis es un mecanismo que interviene en la patogenia de las enfermedades neurodegenerativas. En estudios anteriores evidenciamos que los pacientes con Parkinson (EP) presentan una disminución en el número de linfocitos circulantes, principalmente CD4+CD45RA+, que se correlaciona con un aumento en las células T colaboradoras activadas (CD4+CD25+). Estas alteraciones se explicarían por la existencia de apoptosis de linfocitos activados, con participación de CD95 (Fas).

**Objetivo:** Evaluar la existencia de un aumento de apoptosis en linfocitos en la EP y la especificidad de estos hallazgos en comparación con otra patología neurodegenerativa como la enfermedad de Huntington.

**Métodos:** Se incluyeron 32 pacientes con Parkinson, 15 con enfermedad de Huntington y, en cada grupo, 22 controles de edad media similar. Se estudiaron marcadores seleccionados de la superficie celular en combinaciones dobles y triples. La apoptosis espontánea y la inducida por PHA se evaluaron en subpoblaciones de linfocitos T mediante incubación con anexina-V / yoduro de propidio. Las muestras se analizaron por citometría de flujo. Los resultados se compararon mediante la prueba de Mann-Whitney.

**Resultados:** Hemos observado diferencias significativas en la expresión de CD95 de las células CD4CD45RA ( $p=0,0221$ ) y en el porcentaje de CD4CD25 que coexpresan CD95 ( $p=0,076$ ) en sangre periférica entre los pacientes con Parkinson y controles sanos. La mayor expresión de CD95 (%) se correlaciona con la disminución de linfocitos CD4 ( $-0,8747$ ;  $p<0,001$ ), células CD4CD45RA ( $-0,4350$ ;  $p=0,013$ ) y CD4CD425 ( $0,6638$ ;  $p<0,001$ ). *In vitro*, se observa un aumento de la apoptosis espontánea de los linfocitos CD4CD45RA ( $p=0,0394$ ) y de la apoptosis inducida por activación de los linfocitos CD4 ( $p=0,023$ ) y CD4CD25 ( $p=0,0296$ ). En el grupo de pacientes con Huntington no se observó la disminución de linfocitos de sangre periférica respecto al grupo control. Tampoco se evidenció aumento de expresión de CD95 en las subpoblaciones estudiadas. Sin embargo, se halló un aumento significativo de células activadas CD4CD25 ( $p<0,001$ ) con coexpresión de CD95 ( $p=0,0288$ ).

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que las células T CD4+ presentan una susceptibilidad aumentada a la apoptosis en la EP. Ello puede explicar la disminución de subpoblaciones celulares T e indicar la existencia de un proceso sistémico capaz de inducir apoptosis linfocitaria. Sin embargo, en los pacientes de Huntington, el aumento de células activadas sin evidenciarse disminución de linfocitos se relacionaría con el distinto mecanismo patogénico de ambas enfermedades neurodegenerativas crónicas.

2. **DETECCIÓN DE EXPANSIONES CLONALES DE LINFOCITOS LGG TCR $\alpha\beta$ + / cd4+ (V $\beta$ 13.1) EN INDIVIDUOS HLA-DRB1\*0701.** *Garrido P, Almeida J, Cantón J, López-Nevot MA, Lima M, Méndez Vales R, Bárcena P\*, Garrido F, Orfao A\*, Ruiz-Cabello F. Servicio Análisis Clínicos, Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada, <sup>1</sup>Servicio de Hematología. Hospital Geral Sto Antonio. Oporto. (Portugal). <sup>2</sup>Servicio de Citometría y Dpto de Medicina, y Centro de Investigación del Cáncer. Universidad de Salamanca-CSIC. Salamanca (España).*

Se han descrito recientemente casos aislados de leucemias de linfocitos grandes granulares (LGG) TCR $\alpha\beta$ + / CD4+, de características clínico-biológicas particulares (*Am J Pathol* 2003; 163: 763). El curso clínico es indolente en ausencia de citopenias, aunque es frecuente la coexistencia de otra neoplasia asociada. Característicamente, los LGG TCR $\alpha\beta$  / CD4+ muestran variables niveles de expresión de CD8, y normalmente son positivas para (granzyma B, CD56+, CD57+) con fenotipo de célula T memoria/activado CD2+ / CD7+ / - CD28-, CD27-, CD62L- HLA-DR-). Estas expansiones clonales expresan un repertorio de familias V $\beta$  restringido. Hemos tipado realizado tipaje HLA de clase I y II de sangre periférica (SP) un total de 27 pacientes. El análisis del repertorio de las familias TCR-V $\beta$  se realizó mediante citometría de flujo, con un panel de anticuerpos monoclonales que reconocen 21 familias TCR-V $\beta$ . Un gran número de casos (41%) se evidenció una expansión TCR-V $\beta$ 13.1, TCR-V $\beta$ 2.1+ se encontró en 2 casos (7%), 2 casos TCR-V $\beta$ 3.1+ (7%), 2 casos TCR-V $\beta$ 8.1+8.2+ (7%), 2 TCR-V $\beta$ 17.1+ (7%), un caso TCR-V $\beta$ 14.1+ (4%) y un caso TCR-V $\beta$ 22+ (4%). En los 6 casos restantes (22%) no se identificó la familia TCR-V $\beta$  con el panel de anticuerpos usado. En el grupo V $\beta$ 13.1 el 100% de los casos fueron HLA-DRB1\*0701. Destaca también que en estos individuos la existencia de haplotipos ancestrales, particularmente 44.2 y 57.1. Interesantemente estas expansiones mostraron también un uso restringido de segmentos J y presentaron además una alta homología en la mecánica de recombinación génica y en la secuencia del segmento CDR3 (VDJ). Finalmente, la secuencia de CDR3 no presentó homología con las publicadas en las bases de datos BLAST e IMGT. Estos resultados en su conjunto sugieren fuertemente la mediación de un antígeno en la generación de estas expansiones clonales.

3. **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE CÉLULAS CTL-FLU-MA<sup>(58-66)</sup> EN PBMCS DE INDIVIDUOS SANOS.** *Gayoso I, De la Rosa O, Peralbo E, Casado JG, Pita ML, Nevado R, Tarazona R, Solana R. Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología. Sección Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.*

**Introducción.** La activación crónica del sistema inmune provocada por las repetidas y persistentes infecciones de virus tales como Flu está asociada al envejecimiento del Sistema Inmune. Dicha activación provoca alteraciones en la población de linfocitos T CD8+, como son la disminución de la población CD8 naive y el descenso en la expresión de moléculas las coestimuladoras CD27 y CD28.

**Objetivo.** Caracterizar fenotípicamente las CTLs específicas frente a Flu en comparación con las células T CD8+ no específicas en individuos jóvenes sanos.

**Metodología.** La frecuencia de las CTLs específicas fue analizada mediante la tinción con tetrámero. Se obtuvieron PBMCs procedentes de donantes jóvenes sanos y se analizó la expresión de las moléculas CD8, CD28, CD27, CD94/NKG2A, CD85, CD56, CD45RA, CCR7 y de la presencia de perforina intracelular mediante fluorescencia multiparamétrica.

**Resultados y Discusión.** La expresión de CD28 y CD27 en las CTLs específicas fue elevada y no existieron diferencias significativas con respecto a la población T no específica. El análisis de la expresión de los receptores NK demostró que las CTLs específicas eran mayoritariamente CD94+, CD85+ y CD56-. Con respecto al fenotipo memoria, las células T no específicas presentaban un fenotipo memoria-efectora y naive y la población de CTLs específicas presentaban un fenotipo naive y efector. Finalmente se vio que las CTLs contenían mayor cantidad de perforina que las no específicas.

El fenotipo naive y efector junto con el alto porcentaje de CD28 y NK-R en células FLU específicas de individuos sanos, podría contribuir a una efectiva respuesta funcional frente al virus de la gripe.

#### 4. ANÁLISIS INMUNOQUÍMICO DE LA VARIABILIDAD DE LAS CADENAS CD3 $\epsilon$ DEL COMPLEJO TCR/CD3. *Bello R, Feito MJ, Ojeda G, Portolés P, Rojo JM.* Departamento de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC (Madrid). Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).

Los modelos actuales del complejo del receptor para antígeno de los linfocitos T (complejo TCR/CD3) establecen que la variabilidad de secuencia en las cadenas del receptor se debe exclusivamente a las regiones V de las cadenas  $\alpha\beta$  o  $\gamma\delta$  del TCR. Sin embargo, datos previos de nuestro laboratorio indican la existencia de variabilidad en la secuencia amino-terminal de las cadenas CD3 $\epsilon$ , mediada por metaloproteasas. Esta variabilidad afecta a la avididad de anticuerpos anti-CD3 frente al CD3 de distintas células T de ratón y se correlacionan con variaciones en la fuerza de la interacción TCR/CD3. Teniendo en cuenta que en la secuencia N-terminal de CD3 $\epsilon$  hay varios aminoácidos cargados negativamente, y que es una cadena no glicosilada, pensamos que la pérdida de carga sería detectable por isoelectroforesis, por lo que en este trabajo analizamos la variabilidad de CD3 $\epsilon$  por electroforesis bidimensional e inmunoblot. Para ello hemos generado anticuerpos específicos para la parte extracitoplásmica de CD3 $\epsilon$  murino utilizando una proteína de fusión del dominio CD3 $\epsilon$  extracelular y GST.

Inmunoprecipitamos CD3 $\epsilon$  de la membrana celular de líneas T y de linfocitos de bazo de ratón, que fue separada por punto isoelectrico y peso molecular. El antisuero anti-CD3 $\epsilon$  reconoció distintos "spots" del tamaño de CD3 $\epsilon$  pero con distinto punto isoelectrico, que es congruente con el calculado para la pérdida de residuos cargados negativamente en el extremo amino-terminal de la secuencia de CD3 $\epsilon$ . Esto indica la co-existencia de distintas cadenas de CD3 $\epsilon$  en la membrana de estas células. El grado de variación del pI de las distintas cadenas y el hecho de que todas ellas sean reconocidas por un antisuero frente a los aminoácidos 2 a 15 del extremo amino-terminal de CD3 $\epsilon$  sugieren que la pérdida podría ser mayoritariamente de dos o tres aminoácidos en total, incluyendo hasta dos aminoácidos cargados negativamente. Al comparar distintas células T de ratón se observa una correlación entre la avididad por el anticuerpo YCD3.1 y la proporción de cade-

nas degradadas. Por otra parte, en inmunoprecipitados con anticuerpos contra la cadena  $\beta$  del TCR, aumenta la relación de cadenas de CD3 $\epsilon$  completas coprecipitadas con respecto a las degradadas. Estos resultados confirman otros anteriores que indican que, en las células con mayor proporción de cadenas completas, las cargas negativas en la región amino-terminal de CD3 $\epsilon$  favorecen la interacción con zonas cargadas positivamente del TCR, y dificultan la unión del anticuerpo YCD3.1. Además, datos preliminares indican que la pérdida de aminoácidos de CD3 $\epsilon$  puede favorecer la respuesta a antígeno.

Nuestros datos muestran la existencia de variabilidad no sólo en las cadenas del TCR sino también en las de CD3 $\epsilon$ , y estarían de acuerdo con un modelo en el que las isoformas de CD3 $\epsilon$  contenidas por los complejos TCR/CD3 pueden favorecer los cambios conformacionales y las señales activadoras del TCR.

#### 5. ESTUDIO DE LA EVOLUCIÓN DE LOS LINFOCITOS T CD5+ CD86+ DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE HÍGADO. *Gómez-Mateo J, Marín LA, Miras M, López-Álvarez MR, Minguela A, Marín-Moreno I, García-Alonso AM, Bermejo J, Ramírez P, Parrilla P, Álvarez-López MR.* Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia.

**Objetivos:** La activación de los linfocitos T de la respuesta aloreactiva requiere dos tipos de señales: una primera señal que implica la interacción del receptor de la célula T con el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) de la célula presentadora de antígenos (APC) y una segunda señal coestimuladora en la que participan las moléculas CD80/CD86 de las APCs con sus correspondientes ligandos (CD28/CTLA-4) expresados por los linfocitos T. Estudios previos han demostrado que una baja expresión de las moléculas coestimuladoras en linfocitos B puede favorecer un estado de tolerancia en receptores de un injerto hepático (que muestra un nivel más alto de aceptación que otros órganos sólidos). Sin embargo, los cambios en la expresión de las moléculas coestimuladoras CD80/CD86 en linfocitos T no han sido estudiados en profundidad.

El objetivo del presente estudio fue el análisis de la expresión de CD80/CD86 en células T de sangre periférica de receptores hepáticos y su posible correlación con episodios de rechazo agudo a corto plazo.

**Metodología:** Para llevar a cabo el estudio, se recogieron muestras de sangre periférica de 84 pacientes trasplantados de hígado (una vez excluidos los trasplantes multiorgánicos y los retrasplantes). Los pacientes se clasificaron dos grupos: rechazo agudo (RA) y no rechazo agudo (NRA). Las muestras se recogieron en el pretrasplante y a lo largo de la evolución del paciente durante el primer mes postrasplante. Tras marcar las muestras con una combinación adecuada de anticuerpos monoclonales, éstas fueron adquiridas mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Los linfocitos T que expresan CD80 no presentaron ningún tipo de regulación durante el periodo de seguimiento al comparar ambos grupos de estudio. Por el contrario, la población de linfocitos T que expresan CD86 dentro del grupo de rechazo agudo, experimentó un incremento estadísticamente significativo ( $P < 0.001$ ) tanto en el número como en el porcentaje de linfocitos T CD5+ CD86+. Este incremento se produjo entre los días 7-15 después del trasplante, periodo que coincide con una mayor frecuencia de los episodios de rechazo agudo. No hubo diferencia en los niveles del pretrasplante en ninguna de las poblaciones estudiadas entre los grupos RA y NRA.

**Conclusiones:** El aumento de la población de linfocitos T CD5<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> en sangre periférica de receptores de un injerto hepático durante la segunda o tercera semana postrasplante, se correlaciona con la fecha de rechazo agudo, por lo que este dato, podría ser usado no solo como un marcador del episodio de rechazo sino que también podría ser considerado como un valor predictivo de rechazo agudo.

**6. ALTERACIONES INMUNOFENOTÍPICAS EN LINFOCITOS T EN PACIENTES CON FALLO RENAL CRÓNICO.** *Hernández A<sup>1</sup>, Prieto P<sup>1</sup>, Sánchez MA<sup>1</sup>, Villaruel M<sup>1</sup>, Acuña ML<sup>1</sup>, Parra T<sup>3</sup>, Pérez J<sup>3</sup>, Calvino M<sup>3</sup>, De Arriba G<sup>3</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Monserrat J<sup>1</sup>, Álvarez de Mon M<sup>1,2</sup>.* <sup>1</sup>Unidad mixta CSIC-Dpto. de Medicina U.A.H. <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias. <sup>3</sup>Hospital Universitario de Galdajara.

**Introducción:** En los últimos años se ha descrito que los pacientes con insuficiencia renal crónica padecen un estado de inmunodepresión concurrente con alteraciones de la funcionalidad de las células mononucleares, aunque se desconocen las alteraciones poblacionales asociadas a estas deficiencias funcionales.

**Objetivo:** Estudiar la funcionalidad de las células mononucleares en pacientes con insuficiencia renal crónica.

**Materiales y Métodos:** Se incluyeron en el estudio un total de 28 pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada (criterio de inclusión: creatinina plasmática > 5 mg/dl y revisados en consulta externa) de edades comprendidas entre 28-80 años y un total de 18 controles sanos de edades comprendidas entre 30-80 años.

Se extrajeron las células mononucleares de sangre periférica y se realizó el estudio inmunofenotípico mediante citometría de flujo de 4 colores.

**Resultados:** Se detectaron alteraciones inmunofenotípicas en las células mononucleares de sangre periférica de pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada respecto de los individuos sanos. Aunque los porcentajes de linfocitos T en pacientes son normales, se observa una disminución significativa de la población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y linfocitos B así como un aumento significativo de la población de linfocitos T CD8<sup>+</sup>. Además se aprecia un aumento significativo en la expresión de marcadores de activación CD25, CD69 y HLA-DR en células CD3<sup>+</sup> de los pacientes con respecto a los controles sanos. A su vez en los pacientes aparecen incrementados los porcentajes de células CD45RO<sup>+</sup> tanto en las poblaciones CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>. En ambas poblaciones hay además una expresión elevada del marcador de la función efectora CD57.

**Conclusiones:** El elevado grado de activación linfocitaria detectada en los pacientes con insuficiencia renal crónica avanzada sugiere que dicha patología está asociada a una profunda alteración de la homeostasis del sistema inmune. El estudio de estas alteraciones puede proporcionar marcadores de activación que tengan valor pronóstico en la progresión clínica de la insuficiencia renal crónica.

**7. LA FALTA DE EPH B2 Y B3 PROVOCA ALTERACIONES FENOTÍPICAS Y ESTRUCTURALES EN EL EPITELIO TÍMICO.** *García-Ceca J, Alfaro D, Muñoz JJ, Jiménez E, Zapata A.* Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid.

**Introducción:** Estudios previos han demostrado la expresión de Eph y ephrinas, moléculas implicadas en la morfogénesis de distintos

tejidos, en el timo de varios mamíferos. Además, estudios *in vivo* e *in vitro* sugieren un papel para estas moléculas en la diferenciación de los timocitos. Así, ratones deficientes en las EphB2 (B2 null y LacZ) y/o EphB3 muestran una fuerte reducción de la celularidad y alteraciones en la diferenciación T.

**Objetivos:** En la presente comunicación, se estudia el posible papel de tales moléculas en la maduración del estroma epitelial tímico, un elemento fundamental para la diferenciación de los timocitos.

**Material y Métodos:** En este estudio, se lleva a cabo un análisis inmunohistoquímico y ultraestructural de los timos de los distintos animales mutantes EphB2 (B2 null y LacZ) y/o EphB3.

**Resultados y Conclusiones:** Nuestros resultados demuestran que la falta de los receptores EphB2 y/o EphB3 provocan alteraciones en la morfología de las células epiteliales y en su distribución en la citoarquitectura del timo. Además, en el caso de los timos de animales deficientes en EphB3 y en los dobles mutantes para EphB2 y EphB3 hay una alta proporción de células epiteliales corticales y medulares que coexpresan citoqueratina 5 y 8, fenotipo característico de epitelios indiferenciados. Estas alteraciones descritas en el periodo adulto pueden ser observadas desde los primeros días de vida postnatal. Se discute consiguientemente el papel de las EphBs en la morfogénesis del epitelio tímico.

**8. ANÁLISIS DEL PAPEL DE EPHS EN LA DIFERENCIACIÓN T Y LA SELECCIÓN DEL TCR.** *Alfaro D, García-Ceca J, Jiménez E, Muñoz JJ, Zapata A.* Dpto. Biología Celular, Facultad de Biología, Universidad Complutense, Madrid.

**Introducción:** Eph y ephrinas constituyen una familia de receptores y ligandos que juegan papeles relevantes en los procesos de morfogénesis. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado un papel *in vitro* para la familia de receptores Eph y sus ligandos ephrinas en la diferenciación de los linfocitos T.

**Objetivos:** En este trabajo, se estudia el papel de Ephs B en la diferenciación T y la selección del Tcr.

**Material y Métodos:** Se ha analizado mediante citometría de flujo la diferenciación T en ratones mutantes para EphB2 y la de precursores linfoides de médula ósea de estos ratones inyectados en ratones SCID. Para determinar el papel de las Ephs/ ephrinas en la interacción timocito-epitelio responsable de la selección, se realizan estudios *in vitro* en los que se evalúa la capacidad de asociación timocito-célula epitelial tímica (TEC), analizando la cinética de formación de conjugados bicelulares timocito-TEC, y la capacidad para formar una sinapsis inmunológica funcional en estos conjugados.

**Resultados y Conclusiones:** se muestra que ratones mutantes para EphB2 presentan ligeras alteraciones de la diferenciación T. Precursores linfoides provenientes de médula ósea de estos ratones inyectados en ratones SCID muestran una baja producción de linfocitos T maduros y una retención de los timocitos en el estadio CD4<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>. Se ha determinado que varias Eph / ephrinas están presentes en la superficie de contacto celular en conjugados celulares formados por timocito y célula epitelial tímica. Los primeros resultados obtenidos, indican que la interferencia de la señalización Eph-ephrina reduce considerablemente la capacidad de asociación timocito DP-TEC. Se discutirá, por tanto, el posible papel de las Eph en las interacciones timocito DP-estroma responsables de la selección del Tcr.

9. UN CAMBIO CONFORMACIONAL EN EL TCR PERMITE A LA CÉLULA T DISTINGUIR ENTRE AGONISTAS PARCIALES Y TOTALES. **Risueño RM, Fernández E, Sánchez-Madrid F\*, Alarcón B.** Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. CSIC-UAM. Madrid. \*Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, UAM. Madrid.

**Introducción:** Cuando la célula T reconoce un péptido cargado en una célula presentadora de antígeno, el receptor de la primera (TCR) transmite una señal al interior celular que varía dependiendo de la naturaleza de su ligando. Para que se produzca la activación completa de la célula T, es necesaria la formación de la sinapsis inmunológica (SI) y un cambio conformacional en CD3 $\epsilon$ . Únicamente cuando el péptido es agonista, se produce la activación total. Sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten la discriminación de los ligandos no se conocen.

**Objetivos:** Estudiar la existencia del cambio conformacional en CD3 $\epsilon$  *in vivo* y correlacionarlo con la discriminación entre agonistas parciales y totales.

**Metodología:** Se ha utilizado un anticuerpo monoclonal (APA1/1), que reconoce un epítipo en la porción intracelular de CD3 $\epsilon$ , para teñir células primarias T de ratón estimuladas con anticuerpos anti-CD3, dímeros de MHC cargados con péptidos agonistas totales y parciales y células presentadoras; analizándose las muestras por citometría de flujo y/o microscopía de fluorescencia. Adicionalmente, se analizaron los ganglios linfáticos de ratones inyectados con antígeno por técnicas de inmunohistoquímica.

**Resultados:** El anticuerpo APA1/1 reconoce un epítipo que se expone por cambio conformacionales ocurridos en el TCR tras la estimulación. Los TCRs reconocidos se localizan en la SI únicamente cuando se utilizan péptidos agonistas. Las células T de ganglios linfáticos de ratones inyectados con antígeno presentan una mayor reactividad a APA1/1 que en ratones control.

**Conclusiones:** En nuestro estudio, se demuestra que el epítipo reconocido por APA1/1 sólo se expresa cuando el TCR se activa completamente. Los TCRs reconocidos por este anticuerpo se encuentran en la SI y esto sólo ocurre cuando se estimulan con agonistas totales, y no con los parciales. Finalmente, el cambio conformacional ocurre en células T que están siendo activadas por el antígeno *in vivo*. De este modo, se muestra que el TCR sufre el cambio conformacional al reconocer un MHC-péptido tanto *in vitro* como *in vivo*, estableciendo una correlación molecular para los contactos productivos del TCR.

10. EXPANSIÓN *IN VITRO* DE LINFOCITOS T CD8+ ESPECÍFICOS DEL ANTÍGENO MART-1 DE MELANOMA: DIFERENCIACIÓN HACIA UN FENOTIPO EFECTOR/MEMORIA. **Casado JG, de la Rosa O, Peralbo E, Peña J, Solana R, Tarazona R\*.** Universidad de Córdoba, Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Córdoba, España. \*Universidad de Extremadura, Departamento de Fisiología, Área de Inmunología, Facultad de Veterinaria, Cáceres, España.

**Introducción:** Una paradoja que tiene lugar en la respuesta inmune tumoral es que el tumor frecuentemente progresa unido a respuesta inmune específica del tumor. La comprensión de los mecanismos que implican los cambios fenotípicos y funcionales durante la diferenciación del linfocito T citotóxico podría aportar nuevas soluciones para potenciar la respuesta inmune celular frente al melanoma.

**Objetivos:** Análisis de la frecuencia de linfocitos T CD8+ MART-1 específicos en individuos sanos HLA-A\*0201. Expansión *in vitro* y caracterización fenotípica de linfocitos T CD8+ específicos. Comparación entre el fenotipo resultante de la estimulación *in vitro* antígeno-específica e inespecífica.

**Métodos:** Mediante el uso de tetrámeros se analizó el fenotipo de linfocitos T CD8+ MART-1 específicos circulantes de individuos sanos. La expansión se realizó mediante estimulación autóloga con células CD8- incubadas con el péptido MART-1 (ELAGIGILTV) en presencia de IL-2 e IL-7.

**Resultados y Discusión:** Los linfocitos T CD8+ MART-1 específicos están presentes en individuos sanos y pueden expandirse *in vitro*. Estos linfocitos muestran un fenotipo naïve (CCR7+ CD45RA+) y se diferencian *in vitro* adquiriendo un fenotipo efector/memoria (CCR7- CD45RA-). Los fenotipos efector/memoria resultantes de una diferenciación antígeno-específica e inespecífica son diferentes.

11. DEFICIENCIA DE CD3 CON LINFOCITOS T $\gamma\delta$  NORMALES: ¿CD3 $\delta$ ? **Guardo AC<sup>1</sup>, Kilic SS<sup>2</sup>, Pérez-Flores V<sup>1</sup>, Moreno-Pelayo MA<sup>3</sup>, Moreno F<sup>3</sup>, Recio MJ<sup>1</sup>, Regueiro JR<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Immunology Div, Uludağ University Medical Faculty, Dept. of Pediatrics, Gorukle-Bursa (Turquía). <sup>3</sup>Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

**Introducción:** Las deficiencias de CD3 $\delta$  descritas en humanos hasta ahora (3 familias consanguíneas) presentan una clínica SCID asociada a linfopenia T absoluta (tanto  $\alpha\beta$  como  $\gamma\delta$ ) que impide analizar los niveles de expresión del complejo TCR/CD3. En el KO murino, en cambio, la linfopenia T afecta sólo a las  $\alpha\beta$  que tienen unas 6 veces menos TCR/CD3 en su membrana), mientras que las  $\gamma\delta$  son normales en número y niveles de TCR/CD3, quizá porque CD3 $\delta$  no forma parte de dicho isotipo. Esto sugiere que CD3 $\delta$  es más necesario en humanos que en ratón para el desarrollo T.

**Objetivos:** Caracterizar fenotípica y genéticamente a un paciente compatible con deficiencia de CD3.

**Paciente:** Varón de 7 meses de edad, con 2180 linfocitos/ $\mu$ l, inmunofenotipo T<sup>low</sup>B<sup>+</sup>NK<sup>+</sup> (27% CD3<sup>+</sup>, 43% CD19<sup>+</sup>, 18% CD16<sup>+</sup>56<sup>+</sup>3<sup>-</sup>), sin consanguinidad aparente y con diarrea crónica, infección pulmonar y otitis media recurrentes. Su hermano mayor falleció por sepsis y presentaba diarrea y linfopenia CD3.

**Métodos:** Citometría de flujo y segregación de microsátélites.

**Resultados:** El análisis por citometría de PBL muestra una linfopenia T $\alpha\beta$  severa (2%), pero no  $\gamma\delta$  (8%). Las pocas células T $\alpha\beta$  (definidas como CD4<sup>+</sup> o CD8<sup>bright</sup>) muestran una importante reducción (4-5 veces) en la expresión de TCR/CD3 con la mayoría de los anticuerpos, pero no en la expresión de otras moléculas como CD4, CD8, CD45 o HLA-I. Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>, pero no los CD8<sup>bright</sup>, contienen células TCR/CD3<sup>-</sup> en el paciente. En cultivo se confirma que el TCR $\gamma\delta$  se expresa normalmente y las células T $\gamma\delta$  llegan a ser un 32%, mientras que los linfocitos CD4<sup>+</sup> que crecen son CD3<sup>dull</sup>, no CD3<sup>-</sup>. La segregación de haplotipos CD3 $\gamma\delta\epsilon$  indica que los padres son consanguíneos y que el paciente heredó de ambos progenitores el haplotipo compartido, mientras que su hermana sana sólo porta la copia materna.

**Conclusiones:** Los resultados son compatibles con una deficiencia de CD3, que podría ser de CD3 $\delta$  por homología con los datos de ratón. Si se confirma, indicaría que, bien se trata de un defecto "leaky", o bien que las familias descritas tenían mutaciones adicionales en otros loci.

12. LA TRANSDUCCIÓN DE CÉLULAS T DEFICIENTES DE CD3 $\gamma$  CON UNA QUIMERA CD3 $\delta\gamma$ , DA PISTAS ACERCA DE LA DINÁMICA DEL COMPLEJO TCR/CD3. **Guardo AC<sup>1</sup>, Martín-Fernández JM<sup>1</sup>, Nielsen BL<sup>2</sup>, Geisler C<sup>2</sup>, Sanal O<sup>3</sup>, Rossi NE<sup>1</sup>, Regueiro JR<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Inst. of Medical Microbiology and Immunology, Univ. of Copenhagen, Denmark. <sup>3</sup>Pediatrics, Hacettepe University Children's Hospital, Ankara, Turkey.

**Introduction:** The CD3 subunits of the antigen-specific T-cell receptor (TCR) play a central role in regulation of surface TCR expression levels. Humans who lack CD3 $\gamma$  have a potentially lethal immunodeficiency, reduced surface TCR expression levels and abolished PMA-induced TCR down-regulation.

**Aims and Methods:** We are investigating delivery of CD3 chains to treat this type of immunodeficiency and to understand TCR dynamics *in vivo*. The response to PMA has been clearly mapped to the di-leucine-based motif in the intracellular domains of CD3 $\gamma$ . However, the molecular cause of the reduced TCR surface expression in CD3 $\gamma$  negative patients is not known. We are using CD3 chimeras to approach this question.

**Results:** In the present work we report that retroviral transduction of a chimera containing the extra-cellular domain of CD3 $\delta$  and the transmembrane and intra-cellular domain of CD3 $\gamma$  into CD3 $\gamma$ -deficient peripheral blood T lymphocytes restored TCR expression and down-regulation. Subtle differences in surface TCR staining could be observed with certain monoclonal antibodies when cells transduced with the chimera were compared with cells transduced with normal CD3 $\gamma$ .

**Conclusion:** Since the CD3 $\gamma$ -deficient T lymphocytes contain CD3 $\delta$ , the results suggest that the molecular basis for the reduced surface TCR expression level can be mapped to the transmembrane and intra-cellular domain of CD3 $\gamma$ . These results could be relevant for protocols involving gene transfer of TCR or CD3 chimeras to human T lymphocytes to treat cancer or immunodeficiency syndromes.

13. CARACTERIZACIÓN DE LINFOCITOS T DEFICIENTES DE CD3 $\gamma$  TRANSFORMADOS CON HTLV-1. **Reiné J<sup>1</sup>, Martín-Fernández JM<sup>1</sup>, Sanal O<sup>2</sup>, Recio Hoyas MJ<sup>1</sup>, Guardo AC<sup>1</sup>, Allende LM<sup>3</sup>, Regueiro JR<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Pediatrics Hacettepe University Children's Hospital, Ankara, Turkey. <sup>3</sup>Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

**Introducción:** La falta de alguna de las cadenas que forman parte de los dímeros invariantes del complejo TCR/CD3 causa en humanos un grupo de raras inmunodeficiencias del linaje T que cursa con el bloqueo total (en el caso de CD3 $\delta$  o  $\epsilon$ ) o parcial ( $\gamma$  o  $\xi$ ) de su desarrollo. Esta linfopenia impide abordar el estudio del papel biológico de cada cadena CD3 en la estructura y en la señalización vía TCR/CD3 en linfocitos T maduros, por lo que nuestro grupo intenta hacer modelos *in vitro* con sistemas que transforman a los linfocitos T para que crezcan de manera indefinida: Herpesvirus saimiri, HTLV-I (Human T-cell lymphotropic virus) y hTERT (human Telomerase Reverse Transcriptase).

**Objetivos:** Obtención y caracterización de linfocitos T deficientes en CD3 $\gamma$  transformados con HTLV-I.

**Metodología:** Se aislaron células primarias de sangre periférica mediante centrifugación en gradiente de densidad a partir de una muestra sanguínea heparinizada de individuos con o sin CD3 $\gamma$ . Estas células se pusieron en cocultivo con células de la línea leucémica MT2 productora del virus HTLV-I, previamente inactivadas con mitomicina

na C o mediante irradiación. El cocultivo se mantuvo durante 30 días en presencia de 40UI/ml de IL-2 a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>, dando lugar a líneas celulares de linfocitos T con crecimiento estable que se caracterizaron fenotípica y funcionalmente.

**Resultados y Conclusiones:** Los resultados indican que las células transformadas preservan los defectos fenotípicos y funcionales observados en linfocitos primarios, tales como el defecto de expresión del complejo TCR/CD3 en membrana. Los resultados pueden ayudar a entender la fisiopatología de los defectos congénitos del TCR/CD3, pero también de los adquiridos como la deficiencia de CD3 $\xi$  en patologías inflamatorias o la hipereosinofilia idiopática linfocítica.

14. UN NUEVO EXTRACTO DE CALÉNDULA INDUCE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS. **Jiménez E, Salaya G, Paco L, Schanoski A, Martínez M, García-Lora A, Garrido F.** Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada, Spain.

Un extracto vegetal de *Calendula officinalis L (Asteraceae)* obtenido por un nuevo proceso de extracción, ha sido usado como complemento dietético en pacientes con cáncer, mostrando un doble efecto terapéutico: un efecto antitumoral y una reducción de los efectos secundarios de la quimioterapia. Este estudio se ha centrado en el análisis de su acción biológica, principalmente su posible actividad inmunomoduladora.

Se realizó un estudio dosis-respuesta para establecer su acción *in vitro* sobre la proliferación de PBLs. Se trataron durante 72 horas con diferentes concentraciones del extracto o Concanavalina A, y se midió la incorporación de BrdU durante la síntesis de DNA por un test de ELISA. Las fases del ciclo celular se determinaron con la incorporación de BrdU y el marcaje con 7-amino-actinomicina D a través de citometría de flujo. Diferentes subpoblaciones de PBLs se analizaron usando anticuerpos monoclonales por FACS. Su acción sobre las células NK *in vitro* fue estudiada analizando la proliferación de la línea celular humana NKL en presencia del extracto.

Los resultados muestran un incremento de la proliferación de PBLs de 2-5 veces superior al control, y que representa un 20-30% respecto a la Concanavalina A. El análisis de las fases del ciclo celular han mostrado que los PBLs cultivados *in vitro* se encuentran detenidos en la fase G<sub>2</sub>/M, en cambio cuando son cultivados en presencia del extracto, las células vuelven a entrar en ciclo celular. El estudio de las diferentes subpoblaciones indica que las células en proliferación, fase S, son principalmente: linfocitos B, linfocitos CD4<sup>+</sup> y células NK. El análisis de la proliferación de la línea celular NKL, dependiente de IL-2 para su crecimiento, mostró que el extracto produce un aumento de la proliferación muy semejante al inducido por IL-2.

En conclusión, este extracto de caléndula con muy baja toxicidad *in vivo*, muestra acción induciendo la proliferación *in vitro* de linfocitos y de células NK, por lo que puede ser un buen candidato para el tratamiento de patologías donde se necesita un incremento de la respuesta inmune.

15. LINFOCITOS INTRAEPITELIALES (LIE) EN BIOPSIAS DE INTESTINO DELGADO: CUANTIFICACIÓN Y RANGOS DE NORMALIDAD POR CITOMETRÍA DE FLUJO (CMF). **Sánchez L<sup>1</sup>, León F<sup>1</sup>, Andrés A<sup>2</sup>, Asensio A<sup>3</sup>, Camarero C<sup>2</sup>, Roy G<sup>1</sup>.** Servicio de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Pediatría, Hospital Ramón y Cajal (Madrid). <sup>3</sup>Servicio de Medicina Preventiva, Hospital Puerta de Hierro (Madrid).

**Antecedentes:** El aumento de linfocitos intraepiteliales (LIE) en mucosa duodeno-yeyunal es una característica de la Enfermedad Celíaca (EC) aunque también está presente en otras enteropatías. Sabemos que en la EC existe un aumento de los LIE TcR $\gamma\delta$  y un descenso de los LIE CD3-CD103<sup>+</sup> (i-NK), aunque no de forma exclusiva. Los rangos de normalidad no están claramente establecidos y dependen en gran medida del método empleado.

**Objetivos:** Reevaluar, por CMF, el rango de normalidad del número de LIE infiltrantes y de los porcentajes de las distintas subpoblaciones linfocitarias.

**Materiales:** Un total de 74 biopsias duodenales pediátricas y 36 de adultos han sido seleccionadas como controles entre más de 1.000 biopsias diagnósticas.

**Análisis estadístico:**

#### Distribución del número y subpoblaciones LIE en mucosa duodenal Infantil

n	Media $\pm$ SE	CI <sub>95%</sub>	P*	Percentil 5	Percentil 95
LIE*	72 7,66 $\pm$ 0,35	6,96-8,36		3,24	12,7
TcR $\gamma\delta$ **	74 6,86 $\pm$ 0,54	5,78-7,93		1,38	15,02
i-NK** <3 años	36 50,23 $\pm$ 2,57	45,01-55,45		1,95	70,45
i-NK 3-17 años	35 28,28 $\pm$ 2,23	23,74-32,82	<0.001	10,94	59,48

\*Student t test = 6.43 df = 69

#### Distribución del número y subpoblaciones LIE en mucosa duodenal Adultos

n	Media $\pm$ SE	CI <sub>95%</sub>	Percentil 5	Percentil 95
LIE*	36 8,53 $\pm$ 0,50	7,51-9,56	4	15
TcR $\gamma\delta$ **	36 6,56 $\pm$ 0,79	4,93-8,18	1	14
i-NK**	36 25,46 $\pm$ 2,11	21,16-29,75	7,5	48,4

\*% LIE respecto al total de células del epitelio; \*\*% de TcR $\gamma\delta$  y i-NK respecto a LIE.

**Conclusiones:** Valores de LIE totales por debajo del 12,7% en niños y 15% en adultos, junto con una densidad de LIE TcR $\gamma\delta$  inferior al 15% son considerados límite de la normalidad. Los i-NK varían con la edad, siendo significativamente superiores (50,23 $\pm$ 2,57) en menores de 3 años.

**16. POTENCIAL REGULADOR DE POBLACIONES NATURALES DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>.** Pini E, Ojeda G, Bello R\*, Dianzani U\*\*, Portolés P, Rojo JM\*. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid); \*Departamento de Inmunología, Centro de Investigaciones Biológicas CSIC (Madrid); \*\*Dipartimento di Scienze Mediche, Università "Amedeo Avogadro" (Novara, Italia).

ICOS ("Inducible Costimulator") es una molécula coestimuladora estructural y genéticamente relacionada con CD28 y CTLA-4 (CD152), que es esencial para el desarrollo de las respuestas inmunológicas normales y patológicas. ICOS se expresa típicamente en células activadas y líneas Th2, favoreciendo preferentemente la diferenciación Th2 y su función efectora, por medio de cambios en factores de transcripción como NF-ATc y c-MAf. Además, la coestimulación por ICOS induce muy altos niveles de IL-10. A pesar de ello, ICOS también puede aumentar respuestas de tipo Th1.

En este estudio, hemos analizado la importancia funcional de la coestimulación por ICOS en una población de linfocitos T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>

presente de modo natural en órganos linfoides secundarios, comparándola con el resto de la población, que sólo expresa ICOS al ser estimulada. Además, se ha estudiado la capacidad de estos linfocitos T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> como células con actividad T reguladoras, y el papel de la interacción ICOS-B7h en la actividad de células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>.

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> suponen el 6-15% de los linfocitos CD4<sup>+</sup> en ratones normales, y su aparición depende en parte de coestímulos por CD28. Nuestros datos muestran que, tras la activación por anticuerpos anti-CD3 y anti-ICOS adsorbidos a plástico, las células T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> son la fuente principal de IL-2, IL-4 e IL-10, cuando son comparadas con la población principal de células T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>-</sup>. Por el contrario, las células T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>-</sup>, que producen bajas cantidades de IL-2, IL-4 e IL-10, producen cantidades de IFN- $\gamma$  similares o mayores que las CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup>. Es interesante que las células CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> no proliferan en ensayos de activación por anticuerpos anti-CD3 junto con células auxiliares, y que inhiben la proliferación de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> o CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>-</sup> en ensayos estándar de actividad T reguladora *in vitro*. Sin embargo, la interacción ICOS-B7h no participa de modo detectable en la actividad supresora de las células Treg CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>. A pesar de ello, los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> pueden ser activados y expandidos eficientemente *in vitro* por anticuerpos anti-CD3 adsorbidos a la placa de cultivo, dando lugar a poblaciones marcadamente enriquecidas en células productoras de IL-4 y/o IL-10, con perfiles semejantes a células de fenotipo Th2 y Tr1, en particular cuando estas células son coestimuladas por ICOS.

Nuestros datos muestran que la coestimulación por ICOS altera el perfil Th1/Th2 de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> diferenciados *in vitro*, y que este sistema puede ser usado para la expansión de células con perfil funcional de células Treg. Además, estos resultados indican que las poblaciones naturales CD4<sup>+</sup> ICOS<sup>+</sup> pueden determinar en gran medida el efecto de la coestimulación por ICOS, sugiriendo nuevas explicaciones para los distintos efectos de ICOS observados en las respuestas inmunitarias en las que han sido analizados.

**17. SONIC HEDGEHOG PARTICIPA EN EL MANTENIMIENTO DE LA POBLACIÓN INMADURA DE PROGENITORES TÍMICOS HUMANOS CONTRARRESTANDO EL EFECTO DE IL-7.** Gutiérrez-Frías C, Sacedón R, Hernández-López C, Cejalvo T, Díez B, Zapata AG, Varas A, Vicente A. Departamento de Biología Celular, Facultades de Biología y Medicina, Universidad Complutense de Madrid.

**Introducción:** La familia de proteínas Hedgehog (Hh) comprende un conjunto de moléculas señalizadoras que durante el desarrollo dirigen la organogénesis, regulando la diferenciación, proliferación y supervivencia celulares. En la condición adulta, se ha demostrado que cumplen funciones similares en tejidos que durante toda la vida mantienen una población progenitora.

**Objetivos:** En el presente trabajo demostramos la expresión de los componentes de la ruta de señalización Hh en el timo humano y, analizamos el papel de Sonic Hh (Shh) en las primeras etapas de la diferenciación T, y su posible relación con la función de la IL-7 sobre los progenitores tímicos.

**Metodología:** Las muestras de timo humano procedían de niños sometidos a cirugía cardiaca correctiva. La expresión de los diferentes componentes de la ruta de señalización Hh fue analizada en las distintas poblaciones tímicas mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia y RT-PCR. Los estudios funcionales fueron llevados a cabo

empleando células progenitoras tímicas CD34+ que fueron empleadas en ensayos de proliferación y apoptosis así como para la colonización de lóbulos tímicos fetales de ratones SCID, mantenidos en cultivo orgánico (FTOC), y para el establecimiento de reagregados con células epiteliales tímicas humanas.

**Resultados:** En el timo humano Shh era producido por las células epiteliales localizadas en la subcápsula y la médula del órgano. Los progenitores CD34+ expresaban los dos componentes del receptor Hh, Patched y Smoothed, así como los tres factores de transcripción de la familia Gli (Gli1, Gli2, Gli3) que transducen la señal Hh, demostrándose como posibles dianas de Shh en el timo humano. De hecho, nuestros resultados demuestran que Shh incrementa significativamente su viabilidad modulando los niveles de expresión de las proteínas bcl-2 y bax y, por el contrario, inhibe su proliferación. Asimismo, el tratamiento con Shh de los reagregados de progenitores CD34+ con células epiteliales tímicas humanas resultaba en un bloqueo de la diferenciación T mientras que la adición del ciclopamina, un bloqueante de la señalización Hh, producía el efecto contrario. En los FTOC quimera humano-ratón, Shh producía cambios similares observándose una acumulación de las células progenitoras CD34+ más inmaduras (CD1-). Es más, Shh era capaz de contrarrestar el efecto positivo que la IL-7 ejerce sobre la expansión y diferenciación de los timocitos reduciendo en los progenitores tímicos tanto la expresión del receptor para esta citocina como los niveles de fosforilación de Stat-5 dependientes de IL-7.

**Conclusiones:** Estos resultados demuestran que la ruta de señalización Hh es activa durante las primeras etapas de la diferenciación T humana. Shh participa en el mantenimiento de la población de células progenitoras del timo humano potenciando su supervivencia a la vez que contrarresta el efecto, en diferenciación y supervivencia, que sobre ellas ejerce la IL-7.

**18. EFECTO A CORTO PLAZO DE LA METIL-PREDNISOLONA INTRAVENOSA SOBRE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y SUBPOBLACIONES DE LINFOCITOS T CD4+ y T CD8+ EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN BROTE. *Aristimuño C, Navarro J, De Andrés C\*, Gómez-Jiménez V, Fernández-Cruz E, Sánchez-Ramón S.* Departamentos de Inmunología y \*Neurología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.**

**Objetivos:** La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad crónica, inflamatoria y desmielinizante del Sistema Nervioso Central (SNC). Se postula que son las células Th1 CD4+ las que inician la inflamación en la EM, si bien la destrucción posterior del SNC requiere la cooperación de otros tipos celulares (linfocitos B, macrófagos/microglía y linfocitos T CD8+). Las células dendríticas (DCs) son indispensables en la activación de los clones T autorreactivos y se ha demostrado que los linfocitos T reguladores, (Treg: CD4+CD25+) intervienen de manera crítica en la tolerancia inmunológica. El tratamiento de elección durante los brotes de EM es la terapia intravenosa (iv) con glucocorticoides (GCs). Nuestro principal objetivo fue analizar los efectos de los GCs sobre las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ y las DCs circulantes.

**Métodos:** Se estudiaron las subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+, células dendríticas mieloides (mCDs) y plasmacitoides (pCDs), por citometría de flujo multiparamétrica en sangre total, en 20 pacientes en brote de EM, basalmente y tras 5 días de tratamiento con metilprednisolona iv (MPIV) (1g/d durante 3-5 días) y en 18 controles sanos.

También se realizaron estudios funcionales *in vitro* de las Treg purificadas a partir de sangre periférica de los pacientes y de los controles sanos. Asimismo se realizaron modelos *in vitro* para estudiar el efecto de la MP sobre la apoptosis y maduración de las DCs.

**Resultados:** La MPIV indujo una fuerte disminución de las DCs plasmacitoides (Lin-BDCA2+CD123+HLA-DR+) ( $p < 0.0001$ ) así como de la subpoblación de DCs mieloides (Lin-CD11c+HLA-DR+) ( $p = 0.003$ ). Los linfocitos TCD4+ y TCD8+ activados (CD8+CD38+HLA-DR+) también disminuyeron ( $p < 0.05$ ). Sin embargo los Treg aumentaron considerablemente después del tratamiento (CD4+CD25+) ( $p = 0.004$ ), especialmente la subpoblación reguladora que expresa elevados niveles de CD25 (CD4+CD25high) ( $p < 0.0001$ ). Las células dendríticas plasmacitoides (Lin-CD123+) correlacionaron negativamente con los Linfocitos TCD4+ activados (CD4+CD38+HLA-DR+,  $r = -0.643$ ,  $p = 0.024$ ). Tras la MPIV se observó correlación directa entre la población de linfocitos TCD4+CD25high reguladores y los TCD8+CD25+. ( $r = 0.74$ ;  $p < 0.0001$ ). Se realizaron estudios funcionales sobre las células Treg y se encontró un aumento de la función supresora durante el brote, aunque siempre menor que en los controles sanos.

**Conclusiones:** La metilprednisolona iv disminuye las poblaciones de DCs, afectando más drásticamente a la subpoblación plasmacitoide, así como la generación y maduración *in vitro* de estas células. También disminuye la activación de células T. Hemos observado un incremento en paralelo de Linfocitos T Reguladores. Se describe así un nuevo mecanismo de acción de la metilprednisolona que explicaría también su efecto inmunomodulador.

**19. VALORACIÓN DE LOS NIVELES DE ATP INTRACELULAR COMO UN ÍNDICE DE ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T DURANTE LA MONITORIZACIÓN DEL RECHAZO DE INJERTOS RENALES. *García-Astudillo LA<sup>1</sup>, Sánchez-Velasco P<sup>1</sup>, Rodríguez-Calabía E<sup>2</sup>, Benito-Almazán MJ<sup>1</sup>, Ausín-Ortega F<sup>1</sup>, Arias M<sup>2</sup>, Leyva-Cobián F<sup>2</sup>.* Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Nefrología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.**

Los métodos disponibles para medir la actividad de los linfocitos T humanos son muy limitados; tanto por razones éticas (estudios *in vivo*) como por los sesgos y errores debidos a la manipulación (estudios *in vitro*). Clásicamente se ha utilizado *in vitro* la medida de la proliferación celular frente a estímulos inespecíficos (Vg.: mitógenos) o específicos (Vg.: antígenos virales o bacterianos). La mayor desventaja de este procedimiento es que requiere muchas manipulaciones (purificación de células T, cultivo de las mismas, etc) y una considerable cantidad de tiempo (3-10 días) hasta la obtención de resultados cuantitativos. Esta presentación describe nuestros resultados utilizando sangre completa y estimando la actividad linfocitaria T mediante la medida del aumento de ATP intracelular (iATP), método que se correlaciona bien con la proliferación celular y aunque no elimina la inespecificidad atribuible de forma general a los métodos *in vitro*, su principal ventaja es que proporciona resultados cuantitativos en 24 h. Se presenta un estudio evolutivo durante nueve meses en 74 pacientes con trasplante renal para monitorizar la producción de iATP. Los pacientes se clasificaron de acuerdo con su situación clínica en el momento del estudio (categorías I, normofuncional; categoría II, DGF; categoría III, rechazo agudo inicial; categoría IV, rechazo agudo tratado en resolución; categoría V, rechazo crónico; categoría VI, rechazo crónico no tratado; categoría VII, nefrotoxicidad; categoría VIII, infección aguda y categoría IX, infección crónica) y los niveles de iATP en tres cate-

gorías a saber: Categoría I (iATP > 525 ng/ml), categoría II (iATP 226-524 ng/ml) y categoría III (iATP < 225 ng/ml). Se evidenció una correlación positiva estadísticamente significativa entre una disminución de la producción de iATP y la presencia de infección aguda (CVP, 0,355;  $p < 0,002$ ) y con la utilización de MMF como tratamiento inmunosupresor. Sin embargo no se relacionó producción elevada de iATP y la aparición de rechazo agudo. Tampoco hubo correlación con el tiempo de diálisis, otros tratamientos inmunosupresores, presencia de anticuerpos citotóxicos, concordancia en la tipificación HLA entre donante y receptor, niveles de creatinina en sangre y orina, edad, peso, diuresis y fecha de trasplante.

**20. EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE LAS PROTEÍNAS MORFOGENÉTICAS DE HUESO 2 Y 4 EL TIMO HUMANO.** *Cejalvo T, Hernández-López C, Gutiérrez-Frías C, Sacedón R, Díez B, Zapata AG, Varas A, Vicente A. Departamento de Biología Celular, Facultades de Biología y Medicina, Universidad Complutense de Madrid.*

**Introducción:** Las Proteínas Morfogenéticas de Hueso (BMP) 2 y BMP4 son una familia de proteínas de secreción altamente conservada que participan tanto en la determinación del patrón general de desarrollo del embrión y la orquestación de la organogénesis, como en la regulación de los procesos de diferenciación, proliferación y supervivencia celular. Han sido ya descritos los efectos de BMP4 en el timo murino, donde parecen jugar un importante papel en diferentes puntos de la diferenciación T

**Objetivos:** Analizar la expresión y el papel de estas proteínas en el timo humano.

**Metodología:** Las muestras de timo humano se obtuvieron de niños, de entre 3 meses y 5 años, que habían sido sometidos a cirugía cardíaca correctiva. La expresión de los diferentes componentes de la cascada BMP2/4 fue analizada mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia y RT-PCR. Para los estudios funcionales se llevaron a cabo cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales de ratón SCID reconstituidos con precursores tímicos humanos CD34<sup>+</sup> aislados mediante separación magnética. Por otro lado, se realizaron ensayos de proliferación y de supervivencia con estos mismos precursores.

**Resultados:** En el timo humano, BMP2 y BMP4 eran producidos fundamentalmente por las células del epitelio cortical. El análisis por RT-PCR de la expresión tanto de los receptores, BMPRIA, BMPRII y BMPRII, como de las moléculas que median la transducción de la señal, las R-Smad: SMAD1, SMAD5, SMAD8 y la Co-Smad: SMAD4, demostró que estas moléculas eran expresadas tanto por las células epiteliales tímicas como por diferentes subpoblaciones de timocitos, entre las que se encontraban los progenitores tímicos CD34<sup>+</sup>. Los resultados obtenidos por citometría de flujo indicaban una mayor expresión de BMPRIA y BMPRII en las células CD34<sup>+</sup> comprometidas con el linaje T, que en aquellas más inmaduras CD34<sup>+</sup>CD1<sup>-</sup>. La adición de BMP4 a cultivos orgánicos de lóbulos tímicos fetales de ratones SCID reconstituidos con progenitores CD34 humanos, produjo un bloqueo en la diferenciación T observándose en dichos cultivos una acumulación respecto a la situación control de las células CD34<sup>+</sup>CD5<sup>+</sup>. Además, la proliferación de las células CD34<sup>+</sup> era inhibida tras el tratamiento con este morfógeno sin que se viera afectada su viabilidad.

**Conclusiones:** Estos resultados indican que la señalización BMP2/4 juega un papel fundamental en el mantenimiento de precursores tímicos humanos CD34<sup>+</sup>

**21. LAS CÉLULAS CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> DE CORDÓN UMBILICAL PUEDEN DIFERENCIARSE A CÉLULAS Th EFECTORAS CON POTENCIAL REGULADOR.** *Cantó E, Rodríguez-Sánchez JL, Vidal S. Departamento Inmunología. Institut de Recerca i Hospital Santa Creu i Sant Pau, Barcelona.*

**Objetivos:** Nuestros estudios previos han demostrado que las células de sangre de cordón umbilical (SCU) tienen un comportamiento diferencial respecto a sus homólogas de sangre periférica de adulto (SPA) cuando se activan vía TCR. Para determinar si esta peculiar respuesta repercutiría en la diferenciación de las células *naïve* de SCU a células efectoras, nos planteamos comparar la capacidad secretora de citoquinas y la adquisición de marcadores de activación y maduración en las células efectoras de SCU y SPA.

**Metodología:** Células CD4<sup>+</sup>CD45RA<sup>+</sup> seleccionadas negativamente con bolas inmunomagnéticas, se diferenciaron a células efectoras. Se realizó una activación primaria durante 3 días con OKT3+anti-CD28. Posteriormente, las células se expandieron con IL-2 (50 U/ml) durante 4 días. Finalizada la expansión, las células efectoras en reposo se reestimularon durante 24 horas, con OKT3 y OKT3+anti-CD28, y se analizó la expresión de marcadores de superficie por citometría de flujo y la producción de citoquinas a nivel de mRNA y proteína.

**Resultados:** Los niveles de expresión de CD69, CD40L, OX40, CD62L, PD-1 y CTLA-4 fueron similares en las células efectoras de SCU y SPA, demostrando que adquieren un nivel similar de activación durante el proceso de diferenciación a células efectoras. Sin embargo, las células de SCU reestimuladas con OKT3, presentaban mayor expresión de CD25 y secreción de IL-2 en comparación con SPA. Tanto las células efectoras de SCU como de SPA representan una población heterogénea con una similar frecuencia de células productoras de citoquinas Th1 y Th2, secretando niveles similares de IL-4, IFN $\gamma$  y IL-5. En cambio tras la reestimulación con OKT3, las células efectoras de SCU, producen más IL10.

**Conclusiones:** Las células efectoras de SCU son capaces de responder a una activación vía TCR, como las células de SPA, pero además producen niveles mayores de IL-10, que sugieren un potencial inmunoregulador.

**22. DETERMINACIÓN DEL ANTÍGENO CD103 EN LAVADOS BRONCOALVEOLARES.** *Serrano C\*, Ortega A\*\*, Castañón S\*, Lillo R\*, Flandes J\*\*, Subirá D\*.* \*Servicio de Hematología, \*\*Servicio de Neumología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

CD103 es una integrina relacionada con la activación de los linfocitos T y su reclutamiento a nivel de la mucosa epitelial. En el pulmón, la expresión de CD103 es poco variable sobre la subpoblación TCD8<sup>+</sup> pero irregular sobre la TCD4<sup>+</sup> pudiendo aumentar o disminuir su expresión en diversas patologías que afecten al parénquima pulmonar.

**Objetivo:** Determinar la rentabilidad del marcador CD103 en linfocitos de lavados broncoalveolares para ayudar al diagnóstico en pacientes con patología respiratoria.

**Pacientes:** 60 pacientes consecutivos con afectación pulmonar (34 hombres y 26 mujeres). El diagnóstico final se basó en la historia clínica, radiología pulmonar, estudio anatomopatológico y microbiológico del lavado broncoalveolar (LBA).

**Métodos:** Estudio inmunofenotípico de las poblaciones del LBA con los siguientes marcadores: CD45, CD3, CD19, CD4, CD8, CD33,



Tabla 1.

		n	%LT	% CD4+	%CD103 CD4+	% CD8+	%CD103 CD8+	CD4+/ CD8+
No fibrosis	Sarcoidosis	4	42,75	58,62	15,87	31,37	76,16	2,63
No neumonía	Eosinofilias	3	11,5	60,66	52,5	22,85	68,16	2,88
	Otras patologías	20	28,48	46,03	27,47	40,61	57,64	1,72
Neumonía	No filiada	10	36,27	36,62	23,44	48,12	59,53	1,02
	Viral	3	32,76	37,66	32,66	49,73	57	0,86
	Bacteriana	5	11,15	55,38	20,64	24,42	68,44	3,32
	Oportunistas	5	49,78	22,66	20,79	65,52	67,33	0,49
Tuberculosis		3	26,06	51,26	51,66	40,38	79,66	1,73
Fibrosis pulmonar idiopática		7	14,36	35,65	31,74	44,96	71,56	1

HLADR, CD15, CD103. Para el análisis de la expresión del antígeno CD103 se utilizó la combinación CD3/CD103/CD4 determinándose el porcentaje de CD103 en las subpoblaciones CD3+CD4+ y CD3+CD4-.

**Resultados:** (Tabla 1)

1) El 69,4% de los LBA presentaron un aumento del porcentaje de linfocitos independiente-mente de la patología subyacente y el 69,5% un cociente CD4/CD8 <1,5. 2) El 19,4% muestra linfocitosis T CD4+ (CD4/CD8 >2,5) en su mayoría sarcoidosis, eosinofilias pulmonares y neumonías bacterianas. 3) El porcentaje de células T CD4+ o CD8+ que expresan CD103 es independiente de los linfocitos totales (% LT) del LBA. 4) Existe una correlación indirecta entre el %TCD4+ y los niveles de CD103+ sobre los linfocitos T CD4+. 5) Existe una correlación directa en el %TCD8+ y %CD103+CD8+ y los niveles de CD103+ sobre los linfocitos T CD4+. 6) El porcentaje de CD103 en los linfocitos T CD4+ y CD8+ tiende a ser menor en los pacientes con sarcoidosis y más elevado en tuberculosis y eosinofilias pulmonares aunque no se han encontrado diferencias estadísticamente significativas con otras patologías. 7) No se aprecia un aumento significativo en la expresión de CD103 en los TCD4+ en pacientes diagnosticados de fibrosis pulmonar idiopática.

**Conclusiones:** 1) La mayor parte de las muestras con patología pulmonar analizadas presentaban un aumento de linfocitos. 2) Independientemente del porcentaje de esta población, son las células TCD8+ las que prevalecen sobre las TCD4+. 3) La expresión del antígeno CD103 se comporta de la misma forma en las subpoblaciones TCD4+ y TCD8+. 4) La falta de un diagnóstico etiológico concreto en gran parte de los pacientes limita la utilidad diagnóstica real del antígeno CD103 sobre la población linfocitaria pulmonar.

23. **MEJORA DE LA CARACTERIZACIÓN DE LAS RESPUESTAS APOPTÓTICAS Y DE CRECIMIENTO POR CFSE Y ENUMERACIÓN CELULAR CON EL USO DE UN NUEVO PARÁMETRO CINÉTICO: EL NÚMERO MEDIO DE DIVISIONES CELULARES.** *Díaz D\*, Prieto A\*, Barcenilla H\*, Sánchez MA\*, Monserrat J\*, Chevarría J\*, Chara L\*, Álvarez de Mon M\*\*.* \*Laboratorio de Inmunología Clínica y Oncología, unidad I+D asociada al CSIC, Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares (Madrid). \*\*Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares (Madrid).

**Objetivos:** Dentro de las poblaciones de linfocitos T los blastos estimulados inician su respuesta proliferativa de una manera asincrónica. Se monitorizó el número de divisiones celulares para estudiar como la IL-2 afecta a las decisiones celulares después de estimulación policlonal.

**Materiales y métodos:** Enumeramos células T de poblaciones definidas fenotípicamente previamente marcadas con CFSE. Las células resting y blastos viables y apoptóticas fueron enumeradas después de 5 y 7 días de la estimulación policlonal. El número medio de divisiones celulares (NMCD) se obtuvo por el análisis de los perfiles de CFSE de alta resolución.

**Resultados:** En los días 5 y 7 de cultivo la IL-2 exógena aumentó el número y la viabilidad de la progenie de blastos disminuyendo la proporción de células apoptóticas en cada división. La IL-2 aumentó el NMCD de las células proliferantes viables a 5 días de cultivo y lo dobló a día 7. Aumentos similares en el NMCD fueron observados en las células apoptóticas. La enumeración de células T con un marcaje de CFSE de alta resolución demuestra que la IL-2 exógena permite a las células exceder su tercera división y continuar dividiéndose hasta 5 o mas veces.

**Conclusiones:** La IL-2 en los blastos inhibe apoptosis e induce crecimiento celular disminuyendo la proporción de células apoptóticas en cada división y aumentando el número de divisiones en las células que proliferan. La IL-2 es un potente factor proapoptótico para los linfocitos T maduros estimulados y un factor de crecimiento para los blastos supervivientes proliferantes.

24. **¿QUÉ CÉLULAS T RESPONDEN A LA ESTIMULACIÓN POLICLONAL? UNAS SECRETAN LA MAYORÍA DE LAS CITOQUINAS Y OTRAS PROLIFERAN.** *Barcenilla H, Prieto A\*, Díaz D\*, Sánchez MA\*, Monserrat J\*, Acuña ML\*, Villarroel M\*, Álvarez de Mon M\*\*.* \*Laboratorio de Inmunología Clínica y Oncología, unidad I+D asociada al CSIC, Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Alcalá de Henares (Madrid). \*\*Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares (Madrid).

**Objetivos:** En los últimos años se ha reconocido la heterogeneidad de las respuestas de las diferentes subpoblaciones de linfocitos T a la estimulación policlonal. Nos preguntamos qué células T prolife-

rarán o morirán en respuesta a la estimulación policlonal ¿Son éstas las mismas que secretan citoquinas?

**Materiales y métodos:** Usamos métodos de citometría de flujo para enumerar células previamente marcadas con CFSE. Las células marcadas con CFSE fueron sorteadas para obtener una población con una marca más homogénea. Las células fueron estimuladas policlonalmente con PHA o con micropartículas recubiertas con anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. La producción de citoquinas se midió intra y extracelularmente. El análisis de ciclo celular se realizó mediante marcaje con DRAQ5.

**Resultados:** Las células que blastificaron en respuesta a estimulación policlonal fueron principalmente CD45RA+ pero pronto adquirieron un fenotipo doble positivo y luego proliferaron. Las células CD45RA-CD45RO+ secretaron citoquinas (IL-2, IFN $\gamma$ ) durante varias horas pero en ensayos de proliferación más de la mitad de ellas murieron por apoptosis en las primeras 24 horas de cultivo en respuesta a la estimulación policlonal mientras que el porcentaje de células CD45RA+ fue menor. Sin embargo, experimentos con células CD45RO+ sorteadas demostraron que algunas células CD45RO+ proliferaron vigorosamente en respuesta a la estimulación mitogénica. El 70% de estas células memoria que proliferaron revirtieron su fenotipo a CD45RA+CD45RO+.

**Conclusiones:** Muchas de las células T memoria respondieron al estímulo policlonal secretando citoquinas. Más del 50% de estas murieron por apoptosis, sin embargo, una pequeña fracción de las células memoria adquirió un fenotipo doble positivo y proliferó marcadamente. Las células T naïve respondieron a la estimulación policlonal cambiando hacia el fenotipo CD45RA+CD45RO+ y proliferaron antes de diferenciarse en células T memoria con un fenotipo CD45RA-CD45RO+.

**25. ISOLATION AND CHARACTERIZATION OF CD38-CONTAINING DETERGENT-INSOLUBLE MEMBRANE MICRODOMAINS USING VARIOUS NON-IONIC DETERGENTS. ITS COMPARISON WITH CONFOCAL MICROSCOPY.** Muñoz P, Pavón EJ, Martín AB, Sancho J, Zubiaur M. Instituto de Parasitología y Biomedicina, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Armilla (Granada), Spain.

**Introduction:** Lipid rafts play a central role in signal-transduction, in the immune response and in many pathological situations on the basis of two important raft properties, their capacity to incorporate or exclude proteins selectively, and their ability to coalesce into larger domains

**Objectives:** In this study we investigated whether CD38 is associated with the membrane raft vesicles by biochemical and microscopy techniques.

**Methods:** Rafts were isolated as detergent-insoluble complexes upon solubilization of Jurkat T cells, or normal T cells in Brij 98 at 37°C. Cells were also solubilized with the relatively more hydrophobic detergent Nonidet P-40 on ice, or with the relatively hydrophilic detergent Brij 35 on ice. Last, intact cells were analyzed by confocal or conventional immunofluorescence microscopy by using specific antibodies to a variety of molecules, including CD38, CD3- $\zeta$ , Lck, ZAP-70, and the ganglioside GM1.

**Results:** Our study provides biochemical evidence that in T cells CD38 partitions into membrane microdomains, possessing the predicted characteristics of rafts. The association of CD38 with lipid rafts could be detected based in its resistance to solubilization to various detergents

on ice (NP-40, or Brij 35), or at 37°C (Brij 98), and its buoyancy at low-density fractions following sucrose gradient centrifugation. Comparative analysis of the pattern of proteins and lipids (GM1) recovered in these fractions it is clear that the detergents of the Brij series are comparatively better than NP-40 in discriminating raft from non-raft membrane microdomains. Confocal microscopy studies show that indeed, CD38 co-localizes with well-known raft-associated proteins as Lck, and to a lesser extent with the CD3- $\zeta$  subunit of the TCR/CD3 complex.

**Conclusions:** Our data further support the existence of rafts in cell membranes at physiological temperatures, and the presence of a subset of lipid rafts in which CD38 is associated with Lck and the CD3- $\zeta$  subunit of the TCR.

**26. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN DE LA CADENA CD3 $\gamma$  EN LA SEÑALIZACIÓN A TRAVÉS DEL COMPLEJO TCR/CD3.** Recio Hoyas MJ, Rossi N, Weiss E, Periañez A, Martín-Fernández JM, Crespo Guardo A, Ramírez C, Reiné J, Pérez V, Domínguez O, Regueiro JR. <sup>1</sup>Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>CNIO. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.

**Introducción:** El TCR/CD3 señala mediante oligomerización y cambios conformacionales que reclutan en el citosol quinasas y adaptadores hacia las cadenas CD3. La participación de cada cadena en este proceso sigue siendo objeto de controversia, como las baterías de genes inducidos en cada caso. La señalización vía TCR/CD3 en ausencia de CD3 $\gamma$  está bastante preservada, aunque ciertas rutas tempranas de transmisión de señales y algunas funciones tardías parecen más afectadas que otras. En ratón son pocos los datos funcionales por el escaso número de linfocitos que alcanzan la periferia, pero también se observan algunas respuestas normales y otras reducidas, retrasadas o bloqueadas.

**Objetivos:** En este trabajo nos proponemos estudiar las rutas de señalización en células T maduras deficientes para la cadena  $\gamma$  de CD3. Esto lo abordaremos mediante técnicas bioquímicas, de citometría (eventos proximales) y microarrays (eventos distales.)

**Metodología:** Los estudios bioquímicos se realizaron mediante Western-blot. Los linfocitos CD4 y CD8 con y sin CD3  $\gamma$  se estimularon previamente con el anticuerpo UCHT1 ( $\alpha$ CD3) y los resultados se revelaron utilizando el anticuerpo que reconoce la forma fosforilada de Erk.

Para los estudios de citometría, células aisladas de sangre periférica fueron estimuladas con  $\alpha$ CD3 (MEM57 y MEM 92) y con PMA ionomina. Posteriormente se fijaron con paraformaldehído, se permeabilizaron y se tiñeron intracelularmente con los anticuerpos  $\alpha$ fosfoErk y  $\alpha$ CD3. Finalmente las muestras se analizaron en el Citómetro de flujo.

Los perfiles de expresión génica en células deficientes en CD3 $\gamma$  se obtuvieron mediante el análisis de oncochips.

**Resultados y Conclusiones:** Los resultados bioquímicos indican que la activación de Erk se encuentra retrasada en las células  $\gamma$  deficientes, tanto en el linaje CD4 como CD8, sugiriendo que la cadena CD3 $\gamma$  participa en la activación de esta ruta de señalización intracelular. Por otra parte, es posible detectar, mediante marcaje intracelular, la fosforilación de Erk en células aisladas de sangre periférica. El hecho de que hayamos conseguido optimizar esta técnica en nuestro laboratorio resulta de gran importancia puesto que nos va a permitir complementar el estudio de rutas de señalización que se pueden encontrar defectuosas

en células CD3 $\gamma$  deficientes. Los resultados de microarrays nos indicarán el perfil de expresión de genes implicados en rutas de señalización en células normales y deficientes para la cadena  $\gamma$  de CD3.

**27. POBLACIÓN T DOBLE POSITIVA (CD3+CD4+CD8+) EN UN PACIENTE CON INSUFICIENCIA RESPIRATORIA AGUDA INTERMITENTE.** *Martínez-Gallo M, de la Calle-Martín O, Puy G\*, Rodríguez-Arias JM\*, Rodríguez-Sánchez JL.* Servicio de Inmunología, \*Servicio de Neumología. Hospital de Sant Pau, Barcelona.

**Introducción:** Se describe un paciente varón de 40 años de edad que desde hace diez presenta repetidos ataques de insuficiencia respiratoria aguda (IRA) y una población mayoritaria de células T doble positivas (DP) (CD3+CD4+CD8+).

**Caso Clínico:** Presentamos un paciente que debuta con episodios similares a un síndrome gripal (distermia, fiebre elevada, artromialgias) y disnea, tos presentado a veces esputos hemoptoicos. Durante los últimos diez años ha tenido tres episodios de insuficiencia respiratoria aguda grave, que ha requerido oxígeno a concentraciones del 80% y tratamiento con corticoides. No se detectó germen causal. Diagnosticándose de neumonía organizativa. En la actualidad está controlado con 30 mg/día de prednisona. Retrospectivamente se observa una estrecha relación entre las crisis de insuficiencia respiratoria y la disminución de dosis de corticoides. Cabe destacar la ausencia de infección, así como de signos de autoinmunidad.

El dato más llamativo es la presencia constante y progresiva de un elevado porcentaje de células T DP, que se detectan originalmente en lavado alveolar y que alcanza un 41% del infiltrado, también se encuentra en sangre periférica, aumentando en valores porcentuales y absolutos hasta alcanzar el 90% actual (6000 linfocitos T CD4+CD8+/mm<sup>3</sup>). La expresión de los marcadores de linaje CD4 y CD8 es equivalente a la que se encuentra en células T maduras, con coexpresión de la cadena beta del CD8. El 94% de estas células poseen el marcador CD45RO, asimismo expresan los marcadores CD5 y CD28, sin expresión significativa de marcadores de activación, ni precoces (CD69, CD25), ni tardíos (HLA-DR, CD71, CD40 ligando). Sin embargo, tras la estimulación, dichos marcadores de activación se adquieren siguiendo una dinámica normal.

Se descarta un origen neoplásico u oligoclonal de la población al presentar un patrón policlonal en el reordenamiento del TCR y la expresión de diferentes Vbs. Esta población T DP no ha emigrado recientemente del timo puesto que carece de TRECS.

Los niveles de inmunoglobulinas son normales exceptuando el destacado nivel de IgE (>2000 UI/ml) que disminuye con el tiempo.

Cuando el paciente esta sometido a tratamiento inmunosupresor se observa una disminución en la respuesta proliferativa ante diversos estímulos. En el momento actual, tratado únicamente con corticoides, presenta una respuesta similar a los controles, indicativo de una correcta proliferación celular.

**28. ANÁLISIS DE LA PARTICIPACIÓN DE LOS RECEPTORES CD94/NKG2 EN LA MODULACIÓN DE LAS RESPUESTAS ALOESPECÍFICAS EN CÉLULAS T CD4+.** *Unciti JD<sup>1</sup>, Romero Z<sup>2</sup>, Ortega C<sup>2</sup>, Santamaría M<sup>2</sup>, Molina JP.* <sup>1</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. <sup>2</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.

Los receptores del complejo NKG2 son proteínas tipo lectina que en células NK juegan un importante papel funcional como moduladores del estado de activación celular. Estos receptores están formados por heterodímeros en los que una cadena común (CD94) va a unirse a una de las cadenas de la familia NKG2 (NKG2A; NKG2C y NKG2E). Estos receptores transmiten señales inhibitoras (p. ej. NKG2A) o activadoras (NKG2C). A pesar de que estas moléculas se descubrieron en células NK, también son expresadas en linfocitos. En trabajos anteriores demostramos que las células T CD4+ adquieren la expresión de los receptores del complejo CD94/NKG2 solamente cuando las células se someten a estimulación repetida, lo que reproduce las situaciones de estimulación crónica del Sistema Inmune tales como las observadas en la respuesta a infecciones virales crónicas o rechazo de trasplantes. Los receptores CD94/NKG2 son plenamente funcionales en células CD4, puesto que su entrecruzamiento transmite señales que modulan las respuestas de producción de citocinas. Al objeto de evaluar en detalle la participación de estos receptores en respuestas alogénicas crónicas, hemos utilizado un sistema en el que se han generado líneas de células T de individuos normales tras aloestimulación repetida. Los genes CD94, NKG2A y NKG2C han sido obtenidos mediante RT-PCR introduciendo en los extremos flanqueantes sitios de clonaje para permitir la ligación de los productos en el vector lentiviral pHR-SFF tras un proceso de clonaje intermedio en el vector TOPO 2.1. Los vectores lentivirales pseudotipados con la envuelta del Virus de la Estomatitis Vesical transducen de manera muy eficiente (>80%) las células T aloespecíficas, de manera que puede obtenerse una población de células CD4+ que expresa el homodímero CD94 (no transmisor de señales) o bien el heterodímero inhibidor (CD94/NKG2A) o el activador (CD94/NKG2C), permitiendo de esta manera el análisis de la participación de estos receptores en las respuestas crónicas aloespecíficas.

**29. INDUCCIÓN DE ANERGIA EN LINFOCITOS PRIMARIOS CD4+ POR EL VIRUS DE LA HEPATITIS C.** *Domínguez-Villar M, Muñoz-Suano A, Anaya-Baez B, Rodríguez-Iglesias MA, García-Cózar FJ.* Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Puerto Real/Facultad de Medicina de Cádiz. Universidad de Cádiz. España.

La infección por el virus de la Hepatitis C (HCV), crónica en un 85-90% de los casos, existiendo datos que apoyan un papel de la anergia en la inducción de tolerancia al HCV, mecanismo por el cual el virus escaparía al sistema inmune explicándose de este modo su persistencia y el paso a un estado de infección crónica.

Se ha descrito que el core de HCV activa el factor nuclear de células T activadas (NFAT) en células Jurkat<sup>(1,2)</sup> y por otro lado nosotros hemos descrito que NFAT1 está implicado en la inducción de un programa transcripcional que da lugar a anergia<sup>(3,4)</sup>. Recientemente se ha descrito en células tumorales Jurkat una inhibición de la expresión de IL2 en células que expresan HCV-core de forma estable y que a pesar de estar realizado en células tumorales se ha relacionado con la anergia<sup>(5)</sup>. Nosotros hemos expresado core de HCV en linfocitos primarios utilizando vectores lentivirales y hemos demostrado que en los linfocitos transducidos se induce upregulación de "genes inductores de anergia"<sup>(6)</sup> y un estado de no respuesta compatible con la anergia.

**Bibliografía:** 1) Bergqvist, A, S. Sundstrom, L.Y. Dimberg, E. Gylfe, and M.G. Masucci. 2003. The hepatitis C virus core protein modulates T cell responses by inducing spontaneous and altering T-cell receptor-triggered Ca<sup>2+</sup> oscillations. *J Biol Chem* 278, no. 21:18877. 2) Houshmand, H, and A. Bergq-

vist. 2003. Interaction of hepatitis C virus NS5A with La protein revealed by T7 phage display. *Biochem Biophys Res Commun* 309, no. 3:695. 3) Macian, F, F. García-Cozar, S.H. Im, H.F. Horton, M.C. Byrne, and A. Rao. 2002. Transcriptional mechanisms underlying lymphocyte tolerance. *Cell* 109, no. 6:719. 4) Macian, F, S.H. Im, F.J. García-Cozar, and A. Rao. 2004. T-cell anergy. *Curr Opin Immunol* 16, no. 2:209. 5) Sundstrom, S, S. Ota, L.Y. Dimberg, M.G. Masucci, and A. Bergqvist. 2005. Hepatitis C virus core protein induces an anergic state characterized by decreased interleukin-2 production and perturbation of mitogen-activated protein kinase responses. *J Virol* 79, no. 4:2230.

**30. INDUCCIÓN DE TOLERANCIA POR EL VIRUS DEL PAPILOMA HUMANO.** Anaya-Baez B, Domínguez-Villar M, Muñoz-Suano A, García-Cózar FJ, Rodríguez-Iglesias MA. Unidad de Investigación del Hospital Universitario de Puerto Real/Facultad de Medicina de Cádiz. Universidad de Cádiz. España.

La incapacidad del sistema inmune para eliminar completamente el Virus del Papiloma Humano (HPV), da lugar a la persistencia del virus y eventualmente al desarrollo de tumores malignos.

La dificultad para analizar la respuesta específica de linfocitos CD4+, frente a antígenos del virus, ha impedido conocer en profundidad los factores que subyacen a esta falta de respuesta y analizar fenómenos como la inducción de anergia en linfocitos a los que se le esta presentando antígenos del virus.

La posibilidad de disponer de estudios multiparamétricos y ensayos cuantitativos para medir la respuesta de citoquinas antígeno específicas en linfocitos TCD4+, nos permite analizar el perfil de citoquinas expresado por las células antígeno específicas y discriminar una respuesta productiva, en individuos capaces de eliminar el virus de una respuesta compatible con anergia, en individuos en los que el virus persiste.

Utilizando citometría de flujo hemos analizado la respuesta de citoquinas mediante marcaje intracelular en respuesta a antígenos de HPV, comparando las respuestas en individuos que han resuelto la infección y en individuos afectados de papilomatosis laríngea.

**31. MADURACIÓN Y DESARROLLO SECUENCIAL DEL SISTEMA INMUNE A LO LARGO DE LA GESTACIÓN: ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS.** Pérez A<sup>1</sup>, Álvaro-Meca A<sup>1</sup>, Gurbindo MD<sup>2</sup>, Seoane E<sup>1</sup>, Resino S<sup>1</sup>, Aguarón A<sup>3</sup>, Muñoz-Fernández MA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, H.G.U. Gregorio Marañón (Madrid). <sup>2</sup>Servicio de Inmuno-Pediatría, H.G.U. Gregorio Marañón (Madrid). <sup>3</sup>Servicio de Ginecología y Obstetricia, H.G.U. Gregorio Marañón (Madrid).

**Objetivo:** Investigar la maduración y desarrollo del sistema inmune en los recién nacidos pretérmino y a término, analizando las diferentes poblaciones y subpoblaciones linfocitarias a lo largo del último periodo de la gestación.

**Metodología:** Estudio transversal descriptivo, en niños sanos nacidos de madres sin antecedentes patológicos, en el H.G.U. Gregorio Marañón de Madrid. Se dividió a los niños en 4 grupos, según la edad gestacional de nacimiento: a) grupo 35-36: 12 niños nacidos en semana de gestación 35 ó 36; b) grupo 37-38: 12 niños nacidos en semana 37 ó 38; c) grupo 39-40: 12 niños nacidos en semana de gestación 39 ó 40; d) grupo 41-42: 12 niños nacidos en semana 41 ó 42. El grupo 35-36 es el grupo de niños pretérmino y los otros 3 grupos son de niños nacidos

a término. Las subpoblaciones linfocitarias se midieron por citometría de flujo de 4 colores. En el análisis estadístico se aplicó el test no paramétrico de la U de Mann-Whitney, debido a que no se conoce la distribución de los datos y el tamaño muestral en todos los grupos es inferior a 30.

**Resultados:** En el análisis inicial de las poblaciones T (CD3+CD4+ y CD3+CD8+), NK (CD3-CD56+) y B (CD19+), se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos 35-36 y 41-42 en el %CD3+CD4+ (p=0.003) y el %CD3+CD8+ (p=0.05), siendo en ambos casos mayores en el grupo de los niños pretérmino. Sin embargo, los niños del grupo pretérmino (35-36) tuvieron valores inferiores en el % de NK (CD3-CD56+) que los niños del grupo 41-42 (p=0.02). No hubo diferencias significativas en el % de linfocitos B (CD19+). No se encontraron diferencias entre las poblaciones descritas, cuando se evaluaron en término de números absolutos. En el estudio de subpoblaciones linfocitarias, los niños del grupo pretérmino tuvieron menos células T activadas (CD3+CD71+) y más CD8 inmaduras (CD8+CD38+) que cualquiera de los 3 grupos a término, pero menos CD8 efectoras (CD8+CD27-CD45RA+) que el grupo 41-42, encontrándose en todas ellas diferencias estadísticamente significativas. Además, se encontraron diferencias significativas dentro de los 3 grupos de niños a término: más células T activadas (CD3+CD71+) y menos CD4 memoria activadas (CD4+CD45RO+HLA-DR+) en el grupo 37-38 que en los otros dos. En el grupo 39-40, se encontraron CD8 activadas en mayor número que en el grupo 37-38 y más CD8 vírgen (CD8+CD27+CD45RA+) que en el grupo 41-42. Sin embargo, hubo menores valores de CD8 efectoras (CD8+CD27-CD45RA+) en los grupos 37-38 y 39-40 que en el grupo 41-42. Respecto a las subpoblaciones de linfocitos B, encontramos valores significativamente más altos de CD19+HLA-DR+ y de CD19+CD40+HLA-DR+ en el grupo pretérmino que en el grupo 39-40, y valores más altos también de CD19+CD5+HLA-DR+ que en los grupos 39-40 y 41-42 (a término).

**Conclusiones:** Nuestros datos apuntan a que las diferencias encontradas en las subpoblaciones linfocitarias entre niños pretérmino y a término, e incluso las encontradas entre los grupos gestacionales considerados como a término, pueden deberse a una maduración y desarrollo secuencial del sistema inmune a lo largo de la gestación.

**32. ACTIVIDAD PEPTIDASA DE LAS CÉLULAS DECIDUALES HUMANAS.** Ruiz Magaña MJ, Blanco O, Muñoz Fernández R, Tirado I, Vives F, Alba, F, García Olivares E. Unidad de Inmunología y Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

**Introducción.** Las células deciduales estromales (DSC, decidual stromal cells) humanas son el componente predominante de la decida, el tejido en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Las DSC presentan diversas características y actividades inmunitarias que probablemente las implican en la interrelación inmunológica entre la madre y el feto. Una de estas características es la elevada expresión en la membrana de los antígenos CD26, CD10 y CD13. La peculiaridad de estas moléculas es que son peptidasas, CD26 (dipeptidil peptidase IV), CD10 (neutral endopeptidase), y CD13 (aminopeptidase N), con capacidad potencial de degradar péptidos funcionalmente relevantes.

**Objetivos.** El objetivo del presente trabajo cuantificar la actividad de estas enzimas en DSC humanas purificadas.

**Métodos.** Se ha cuantificado la actividad peptidasa frente a distintos sustratos mediante fluorimetría en DSC purificadas y viables.

**Resultados y Conclusiones.** Se ha observado que las DSC mostraban intensa actividad peptidasa de membrana compatible con CD10, CD13 y CD26. Esta actividad peptidasa es relevante en la funcionalidad de la decidua, pues estas moléculas de membrana pueden actuar (inhibiendo o activando) sobre diversos peptidos (hormonas, citoquinas, factores de crecimiento) del espacio extracelular, modulando, por tanto, actividades gestacionales e inmunitarias. Así, CD13 puede inactivar la IL-8, mientras que CD10 puede degradar F-MLP, IL-1 y oxitocina. CD26, puede degradar colágeno y afectar a la adhesión de la placenta durante el parto.

## SESIÓN 2: AUTOINMUNIDAD Y GENES

**Moderadores:** Francisco Lozano (Hospital Clinic, Univ. Barcelona), Javier Martín (Inst. López Neyra, CSIC, Granada)

### 33. INFLUENCIA DE VARIOS POLIMORFISMOS EN EL GEN CARD15 EN LA INCIDENCIA DE LA ENFERMEDAD DE CROHN (EC) Y LA PRESENCIA DE AUTOANTICUERPOS. Castro P<sup>1</sup>, Suárez A<sup>2</sup>, Mozo L<sup>1</sup>, Gutiérrez C<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup>Departamento de Biología celular. Universidad de Oviedo.

Tanto factores genéticos como ambientales han sido identificados en el origen de la EC. La asociación genética más fuerte encontrada es la de la región pericéntrica del cromosoma 16 (locus IBD1). Aquí se encuentra el gen CARD15, antes denominado NOD2. Este gen codifica una proteína implicada en la respuesta al lipopolisacárido bacteriano (LPS) a través de la activación de NFκB. Existen en este gen varios polimorfismos que afectan a la función de la proteína y que se han relacionado con mayor susceptibilidad a sufrir esta patología. Concretamente estudiamos las frecuencias de los polimorfismos Pro268Ser, Arg702Trp y Gly908Arg mediante polimorfismo de fragmentos de restricción (RFLPs) en 183 controles sanos, 143 pacientes de EC y 98 pacientes de colitis ulcerosa (CU). Realizamos también la determinación de anticuerpos anti-páncreas exocrino (PAB), anti-citoplasma de neutrófilo (ANCA) y anti-células globulares del intestino (GAB) por inmunofluorescencia indirecta (IFI).

En el caso del polimorfismo Pro268Ser, encontramos una elevación de la frecuencia de éste en nuestros pacientes de EC (0.21 en controles sanos y 0.30 en pacientes de EC) ( $p = 0.011$ ). En el polimorfismo Arg702Trp encontramos también una mayor frecuencia en pacientes de EC que en controles sanos (0.019 en controles y 0.087 en EC) ( $p = 0.001$ ). Sin embargo no encontramos diferencias en las frecuencias del alelo Gly908Arg entre la población normal y la población de enfermos de EC. En ninguno de estos polimorfismos encontramos ninguna asociación entre estos y la susceptibilidad a padecer CU.

En cuanto a la presencia de autoanticuerpos (GAB, PAB y ANCA), el polimorfismo Pro268Ser estaba fuertemente asociado con el desarrollo de éstos en enfermos de EC (1,2/2,2 vs 1,1; OR=2.7 (1.4-5.5),  $p = 0.004$ ). En concreto la mayor asociación se encontraba en los autoanticuerpos más característicos de EC, los PAB (1,2/2,2 vs 1,1; OR=2.6 (1.3-5.4),  $p = 0.009$ ).

En resumen, la presencia de las mutaciones Arg702Trp y Pro268Ser se asocia con una mayor susceptibilidad a padecer EC y en el caso de esta última a desarrollar autoanticuerpos en el curso de la enfermedad, particularmente PAB.

### 34. POLIMORFISMOS DEL GEN CASP- 7 EN LA PROGRESIÓN A CIRROSIS EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VHC. Alvarez Márquez A, Aguilar Reina J, Núñez Roldán A, González Escribano MF. Servicio de Inmunología y Servicio de Digestivo (Sección de Hepatología). Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla.

**Introducción:** Entre los factores que pueden influir en la progresión a cirrosis en los pacientes con infección crónica por VHC se encuentra la expresión de moléculas implicadas en los procesos de apoptosis como la caspasa 7, que es una cistein-proteasa implicada en la fase final o ejecutora de la apoptosis. Se han descrito dos polimorfismos SNP en el gen CASP7 en las posiciones 877(C/G) que se traduce en un cambio de aminoácido (S/T) en todas las isoformas y 892 (G/A) que origina un cambio de aminoácido en la isoforma beta (K249R).

**Objetivo:** Analizar la posible influencia de estos polimorfismos del gen CASP7 en la progresión a cirrosis en los pacientes con infección crónica por VHC.

**Material y Método:** Se estudiaron 278 pacientes con infección crónica por VHC. Este grupo se subdividió según el grado de fibrosis establecido mediante el índice de Scheuer en pacientes con estadios F0-F3 (sin fibrosis-fibrosis avanzada) y pacientes con estadio F4 (cirrosis). El genotipaje de ambos polimorfismos se realizó mediante un sistema de PCR-RFLP. La frecuencia de los haplotipos resultado de la combinación de ambos polimorfismos se obtuvo utilizando el programa haploview v. 2.03. El estudio estadístico se realizó mediante  $\chi^2$ .

**Resultados:** En el análisis del polimorfismo 877 (C/G) observamos que la frecuencia de pacientes portadores de G en esta posición se encontraba ligeramente incrementada en el grupo de pacientes con cirrosis (58.9% vs. 45.4 en el grupo de no cirróticos) si bien esta diferencia no alcanzaba la significación estadística. La frecuencia del alelo G también se encontraba ligeramente aumentada en el grupo de pacientes cirróticos (34.2% vs. 26.3% en el grupo de no cirróticos) aunque sin alcanzar la significación estadística.

Respecto al análisis del polimorfismo 892 (G/A) observamos una mayor frecuencia de individuos portadores de A entre los pacientes cirróticos (53.4 vs. 42.9% en el grupo de no cirróticos) que no alcanzaba la significación estadística. En este caso, la frecuencia del alelo A se encontraba significativamente aumentada entre los pacientes cirróticos (33.6% vs. 25.1%,  $p = 0.049$ , OR=1.51, 95%CI 0.98-2.31).

En cuanto al análisis de haplotipos, se encontró que 2 haplotipos (877C:892G y 877G:892A) se presentaban en más del 95% de las muestras. Al comparar la frecuencia de ambos haplotipos entre ambos grupos de pacientes observamos que la del haplotipo 877G:892A se encontraba aumentada entre los pacientes cirróticos (32.2% vs. 23.9%,  $p = 0.05$ , OR=1.51, 95%CI 0.98-2.34).

**Conclusión:** Nuestros datos sugieren que la presencia de 877G y 892A en el gen CASP7 puede influir en la evolución a cirrosis en pacientes con infección por VHC

### 35. ASOCIACIÓN DE MICB CON ARTRITIS REUMATOIDE. López-Arbesú R<sup>1</sup>, López-Soto A<sup>1</sup>, Fdez.-Morera JL<sup>2</sup>, Ballina J<sup>3</sup>, López-Alperi M<sup>3</sup>, Martínez-Borra F<sup>3</sup>, Rodríguez-Rodero S<sup>3</sup>, López-Vázquez A<sup>2</sup>, López-Larrea C<sup>2</sup>, González S<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biología Funcional, Facultad de Medicina, Instituto Universitario de Oncología, Universidad de Oviedo, Oviedo, España. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Hospital Central de Asturias, Oviedo, España. <sup>3</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Central de Asturias, Oviedo España.

La artritis reumatoide es una enfermedad poligénica. Recientemente se ha descrito la asociación de una segunda región de susceptibilidad en el MHC de clase III independiente de HLA-DRB1. Esta región está formada por los genes IkbL, ATP6G, BAT1 y MICB. MICB es una glicoproteína celular inducida por estrés, la cual se encuentra sobreexpresada en la sinovial de pacientes con artritis reumatoide.

**Objetivo:** Nuestro objetivo es determinar si MICB está asociado con la susceptibilidad a artritis reumatoide, para lo cual se ha tipado HLA-DRB1, MICA y MICB en una población de 147 pacientes con artritis reumatoide y 136 controles sanos mediante PCR-SSP.

**Resultados:** La frecuencia de HLA-DR4 estaba aumentada en pacientes (21,32% vs 34,69%,  $p=0,015$ ,  $OR=1,96$ ) siendo la frecuencia de DRB1\*0401 la más aumentada (4,41% vs 13,6%,  $p=0,0095$ ,  $OR=3,41$ ). La frecuencia del HLA-DR8 también está incrementada en pacientes (2,2% vs 12,24%,  $p=0,00563$ ,  $OR=6,18$ ). La frecuencia de los alelos del HLA-DRB\*1 que tienen el epitopo compartido (DRB1\*01, \*0401, \*0404, \*0405, \*0408, \*1001 y \*1402) está aumentada en enfermos (42,65% vs 63,06%,  $p=0,00059$   $OR=2,3$ ). Por otra parte HLA-DR 15 presenta un efecto protector de la susceptibilidad a la artritis reumatoide (29,41% vs 13,60%,  $p=0,00149$   $OR=0,38$ ). El estudio de MICB reveló que MICB 0104 está aumentado en enfermos con respecto a los controles (13,04% vs 20,07%,  $p=0,04617$   $OR=1,61$ ). MICB 0104 no está en desequilibrio de ligamiento con ningún HLA-DRB\*1 lo cual sugiere que esta asociación es independiente del MHC clase II. Sin embargo no hemos encontrado asociación ninguna de la enfermedad con ningún alelo de MICA.

**Conclusiones:** Nuestros resultados, junto con el papel de MICB en la patogenia de la artritis reumatoide, sugieren que MICB puede ser un segundo gen asociado con la susceptibilidad al desarrollo la artritis reumatoide independiente de MHC de clase II.

### 36. ASOCIACIÓN DE HAPLOTIPOS MBL-2 (MANNANOSE-BINDING LECTIN 2) CON ENFERMEDAD CELÍACA EN LA POBLACIÓN DE CÓRDOBA. *González RA\**, *Rodríguez-Reynoso MF\*\**, *Miró M\**, *Cantisán, S\**, *Jiménez J\*\**, *Sánchez-Ruiz F\*\**, *Peña J\**. \*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. \*\* Unidad de Gastroenterología Pediátrica, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

**Introducción:** La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa intestinal de base inmunitaria, debida a intolerancia al gluten en individuos genéticamente predispuestos que presenta asociación con determinados genes del sistema HLA. También existen evidencias de correlación entre MBL-2 y enfermedad celiaca en diversas poblaciones. Sin embargo el grado de asociación varía entre los diferentes grupos étnicos e incluso entre poblaciones relativamente cercanas.

**Objetivos:** Estudiar la asociación entre el polimorfismo de los genes MBL2 y enfermedad celiaca en la población de Córdoba.

**Pacientes y Métodos:** Se han estudiado 50 familias de pacientes celiacos seguidos en la Unidad de Gastroenterología Pediátrica del Hospital Reina Sofía de Córdoba. Todas estas familias tenían la particularidad de que los enfermos tenían al menos un hermano HLA idéntico. Se analizaron los polimorfismos de MBL-2 mediante la amplificación de ácidos nucleicos del promotor y el exón 1 (INNO-LIPA MBL-2). La reacción se realiza mediante PCR múltiple. Este sistema discrimina entre los haplotipos HYP A, LYP A, LXPA, LYQA, HYPD, LYPB, LYQC. El estudio familiar (enfermo, hermano HLA idéntico y los dos padres) nos permitió el estudio de la frecuencia de los diversos genes por separado así como de los haplotipos. También se estudiaron 50

familias sin enfermedad celiaca para la asignación de los haplotipos en la población control. Se calculó el riesgo relativo y la fracción etiológica para cada alelo y haplotipo.

**Resultados y Conclusiones:** La frecuencia de los alelos y genotipos MBL2 varían significativamente entre los pacientes celiacos y controles sanos. Se analizará si el estado heterocigoto u homocigoto influye el grado de susceptibilidad. Se presentará también los datos correspondientes al estudio de haplotipos con mayor asociación a EC, así como aquellos haplotipos más frecuentes en los hermanos sanos de pacientes con EC y que son HLA idénticos. Polimorfismo MBL2 puede suponer un factor de riesgo añadido para enfermedad celiaca y podría ayudarnos a conocer el riesgo de padecer esta enfermedad en hermanos HLA idénticos al paciente

### 37. ANÁLISIS DE UN POLIMORFISMO FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN NFKB EN ARTRITIS REUMATOIDE Y LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. *Sánchez E<sup>1</sup>*, *Orozco G<sup>1</sup>*, *Collado MD<sup>1</sup>*, *García A<sup>2</sup>*, *Jiménez-Alonso J<sup>1</sup>*, *Martín J<sup>1</sup>*. <sup>1</sup> Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra" (CSIC), Granada. <sup>2</sup> Hospital Virgen de las Nieves, Granada.

**Introducción:** El factor nuclear (NF)- $\kappa$ B se encuentra sobreexpresado en el sinovio de pacientes con artritis reumatoide (AR), por el contrario la activación de NF $\kappa$ B está disminuida significativamente en pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES). Estas observaciones sugieren que el mecanismo patológico de regulación de NF $\kappa$ B tiene un papel importante en estas enfermedades autoinmunes. Recientemente, ha sido identificada una inserción-delección (-94ins/delATTG), localizada en el promotor entre dos elementos reguladores esenciales, mostrando un efecto en la transcripción de este gen *NFKB1*. Por otra parte el gen *NFKB1* se localiza en la región cromosómica 4q, la cual ha sido descrita por rastreamiento sistemático del genoma, como una región de asociación de AR y LES. De manera, que el gen *NFKB1* parece ser un gen candidato desde el punto de vista posicional y funcional, para el estudio de la AR y el LES.

**Objetivos:** El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de este polimorfismo (-94ins/delATTG) del gen *NFKB1* en la susceptibilidad/severidad a la AR y al LES.

**Metodología:** Se analizó la distribución de este polimorfismo en 272 pacientes de AR, 181 pacientes de LES y 264 controles sanos. El tipaje se realizó mediante polymerase chain reaction (PCR) combinada con tecnología fluorescente.

**Resultados:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución genotípica y alélica de este polimorfismo entre pacientes de AR o LES y controles. Tampoco encontramos asociación del polimorfismo de *NFKB1* y parámetros demográficos y clínicos testados para pacientes de AR y LES.

-94 ins/delATTG N= 272 (%)	Pacientes AR N= 181 (%)	Pacientes LES N= 264 (%)	Controles
<b>Genotipos</b>			
del/del	29 (10.7)	19 (10.5)	37 (14)
del/ins	131 (48.2)	89 (49.2)	113 (42.8)
ins/ins	112 (41.2)	73 (40.3)	114 (43.2)
<b>Alelos</b>			
del	0.35	0.35	0.35
ins	0.65	0.65	0.65

**Conclusiones:** Nuestros datos sugieren que el polimorfismo funcional -94ins/delATTG del promotor del gen NFKB1 no juega un papel relevante en AR y LES en nuestra población.

**38. EL POLIMORFISMO PADI4\_104 NO SE ASOCIA CON LA ARTRITIS REUMATOIDE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.** *Valdivia Pérez A<sup>1</sup>, Martínez Doncel A<sup>1</sup>, Fernández-Arquero M<sup>1</sup>, Pascual-Salcedo D<sup>2</sup>, Balsa A<sup>3</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>, Urcelay E<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos (Madrid). Servicios de <sup>2</sup>Inmunología Clínica y <sup>3</sup>Reumatología, Hospital Universitario La Paz (Madrid).

**Introducción:** El gen *PADI4* codifica para una isoforma hematópoyética de la enzima citrulinadora peptidilarginil deiminasa. Un haplotipo del gen *PADI4* se ha asociado recientemente con susceptibilidad a la artritis reumatoide (AR) en Japón. Posteriormente un estudio realizado con población británica no pudo confirmar esta asociación

**Objetivos:** estudio del polimorfismo *PADI4\_104* (localizado en la posición 349 del 4º exón del gen *PADI4*) como marcador de dicho haplotipo de riesgo y su posible influencia en la susceptibilidad a la AR en la población española.

**Metodología:** se realizó un estudio caso-control en 354 pacientes con AR y 498 controles. También se hizo un test de desequilibrio de transmisión (TDT) con 53 familias del Consorcio Europeo de AR (CEAR). El análisis del polimorfismo se realizó mediante PCR cuantitativa a tiempo real en un ABI Prism 7700.

**Resultados:** En el estudio caso-control no se demostró asociación entre la AR y el alelo menos frecuente de este polimorfismo (genotipo CC, 16.1% en AR y 14.3% en controles.  $p=0.46$ ,  $OR=1.15$  [IC 95%=0.78-1.71]). En el TDT no se detectaron diferencias en la transmisión de alelos ( $p=0.44$ ).

**Conclusiones:** los resultados de nuestro grupo y del estudio británico sugieren que el haplotipo asociado con susceptibilidad en Japón no juega un papel en la susceptibilidad a la AR en poblaciones caucásicas.

**39. ASOCIACIÓN A DIABETES TIPO 1 DE HAPLOTIPOS INFERIDOS EN INTERLEUCINA-12 E INTERFERÓN- $\gamma$ .** *Santiago Álvarez JL<sup>1</sup>, Urcelay García E<sup>1</sup>, Martínez Doncel A<sup>1</sup>, de la Calle H<sup>2</sup>, Fernández-Arquero M<sup>1</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica, H. Clínico San Carlos. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Endocrinología, H. Ramón y Cajal. Madrid.

**Introducción y Objetivos:** La Diabetes tipo 1 (T1D) es una enfermedad autoinmune multifactorial con perfil de respuesta Th1 y cuyos principales genes de susceptibilidad se encuentran en el MHC. Se ha postulado la existencia de otros genes relacionados con esta patología en diferentes cromosomas. Dado que la T1D se correlaciona con la producción de citocinas tipo 1, decidimos estudiar las asociaciones con la enfermedad de dos citocinas de este grupo, la Interleucina 12 (IL-12) concretamente la subunidad p40 localizada en la región 5q31 y el Interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) situado en el cromosoma 12.

**Metodología:** Realizamos un estudio caso-control con los haplotipos formados por dos microsatélites y un SNP para la IL-12, y por dos microsatélites para el IFN- $\gamma$ . Las frecuencias haplotípicas se estimaron mediante el algoritmo de expectación-maximización implementado por el programa informático Arlequin v 2000. Tanto en enfermos

como en controles descartamos los haplotipos infrecuentes fijando el punto de corte en el 3%. Solo consideramos valores de p estadísticamente significativos los que así resulten una vez corregidos por el número de haplotipos diferentes listados. El tamaño muestral fue de 556 haplotipos en diabéticos frente a 980 en controles para la IL-12 y de 596 vs 898 respectivamente en el caso del IFN- $\gamma$ .

**Resultados:** Encontramos diferencias significativas en los haplotipos: D5S2038\*4/D5S1352\*1/SNP1188A (13 haplotipos en enfermos vs 55 en controles;  $OR=0.40$ ,  $p_c=0.0405$ ) y D5S2038\*8/D5S1352\*2/SNP1188C (20 vs 12;  $OR=3.01$ ,  $p_c=0.0255$ ) de IL-12. En cuanto al IFN- $\gamma$  el haplotipo D12S313\*9/IFN $\gamma$ \*1 era más frecuente en enfermos que en controles (94 vs 95;  $OR=1.58$ ,  $p_c=0.0217$ ). Cuando analizamos la presencia simultánea de estos alelos en nuestros individuos, las diferencias no llegaron a ser significativas ni para el conjunto de marcadores que confieren protección ni para los que confieren susceptibilidad.

**Conclusiones:** A partir de los haplotipos inferidos mediante el programa Arlequin podemos definir un haplotipo de susceptibilidad y otro de protección para la IL-12 y en el caso del IFN- $\gamma$  un haplotipo de susceptibilidad. El hecho de encontrar diferencias significativas en haplotipos y no en el análisis de los marcadores por separado nos sugiere que éstos no son polimorfismos etiológicos de la enfermedad sino que son marcadores del gen de susceptibilidad o de protección que se localiza en esos haplotipos.

**40. ESTUDIO DE ALELOS HLA ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN CASTILLA.** *Rodríguez-Pérez R, León VJ<sup>1</sup>, Cacho JL, Bowakin D<sup>2</sup>.* Servicio de Neurología. <sup>1</sup>Serv. de Bioquímica, Hospital Universitario de Salamanca. <sup>2</sup>Serv. Neurología. Hospital Río Hortega. Valladolid.

**Introducción.** Nuestra región, Castilla y León, presenta una población estanca superior a 2 millones de habitantes la cual no ha recibido emigrantes en los últimos siglos, más bien su población ha emigrado. Todo ello hace idónea para un estudio poblacional de enfermedades que aparecen en personas jóvenes con Esclerosis Múltiple, EM. Hemos elegido en nuestro estudio los marcadores HLA A3, B7 y DR15 en enfermos de (EM) de nuestra región.

**Material y Métodos.** Hemos estudiado una serie de 20 de pacientes diagnosticados de EM según criterios de POSER, y 29 sujetos sanos control (SC) El ADN fue extraído mediante la técnica de Salting-Out. Los genes HLA fueron estudiados con Kits Dynal, Asimismo se estudio un marcador genético de EA bien definido como es la Apo E, kit de Innogenetics.

**Resultados.** La frecuencia de alelo HLA A3 fue 41% en EM (24% en GC), el alelo HLA B7 se un 43% (23% en GC) el alelo DR 15 61% en el grupo EM (30% en el GC).

Los resultados obtenidos, equiparables a los obtenidos por otros autores, hace aparecer a los alelos HLA A3, B7 y DR15 como marcadores de factor de riesgo en EM al menos tan fiables como la Apo E.

**41. POLIMORFISMOS DEL MICROSATÉLITE DEL INTERFERÓN-GAMMA EN PACIENTES DE BRUCELOSIS HUMANA.** *Bravo Romero MJ<sup>1</sup>, Lavado Valenzuela R<sup>1</sup>, Colmenero JD<sup>2</sup>, Martín Ibáñez J<sup>3</sup>, López-Nevot MA<sup>4</sup>, Alonso Ortiz A<sup>1</sup>, Caballero González A<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Medicina Interna, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga. <sup>3</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Granada. <sup>4</sup> Sección de Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada.

**Objetivos:** La brucelosis es una zoonosis que se transmite a humanos causada por la infección de *Brucella* spp. La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida por el mundo, especialmente en los países de la cuenca Mediterránea. Además de los factores ambientales y la virulencia del patógeno, está claramente establecido que los factores genéticos del hospedador son grandes determinantes de la susceptibilidad así como del desarrollo de la infección. La mayoría de los trabajos que estudian la respuesta inmune frente a brucella han sido realizados en un modelo murino y en éstos se ha puesto de manifiesto que el IFN- $\gamma$  juega un papel fundamental ya que contribuye al control de la infección. En este estudio hemos pretendido determinar si existe susceptibilidad frente a las diferentes variantes alélicas del microsatélite del gen del IFN- $\gamma$ .

**Metodología:** Se tiparon las variantes alélicas de la repetición dinucleotídica (CA) del primer intrón del gen del IFN- $\gamma$  en 77 pacientes de brucelosis mediante PCR y posterior análisis de fragmentos en secuenciador automático y se compararon con un grupo de 99 controles sanos, todos pertenecientes a la misma área geográfica.

**Resultados:** La distribución de los alelos era similar entre los pacientes de brucelosis y los controles. El alelo 1 no se encontró presente en la población estudiada. Se observó en los pacientes de brucelosis una disminución del alelo 4 (9% vs. 17%) con respecto a los controles aunque esta diferencia no era estadísticamente significativa.

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, que el polimorfismo del microsatélite del IFN- $\gamma$  no influye en la susceptibilidad frente a la brucelosis humana.

#### 42. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS DEL GEN CARD15 EN ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL. *Ocaña E, Bohórquez JC, Brieva JA, Nieto A. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

**Introducción:** El aneurisma de aorta abdominal (AAA) consiste en una dilatación localizada y permanente de la pared arterial, con al menos un incremento del 50% de su calibre respecto al diámetro normal esperado. La inflamación crónica transmural es una de las principales características histológicas de los aneurismas de aorta abdominal (AAA) junto con la desorganización de la capa media y la presencia de infiltrados inflamatorios. Existen evidencias que sugieren que diferentes agentes infecciosos, fundamentalmente CMV y *Chlamydia pneumoniae*, pueden jugar un papel importante en la patogénesis de los AAA. Por otra parte, diferentes factores genéticos han sido involucrados en la susceptibilidad a AAA.

CARD15 codifica una proteína intracelular que interviene en el reconocimiento de patógenos y se ha visto que polimorfismos en este gen se asocian con enfermedad de Crohn y con otras patologías inflamatorias.

**Objetivos:** Analizar los polimorfismos del gen CARD15 en pacientes de AAA, así como la asociación de dichos polimorfismos con determinadas características clínicas de la enfermedad.

**Materiales y Métodos:** En este trabajo analizamos los polimorfismos P268S, G908R y L1007fs mediante PCR-RFLP y R702W mediante PCR-SSP en 74 pacientes diagnosticados de AAA y 145 controles sanos de la misma área.

**Resultados:** La frecuencia alélica y genotípica en los controles fue similar a la descrita previamente en la población española. No observamos diferencias significativas en la distribución de frecuencias genotípicas y alélicas de los polimorfismos G908R, P268S y 1007fs en pacientes y controles. Sin embargo, la frecuencia alélica del polimorfismo R702W fue significativamente más elevada en pacientes de AAA (11.4%

vs 5.8%,  $p < 0.03$ ), lo cual se correspondía con una mayor prevalencia del genotipo R702W en el grupo de los pacientes (23% vs 12%,  $p = 0.03$ , O.R.=2.25, 1.01-5.02 95% CI). Esta asociación era independiente del polimorfismo P268S con el que R702W está en desequilibrio de unión completo. No observamos correlación con ninguna de las características clínicas analizadas (edad, tabaquismo, diámetro, sintomatología, signos de enfermedad arterial oclusiva y grado de inflamación, calcificación y neovascularización).

**Conclusiones:** Estos resultados sugieren que el polimorfismo del gen CARD15 podría intervenir en la susceptibilidad genética a AAA.

#### 43. ANÁLISIS DE UN POLIMORFISMO FUNCIONAL EN EL PROMOTOR DEL GEN NFKB1 EN PACIENTES ESPAÑOLES DE COLITIS ULCEROSA. *Oliver J<sup>1</sup>, Gómez-García M<sup>2</sup>, Piñero A<sup>3</sup>, Brieva JA<sup>4</sup>, Nieto A<sup>4</sup>, Martín J<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, Granada, Spain. <sup>2</sup>Servicio Digestivo, Hospital Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>3</sup>Servicio Digestivo, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain. <sup>4</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Puerta del Mar, Cádiz, Spain.*

**Introducción:** La colitis ulcerosa (CU) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa intestinal. Los factores genéticos juegan un papel relevante en la predisposición a dicha enfermedad. En los paciente de CU es característica la destrucción de la mucosa intestinal mediada por una elevada secreción de mediadores inflamatorios, muchos de los cuales están reguladas por el factor de transcripción NF- $\kappa$ B. Recientemente se ha descrito en el promotor del gen NFKB1 una polimorfismo consistente en una inserción-delección (-94ins/delATTG) que afecta a la transcripción del gen. La delección reduce la expresión de NFKB1 y se observó que se asociaba con un mayor riesgo de padecer CU en una población de Norte América.

**Objetivos:** Estudiar la asociación entre el polimorfismo funcional del promotor NFKB1 -94ins/delATTG en la susceptibilidad o severidad de CU en la población española.

**Pacientes y Métodos:** Se analizaron 258 pacientes de CU y 264 controles sanos. Ambos grupos fueron tipados por reacción en cadena de la polimerasa (PCR) combinada con tecnología fluorescente para su resolución por electroforesis capilar.

**Resultados:** No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes de CU y controles ( $p = 0.85$ , OR= 0.98, 95% IC= 0.75-1.27) considerando tanto frecuencias genotípicas como frecuencias alélicas (35% vs 34.88%). Así mismo, tampoco se encontró asociación de este polimorfismo con respecto a las manifestaciones clínicas analizadas.

**Conclusiones:** Los resultados sugieren que el polimorfismo -94ins/delATTG del promotor del gen NFKB1 no parece influir ni en la susceptibilidad ni en las características clínicas de la CU en la población española.

#### 44. ESTUDIO DE LA ASOCIACIÓN DE LOS POLIMORFISMOS DE MICA CON LA ENFERMEDAD DE BEHÇET EN POBLACIÓN ESPAÑOLA. *Muñoz-Saá I, Cambra A, Julià MR, Milà J, Yagüe J\*\*, Pallarés L\*, Espinosa G\*\*\*, Luque A, Serra A, Matamoros N. Servicio de Inmunología y \*Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitari Son Dureta. Palma de Mallorca. \*\*Servicio de Inmunología y \*\*\*Departamento de Enfermedades Autoinmunes, Hospital Clínic. Barcelona.*



**Introducción:** La enfermedad de Behçet (EB) es un síndrome inflamatorio sistémico. Cursa con úlceras bucales y genitales, y puede existir además afectación ocular, cutánea, vascular y del sistema nervioso central. Aunque su etiología es desconocida, el alelo HLA-B\*51 es utilizado como marcador genético de susceptibilidad. La relación de los polimorfismos del gen MICA con esta enfermedad no está clara y ello puede deberse a que la mayoría de los estudios analizan únicamente la región transmembranal (exón 5). En población española, la asociación entre los polimorfismos de la región extramembranal y la EB no está estudiada.

**Objetivo:** Estudiar la posible asociación entre los polimorfismos de los exones codificantes de la región extramembranal del gen MICA con la EB y la frecuencia de dichos polimorfismos en población sana.

**Metodología:** Tipificación del gen MICA (polimorfismos de los exones 2, 3 y 4) mediante PCR-SSP modificada para la detección de los alelos descritos hasta la fecha. Tipificación del gen HLA-B mediante PCR-SSP.

**Resultados:** Nuestros estudios confirman desequilibrios de ligamiento previamente descritos en otras poblaciones (MICA\*001-HLA-B\*18; MICA\*004-HLA-B\*44, MICA\*011-HLA-B\*65, entre otros). Por otra parte, algunos alelos MICA no han sido detectados, probablemente debido a su baja frecuencia o ausencia en nuestra población. Se observa además una frecuencia aumentada del alelo MICA\*009 en la muestra de pacientes con enfermedad de Behçet.

**Conclusiones:** Con el análisis de los polimorfismos de los exones correspondientes a la región extramembranal de MICA detectamos una asociación de un alelo con la EB. Asociaciones de polimorfismos de MICA con la EB no habían sido detectadas en población española al analizar polimorfismos del exón 5 (región transmembranal). Su implicación como locus modulador de la variabilidad clínica de esta enfermedad será objeto de posteriores trabajos.

**45. ASOCIACIÓN DE UN POLIMORFISMO EN EL GEN EBF CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. Mas A<sup>1</sup>, Arroyo R<sup>2</sup>, de las Heras V<sup>2</sup>, Martínez A<sup>1</sup>, Gómez de la Concha E<sup>1</sup>, Urcelay E<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Clínica, <sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Desmielinizantes, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.**

**Introducción y Objetivos:** La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad poligénica, con componente ambiental, con una prevalencia de 60-70 casos de cada 100.000 personas en nuestra población. El componente genético más importante en esta enfermedad se encuentra situado en el complejo principal de histocompatibilidad (MHC), pero diversos estudios de barrido genómico así como el conocimiento de los mecanismos inmunes operativos en la patofisiología hacen pensar que existen más genes implicados, situados en otros cromosomas. Una de las zonas más interesantes es la banda citogenética 5q34, ubicada en el brazo largo del cromosoma 5, donde se encuentra el gen de EBF (early B-cell factor). En este estudio nos planteamos analizar su posible asociación con la susceptibilidad a padecer EM en nuestra población. Para ello estudiamos dos polimorfismos situados en EBF, un factor de transcripción relacionado con el desarrollo linfocitario B e importante en la maduración axonal.

**Metodología:** En este estudio se han incluido 351 pacientes y 524 controles sanos, todos ellos españoles de raza blanca y de la región de Madrid. Los polimorfismos estudiados son una variación A/T situa-

da en el intrón 7 del gen (rs1368297) y el microsatélite D5S2038. Pacientes y controles fueron tipados mediante sondas TaqMan (ensayo a demanda de Applied Biosystems) para el SNP y por PCR seguida de electroforesis capilar para el microsatélite. Procedente de estudios previos disponíamos de datos del HLA, para estratificar por presencia/ausencia de HLA-DRB1\*1501, el principal determinante de susceptibilidad a la enfermedad.

**Resultados:** El alelo A se asociaba significativamente a la enfermedad (OR=1.26; p=0.02). Nuestros datos se ajustaban mejor a un modelo recesivo de herencia (p=0.02; OR=1.39). La asociación era mayor entre los individuos DRB1\*1501<sup>+</sup> (OR=1.78; p=0.005) que entre los individuos DRB1\*1501<sup>-</sup> (OR=1.21; p=0.27) aunque la diferencia entre estratos no llegó a alcanzar significación estadística (p=0.09). No se observaron diferencias cuando dividimos a los pacientes por sexo o forma clínica (primaria progresiva, vs remitente recurrente + secundaria progresiva). El análisis del microsatélite D5S2038 reveló que de los 11 alelos encontrados sólo el alelo 5 presentaba una tendencia a la asociación.

**Conclusiones:** Nuestros datos sugieren la existencia de un nuevo gen de susceptibilidad a la esclerosis múltiple, el gen EBF localizado en 5q34, o algún otro gen en desequilibrio de ligamiento con él situado en esa zona.

### SESIÓN 3: MHC Y TRASPLANTES

**Moderadores:** José Luis Vicario (Centro de Transfusiones, Madrid), Rafael González (Hospital Univ. Reina Sofía, Córdoba)

**46. SENSIBILIDAD DEL TIPAJE POR CITOMETRÍA DE FLUJO: DETECCIÓN DE QUIMERISMO. Rubio García M, Campos Esteban J, Gómez Rial J, Andrés Martín A, Vázquez González A, Castañer Alabau JL. Servicio de Inmunología Hospital Ramón y Cajal, Madrid.**

**Introducción:** A partir de los problemas suscitados en la identificación de los antígenos (Ag) de HLA clase II en un receptor de médula ósea (MO), hemos valorado la capacidad del tipaje por citometría de flujo para la detección de quimerismo. El paciente (BIG, diagnosticado de SCID con 3 meses de edad, DRB1\*11 DRB1\*13 DRB3+ DQB1\*06 DQB1\*03) presentaba reacciones debidas a la presencia del haplotipo materno no heredado (DRB1\*07 DRB4+ DQB1\*02). La detección de este quimerismo justificaba algunas de las manifestaciones cutáneas que presentaba el paciente. Esto nos indujo a buscar el nivel de detección del quimerismo mediante esta técnica.

**Métodos y Protocolo:** Además del caso clínico arriba mencionado se diseñó un protocolo inicial para la detección de quimerismo. Se estudiaron diferentes proporciones de sangre periférica de individuos distintos, ajustando la celularidad de cada uno de ellos respecto al valor del recuento leucocitario. Las concentraciones finales fueron de un 5%-10% de población minoritaria en población mayoritaria. De estas combinaciones se extrajo el DNA mediante UltraClean™ DNA Bloodspin Kit (MO BIO Labs. Inc.). Posteriormente se amplificaron e hibridaron las muestras según los protocolos de los ensayos RSSO1A #003, RSSO1B #005, RSSO2B1 #006 y RSSO2QB1 #002. La lectura se realizó LabScan100 (con el software Lumindex v1.7). La interpretación de los resultados se realizó a partir del valor "peak" de fluorescencia mediante procesamiento manual.

**Conclusiones:** 1) La alta sensibilidad de la técnica de tipaje HLA con fluorescencia sobre "beads" permite la detección de quimerismo. El quimerismo lo hemos detectado en diferencias de un solo alelo tanto en los loci de clase I A y B y de clase II DRB1 y DQB1, aunque cada analito presenta distinta sensibilidad para la detección del mismo. Hasta donde hemos estudiado, se detecta hasta un 5% de población minoritaria.

2) La presencia de quimerismo puede ocasionar resultados no interpretables (con los programas de análisis) debido a la presencia de más de dos alelos en la muestra. Para el análisis manual de la muestra el valor de fluorescencia más sensible es el "peak": canal que cuenta con el mayor número de eventos fluorescentes positivos.

**47. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO -403G/A EN EL PROMOTOR DE RANTES EN RECHAZO AGUDO Y SUPERVIVENCIA DEL ALOINJERTO HEPÁTICO.** *Botella C, Marín L, Moya R, Sánchez-Bueno F\*, Miras M\*, Gómez-Mateo J, López-Alvárez R, Montes O, Guerra N, Minguela A, Robles R\*, Bermejo J\*\*, García-Alonso A, Álvarez R, Muro M. Servicios de Inmunología, \*\*Anatomía Patológica y \*Cirugía, Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca, Murcia.*

**Introducción:** Las quimioquinas y sus receptores juegan un papel importante en las respuestas inflamatorias e inmunes que median la evolución de un trasplante. Estudios recientes revelan que una mutación en posición -403G/A en el promotor del gen de la quimioquina RANTES puede tener significado en varias enfermedades de etiología inmunitaria e infecciosa.

**Objetivos:** Nuestro propósito fue estudiar el polimorfismo del promotor de RANTES en la evolución del trasplante hepático, con relación al desarrollo de rechazo agudo y la supervivencia del injerto.

**Metodología:** Se examinó el polimorfismo de RANTES en 109 trasplantes hepáticos divididos en pacientes con (RA) y sin rechazo agudo (NRA) y se comparó con 101 sujetos control. Se utilizó triple terapia inmunosupresora (metilprednisolona, azatioprina y CsA) con la mayoría de los pacientes o protocolos de inducción basados en Tacrolimus. El diagnóstico de rechazo agudo se basó en criterios clínicos, bioquímicos e histológicos. RANTES se genotipó por PCR-RFLP. Se utilizaron primers específicos de secuencia para amplificar un segmento de 135 bps en la región 5' flanqueando RANTES entre los nucleótidos -513 y -378 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Una base G en el extremo 3' del primer reverso se mutó a C para introducir un sitio de restricción para MaeIII. Los productos PCR se digirieron con 2U de MaeIII a 37°C durante 2 h, y corridos en geles de agarosa al 3%. Los datos obtenidos se analizaron con los tests de Fisher y  $\chi^2$ , método de Kaplan-Meier y el test generalizado de Wilcoxon (programa SPSS).

**Resultados:** De los receptores hepáticos RA, 67.6% tuvieron el genotipo GG, 32.3% el genotipo GA y no se encontró el genotipo AA. La frecuencia del alelo G fue 83.8% y la del alelo A un 16.2%. De los receptores hepáticos NRA, 69.3% fueron genotipo GG, 29.3% fueron GA y 1.3% presentaron el genotipo AA. La frecuencia del alelo G fue 84% y la del alelo A un 16%. No se observaron diferencias significativas en la distribución genotípica y alélica entre los grupos de receptores RA y NRA, receptores hepáticos y controles ( $p > 0.05$ ). Tampoco se obtuvieron diferencias significativas en la supervivencia del aloinjerto hepático con respecto al polimorfismo de RANTES. La superviven-

cia actuarial del aloinjerto hepático a 10 años fue del 61.3% en los receptores con genotipo GG frente al 58.8% en los receptores que presentaban los genotipos GA y AA.

**Conclusión:** El polimorfismo del promotor del gen de RANTES humano no parece influenciar el desarrollo de rechazo agudo, ni la supervivencia del aloinjerto en receptores hepáticos.

**48. NIVELES PRETRASPLANTE ELEVADOS EN SANGRE PERIFÉRICA DE CÉLULAS CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> Y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> PUEDEN FAVORECER LA ACEPTACIÓN DE INJERTOS HEPÁTICOS.** *López Álvarez MR, Miras M, Minguela A, Moya Quiles MR, Gómez Mateo J, Marín L, Marín Moreno I, Robles R, García Alonso AM, Parrilla P, Álvarez López MR. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia.*

**Objetivos:** El trasplante de hígado muestra mejor aceptación que el de otros órganos sólidos. En los últimos años, nuestro grupo ha estudiado distintos factores que influyen en la aceptación de los injertos hepáticos, entre ellos, la compatibilidad HLA, anergización de células T, citoquinas, polimorfismos genéticos, etc. Más recientemente, se ha impulsado el estudio de células T reguladoras, considerando como células reguladoras aquellas que presentan un fenotipo CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y además coexpresan la molécula CTLA-4. El objetivo del presente estudio es valorar los niveles a largo plazo de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica y, con especial interés, de los subtipos CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> en receptores hepáticos.

**Metodología:** En este estudio se han incluido 23 trasplantes hepáticos con un periodo de monitorización postrasplante superior a los 90 días, seleccionados de un total de 95 trasplantes hepáticos de los que además se han excluido los receptores multiorgánicos y los retrasplantes. En los pacientes seleccionados se han recogido un total de 115 muestras de sangre periférica correspondientes a los días 0 (pretrasplante), 7, 15, un mes, tres meses y un año postrasplante. Las cifras absolutas de linfocitos CD4<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> se han estimado mediante citometría de flujo utilizando combinaciones adecuadas de anticuerpos monoclonales. Los pacientes se clasificaron en dos grupos: rechazo agudo (RA, n=6) y no rechazo agudo (NRA, n=17).

**Resultados:** En el pretrasplante, los pacientes del grupo NRA presentan un número absoluto de células CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> dos veces superior al de los del grupo RA. Esta diferencia, aunque atenuada en los primeros meses postrasplante, se mantiene a lo largo de todo el periodo de monitorización, mostrando al año postrasplante una distribución muy similar a la del día 0. Por el contrario, las células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> parten de niveles pretrasplante muy similares en ambos grupos, sin embargo, durante las 3 primeras semanas postrasplante predominan en los pacientes del grupo RA, periodo en el que todos los pacientes sufrieron su rechazo agudo.

**Conclusiones:** Desde el pretrasplante, los pacientes con buena evolución de sus injertos muestran niveles superiores de los subtipos celulares CD4<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CTLA-4<sup>+</sup> que los pacientes que tienden a rechazar sus injertos. Esto parece indicar que dichas células pueden jugar un papel favorecedor de la aceptación del injerto. Sin embargo, la expresión de CD25 en ausencia de CTLA-4, parece correlacionarse mejor con la presencia de células alogénicas activadas frente al injerto.

#### SESIÓN 4: AUTOINMUNIDAD Y TOLERANCIA

**Moderadores:** Cándido Juárez (Hospital Univ. Sant Pau, Barcelona), Francisco J. García-Cozar (Hosp. Puerto Real, Univ. de Cádiz)

49. **LOS PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE (EM) CARECEN DE ANTICUERPOS ANTI SEROALBÚMINA BOVINA (BSA).** López Santalla M, González Gujel E, Gómez Escalonilla C, Rodríguez Juan C, Pérez Blas M, Aguilera Montilla N, Valeri Lozano A, Rodríguez Pérez N, Aguinaga Barrilero A, Martín Villa JM. *Inmunología, Facultad de Medicina Universidad Complutense de Madrid, Madrid.*

**Introducción:** Se ha descrito en pacientes con esclerosis múltiple (EM) la presencia de clones específicos de linfocitos T dirigidos frente a péptidos de la seroalbúmina bovina (BSA<sub>193</sub>), y se ha asociado la susceptibilidad a esta enfermedad con un consumo elevado de leche de vaca. Esta situación recuerda a la descrita en otras patologías autoinmunes, tales como la diabetes mellitus insulino dependiente, donde, además, se han encontrado anticuerpos anti BSA.

**Objetivos:** Dada la complejidad de la caracterización de clones de células T específicos frente a BSA, nos propusimos establecer un sistema de enzimo-inmunoensayo (ELISA) para la detección de anticuerpos anti BSA en el suero de pacientes con EM.

**Pacientes y Métodos:** Se realizó un kit de ELISA propio, en el que en las placas de poliestireno se adhirió BSA. Se analizaron 14 sueros de enfermos con EM, 6 de pacientes con celiaquía y 13 procedentes de individuos sanos, que usamos como grupo control. Los sueros se diluyeron 1/100 en PBS y se revelaron con un suero anti inmunoglobulinas totales humanas, conjugado con peroxidasa. Los resultados en unidades de absorbancia obtenidos se transformaron en unidades arbitrarias (U.A.), usando una recta estándar interna.

**Resultados y Conclusiones:** Con los individuos sanos analizados se estableció un punto de corte, a partir del cual podemos considerar un suero positivo, en 36.1 U.A. En el grupo de pacientes con enfermedad celíaca se obtuvieron resultados positivos en el 67% de los pacientes con un valor medio de 38.3 U.A., claramente positivo. Sin embargo, en el grupo de pacientes con EM, ninguno dio un resultado positivo, con un valor medio de 25.0 U.A.

Como conclusión, no se detectan anticuerpos anti BSA en pacientes con EM, a diferencia de lo descrito en otras enfermedades autoinmunes, lo que plantea dudas sobre la relación entre EM y un elevado consumo de leche de vaca.

50. **PERFIL FENOTÍPICO DE LAS CÉLULAS T REGULADORAS EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.** Sempe-re-Ortells JM<sup>1</sup>, De la Sen M<sup>1</sup>, Navarro-Blasco FF, Pascual E<sup>2</sup>, Campos A<sup>4</sup>, Marco FM<sup>1</sup>, Muñoz C<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Div. de Inmunología, Dpto. de Biotecnología, UA. <sup>2</sup>S. de Reumatología, Hospital General Universitario de Elche. <sup>3</sup>S. de Reumatología y S. de Inmunología, Hospital General Universitario de Alicante, UMH. <sup>4</sup>Div. de Inmunología, Hospital Clínico de San Juan, UMH.

**Introducción:** Desde finales de los 90, se han ido identificando una serie de subpoblaciones de linfocitos T CD4+ con fenotipos característicos, capaces de inhibir la respuesta de otras células T; todas ellas se han agrupado bajo el nombre de células T reguladoras (Treg), y parecen ejercer un importante papel en el mantenimiento de la autoin-

munidad fisiológica y en la prevención de algunas enfermedades autoinmunes (EA). Su papel regulador parece estar mediado por contacto directo célula-célula o mediante liberación de citocinas, pudiendo inhibir respuestas anómalas Th1 y Th2. La Artritis reumatoide (AR) constituye un buen ejemplo de EA mediada principalmente por una respuesta aberrante Th1.

**Objetivos:** caracterizar los principales fenotipos de células Treg en pacientes con AR sin tratar o en tratamiento, tanto durante los brotes como en los periodos de inactividad de la enfermedad.

**Pacientes y Métodos:** El estudio se realizó por citometría de flujo e inmunofluorescencia directa, en sangre total proveniente de 25 controles sanos y de 5 pacientes con AR. Todos los pacientes se hallaban activos en el momento del estudio (Disease Activity Scale-DAS superior a 2.4) y estaban siendo tratados con metotrexate y/o anticuerpos anti-TNF. Los antígenos de membrana analizados fueron CD4, CD25, CD28, CD45RB, CD152 y CD154.

**Resultados y Conclusiones:** Los resultados del fenotipo de membrana celular en los sujetos control fueron los esperados, coincidiendo en gran parte con los hallados por otros autores. Los pacientes presentaron una expresión ligeramente mayor de células CD4+CD45RBlow+ (20% vs.15%) y ligeramente menor de células CD4+CD28+ (85% vs. 97%). Aproximadamente el 2% de sus células T CD4+ expresaban CD25 con una intensidad intermedia/alta y menos del 1% con intensidad alta; estos porcentajes representaban la mitad de los de la población sana. Sin embargo, y especialmente en la población T CD4+ con alta expresión de CD25, en todos los pacientes se observó una mayor coexpresión de los antígenos CD152 y/o CD45RBlow y una menor coexpresión del antígeno CD28, salvo en el paciente con valores de DAS más altos, que no expresaba CD152 y que expresaba valores muy bajos de CD45RBlow. Si bien los resultados obtenidos son preliminares dado el escaso número de pacientes analizados, se observa una tendencia de los mismos a presentar niveles más bajos de Treg que los controles sanos. Sin embargo, la mayor expresión en estas células de antígenos relacionados con respuestas inhibitorias, podría estar relacionada con el grado de control de la enfermedad.

51. **ESTUDIO DE PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES Y ANTÍGENOS EXTRAÍBLES DEL NÚCLEO EN UN ÁREA DE MADRID.** Sánchez Calvin MT, Fernández Chacón T, Manzanares Secades C, Orellana Miguel MA, Galera Moreno G, Aramendi Ramos M, Amérigo González MA. *Ambulatorio Hermanos Miralles. Área 11. Madrid.*

**Introducción.** La gran variedad de manifestaciones clínicas de las enfermedades autoinmunes constituyen un grupo de afecciones importante para un gran número de especialistas. La detección de anticuerpos antinucleares (ANA) y antígenos extraíbles del núcleo (ENA), solicitados ante una sospecha clínica o interpretados en un contexto clínico, son de gran ayuda para el diagnóstico y seguimiento de dichas enfermedades.

El número de peticiones de serología autoinmune está aumentando de forma considerable en nuestro laboratorio. En el año 2004 aumentó un 25% el número de determinaciones de ANA, y un 12% el de ENA, con respecto al año 2003. El objetivo de este trabajo ha sido establecer la prevalencia de estos anticuerpos en la población de nuestro área.

**Material y Métodos.** Se han analizado 2.130 muestras de suero para valorar la presencia de ANA en el periodo comprendido entre mayo de 2003 y febrero de 2005. Las muestras remitidas a nuestro labo-

ratorio proceden de pacientes de consultas tanto de atención primaria como de especializada. A los sueros con resultado positivo para ANA se les estudió posteriormente la presencia o no de ENA (un total de 844 determinaciones).

La detección de ANA se realizó por inmunofluorescencia (IFI) en sustrato Hep-2 (Palex Medical) y los ENA por inmunoblot (InnoLia de Innogenetics).

Se ha calculado la prevalencia de ANA y ENA positivos y hemos analizado cuales son los ENA más frecuentemente encontrados.

**Resultados.** De todas las muestras analizadas 165 presentaban anticuerpos antinucleares positivos lo que indica una prevalencia del 7.7%

De los 165 sueros con ANA positivos, 80 tenían ENA positivos, lo que supone una prevalencia del 48%

Los anticuerpos anti-ENA que hemos encontrado con más frecuencia son: SSA/Ro 52 en un 25%, anti-histonas en el 23.7%, Scl-70 SmB en el 22.5%, SSA/Ro 62 en el 17%. SSB/La e el 17% y RNP A y Cenp B en el 15%.

#### 52. CARACTERIZACIÓN DE UN NUEVO AUTOANTÍGENO RECONOCIDO POR UNA IgM MONOCLONAL SECRETADA POR UN LINFOMA B DE BAJO GRADO. *López Sañudo S, Plaza A, Díaz de Espada F. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid.*

En pacientes con linfoma de células B, sólo en casos excepcionales se secreta una paraproteína al plasma, y en muy pocas de estas situaciones se ha demostrado una actividad autoanticuerpo asociada. Previamente, nuestro grupo identificó un paciente con linfoma folicular de células B de bajo grado que secretaba al suero una paraproteína biclonal IgM $\lambda$ , G $\lambda$ . El estudio por inmunofluorescencia indirecta (IFI) del suero sobre tejidos humanos y de ratón mostró un patrón de tinción inesperado y peculiar sugestivo de una nueva especificidad. Se apreciaba una tinción intracitoplásmica filamentosa sobre Hep-2 y una tinción intersticial granular en glomerulos, áreas intertubulares de la corteza y médula renal, vasos sanguíneos, muscularis mucosa, capa muscular gruesa del estómago y alrededor de los hepatocitos en cortes de tejido de ratón. Tras aislamiento por cromatografía de exclusión molecular de las IgG e IgM monoclonales, se comprobó que sólo esta última presentaba la actividad autoanticuerpo. Un hibridoma obtenido por fusión con células tumorales del paciente secretaba un anticuerpo monoclonal (AcMc) IgM $\lambda$  (2E4F4) con idéntica actividad de anticuerpo.

Se estudió la naturaleza del antígeno reconocido por el AcMc 2E4F4 mediante técnicas de inmunoprecipitación, empleándose células HeLa marcadas metabólicamente con <sup>35</sup>[S]-cisteína/metionina. Tras SDS-PAGE se apreció una banda de 42 KDa, que se identificó por técnicas de huella peptídica/espectrometría de masas, como  $\beta$ / $\gamma$ -actina, formas típicas del citoplasma y músculo entérico. Se comprobó mediante técnicas de ELISA y Western blot que el AcMc 2E4F4 reconoce G-actina de músculo bovino.

Aunque la actividad autoanticuerpo de la IgM sérica en pacientes con linfoma ha sido descrita anteriormente, no conocemos estudios previos que muestren actividad autoanticuerpo asociada a componentes individuales de una gammapatía biclonal. El patrón de tinción observado en IFI no se corresponde canónicamente con ninguno de los patrones habitualmente asociados a enfermedades autoinmunes. La única patología observada en el paciente fuera de su proceso linfomatoso fue una eritroblastopenia permanente. La tinción de filamentos citoplasmáticos recuerda los patrones asociados a reactividad con pro-

teínas del citoesqueleto, lo que, unido a la reactividad con diversos tejidos podría explicarse por la presencia de moléculas de actina. La identificación de nuevas parejas antígeno-anticuerpo en humanos siempre es de utilidad para ayudarnos a conocer mejor el papel de los anticuerpos en la patología de las enfermedades autoinmunes y para entender mejor la relación existente entre cáncer y autoinmunidad.

#### 53. ESTUDIO MULTICÉNTRICO Y META-ANÁLISIS: ACCP EN POBLACION ESPAÑOLA. *Martín MC<sup>1</sup>, Valdivia A<sup>1</sup>, Loza E<sup>1</sup>, Pascual-Salcedo D<sup>2</sup>, Ruiz de Alegría C<sup>3</sup>, López S<sup>4</sup>, Fernández A<sup>5</sup>, Figueredo MA<sup>1</sup>. <sup>1</sup>H. C. San Carlos- Madrid; <sup>2</sup>H. U. La Paz-Madrid; <sup>3</sup>H.U. Marqués de Valdecilla-Santander; <sup>4</sup>H. Puerta de Hierro-Madrid; <sup>5</sup>H.U. Virgen del Rocío-Sevilla.*

**Objetivos:** Los anticuerpos contra el péptido cíclico citrulinado (ACCP) en suero como marcador en artritis reumatoide (AR) han sido en los últimos años objeto de múltiples estudios individuales en diversos hospitales de España, por lo que parece útil aunar estos resultados en la medida de lo posible en un estudio multicéntrico, con la intención de aumentar la potencia del estudio y posteriormente para hacer una revisión sistemática y metaanálisis. Se persigue determinar el efecto conjunto para llegar a un consenso sobre los índices diagnósticos de esta prueba. También se analizará la eficacia comparándola con la del factor reumatoide y el uso conjunto de ambos, así como el valor del ACCP como predictor de AR.

**Metodología:** El estudio se divide en dos partes: una a partir de datos ya publicados y otra de las bases de datos proporcionadas por servicios de inmunología de varios hospitales de España. Los criterios de inclusión para ambos grupos son partir de una población de pacientes con poliartritis de comienzo y AR y utilización de los criterios del ACR (American College of Rheumatology) para el diagnóstico definitivo de AR. Los criterios de calidad empleados son los de Flynn. En la primera parte se analizan los criterios de validez diagnóstica (sensibilidad, especificidad, valores predictivos, cocientes de probabilidad y valor global de la prueba) y en la segunda los estimadores conjuntos para los índices diagnósticos, el área global bajo la curva y el Odds Ratio diagnóstico. El software para el análisis estadístico fue el SPSS 12.0, el Metadisc 1.1 beta y el Revman 4.2.

**Resultados:** Tanto las bases como la bibliografía revisada hasta el momento son heterogéneas en cuanto a la baremación de calidad de Flynn. Los índices obtenidos a partir de las bases de cada Centro y los publicados coinciden en la utilidad del anticuerpo, encontrándose valores altos de sensibilidad y especificidad aunque en esta última difieren significativamente.

**Conclusiones:** El bajo tamaño muestral en los estudios llevados a cabo de forma individual en cada Centro hace necesario que un análisis global multicéntrico permita aumentar la potencia y dar cohesión a los resultados para optimizar el uso de las herramientas diagnósticas a nuestro alcance y en particular para revisar la utilidad de los ACCP como marcador precoz.

#### 54. CAPACIDAD ANTIPROLIFERATIVA DISMINUIDA DE LOS LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> REGULADORES EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. *Gómez J<sup>1</sup>, López P<sup>2</sup>, Suárez A<sup>2</sup>, Gutiérrez C<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias, Oviedo. <sup>2</sup>Departamento de Biología Funcional, Área de Inmunología, Universidad de Oviedo*

Los linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> son células inmunoregulatoras que actúan a través de contactos intercelulares. Su activación pudiera depender en particular de las células dendríticas mieloides y se les atribuye un papel clave en la tolerancia periférica y en la iniciación de enfermedades autoinmunes, aunque aún no han sido suficientemente estudiados. En este trabajo nos propusimos evaluar la actividad inhibitoria de las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> de pacientes con lupus eritematoso sistémico (LES) sobre la proliferación linfocitaria en cultivos mixtos (MLR) bajo estimulación alogénica con células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). Se aislaron monocitos de sujetos normales mediante el método de separación por columnas magnéticas de Miltenyi Biotec, diferenciados en células dendríticas con GM-CSF e IL-4, y maduradas con TNF $\alpha$ . Por el mismo procedimiento se obtuvieron linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> y T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> de pacientes y sujetos sanos, y se realizaron cultivos mixtos con MDDC y linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> o T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> en proporciones de 1:5, 1:10 y 1:20 en relación con las células respondedoras. Todas las combinaciones se realizaron en triplicados y la proliferación se evaluó por incorporación de timidina tritiada. Encontramos que en pacientes con LES, la adición de linfocitos T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> provocó una inhibición más baja y heterogénea de la proliferación linfocitaria que en los controles, en los que se observó una inhibición importante. En ninguno de los dos grupos se observó inhibición sustancial a la proporción de 1:20 donde la proliferación fue comparable con el control positivo. Concluimos que las células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> exhiben una inhibición cuantitativamente menor sobre la proliferación linfocitaria en el grupo de pacientes que en los sujetos sanos, que puede interpretarse por un deterioro de la función reguladora o más probablemente por la presencia de células efectoras activadas, también CD25<sup>+</sup>, en la población de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> aisladas.

**55. ANTICUERPOS ANTI-ANTÍGENO DE PROLIFERACIÓN CELULAR (PCNA): DETECCIÓN EN UNA PACIENTE CON MIOPATÍA INFLAMATORIA IDIOPÁTICA Y REVISIÓN DE SU VALOR DIAGNÓSTICO.** *Almarza S, Mozo L, Caminal L\*, Suárez A, Gutiérrez C. S. de Inmunología y \*S. de Medicina Interna. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo.*

Los Ac anti-antígeno de proliferación celular (PCNA) son detectados muy infrecuentemente durante la determinación rutinaria de ANAs en muestras patológicas. Estos autoAc reaccionan con un polipéptido intranuclear de 34 kD cuya expresión es máxima en las fases G1 tardía y S temprana del ciclo celular y que ha sido identificado como una proteína auxiliar de la DNA polimerasa  $\delta$ . Los Ac anti-PCNA han sido detectados casi exclusivamente en un bajo porcentaje (3-5%) de pacientes con LES por lo que se han venido considerando como específicos de la enfermedad.

En nuestro laboratorio, hemos detectado la presencia de anticuerpos anti-PCNA en una paciente de 43 años diagnosticada de probable miositis de cuerpos de inclusión en base a datos clínicos, electromiográficos y anatomopatológicos. La paciente no presentaba ningún síntoma ni signos asociados a LES. Mediante IFI, utilizando células HEP-2 como sustrato, se observó la presencia de la tinción característica de Ac anti-PCNA consistente con la variable expresión del antígeno durante el ciclo celular. La especificidad anti-PCNA fue confirmada por inmunodifusión radial con un suero prototipo perteneciente a un paciente con LES y por la reacción del suero de la paciente con PCNA purificado absorbido en tiras. Confirmando estos hallazgos, mediante IB uti-

lizando un extracto nuclear de células HeLa, se detectó reactividad frente a una proteína de peso molecular compatible con PCNA.

En la literatura publicada, se han descrito pocos casos de positividad anti-PCNA en patologías diferentes al LES. Entre ellos, hay un paciente con glomerulonefritis proliferativa idiopática, otro con artritis seronegativa y tres pacientes con disfunción gastrointestinal. Además, mediante IB y ELISA usando como antígeno PCNA recombinante de rata, estos autoAc se han encontrado en el 7-18% de un grupo de pacientes japoneses con hepatitis crónica viral B y C. En nuestra experiencia, no se detectan anticuerpos anti-PCNA en sueros de hepatitis B y C mediante IFI. La menor sensibilidad de la IFI frente al IB y al ELISA puede explicar estos resultados contradictorios.

Esta es la primera descripción de asociación de Ac anti-PCNA y miositis. Debido a la baja frecuencia de estos autoAc y su presencia en patologías distintas del LES, son necesarios más estudios para establecer sus correlaciones clínicas y diagnósticas.

**56. SIGNIFICADO DE LOS ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDO EN LA EVOLUCIÓN POSTRASPLANTE RENAL.** *San Segundo Arribas D<sup>1</sup>, Fernández-Fresnedo G<sup>2</sup>, Crespo del Pozo J<sup>1</sup>, Ruiz JC<sup>2</sup>, De Francisco A<sup>2</sup>, Arias M<sup>2</sup>, López-Hoyos M<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Nefrología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

**Objetivo:** Los anticuerpos antifosfolípidos (AAF) son un grupo heterogéneo de anticuerpos entre los que destacan los dirigidos frente a la cardiolipina y su cofactor, beta2-glicoproteína I. Los AAF han adquirido gran importancia como factores aterogénicos, tanto a nivel experimental como epidemiológico. Los pacientes trasplantados renales son una población con una mayor prevalencia de complicaciones cardiovasculares (CCV) que la población general y los factores de riesgo tradicionales no explican por sí solos este hecho. El objetivo de este estudio retrospectivo fue examinar la posible influencia de los AAF en la evolución postrasplante y la asociación entre los AAF y las CCV en pacientes trasplantados renales.

**Métodos:** 197 pacientes trasplantados renales de cadáver de 1985 a 1998 y en seguimiento hasta enero de 2002. Se determinaron los títulos de AAF (anti-cardiolipina y anti-beta 2 glicoproteína I dfe clase IgG e IgM) en un suero pretrasplante y en otro al menos un año después del trasplante. En el caso de los pacientes con CCV postrasplante, el suero estudiado fue siempre previo al evento cardiovascular. La cuantificación de AAF se realizó por duplicado mediante ELISA puesto a punto en nuestro laboratorio, en tres ensayos diferentes.

**Resultados:** Un 27% de pacientes presentaban AAF pretrasplante y un 15.7% desarrolló AAF postrasplante de novo. La presencia de AAF pretrasplante no se asoció a mayor desarrollo de CCV postrasplante. El desarrollo de AAF de novo postrasplante se relacionó con la presencia de episodios de rechazo agudo, de forma que el porcentaje de pacientes con AAF de novo fue mayor en aquellos que presentaron rechazo (18.8% vs 7%, p=0.01). Además, en aquellos pacientes en CCV ni AAF pretrasplante y que desarrollaron algún episodio de rechazo agudo, la producción de AAF postrasplante se asoció a una mayor frecuencia de CCV postrasplante (37.5% vs 18%, p=0.1).

**Conclusiones:** La incidencia de CCV postrasplante y la presencia de AAF es similar a la descrita en otras series. La presencia de AAF (determinada mediante ELISA dependiente del cofactor beta-2 glicoproteína I) no es un marcador independiente de riesgo cardiovascular postrasplante renal. Los fenómenos inflamatorios secundarios a un

episodio de rechazo agudo pueden ser responsables de la producción de novo de AAF postranplante, los cuales parecen asociarse al desarrollo de eventos cardiovasculares en el período postrasplante. En estos pacientes deben intensificarse el control de los factores de riesgo cardiovascular.

**57. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE INTERLEUQUINA 4 EN EL TRATAMIENTO DE ENCEFALOMIELITIS ALÉRGICA EXPERIMENTAL POR INTERFERÓN- $\beta$ .** *Martín-Saavedra FM, Dorado B, Flores N, Ballester S. Unidad de Regulación Génica, CNM, Instituto de Salud Carlos III (Majadahonda, Madrid).*

La encefalomiélitis alérgica experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) y constituye un modelo animal para esclerosis múltiple humana (EM). La EAE está mediada por un proceso autoinmune con implicación de células del subtipo 1 de linfocitos T cooperadores (Th1), caracterizadas por la secreción de citoquinas como interleuquina 2 (IL-2) e interferón gamma (IFN $\gamma$ ) entre otras. En la actualidad no existe un tratamiento eficaz para EM. Aunque interferón beta (IFN $\beta$ ) ha mostrado algunos efectos beneficiosos, los mecanismos moleculares por los que tienen lugar dichos efectos no han sido determinados.

Resultados previos de nuestro laboratorio, mostraron que en el modelo de ratón SJL para EAE la administración de IFN $\beta$  retrasa la aparición de signos clínicos de la enfermedad, atenúa su intensidad y a nivel histológico reduce la aparición de infiltrados perivasculares en el sistema nervioso central. Estos efectos son acompañados de un fuerte incremento en los niveles de expresión del gen de la interleuquina Th2 IL-4, detectados mediante PCR cuantitativa en células de ganglio (LNC) de animales tratados con IFN $\beta$ .

Con el objeto de distinguir si IFN $\beta$  influye en el proceso de diferenciación Th, favoreciendo la desviación hacia el fenotipo Th2, o bien actúa directamente sobre la regulación transcripcional del gen de IL-4, estudiamos el efecto *in vitro* del IFN $\beta$  sobre la expresión de IL4 durante la diferenciación Th y sobre un clon ya definido Th2. En el proceso de diferenciación celular de células T vírgen hacia los subtipos Th1 y Th2 en presencia de IFN $\beta$ , hemos observado un incremento en la producción de IL-4 (medida por ELISA) y en los niveles de su RNA mensajero (medidos por RT-PCR en tiempo real). También hemos detectado una acumulación de transcritos de IL-4 como consecuencia del tratamiento *in vitro* con IFN $\beta$  en el clon Th2 D10.G4.1, lo que indica un efecto sobre la regulación de la expresión de IL-4 en células individuales más que un aumento en la proporción de células productoras de IL-4. El efecto del IFN $\beta$  sobre la expresión de IL-4 no es una respuesta celular inmediata, sino que requiere más de 6 horas. Esto sugiere que el aumento de producción de IL-4 provocado por tratamiento con IFN $\beta$  puede requerir la activación o síntesis de algún mediador intracelular. En estos momentos se está determinando si la acumulación del mRNA de IL4 en presencia de IFN $\beta$  es debida a un efecto de estabilización de los transcritos del gen de IL-4 que permita aumentar su vida media.

**58. ANTICUERPOS ANTI-TIROGLOBULINA (TGB), ANTI-TIROPEROXIDASA (TPO), ANTI-ÁCIDO GLUTÁMICO DECARBOXILASA-65 (GAD65) Y ANTI-IA2 EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH.** *Crespo del Pozo J, San Segundo Arribas D, Echevarría Vierna S, López-Hoyos M. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Medicina Interna. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

Los pacientes con infección por el VIH sufren alteraciones en su metabolismo, especialmente como consecuencia del tratamiento anti-retroviral. Es posible que parte de estas alteraciones sean secundarias a una respuesta autoinmune frente a antígenos implicados en el metabolismo del organismo.

**Objetivo:** Evaluar la presencia de anticuerpos frente a antígenos tiroideos (anti-TGB y anti-TPO) y anticuerpos dirigidos frente a antígenos pancreáticos (anti-GAD65 y anti-IA2) en pacientes con infección por el VIH.

**Métodos:** Se tomaron muestras de 40 pacientes VIH en dos momentos de evolución de su infección separados dos años. Se determinaron subpoblaciones celulares (CD3, CD4 y CD8), carga viral, anticuerpos anti-GAD65 e -IA2 (RIA) y anti-TGB y -TPO (ELISA).

**Resultados:** En el grupo de muestras más reciente el título medio de anticuerpos anti-GAD65, -IA2 y -TGB descendió respecto a la determinación previa, no ocurriendo así con los anticuerpos anti-TPO. Cuando se dividió el grupo de pacientes VIH+ respecto al daño inmunológico sufrido (estimado por el registro más bajo de CD4) se observaron títulos más altos de autoanticuerpos cuando la restauración inmunitaria (determinada por las cifras absolutas de células CD4+) fue mayor.

**Conclusión:** Los resultados de nuestra serie apuntan a la aparición de autoanticuerpos frente a antígenos implicados en mecanismos de regulación metabólica en pacientes VIH+. Los pacientes que habiendo sufrido un daño mayor en su sistema inmunitario experimentaron una mayor recuperación en el mismo, han sido quienes han exhibido unos títulos más altos de autoanticuerpos. Estos datos indican la inducción de autoinmunidad por parte de algunos virus como el VIH. Además, abren la puerta a la investigación de estos procesos en el desajuste "metabólico" que se produce en pacientes VIH+ en tratamiento bajo terapia HAART.

**59. ESTUDIO COMPARATIVO DE CINCO ENZIMOINMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS.** *Benito MJ, Guerrero MA, Bolívar A, Beares I, López-Hoyos M. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.*

**Objetivo:** La determinación de anticuerpos (Ac) anti-fosfolípidos se han convertido en una de las pruebas más solicitadas en los laboratorios de Inmunología. Por otra parte, dada la características de los autoantígenos frente a los que van dirigidos, resulta muy difícil su estandarización. Muchos laboratorios han empleado hasta el momento métodos de elaboración propia que precisan mucho tiempo de trabajo. Dada la elevada presión asistencial de los laboratorios de autoinmunidad, una alternativa es emplear un ELISA comercial, que suelen emplear tiempos de trabajo más cortos. Nuestro objetivo ha sido evaluar las características diagnósticas de cinco métodos de ELISA comerciales.

**Métodos:** Se evaluaron los kits de ELISA para detección de Ac anti-cardiolipina (CLP) y anti-beta 2 glicoproteína 1 (IgG e IgM) suministrados por 5 empresas: Atom (Biosystems, Shield), Cormédica (Orgentec), Menarini (Inova), Pharmacia Diagnostics (Varelisa), Movaco (Aeskulisa). Se estudiaron 528 sueros de los siguientes pacientes: 25 síndromes antifosfolípido 1º (SAF 1º), 99 LES, 39 patologías gravídicas diversas, 149 artritis reumatoides, 12 celiaquías, 47 diabetes mellitus tipo I, 34 enfermedades de Crohn, 44 hepatitis C, 18 síndromes de Sjögren y 61 sujetos sanos. A cada empresa se le asignó una letra (A, B, C, D y E) a la hora de describir los resultados.

**Resultados:** Los ELISA A y C mostraron la mayor sensibilidad en el SAF 1<sup>o</sup> (superior al 30% para los Ac anti-CLP IgG). La sensibilidad fue inferior en los pacientes con LES y en este caso los equipos más sensibles fueron B y D. La especificidad de los 5 ELISA, considerando únicamente los sueros de los sujetos controles sanos, fue elevada (por encima del 95% para los 4 tipos de Ac anti-fosfolípidos) salvo en el caso del ELISA B para los Ac anti-beta 2 glicoproteína 1 que estuvo alrededor del 85%. Considerando los 4 tipos de anticuerpos en conjunto, la mejor correlación de títulos se encontró entre los ELISA A y C. Metodológicamente, el único ELISA complejo fue el de detección de Ac anti-CLP de la empresa B.

**Conclusión:** El análisis preliminar de los datos obtenidos muestra una especificidad elevada de los 5 equipos, aunque dos de ellos presentaron una cierta mayor sensibilidad. No obstante se han empleado los puntos de corte indicados por cada empresa. Deben estudiarse las curvas ROC para cada ELISA y reevaluar los datos en función de ello.

**60. ESTUDIO DE MECANISMOS APOPTÓTICOS EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES: LUPUS ERITEMATOSO.** Sáez-Gutiérrez B<sup>1</sup>, Royo-Cañas M<sup>1</sup>, Hortells JL<sup>3</sup>, Velilla J<sup>2</sup>, Lasierra P<sup>1</sup>, Larrad L<sup>1</sup>, Martínez-Lorenzo MJ<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa e Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa. Zaragoza.

**Introducción:** El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad que cursa con la presencia de anticuerpos (Acs) circulantes que se dirigen y lesionan estructuras del propio organismo. Se desconocen tanto las causas del mismo, como el mecanismo íntimo inmunológico. Se cree que el estudio de la posible implicación de diferentes mecanismos apoptóticos en la regulación de las diferentes subpoblaciones linfocitarias ayudará a comprender mejor esta patología en función del grado y tipo de actividad de la misma. En relación con esto, se ha descrito que la persistencia de células T activadas autoreactivas, podría paliarse en parte exacerbando la actividad del sistema Fas/Fas-L.

**Objetivos:** 1) Analizar la expresión de diferentes marcadores de membrana por citometría de flujo a partir de sangre entera de pacientes con LES (en fase activa e inactiva) y donantes sanos (control). 2) Estudiar posibles fallos en los mecanismos de apoptosis implicados en la regulación de los linfocitos. 3) Correlación de los resultados obtenidos con el estadio de la enfermedad y su tratamiento.

**Metodología:** Los métodos empleados en este estudio son: citometría de flujo y test de proliferación celular para estudios de sensibilidad (MTT).

**Resultados y Conclusiones:** En el estudio realizado en linfocitos de sangre periférica (PBLs) se observan niveles de CD3 similares en donantes sanos y pacientes LES inactivos, disminuyendo ligeramente en pacientes LES activos. Se observó también un ligero aumento de CD19 en PBLs de pacientes LES inactivos, mientras que en LES activos observamos niveles similares a PBLs de donantes sanos. La expresión de HLA-DR en PBLs activos fue similar a la de blastos de donantes sanos. Por otro lado se observa una disminución de CD38 en PBLs de pacientes LES inactivos mientras que en los activos es similar a PBLs control.

En cuanto a la expresión de Fas en membrana y Fas citoplasmático no se observaron diferencias significativas entre los diferentes grupos analizados. Sin embargo sí aumenta la expresión de Fas-L en PBLs y blastos de pacientes LES inactivos. En cuanto a la expresión de la proteína APO2L/TRAIL, disminuye en PBLs inactivos hasta desaparecer en los blastos. En el caso de pacientes LES activos la expresión es prácticamente indetectable tanto en PBLs como en blastos.

Por otro lado se ha realizado un estudio de sensibilidad de PBLs y blastos de pacientes con LES a la muerte celular inducida por anticuerpos anti-Fas, PHA, APO2L recombinante. Resulta curioso que la sensibilidad a APO2Lr en PBLs inactivos (17%) fue superior a la de blastos (13%) generados a partir de ellos, al contrario de lo que ocurre en donantes sanos. En cuanto a la sensibilidad a anticuerpos anti-Fas es baja (15%), y no se observan diferencias significativas entre pacientes LES activos o inactivos y donantes sanos.

El bajo porcentaje de PBLs que expresaban la proteína Fas en membrana podría explicar la baja sensibilidad frente a anticuerpos anti-Fas, aunque los niveles de expresión de esta proteína en el interior celular sean elevados.

*Financiación:* FIS.

**61. ANTICUERPOS ANTI-CANALÍCULOS BILIARES EN UNA PACIENTE CON TRASPLANTE HEPÁTICO.** Delgado Cerviño E<sup>1</sup>, Álvarez Doforno R<sup>1</sup>, Hierro L<sup>2</sup>, Sánchez Sabater E<sup>3</sup>, Álvarez L<sup>3</sup>, Larrauri J<sup>4</sup>, Yáñez Pereira F<sup>1</sup>, Jara Vega P<sup>2</sup>, Fontán Casariego G<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital La Paz (Madrid); <sup>2</sup>Servicio de Hepatología Infantil, Hospital La Paz (Madrid); <sup>3</sup>Unidad de Investigación, Hospital La Paz (Madrid); <sup>4</sup>Servicio de Anatomía Patológica, Hospital La Paz (Madrid).

**Introducción:** La colestasis intrahepática familiar progresiva tipo II (CIFP-2) es una enfermedad de herencia autosómica recesiva, que se debe a mutaciones en el gen que codifica para BSEP (una bomba canalicular de exportación de sales biliares), expresada únicamente en el hígado. Se caracteriza por la presencia de altas concentraciones de sales biliares en suero, valores normales de gamma-glutamyl transpeptidasa (GGT) y rápida progresión hacia cirrosis. En biopsia hepática se observa frecuentemente transformación gigantocelular y en ocasiones desaparición ductal.

**Caso clínico:** Paciente de 13 años de edad, que a los 3 años de vida se somete a trasplante hepático por una colestasis crónica, que posteriormente se diagnostica como CIFP-2. Es tratada con inmunosupresión y la evolución es buena. A partir de los 3 años y medio post-trasplante presenta tres episodios de disfunción del injerto, que coinciden con la disminución de la inmunosupresión y resuelven al aumentar la misma.

**Resultados:** El estudio del último episodio muestra aumento de bilirrubina, con GGT normal, virus de Epstein Barr (VEB) -, virus de hepatitis B (VHB) -, y virus de hepatitis C (VHC) -. En biopsia se aprecian focos de citolisis, ligera colestasis, y células gigantes multinucleadas dispersas compatible con CIFP-2. Se confirma en la biopsia la presencia de BSEP. Respecto al estudio inmunológico presenta una IgG de 1180 mg/dL, IgA de 213 mg/dL, IgM de 85 mg/dL, C de 148 mg/dL, C4 de 16 mg/dL, los anticuerpos antinucleares (ANA), anti-músculo liso (AML), antimitocondria (AMA), anti-microsomas de hígado y riñón (anti-LKM), anticuerpos anti-antígeno soluble hepático (anti-SLA), anticuerpos anti-antígeno citosólico hepático (anti-LC-1) y antitiroideos fueron negativos. Por inmunofluorescencia indirecta

ta (IFI) sobre hígado de rata, se observa la presencia de anticuerpos anti-canalículos biliares a título alto.

**Conclusiones:** Dado que las recaídas presentan características de CIFP-2, y el injerto presenta BSEP, es posible que los anticuerpos anticanaliculares observados estén dirigidos contra la proteína BSEP interfiriendo en su función, siendo necesarios posteriores estudios para verificarlo.

62. ANTICUERPOS ANTI-MEMBRANA BASAL TUBULAR EN UN PACIENTE CON NEFRITIS INTERSTICIAL ASOCIADA A ENTEROPATÍA AUTOINMUNE. *Delgado Cerviño E<sup>1</sup>, Álvarez Doforno R<sup>1</sup>, Melgosa M<sup>2</sup>, Picazo L<sup>3</sup>, Lamas R<sup>4</sup>, Marcos Gutiérrez MJ<sup>1</sup>, Fontán Casariego G<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital La Paz (Madrid); <sup>2</sup>Servicio de Nefrología Infantil, Hospital La Paz (Madrid); <sup>3</sup>Servicio de Anatomía Patológica Infantil, Hospital La Paz (Madrid); <sup>4</sup>Servicio de Digestivo Infantil, Hospital La Paz (Madrid).

**Introducción:** La enteropatía autoinmune es un raro trastorno que se define mediante los siguientes criterios: diarrea prolongada que no responde a la nutrición parenteral, presencia de anticuerpos antienterocito circulantes y predisposición a desarrollar enfermedades autoinmunes extraintestinales.

**Caso clínico:** Presentamos el caso de un varón que ingresa a los dos meses de edad diagnosticado de diarrea intratable de causa desconocida. Se realiza biopsia intestinal que muestra atrofia vellositaria subtotal con hiperplasia críptica. Presenta asimismo una dermatopatía por déficit de zinc y fracturas que fueron achacadas a déficit de cobre. A pesar de los distintos tratamientos a los 5 años inicia un cuadro consistente en anorexia, astenia, pérdida de peso y diarrea secretora intensa; por lo que ingresa de nuevo. En el estudio inmunológico se detectan anticuerpos antienterocito y se le diagnostica de enteropatía autoinmune, iniciándose tratamiento con corticoides y ciclosporina, con buena evolución. Se mantiene dos años la corticoterapia y tres años después se retira la ciclosporina. Al año siguiente presenta una nueva recaída, reiniciándose el tratamiento con corticoides y ciclosporina. Tras tres años asintomático vuelve a retirarse la inmunosupresión presentando una nueva recaída, motivo por el que se reinicia la corticoterapia y se decide iniciar tratamiento con tacrolimus. Al año se disminuye la dosis de corticoterapia, y unos meses después, en fase de retirada del tacrolimus y sin sintomatología digestiva, el paciente presenta una insuficiencia renal aguda (máxima creatinina = 2,5 mg/dl) que se acompaña de fiebre, anorexia, astenia, aumento de reactantes de fase aguda y anemia. Se realiza estudio inmunológico y anatomopatológico.

**Resultados:** IgG 571 mg/dL, IgA 75 mg/dL, Ig M 63 mg/dL, C3 103 mg/dL, C4 23 mg/dL, anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimitocondria (AMA), anticuerpos antimúsculo liso (AML), anticuerpos anti-microsomas de hígado y riñón (anti-LKM), anticuerpos antienterocito, anticitoplasma de neutrófilos (ANCA), anti-membrana basal glomerular (anti-MBG) fueron negativos. Por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre riñón de mono se detectaron anticuerpos antimembrana basal tubular (anti-MBT). La biopsia renal presenta una nefritis tubulointersticial aguda por anti-MBT y una nefropatía membranosa asociada a una glomerulonefritis necrotizante con proliferación extracapilar.

**Conclusiones:** El paciente, con una enteropatía autoinmune de base, presenta una nefritis túbulointersticial aparentemente no asociada a inmunodeficiencia.

63. LA TERAPIA CON INFILIXIMAB INDUCE LA APARICIÓN DE AUTOANTICUERPOS EN PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE. *Delgado Cerviño E<sup>1</sup>, Álvarez Doforno R<sup>1</sup>, Sabina Villar P<sup>1</sup>, Bonilla G<sup>2</sup>, Marco Castro E<sup>1</sup>, Lozano Doncel M<sup>1</sup>, Martín Mola E<sup>1</sup>, Fontán Casariego G<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital La Paz (Madrid); <sup>2</sup>Servicio de Reumatología Hospital La Paz (Madrid).

**Introducción:** La Artritis Reumatoide (AR) es una enfermedad de naturaleza autoinmune de etiología desconocida. Uno de los tratamientos que se emplean es la administración de infliximab, un anticuerpo monoclonal anti-TNF $\alpha$ . Diversos estudios indican que su administración puede provocar en algunos pacientes la aparición de autoanticuerpos.

**Objetivo:** Comparar los niveles de una batería de anticuerpos en pacientes diagnosticados de Artritis Reumatoide antes y después de recibir tratamiento con infliximab.

**Materiales y métodos:** Seleccionamos un grupo de 40 pacientes diagnosticados de AR según los criterios de la American Rheumatism Association de 1987, con enfermedad activa que no habían respondido al tratamiento con metotrexato y otros fármacos. Los pacientes recibieron conjuntamente tratamiento con metotrexato o leflunomida. En la visita basal y tras la administración del infliximab se determinaron los anticuerpos antinucleares (ANA), anticuerpos antimitocondria (AMA) y anticuerpos anti-músculo liso (AML) por inmunofluorescencia indirecta (IFI), estudiando las especificidades de los anticuerpos positivos por ELISA e inmunoblot.

**Resultados:** En la visita basal once pacientes (27,5%) de los 40 pacientes tenían ANA, dos pacientes (5%) tenían AMA, y uno (2,5%) AML. Ninguno de los ANA + presentaban anticuerpos anti-DNA. Los pacientes con AMA (+) en la visita basal presentaban, uno la gammaglutamil transpeptidasa (GGT) elevada y otro una hepatopatía crónica con hipertensión portal, GGT y fosfatasa alcalina (PA) elevadas. Por el contrario, el paciente con AML no presentaba ninguna alteración hepática. Tras el tratamiento con infliximab presentaron ANA positivo 22 de los 40 pacientes (55%), tres pacientes (7,5%) presentaban AMA y la prevalencia de AML no varió. Ninguno de los ANA (+) presentaban anticuerpos anti-DNA. Los pacientes que positivizaron no presentaban un cuadro clínico indicativo de lupus eritematoso sistémico (LES) ni cirrosis biliar primaria (CBP).

**Conclusión:** La aparición de anticuerpos se asocia al tratamiento con infliximab. El mecanismo de inducción de anticuerpos es desconocido. Será necesario estudiar la presencia o ausencia de estos anticuerpos en series más grandes y en tratamientos prolongados para conocer su significado.

64. TRATAMIENTO CON PLASMAFERESIS, GAMMAGLOBULINA INTRAVENOSA Y ANTICUERPOS ANTI-TNF EN UN CASO DE NEFRITIS LÚPICA DURANTE LA GESTACIÓN. *Micheloud D<sup>1</sup>, Carbone J<sup>1</sup>, Rodríguez-Mahou M<sup>1</sup>, López-Longo FP<sup>1</sup>, Rodríguez-Molina JJ<sup>1</sup>, Velástegui A<sup>1</sup>, Ortega de la OC<sup>2</sup>, Fernández-Cruz E<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Unidad de Inmunología Clínica, <sup>2</sup>S. de Reumatología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

**Introducción:** El desarrollo o el agravamiento de la nefropatía lúpica es uno de los problemas más graves durante la gestación. Ante una complicación grave de un proceso autoinmune sistémico mediado por autoanticuerpos con repercusión materno-fetal durante la gestación, es necesario instaurar una terapia inmunosupresora agresiva. El empleo



de plasmaféresis, gammaglobulina intravenosa (GGIV) y más recientemente con anticuerpos monoclonales, podrían considerarse como opciones terapéuticas cuando el uso de corticoides y otros fármacos falla o no es posible durante el embarazo.

**Objetivo:** Describir la evolución de una paciente con nefritis lúpica tratada durante la gestación mediante plasmaféresis, GGIV y anticuerpos anti-TNF (etanercept).

**Caso Clínico:** Paciente de 26 años, primigesta con amenorrea de 22 semanas, diagnosticada de lupus eritematoso sistémico 7 años antes, con antecedente de posible reacción adversa a los corticoides. Presenta un brote lúpico durante la gestación con leve brote cutáneo, síndrome nefrótico y crisis hipertensiva resistente al tratamiento habitual junto con niveles elevados de anticuerpos anti-ADN (193-283 UI/ml) y datos indicativos de consumo de complemento (C3: 58-74 mg/dl, C4: 7-10 mg/dl). Se decide tratamiento mediante antihipertensivos, tratamiento del lupus con anticuerpos anti-TNF (etanercept) y azatioprina, combinado con seis sesiones de plasmaféresis. Tras las sesiones de plasmaféresis se continuó con terapia inmunomoduladora con GGIV a alta dosis (1 g/kg/mes) dividida en 4 dosis, 1 por semana. Se administró concomitantemente dexametasona. Se realiza un estrecho control materno y del bienestar fetal y ante el inicio de redistribución vascular fetal se valora el riesgo/beneficio de la prematuridad así como el estado de la enfermedad materna y se decide la finalización del embarazo con una edad gestacional de 30 semanas.

**Resultados:** Se consiguió controlar la crisis hipertensiva y mejorar la función renal parcialmente, realizándose cesárea electiva obteniéndose RNV de 30 semanas. Tanto las sesiones de plasmaféresis como la terapia con GGIV fueron bien toleradas por la paciente. Durante el periodo de infusión de GGIV se observó disminución del nivel de anticuerpos anti-ADN (104-30 UI/ml) con persistencia de niveles disminuidos de complemento (C3: 60-78 mg/dl, C4: 11-13 mg/dl). Dos meses después del parto la paciente se encuentra asintomática con buen control de la TA, pero con persistencia de proteinuria <1,5 g con tendencia a disminuir. Una biopsia renal ha confirmado la presencia de una glomerulonefritis proliferativa difusa. Durante el puerperio la paciente continuó con la terapia antihipertensiva, azatioprina, etanercept y GGIV semanal.

**Conclusiones:** El uso combinado de plasmaféresis, GGIV y anticuerpos anti-TNF en el caso presentado puede haber contribuido a la reducción de la morbimortalidad materna y fetal durante el embarazo.

**65. CORRELACIÓN DE LA CUANTIFICACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS POR ELIA CON LA ACTIVIDAD CLÍNICA EVALUADA SEGÚN EL "BIRMINGHAM ACTIVITY SCORE".** *Vañas O<sup>1</sup>, Vera M<sup>2</sup>, Rodríguez R<sup>1</sup>, Mirapeix E<sup>2</sup>.* <sup>1</sup>Servei d'Immunologia, CDB y <sup>2</sup>Servei de Nefrologia i Trasplantament Renal, ICNU, Hospital Clínic, Barcelona, Espanya.

La cuantificación de los anticuerpos anticitoplasma de neutrófilos (ANCA) anti-MPO y anti-PR3 tienen una importancia capital en el diagnóstico y seguimiento de un serie de vasculitis como son la poliangeitis microscópica (MPA) y la granulomatosis de Wegener (WG).

**Objetivo:** Comparar, en un estudio retrospectivo de pacientes diagnosticados de vasculitis, el grado de correlación entre la actividad clínica según el "Birmingham activity score" (BVAS) y la cuantificación de los ANCA determinados por Elia y por el método de referencia habitual.

**Pacientes y Métodos:** Se evaluaron un total de 42 pacientes (26 MPA y 16 WG) en el momento del diagnóstico, y el seguimiento de 7 pacientes. La cuantificación de los ANCA IgG anti-MPO y anti-PR3 se realizó mediante Elia-ANCA UNI-Cap system (Farmacia Diagnostics) y Wielisa WIESLAB ELISA (Menarini) como método de referencia.

**Resultados:** Coeficiente de correlación (CC) entre U/mL de ANCA y el grado de actividad clínica medida por BVAS:

**I) Primera evaluación en el momento del diagnóstico (análisis global)**

Diagnóstico (n)	MPO		(n)	PR3	
	ELISA	Elia		ELISA	Elia
MPA + WG (22)	0,191	0,447	(22)	-0,166	0,220
MPA (20)	0,172	0,445	(16)	-0,006	0,377
WG	nd	nd	(6)	-0,212	0,138

**II) Seguimiento individual (5-8 evaluaciones por paciente)**

Patient	nº	MPO		Patient	nº	PR3	
		eval	ELISA			ELISA	Elia
A	6	0,967	0,925	D	8	0,771	0,690
B	6	-0,450	-0,390	E	6	0,754	0,993
C	5	0,489	0,025	F	5	0,186	0,726
			G	5	0,957	0,833	

En el análisis global se obtuvo una baja correlación entre ANCA y BVAS (0-0.447) (I). En el seguimiento, 5 de 7 pacientes mostraron una elevada correlación entre la cuantificación de los ANCA y el BVAS (0.690-0.993) por ambos métodos (II).

**Conclusión:** Los resultados muestran que no se observan correlaciones similares entre los valores de ANCA y el grado de actividad clínica (BVAS) con ambos métodos (Elia y ELISA) de cuantificación de ANCA.

**66. ANÁLISIS CLONAL DE LOS LINFOCITOS T CD4+ DE LÁMINA PROPIA DE PACIENTES CELÍACOS.** *Ortega C, García-V. A, Herrero MD, Ortega-B. M, Santamaría M.* *Unidad de Inmunología, Facultad de medicina Hospital Universitario Reina Sofía. Universidad de Córdoba. Córdoba.*

La enfermedad celíaca un desorden inflamatorio intestinal mediado por linfocitos T presentes en la mucosa. Es inducida por péptidos derivados del gluten, se asocia a HLA-DQ2 o -DQ8 en más del 99% de los casos y en su patogénesis se incluye a un enzima tisular, la transglutaminasa tisular 2, una endopeptidasa entre cuyos sustratos se encuentran el gluten y la histamina. Hemos generado un conjunto de clones de linfocitos T a partir de células obtenidas de biopsias intestinales delgadas de pacientes celíacos y controles no celíacos mediante cultivo de la biopsia en condiciones que favorecen el crecimiento de linfocitos T CD4+ de la lámina propia y su posterior clonación límite. Hemos estudiado diferentes aspectos relevantes de estas células para entender su función en el intestino y su contribución a la patogénesis de la enfermedad. Nuestro estudio se ha centrado en linfocitos CD4+ de lamina propia intestinal. En primer lugar se ha determinado mediante citometría de flujo e inmunofluorescencia el patrón de producción de citoquinas que produce cada uno de los clones en respuesta a: péptido 33-mero del gluten presentado por células HLA-DQ idénticas,

anti-CD3 y la combinación éster de forbol-Ionomicina. La especificidad de los clones al antígeno fue identificada previamente. Nuestros datos, obtenidos de 25 clones, indican que en la lamina propia, si bien predominan los linfocitos T CD4<sup>+</sup> del subtipo Th1 (productores de gamma-interferón e IL-2), se encuentra un porcentaje elevado de Th2 (esto es productores de citoquinas antiinflamatorias como IL-4, IL-5 y TGFβ). Es interesante que entre nuestro panel de células hemos identificado 3 clones con claro perfil regulador. Se discutirán estos resultados así como los que actualmente están en curso dirigidos a determinar la posible actividad supresora/reguladora de estos últimos así como resultados de experimentos focalizados en la discriminación de la reactividad cruzada de nuestros clones específicos de gluten con histamina.

**67. VALOR DIAGNÓSTICO Y CORRELACIÓN CLÍNICA DE ANTICUERPOS ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE (ASCA) Y ANTI-CITOPLASMA DE NEUTRÓFILOS (ANCA) EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII).** *Rodríguez-Bayona B, Piñero A\*, Correro F\*, Martín L\*, Brieva JA, Rodríguez C, Nieto A. Servicios de Inmunología y \*Digestivo, H. U. Puerta del Mar, Cádiz.*

**Antecedentes:** ASCA y ANCA son marcadores serológicos asociados con enfermedad de Crohn (EC) y con colitis ulcerosa (CU), respectivamente, aunque su significado clínico y su valor diagnóstico y pronóstico aún no están bien definidos. A ello contribuye la variación demostrada de la prevalencia de estos marcadores en distintas poblaciones estudiadas.

**Objetivos:** En el presente estudio nos propusimos: a) Determinar la sensibilidad (SS), especificidad (SP), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) de estos marcadores en población española y b) Analizar la posible correlación de la presencia de los anticuerpos con subtipos clínicos de la enfermedad.

**Pacientes y Métodos:** Se incluyeron en este estudio 229 pacientes consecutivos no relacionados diagnosticados de EII (129 EC y 100 CU). Los Ac ASCA (IgG + IgA) se determinaron mediante la técnica de ELISA y los Ac ANCA se analizaron por inmunofluorescencia indirecta (IFI), en ambos casos sin conocimiento del diagnóstico. Las características clínico-epidemiológicas analizadas fueron historia familiar, sexo, tabaquismo, edad al diagnóstico, manifestaciones extradigestivas, necesidad de inmunosupresión y necesidad de cirugía en EC y CU; localización, patrón e índice de actividad (CDAI) en el momento de recogida del suero en EC; y extensión, patrón e índice de Truelove en CU. El análisis estadístico se realizó mediante los programas SPSS (v.11.0) y EpiInfo (v.6.0)

**Resultados:** La combinación ASCA+/ANCA- mostró una SS del 68.2%, una SP del 95%, un VPN del 66.4% y un VPP del 94.2% en la EC. La combinación ASCA-/ANCA+ arrojó unos valores de SS, SP, VPN y VPP del 43%, 98.4%, 69% y 95.6%, respectivamente para la CU. El considerar la positividad aislada de ANCA mejora la sensibilidad del test (51%), si bien a costa de una menor especificidad (87%). La prevalencia de ASCA en pacientes con EC fue significativamente mayor en varones (OR=4.18, IC 95% 1.72-10.38; p=0.0004); lo cual aumenta la SS y el VPN del test en este grupo mientras que los disminuye en mujeres. Por otro lado, los ASCA se asociaron de forma independiente y positiva con afectación ileocolónica (L3) (O.R= 3.07 IC 95% 1.29-7.42; p=0.005) y negativa con la exclusivamente colónica (L2) (OR=0.24 IC 95% 0.08-0.7; p=0.002). Asimismo, se encontró asociación con la nece-

sidad de tratamiento inmunosupresor (O.R= 2.17, IC 95% 0.96-4.94; p=0.04). La presencia de ANCA en CU se asoció con una mayor necesidad de cirugía (O.R= 7.6, p= 0.027).

**Conclusiones:** La determinación de ANCA y, especialmente de ASCA, puede ser de gran utilidad en el diagnóstico diferencial de EC y CU; la baja sensibilidad cuestiona su valor en el screening de población. Estos resultados implican a ASCA como marcador de localización y progresión de EC. Asimismo, ANCA es un marcador de peor progresión de CU en nuestra población.

**68. ANÁLISIS EPITÓPICO DE UN PÉPTIDO 33-MERO DERIVADO DEL GLUTEN MEDIANTE RECONOCIMIENTO CLONOTÍPICO POR CÉLULAS CD4+ ANTÍGENO-ESPECÍFICAS DE LÁMINA PROPIA DE ENFERMOS CELÍACOS.** *Herrero MD, Ortega C, García-V. A, Ortega-B. M, Sánchez F, Reynoso MF, Jiménez J, Santamaría M. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina. Hospital Universitario Reina Sofía. Universidad de Córdoba. Córdoba.*

La enfermedad celíaca es una enteropatía crónica de origen autoinmune caracterizada histológicamente por hiperplasia de las criptas intestinales y atrofia vellosa, lo que produce malabsorción y diarreas. La enfermedad se produce en individuos susceptibles genéticamente (HLA-DQ2 o HLA-DQ8) por la ingestión de proteínas de cereales, en particular el gluten del trigo. Fuertes evidencias apoyan que las células CD4+ TCRαβ,+ que infiltran la lámina propia intestinal ejercen un papel central en el control de la respuesta inmune al gluten

Nuestro objetivo fue determinar la especificidad de células T CD4+ intraepiteliales de pacientes celíacos al péptido derivado de la gliadina 33-mero.

Los clones de células T CD4+ (HLA-DQ2) se obtuvieron de biopsias intestinales de pacientes celíacos y se enfrentaron a células presentadoras de antígenos (línea CDG-EBV) que portaban el péptido en estado nativo o el péptido tratado con transglutaminasa tisular. La especificidad se determinó mediante ensayos de proliferación tras marcaje con H<sup>3</sup>-Thy.

Los resultados indican que hay células T CD4+ que reconocen un epitopo del 33-mero que es independiente de transglutaminasa.

**69. EVALUACIÓN DE LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS ANTIMEMBRANA BASAL MEDIANTE LA TÉCNICA DE ELIA.** *Rodríguez Pérez R\*, Vera Rivera M\*\*, Mirapeix Vicens E\*\*, Viñas Gomis O\*. \*Servicio d'Inmunología y \*\*Servicio de Nefrología, Hospital Clinic, Barcelona, Spain.*

**Introducción.** Los anticuerpos IgG dirigidos a la cadena α3 del colágeno tipo IV (antígeno de Goodpasture) son característicos de la enfermedad por anticuerpos antimembrana basal glomerular, (GBM). Estos anticuerpos se depositan tanto a nivel glomerular ocasionando **glomerulonefritis rápidamente progresivas (GNRP)** y a nivel de las paredes alveolares induciendo hemorragia pulmonary.

**Objetivo.** Evaluar el método Elia en la determinación de los anticuerpos antimembrana basal glomerular en comparación con la técnica ELISA que es el método de referencia usada en nuestro Hospital.

**Pacientes y Métodos.** Se realizó retrospectivamente la determinación de anticuerpos antimembrana basal glomerular en el momento del diagnóstico en un total de 79 pacientes: 64 Síndrome de Good-

pasture, 15 casos de vasculitis ANCA+ con presencia también de positividad para el anti membrana basal glomerular (**Glomerulonefritis rápidamente progresiva tipo IV**)

Como controles se usaron muestras de 10 pacientes sanos, 10 pacientes con el diagnóstico de poliangeitis microscópica y con anticuerpos anti-MPO positivos y 10 pacientes con el diagnóstico de Granulomatosis de Wegener y anticuerpos antiPR3 positivos.

Los anticuerpos antimembrana Basal Glomerular se determinaron mediante el Elia-GBM UNI-Cap system de Pharmacia Diagnostics y el Wielisa WIESLAB ELISA de Menarini (método de referencia).

**Resultados:**

Diagnostic	n	Elia/ ELISA			
		+/+	+/-	-/+	-/-
GS	64	62 (96,8%)	1	1*	0
IV-RPGN	15	14 (93,3%)	0	1*	0

\*: Resultados negativos, "zona gris " por ELISA

La sensibilidad fue del 98.7% y del 97.0% para el Elia y ELISA respectivamente. La correlación de los resultados (U/mL) obtenido por los dos métodos fue del 0.62.

La especificidad fue del 100% para ambos métodos en los 30 sueros control, que fueron negativos para ambos métodos.

**Conclusiones.** Se obtuvieron sensibilidades y especificidades similares para la determinación de anticuerpos anti membrana basal glomerular mediante ambos métodos ELISA y Elia.

**70. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE TRAIL Y FASL POR LAS CÉLULAS DECIDUALES HUMANAS. Ruiz-Ruiz C, Morales J, Blanco O, García Olivares E. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.**

**Introducción:** La célula decidual estromal (DSC, decidual stromal cell) es el componente predominante de la decidua humana, el tejido materno que se encuentra en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Las DSC presentan diversas características y funciones inmunitarias que podrían estar implicadas en los mecanismos de tolerancia materno-fetal. Las DSC son fenotípicamente semejantes a las células foliculares dentríticas y se encuentran relacionadas con el precursor estromal de médula ósea.

La apoptosis es un fenómeno relevante en la interfase materno-fetal, ya que uno de los mecanismos de la tolerancia materno fetal (o privilegio inmunológico de la placenta) es la expresión de FasL por las células del trofoblasto, lo que determina la inducción de apoptosis en los leucocitos deciduales. Por otra parte, durante el embarazo fisiológico, se produce una continua muerte por apoptosis de las DSC, lo que ha determinado el nombre clásico de "decidua" (tiene que ver con la palabra decadencia, y a la decidua también se le llama caduca)

**Objetivos:** Estudiar la expresión de receptores de membrana de moléculas relacionadas con la apoptosis en DSC humanas.

**Métodos:** Se estudió la expresión de estos receptores mediante anticuerpos monoclonales y citometría de flujo.

**Resultados y Conclusiones:** Las células DSC expresan TRAILR2 y TRAILR4, pero fueron negativos para TRAILR1 y TRAILR3. Detectamos además una intensa expresión de FasL. Estos resultados podrían estar relacionados con la inducción de apoptosis en DSC a lo largo del embarazo, pero, además, mediante la expresión de FasL, las

DSC podrían autoinducirse apoptosis, o determinar la muerte por apoptosis de los leucocitos deciduales.

**71. PAPEL DE CD48 EN LAS CÉLULAS T Y EN LAS CÉLULAS PRESENTADORAS DE ANTÍGENO. Abadía-Molina AC, Ji H, García-Olivares E, Bhan A, Terhorst C. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Granada. Division of Immunology, BIDMC, Harvard Medical School, Boston.**

**Objetivos:** La molécula CD48 es una proteína de anclaje lipídico que se expresa tanto en células presentadoras de antígeno como en células T. CD244 (2B4) y CD2, ligandos de CD48, son expresados igualmente en células hematopoyéticas. Hemos querido examinar la función de CD48 en la patogénesis del modelo experimental de colitis crónica y como afecta a la función de las células T y los macrófagos.

**Metodología:** Se utilizó el modelo experimental de colitis de transferencia de células T CD4<sup>+</sup>CD45<sup>HI</sup> en ratones deficientes para Rag (Rag<sup>-/-</sup>). Con objeto de estudiar el efecto de CD48 se aislaron células T de ratones salvajes o de ratones deficientes para CD48 (CD48<sup>-/-</sup>). Los receptores de dichas células fueron tanto ratones Rag<sup>-/-</sup> salvajes para CD48, como ratones Rag<sup>-/-</sup> cruzados con ratones CD48<sup>-/-</sup> (CD48<sup>-/-</sup> x Rag<sup>-/-</sup>). El papel de CD48 en células T y macrófagos se analizó *in vitro* aislando dichas células de ratones salvajes o de ratones CD48<sup>-/-</sup>.

**Resultados:** La colitis solo fue inhibida cuando ratones CD48<sup>-/-</sup> x Rag<sup>-/-</sup> fueron transferidos con células T CD48<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup>, lo que implica que la molécula CD48 es relevante tanto en la función de la célula T CD4<sup>+</sup> como para la célula presentadora del antígeno. En consonancia con este resultado se observó que la proliferación de las células T CD48<sup>-/-</sup> estimuladas *in vitro* con macrófagos CD48<sup>-/-</sup> estaba muy disminuida. Por otra parte, los macrófagos CD48<sup>-/-</sup> estimulados *in vitro* con LPS producen menos cantidad de TNF-α e IL-12 y una menor capacidad de eliminar bacterias Gram-negativa (*E. coli* - F18) *in vitro* que los macrófagos procedentes de ratones salvajes.

**Conclusión:** Estos resultados demuestran que la activación de macrófagos y el control de la respuesta de las células T a través de CD48 controla la respuesta inmunológica. Es por este hecho que solo se mejora la colitis cuando CD48 esta ausente tanto en los ratones receptores como en las células T transferidas.

**72. EXPRESIÓN DE MEDIADORES DE APOPTOSIS EN LINFOCITOS T CCR5+ Y CXCR3+ EN LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE. Julià E, Comabella M, Zayat M, Montalban X. Unitat de Neuroimmunologia Clínica. Hospital Universitari Vall d'Hebron. Barcelona.**

**Introducción:** Los receptores de quimiocinas CCR5/CXCR3 intervienen en la migración leucocitaria a través de la barrera hematoencefálica. Uno de los mecanismos implicados en el mantenimiento de la tolerancia inmunológica es la muerte celular apoptótica de linfocitos T (LT) activados auto-reactivos. Un defecto en la eliminación de células potencialmente patogénicas, como los LT CCR5+ y CXCR3+, conduciría a una persistencia anormal de estas células en sangre periférica.

**Objetivos:** Estudiar la expresión de mediadores de apoptosis en LT CCR5+ y CXCR3+ de pacientes con esclerosis múltiple (EM).

**Métodos:** Se incluyeron en el estudio 12 controles sanos (CS) y 30 pacientes con EM [8 con EM primariamente progresiva (EMPP), 11 con EM secundariamente progresiva (EMSP), 11 con EM remitente-recurrente (EMRR) sin tratamiento, y 11 con EMRR tratados con inter-

ferón-beta (IFN $\beta$ )]. La expresión de CD69, TNF-RI, Fas, FasL, bax y bcl-2 se determinó mediante citometría de flujo en las poblaciones de LT CD4 y CD8 positivas para CCR5 y CXCR3.

**Resultados:** En pacientes con EM se observó una mayor expresión del marcador de activación CD69 y una expresión disminuida del receptor de muerte Fas en la población de LT CD4+CCR5+ comparado con CS. Estos cambios fueron específicos de la población CD4+CCR5+. No se encontraron diferencias de estos marcadores entre las diferentes formas clínicas de la enfermedad. El tratamiento con IFN $\beta$  aumentó la expresión de Fas y bcl-2 en las diferentes poblaciones de LT, aunque dicho efecto fue más marcado en los LT CD4+CCR5+. Finalmente, el porcentaje de LT CD8+CCR5+ que expresaron FasL estaba aumentado en pacientes con EM comparado con CS.

**Conclusiones:** La menor expresión del receptor de muerte Fas en LT CD4+CCR5+ activados de pacientes con EM podría contribuir en la patogénesis de la enfermedad prolongando la supervivencia de estas células y favoreciendo su migración al Sistema Nervioso Central.

## SESIÓN 5: INMUNODEFICIENCIAS Y ALERGIA

**Moderadores:** M<sup>a</sup> Cruz García Rodríguez (H. Univ. La Paz, Madrid), Ignacio J. Molina (Univ. de Granada)

**73. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA Y GENÉTICA DE UNA PACIENTE ESPAÑOLA CON SÍNDROME HIPOPLASIA CARTÍLAGO-PELO (CHH).** Muñoz Robles J, Allende L, Clemente J, Calleja S, Varela P, González L, Paloma P, Paz-Artal E, Morales P. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

**Introducción:** El síndrome Hipoplasia Cartilago-Pelo (CHH) es una entidad altamente pleiotrópica, causada por mutaciones en el componente RNA de la RNasa MRP (RMRP) que se transmite de forma autosómica recesiva. CHH se caracteriza, principalmente, por estatura corta, hipoplasia del pelo, inmunodeficiencia y predisposición a neoplasias malignas.

**Objetivo:** Estudio inmunológico y genético en una paciente española diagnosticada de CHH.

**Métodos:** Se realizó la cuantificación de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM), subclases de IgG, niveles de complemento (C3, C4), poblaciones linfocitarias y proliferación linfocitaria para ver el status inmunológico del paciente. Para el estudio genético se extrajo DNA de leucocitos de sangre periférica y se amplificó por PCR el gen RMRP de la paciente y sus padres. Posteriormente se realizó la secuenciación pertinente.

**Resultados:** El fenotipo y la función linfocitaria estaban alterados. La paciente mostraba un deterioro en el desarrollo de las células T con importante disminución en el número de linfocitos T CD3+ y el cociente CD4+/CD8+ era muy alto debido al reducido número de linfocitos T CD8+. Desde el punto de vista genético, encontramos 2 mutaciones: la mutación paterna correspondía al cambio de una C por una T en la posición +4 del gen; esta mutación ya ha sido descrita. La mutación materna consistió en una duplicación de 15 nucleótidos en la posición -11 del gen RMRP (región promotora) que no ha sido descrita previamente.

**Conclusión:** Hemos caracterizado inmunológica y genéticamente a una paciente con síndrome CHH. Se ha encontrado una nueva mutación en el gen RMRP y estamos capacitados para realizar diagnóstico prenatal en futuros embarazos de la pareja.

**74. ALERGENOS DE REACTIVIDAD CRUZADA. NUEVOS DATOS.** Herrera Mozo I, Ferrer B, Rodríguez-Sánchez JL, Juárez C. Departamento de Inmunología, Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona, España.

Estudios previos demuestran la existencia de anticuerpos IgE con reactividad cruzada entre organismos sin relación taxonómica, hongos ambientales pertenecientes a la clasificación *fungi imperfecti*, y dos alimentos de consumo habitual en nuestro país: espinaca y champiñón. Con objeto de caracterizar los antígenos responsables de dicha reactividad cruzada, se han realizado técnicas de Immunoblot para analizar extractos de espinaca y champiñón frescos, utilizando sueros de pacientes sensibilizados a dos hongos ambientales, *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum*. Posteriormente, se han realizado ensayos de Inhibición para estudiar la posible relación entre antígenos reconocidos en los distintos extractos.

Los resultados obtenidos muestran que 7 de los 22 pacientes alérgicos a hongos, y ninguno de los individuos control, reconocían una proteína de aproximadamente 30 kD, presente tanto en los extractos de espinaca como en los de champiñón. Estas proteínas están estructuralmente relacionadas, como se demuestra por los estudios de Inhibición.

**75. CARACTERIZACIÓN CLÍNICA DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN CLASIFICADOS SEGÚN EL FENOTIPO DE LOS LINFOCITOS B.** Detková D, Urban S, Oliveros E, Pérez E, Mur E\*, García Salgado G\*, Alvarez A\*, De Gracia J\*, Soler P\*\*, Rodrigo MJ, Caragol I, Hernández M, Español T. Unidad de Inmunología, \*Servicio de Neumología, \*\*Unidad de Inmunodeficiencias. Hospital Universitario Valle de Hebron, Barcelona.

**Introducción:** La Inmunodeficiencia Variable Común (IDVC) es una Inmunodeficiencia Primaria que engloba varias entidades caracterizadas por hipogammaglobulinemia e infecciones bacterianas de repetición. No se conoce el defecto genético y desde la diversidad clínico-inmunológica se han intentado diversas clasificaciones para facilitar su estudio. La clasificación basada en el fenotipo de los linfocitos B (LB) de memoria divide a los pacientes en tres grupos:

- Grupo MB0: pacientes sin LB de memoria (LB CD27-)
- Grupo MB1: pacientes con LB de memoria sin cambio de isotipo (LB CD27+IgD+)
- Grupo MB2: pacientes con LB de memoria con cambio de isotipo (LB CD27+IgD-)

**Objetivo:** Caracterizar los aspectos clínicos de los pacientes con IDVC, clasificados según el fenotipo de los LB.

**Métodos:** Se incluyeron 41 pacientes con IDVC: 18 pacientes pertenecían al grupo BM0, 16 pacientes al grupo BM1 y 7 al grupo BM2. Se recogieron datos clínicos al diagnóstico y al momento de este estudio.

**Resultados:** En el grupo BM0, el 55% de pacientes con infecciones respiratorias recurrentes, desarrolló bronquiectasias con expectoración habitual, frente al 27% de los pacientes del grupo BM1 y el 0% del grupo BM2 (p<0.05). En el grupo BM0, el 50% de los pacientes con síntomas gastrointestinales, desarrolló el síndrome de malabsorción, frente al 19% del grupo BM1 y el 0% del BM2 (p<0.05). Los signos de las reacciones linfoproliferativas fueron más frecuentes en el grupo BM0 (50%) que en el grupo BM1 (16%) y BM2 (14%), (p<0.05).

**Conclusión:** Los pacientes con ausencia de LB de memoria presentaron una clínica más grave, observando un mayor número de casos con bronquiectasias clínicamente importantes, síndrome de malabsorción y manifestaciones linfoproliferativas. Estas diferencias podrían ser indicativas de distintos defectos etiopatogénicos en cada uno de los grupos.

**76. DIAGNÓSTICO MOLECULAR RÁPIDO DE ATAXIA TELANGIECTASIA MEDIANTE RT-PCR OPTIMIZADA Y SECUENCIACION DIRECTA.** *Mancebo E, Pacho A, de Pablos P, Cortezón S, Muñoz-Robles J, Castro MJ, Romo E, Morales P, González L, Paz-Artal E, Allende LM. Servicio de Inmunología. Hospital 12 de octubre. Madrid.*

**Objetivos:** La Ataxia Telangiectasia (AT) es una enfermedad severa de herencia autosómica recesiva que provoca degeneración cerebral, inmunodeficiencia, inestabilidad cromosómica, radiosensibilidad y predisposición a diversos tipos de cáncer. La incidencia de la enfermedad está estimada en 1 de cada 300.000 nacidos vivos. AT se produce por mutaciones en un único gen (ataxia telangiectasia mutada, ATM) del cromosoma 11, que codifica para una única proteína de gran tamaño (ATM) que participa en la transducción de señales al núcleo celular, transporte intracelular de proteínas, y control del ciclo celular. El propósito de este estudio es diseñar un método fácil y rápido para realizar el diagnóstico molecular de AT el cual podría ser aplicado al diagnóstico clínico, consejo genético, estudio de portadores, y diagnóstico prenatal.

**Métodos:** Se han diseñado dieciséis parejas de primers solapantes para la realización de RT-PCR. Las condiciones de PCR se optimizaron para obtener unas condiciones de amplificación únicas para las dieciséis parejas de primers. Los productos de PCR fueron purificados, secuenciados e interpretados.

**Resultados:** Las mutaciones presentes en tres familias españolas de AT fueron reconfirmadas con la PCR optimizada y el análisis por secuenciación directa.

**Conclusión:** Hasta el momento se han encontrado más de 400 mutaciones en el gen ATM productoras de AT, la localización de estas mutaciones no permite definir la existencia de uno o varios puntos calientes en el gen. El inmenso tamaño (transcrito de 9168 nucleótidos) y la estructura de este gen (66 exones) complica el proceso de *screening* para todas las posibles variaciones genéticas. Nuestro método permite identificar mutaciones en la región codificante del gen ATM desde cDNA de manera rápida y sencilla y representa una herramienta útil para el diagnóstico temprano de la enfermedad dando la posibilidad de dar consejo genético a familiares y enfermos de AT.

**77. HIPER IgM VERSUS IDVC.** *Vázquez AC, Andrés A, Rubio M, Gómez J, Campos J, Castañer JL. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid.*

El Síndrome de Hiper-Inmunoglobulina M (HIGM) y la Inmunodeficiencia variable común (IDVC) pueden presentar sintomatología común, principalmente infecciones bacterianas de repetición. Analíticamente también pueden cursar con disminución de los valores de IgG e IgA, siendo más común el valor normal ó aumentado de IgM en el HIGM, mientras que en la IDVC este isotipo puede estar aumentado o disminuido.

Mientras el diagnóstico de la IDVC es por exclusión, se han descrito defectos genéticos causales de HIGM.

**Objetivos:** Diagnóstico diferencial entre la IDVC y el HIGM.

**Descripción:** Presentamos una paciente de 12 años que fue estudiada en nuestra consulta por Neumonías de repetición (2 en 5 meses) que requirieron ingreso, retraso pondero-estatural (P10 peso y P3 talla), 4 episodios de otitis que requirieron tratamiento antibiótico, posible atopía y diversos episodios otorrinolaringológicos. Calendario vacunal completo sin complicaciones.

En el estudio inmunológico destacó: IgG < 6.75, IgA < 5.87, IgM 535; Ausencia de isohemaglutininas IgG; Disminución de la respuesta proliferativa a mitógenos; Alta producción espontánea de IgM en cultivos sin producción de inmunoglobulina tras estímulo con el mitógeno PWM. Inmunofenotipo: Normalidad en la cifra de linfocitos B en sangre periférica con disminución de linfocitos B de memoria y aumento de la expresión de CD40 y CD40L.

Estudio genético: Ausencia de mutaciones en el gen AID con presencia de 2 polimorfismos en intrón 1 y exón 4. Ausencia de anomalías en el gen del CD40.

Tras tratamiento con Inmunoglobulina intravenosa (IGIV), tras la primera dosis, se alcanzan niveles óptimos de IgG (838 mg/dl) con disminución del valor de IgM (375 mg/dl).

**Conclusiones:** Paciente con criterios analíticos de HIGM que no presenta las mutaciones conocidas asociadas a esta enfermedad, siendo diagnosticada como Inmunodeficiencia humoral. Se discute el diagnóstico diferencial entre ambas patologías y el valor de los polimorfismos encontrados.

**78. LA ACTIVACIÓN DE MAPK, PRODUCCIÓN DE CITOKINAS Y EL ESTALLIDO RESPIRATORIO NO SE VEN AFECTADOS POR LA AUSENCIA DE BTK EN MONOCITOS DE PACIENTES ALX.** *Pérez De Diego R, López-Granados E, Pozo M, Rodríguez C, Sabina P, Ferreira A, Fontán G, Alemany S, García Rodríguez MC. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario "La Paz" (Madrid).*

**Introducción:** La Btk (tirosina quinasa de Bruton), proteína responsable de la agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX), se expresa entre otras células en monocitos, implicados en la respuesta inmune a través de la fagocitosis y la muerte de microorganismos.

**Objetivo:** Estudiar si la ausencia de Btk afecta a la actividad de monocitos en pacientes ALX.

**Material y métodos:** 7 pacientes con ausencia de Btk y 7 controles sanos de similar edad. La identificación de las mutaciones se realiza mediante PCR y secuenciación. El estudio proteico de Btk se hizo mediante Western blot y citometría de flujo. Se estudia mediante citometría de flujo la fosforilación de ERK1/2, JNK y p38 tras estímulo con LPS o PMA, la producción de TNF $\alpha$  e IL-6 intracitoplasmático tras estímulo con LPS y la actividad Burst oxidativa tras activación con *E. coli* opsonizado o PMA. También se estudian los niveles de ARNm de TNF $\alpha$  e IL-6 mediante RT-PCR a tiempo real.

**Resultados:** Los 7 pacientes tienen una ausencia total de proteína Btk. Los estudios de fosforilación de MAPK en respuesta a LPS o PMA muestran que no hay diferencias entre la fosforilación ERK1/2, JNK y p38 de los monocitos de ALX y controles sanos.

Respecto a la producción de TNF $\alpha$  y de IL-6, los niveles de ARNm y de proteína tras estímulo con diferentes cantidades de LPS son los mismos en controles sanos que en ALX.

Por otra parte la respuesta burst respiratorio es la misma en ALX que en controles sanos.

**Discusión y conclusiones:** Diferentes estudios en ratones Xid muestran diferencias de activación en monocitos de algunas MAPK y del burst respiratorio con respecto a las formas WT. Por otra parte también se ha visto que los niveles de TNF $\alpha$  en el sobrenadante de monocitos de un paciente ALX son inferiores con respecto a los controles sanos. Todo esto nos ha llevado a estudiar en nuestra serie de ALX si la activación de monocitos en estas tres vías se podía ver afectada por la ausencia de Btk. La activación de las tres MAPK y el burst respiratorio no se encuentra alterado en los monocitos de ALX. Las diferencias con ratones pueden deberse a la distinta señalización entre ratones y humanos; en humanos es posible que otras Tec quinasas suplan la función de Btk. Las diferencias en el estudio de la producción del TNF $\alpha$  se deben a que nosotros medimos la transcripción y la traducción de TNF $\alpha$  en respuesta al estímulo con LPS. Tal vez Btk sea un paso limitante en la fase secretora de TNF $\alpha$ , pero no lo es en la producción de proteína. En cualquier caso estos pacientes no padecen de patología asociada a una mala función de monocitos, lo que apoya la validez de los resultados encontrados.

**79. DEFICIENCIA DEL COMPONENTE C7 DEL COMPLEMENTO. DESCRIPCIÓN DE DOS NUEVAS MUTACIONES.** Barroso S, Álvarez AJ, López-Trascasa M, Wichmann I, Rieubland C, Bart PA, Núñez-Roldán A, Sánchez B. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital La Paz, Madrid. <sup>2</sup>Service d'immunologie et d'allergie, Centre Hospitalier Universitaire Vaudois, Lausanne (Suiza).

Las deficiencias en componentes del complemento se asocian con un aumento en el riesgo de padecer infecciones sistémicas recurrentes, principalmente por *Neisseria meningitidis*. Se han descrito 17 mutaciones que dan lugar a una deficiencia del componente C7 del complemento. Hemos estudiado dos pacientes en los que se sospechaba una deficiencia de algún componente del complemento por haber padecido infecciones meningocócicas y presentar una capacidad hemolítica en suero indetectable. Un análisis subsecuente mostró que los niveles de C7 en el suero de estos pacientes eran indetectables o muy inferiores a los normales por lo que realizamos la amplificación y posterior secuenciación de los 17 exones del gen que codifica C7 para determinar las bases moleculares responsables de este déficit.

En el paciente 1, de origen español, hemos encontrado una mutación, no descrita previamente, en la posición 1458 del cDNA que da lugar a la aparición de un codón de parada (C464X); combinada con otra mutación de cambio de sentido (R499S) descrita previamente en una familia rusa.

En el paciente 2, de origen étnico boliviano y checo, hemos encontrado una delección de 11 nucleótidos en la posición 631 del cDNA, no descrita previamente, que da lugar a la aparición de un codón de parada (T189X193); combinada con otra delección de dos nucleótidos en la posición 1922 (S620X630) descrita previamente en una familia española.

En este estudio hemos detectado dos mutaciones nuevas que dan lugar a una deficiencia en el componente C7 del complemento que apoya la idea de que las bases moleculares de esta deficiencia son heterogéneas, ya que en diferentes familias aparecen distintos defectos moleculares. Por otro lado, algunos defectos tienen prevalencia en individuos de ciertas poblaciones o que viven en áreas geográficas definidas.

**80. ESTUDIO COMPARATIVO DE CÉLULAS Y MEDIADORES EN ESPUTO Y SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS RESPIRATORIAS.** Sastre B<sup>1</sup>, Seoane C<sup>1</sup>, Fernández M<sup>2</sup>, López E<sup>1</sup>, Civantos E<sup>1</sup>, Cárdbaba B<sup>1</sup>, Gallardo S<sup>1</sup>, Llanes E<sup>1</sup>, Palomino P<sup>1</sup>, del Pozo V<sup>1</sup>, Quirce S<sup>2</sup>, Sastre J<sup>1</sup>, Lahoz C<sup>1</sup>. Departamento de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Alergia. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

**Objetivos:** Determinar el patrón celular y molecular en muestras de esputo y sangre periférica obtenidas de pacientes con distintas enfermedades del aparato respiratorio.

**Metodología:** 1) Selección y diagnóstico de pacientes con diferentes patologías del aparato respiratorio: bronquitis eosinofílica, asma atópico causado por un alérgeno de alto peso molecular y pacientes con asma ocupacional por sustancia de bajo peso molecular. 2) Procesamiento del esputo de 2 formas distintas: con DTT (Ditiotritol) y con PI (Inhibidores de Proteasas). 3) Análisis de subpoblaciones celulares en esputo y en sangre periférica mediante citocentrifugación y citometría de flujo. 4) Estudios de biología molecular, de las células obtenidas del esputo procesado y de eosinófilos purificados de sangre periférica, mediante RT-PCR (PCR cuantitativa a tiempo real) midiendo los niveles de IL (Interleucina) -5, IL-10, IL-13 y VEGF (Factor de crecimiento del endotelio vascular). 5) Análisis de mediadores inflamatorios en sobrenadante de esputo tales como IL-8/NAP-1, TNF- $\alpha$  (Factor de Necrosis Tumoral- $\alpha$ ) e IL-1- $\alpha$ .

**Resultados:** Nuestros resultados preliminares muestran:

- En esputo, y a través de la citometría de flujo, se observa una tendencia a una mayor presencia de eosinófilos en pacientes con bronquitis eosinofílica, frente al resto de patologías estudiadas. Se han observado precursores eosinofílicos tanto en pacientes con bronquitis eosinofílica como en pacientes con asma extrínseco. En estos mismos pacientes se ha comprobado la presencia de basófilos activados.

- En sangre periférica, y a través de la citometría de flujo, se observa una tendencia a un mayor porcentaje de eosinófilos en pacientes con asma ocupacional a diferencia de los datos obtenidos en esputo. Mientras que, al igual que en esputo, se observan precursores eosinofílicos y basófilos activados en bronquitis eosinofílica y asma extrínseco.

- Por otro lado, y a través de RT-PCR, se observa un incremento del VEGF significativo en las muestras de esputo de la mayor parte de los pacientes pero, principalmente, de los que padecen bronquitis eosinofílica. Por otro lado, en las mediciones de eosinófilos de sangre periférica, este aumento es ligeramente superior en los pacientes con asma ocupacional y en los linfocitos de dicha muestra.

- Por último se ha visto que en el sobrenadante del esputo inducido se encuentran niveles superiores a los normales tanto de IL-8, TNF- $\alpha$  e IL-1- $\alpha$ , encontrando niveles más altos de TNF- $\alpha$  e IL-1- $\alpha$  en los pacientes con asma ocupacional que en el resto de patologías.

**Conclusiones:** El estudio del esputo inducido es una buena herramienta que nos permite estudiar tanto el patrón celular como inflamatorio de las patologías respiratorias, aunque es necesario incrementar el número de pacientes de cada patología para identificar marcadores específicos de cada proceso.

**81. POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE IL-4RA, IL-5, IL-13 Y RECEPTOR  $\beta_2$ ADRENÉRGICO EN UNA POBLACIÓN DE ALÉRGICOS AL POLEN DEL OLIVO.** Llanes E<sup>1</sup>, Civantos E<sup>1</sup>, López E<sup>1</sup>, Sastre B<sup>1</sup>, Seoane C<sup>1</sup>, del Pozo V<sup>1</sup>, Gallardo S<sup>1</sup>, Palomino P<sup>1</sup>, Rodríguez R<sup>2</sup>, Quiralte J<sup>2</sup>, Lahoz C<sup>1</sup>, Cárdbaba B<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departa-

mento de Inmunología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica. Universidad Complutense de Madrid. <sup>3</sup>Servicio de Alergia. Hospital General de Especialidades Ciudad de Jaén.

**Introducción y Objetivos:** El asma y los fenotipos asociados están causados por una compleja interacción entre factores ambientales y susceptibilidad genética. Numerosos estudios han identificado regiones cromosómicas y polimorfismos en genes candidatos asociados con el asma, la rinitis y los niveles de IgE en suero. Nuestro objetivo es determinar la implicación de algunos de estos polimorfismos (746 T/C de IL-5, Ile50Val de la cadena  $\alpha$  del receptor de IL-4 (IL-4RA), Gln27Glu del receptor  $\beta_2$  Adrenérgico (B2AR) y -1112 C/T del promotor de IL-13), en la sensibilización específica a distintos alérgenos de *Olea europaea* y la propensión a desarrollar un fenotipo clínico determinado.

**Sujetos y Métodos:** Seleccionamos 50 individuos sanos y 146 pacientes con rinitis estacional y/o asma y test cutáneo positivo a *O. europaea* en los que determinamos niveles de anticuerpos IgE total e IgE específica frente a *O. europaea* y los alérgenos purificados Ole e 1, Ole e 2, Ole e 3, Ole e 6, Ole e 7, Ole e 8 y Ole e 10. El estudio genético de los polimorfismos: 746 T/C del gen de IL-5, Ile50Val del gen IL-4RA, Gln27Glu del gen B2AR y -1112 C/T del promotor de IL-13 se realizó con cebadores específicos marcados para ser visualizados en el ABI310, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) seguida de digestión selectiva con endonucleasas de restricción y posterior análisis de los fragmentos obtenidos en el secuenciador.

**Resultados:** El haplotipo homocigoto Val/Val del polimorfismo Ile50Val del gen IL-4RA se encontró significativamente incrementado en los enfermos sensibilizados a Ole e 3 (24,6% sensibilizados vs 11,2% no sensibilizados,  $p=0.018$ ). Respecto al polimorfismo de IL-13, encontramos que el haplotipo TT está significativamente disminuido en pacientes alérgicos al olivo (17,8% enfermos vs 38% sanos,  $p=0.006$ ). Además, el alelo T está asociado a los niveles más bajos de IgE específica a Ole e 10 y se encuentra estadísticamente disminuido en pacientes sensibilizados a este alérgeno comparado con pacientes alérgicos no sensibilizados al mismo (36,1% vs 49,3%,  $p=0.024$ ). Los otros dos polimorfismos estudiados (746 T/C del gen de IL-5 y Gln27Glu del gen B2AR) no presentan asociaciones significativas.

**Conclusiones:** Encontramos que el haplotipo homocigoto Val de IL-4RA predispone a la sensibilización específica a Ole e3. El haplotipo TT de IL-13 es un factor de protección en la alergia al polen del olivo. En concreto, el alelo T confiere protección específica a la sensibilización a Ole e 10. Los polimorfismos del gen de IL-5 y B2AR no estarían relacionados con la regulación de la respuesta alérgica al polen del olivo.

**82. CAUSAS DE HIPERCATABOLISMO DE IGG EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN TRATADOS CON GAMMAGLOBULINA INTRAVENOSA.** Carbone J, Mora R, Paravisini A, Sarmiento E, Micheloud D, Gil J, Rodríguez-Molina JJ, Sánchez-Ramón S, Fernández-Cruz E. *Unidad de Inmunología Clínica. Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.*

**Introducción.** Las gammaglobulinas intravenosas (GGIV) poseen la mayoría de las características de las inmunoglobulinas naturales tales como la neutralización de antígenos y la activación del complemento. La vida media de la IgG natural es de 21 días, habiéndose descrito similares vidas medias en distintas preparaciones de GGIV. Algu-

nos pacientes que reciben dosis convencionales de GGIV presentan tasas catabólicas aumentadas de IgG, lo cual puede suponer la necesidad de ajustes periódicos en las dosis así como en los intervalos de infusión.

**Objetivo:** Determinar posibles causas de hipercatabolismo de IgG en pacientes con hipogammaglobulinemia tratados con GGIV.

**Métodos.** Se estudiaron las características clínicas e inmunológicas de 12 pacientes con inmunodeficiencia variable común. Todos los pacientes recibían terapia crónica con GGIV a dosis de 400 mg/kg cada tres semanas. Se obtuvo la mediana de IgG entre los niveles pre-infusionales observados a lo largo de 2004. Se definió hipercatabolismo de IgG como la presencia de niveles menores al valor de la mediana menos una desviación standard. Entre las pruebas inmunológicas se investigó la expresión de moléculas de activación de linfocitos T CD4+ y CD8+ asociadas a la presencia de infecciones crónicas mediante citometría de flujo de tres colores. Panel de anticuerpos monoclonales: CD38-FITC/HLADR-PE/CD4 o CD8-PerCP.

**Resultados.** La mediana de IgG fue de  $809 \pm DS 204$  mg/dl, intervalo: 499-1040 mg/dl. Se observó una asociación entre hipercatabolismo de IgG y la presencia de enfermedad autoinmune (Prueba de Fisher,  $p=0.018$ ); presencia de esplenomegalia ( $p=0.067$ ) y con la presencia de niveles aumentados de células T CD4+ activadas (CD4+CD38+DR+,  $p=0.07$ ). No se observó asociación con la presencia de infecciones activas ( $p=0.57$ ), con el uso de distintos preparados de GGIV ( $p=0.76$ ) o con la activación de células T CD8+ (CD8+CD38+ ( $p=0.46$ )). Los niveles de IgG correlacionaron negativamente con el nivel de células T CD4+ activadas (coeficiente de Spearman -0.6,  $p=0.05$ ).

**Conclusión.** Estos datos sugieren que la presencia de hipercatabolismo de IgG en pacientes con IDVC que reciben GGIV debiera llevar a un control de la actividad de procesos autoinmunes, monitorización de esplenomegalia e investigación de patologías que cursan con hiperactivación de células T CD4+.

**83. DESCRIPCIÓN DE UN PACIENTE CON AUSENCIA DE CÉLULAS NATURAL KILLER.** Fernández Suárez A, Lara Ruiz JM, Navarro Merino M, Pérez Pérez G, Rojo Jurado MT, Guzmán Espinosa C, Núñez Roldán A, Sánchez Sánchez B. *Servicio de Inmunología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla. Servicio de Pediatría. Hospital Universitario Virgen Macarena, Sevilla.*

**Objetivo.** Estudio de un niño de seis meses de edad, procedente del Hospital Universitario Virgen Macarena de Sevilla, remitido por el servicio de Neumología a la Sección de Inmunodeficiencias. Presentaba fallo de medro, diarrea persistente, neumonías de repetición con picos febriles y bronquitis grave de evolución muy tórpida (sin respuesta a tratamiento durante 3 meses). Se descartó una fibrosis quística.

**Resultados.** Analítica normal. Hemograma con discreta monocitosis. Niveles normales de Igs y complemento. Anticuerpos específicos: IgG toxoide tetánico e IgG2 polisacárido capsular *Pneumococcus* normales, IgG *Haemophilus* tipo B < límite detección. En el estudio de subpoblaciones se encontraron sólo 24 células/ $\mu$ L CD3-/CD56+ (0.6%), 47 células/ $\mu$ L CD3-(CD16+/CD56+) (1.0%), y menos de un 1% de células CD3-/CD16+, lo que implica la práctica ausencia de células natural killer (NK). Se repitió el estudio dos veces más con nuevas muestras, y se emplearon distintas combinaciones de anticuerpos con diferentes marcajes para confirmar la deficiencia de células NK, con idénticos resultados: CD16 FITC (NKP15)/CD3 PE, CD3 FITC/CD16 PE (Leu-

11c ó B73.1), CD57 FITC (Leu 7)/CD3 PE, CD56 FITC (NCAM 16.2)/CD3 PE, CD3 FITC/CD56 PE (Leu 19), CD3 FITC/CD56 PE (MY 31) y CD56 (N901/NKH-1). También se analizaron las poblaciones celulares en los familiares del niño afecto. Su padre no presentaba clínica, con un estudio subpoblaciones de 382 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> (18.0%), 283 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> (13.0%); analítica y niveles de Igs y complemento normales. Su madre no manifestaba clínica a pesar de las 49 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> (3.0%) y las 16 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> (1.0%) encontradas; niveles normales de IgG1 e IgG3, disminuidos de IgG2 e IgG4 y resto de analítica normal. Su hermana tampoco presentaba clínica, con 81 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD56<sup>+</sup> (4.5%) y 18 células/ $\mu$ L CD3<sup>-</sup>/CD16<sup>+</sup> (1.0%), siendo el resto de analíticas y los niveles de Igs y complemento normales. Para descartar la presencia de linfocitos maternos residuales en el niño se procedió a realizar el tipaje HLA de baja resolución de la familia con los siguientes resultados: paciente, A\*01/24 B\*38/52 DRB1\*03/13; padre, A\*01/03 B\*52/14 DRB1\*03/-; madre, A\*24/25 B\*18/38 DRB1\* 03/13; hermana, A\*01/24 B\*38/52 DRB1\*03/13.

**Conclusiones.** El paciente presenta una deficiencia en el número de células NK. Tras realizar el estudio familiar se observa un fenómeno de redundancia en la madre y en la hermana del paciente, puesto que ambas también presentaron un marcado descenso del número de células NK y ausencia de clínica. Finalmente, tras consultar los pocos casos similares descritos en la literatura, se procedió al tratamiento empírico con gammaglobulina endovenosa, observándose una mejora sustancial en el estado general del paciente.

#### 84. CARACTERIZACIÓN DE LAS MUTACIONES DE *SPLICING* E IDENTIFICACIÓN DE UN POSIBLE MOTIVO DE SECUENCIA REGULADOR DEL *SPLICING* (*EXONIC SPLICING ENHANCER*) EN EL GEN DEL C1 INHIBIDOR. *Roche O, Blanch A, Saboya M, Garrido S, Fontán G, López-Trascasa M.* Departamento de Inmunología del Hospital Universitario La Paz. Madrid.

**Objetivos:** Hemos estudiado el gen del C1-Inhibidor (*C1NH*) en una serie de 93 familias españolas, y hemos caracterizado a nivel de ARNm las mutaciones de *splicing* y las mutaciones puntuales encontradas en los exones 4, 5 y 7.

**Metodología:** El análisis de las mutaciones se ha realizado mediante polimorfismo de conformación de la cadena sencilla (SSCP), secuenciación, Southern blot y PCR múltiple cuantitativa. La caracterización de las mutaciones en las secuencias de *splicing* se ha efectuado mediante RT-PCR.

**Resultados:** Se han encontrado 10 mutaciones diferentes, que afectan a las secuencias de *splicing* de los intrones 2, 3, 4, 5 y 7, o a la última base del exón 3. La mutación c.5512delA (g.4349delA) produce la delección del exón 4 en el ARNm maduro, c.6863C>G (g.8322C>G) y c.889+2T>C (g.8539T>C) la delección del exón 5, y c.1249+2delT (g.14252delT) la delección del exón 7. También se han analizado mediante RT-PCR las mutaciones puntuales encontradas en los exones 4, 5 y 7. Dos de estas mutaciones, c.882C>G y c.884T>G, que se localizan a 8 y 6 bases del extremo 3' del exón 5 producen la delección de este exón durante el proceso de *splicing*. En la RT-PCR del paciente con la mutación c.884T>G (g.8523T>G; Leu273Arg) se han identificado 3 transcritos distintos: uno de menor tamaño del esperado con el exón 5 deleccionado, y dos del tamaño esperado que corresponden al transcrito salvaje y otro con la mutación Leu273Arg. Sin embargo, en la RT-PCR del paciente con la mutación c.882C>G (g.8521C>G; Tyr272Stop) solamen-

te se han identificado 2 transcritos distintos, el ARNm salvaje y un ARNm en el que se ha deleccionado el exón 5 durante el proceso de *splicing*.

**Conclusión:** Hemos caracterizado el efecto de 4 mutaciones en los sitios de *splicing* de los intrones 4, 5 y 7, y hemos identificado por primera vez en el *C1NH* un posible motivo de secuencia regulador del *splicing* (*exonic splicing enhancer*).

#### 85. UTILIDAD DE IgE TOTAL SÉRICA COMO CRIBADO PREVIO A LA DETERMINACIÓN DE IgE ESPECÍFICA ANTE EL PACIENTE CON SOSPECHA DE ALERGIA. *San Segundo Arribas D, Crespo del Pozo J, Gómez García C, Bolívar A, López-Hoyos M.* Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

**Objetivo:** Presentar la situación actual del diagnóstico alérgico basado en la determinación de IgE específica y en qué casos podría beneficiarse de la incorporación de una determinación de una IgE total como método de cribado.

**Métodos:** Se recogieron y analizaron las determinaciones de IgE total e IgE específica de 499 pacientes con sospecha de alergia en un estudio retrospectivo observacional.

**Resultados:** A partir de las 499 muestras recibidas, 82 tenía un nivel indetectable de IgE total (<18 IU/mL), 164 entre 18-100 IU/mL y 253 más de 100 IU/mL. Nuestro servicio realizó un total de 2832 determinaciones de IgE específicas. Se observaron 2092 con resultado de clase 0 (73,87%), 123 de clase 1 (4,34%), 195 de clase 2 (6,88%), 169 de clase 3 (5,96%), 122 de clase 4 (4,30%), 76 de clase 5 (2,68%) y 55 de clase 6 (1,94%). Un 54,3% de los pacientes presentó positividad para al menos un alérgeno. Tan solo se detectaron 3 positividad de IgE específica cuando la IgE total resultó indetectable. Cuando se analizó la muestra con niveles de IgE total dentro de unos límites fisiológicos (18-100 IU/mL) el 95% de las mismas se incluyeron en clases 0, 1 ó 2, siendo el 88,6% clase 0. En el análisis del grupo de alérgenos más frecuentes se observaron clases de IgE específica frente a alérgenos inhalantes junto a niveles más altos de IgE total.

**Conclusión:** Los resultados parecen tener el suficiente peso como para revalorizar la determinación de IgE total en términos de eficiencia para un laboratorio con una presión asistencial elevada como el nuestro. Permite claramente ahorrar las determinaciones de IgE específicas y todo el consumo de recursos técnicos y humanos que esto conlleva. Los criterios para la determinación de determinados alérgenos debieran ser revisados, al menos en nuestro medio, llegando a un consenso entre el médico peticionario y el receptor de la muestra, encargado de la determinación, por cuanto puede disponer previamente del valor total de IgE. Por último, nuevos estudios de coste/efectividad más detallados podrían aportar una mejor valoración del impacto económico de todo lo apuntado en el estudio.

#### 86. IgE ESPECÍFICA FRENTE AL GLUTEN EN PACIENTES CON SOSPECHA DE ALERGIA ALIMENTARIA. *Crespo del Pozo J, San Segundo Arribas D, Gómez García C, Bolívar A, López-Hoyos M.* Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.

**Objetivo:** Evaluar la presencia de anticuerpos de clase IgE frente al gluten como un factor más de confusión en el diagnóstico diferencial entre alergia alimentaria por mecanismo IgE y enfermedad celiaca.



**Métodos:** Se recogieron y analizaron las muestras de 100 pacientes con sospecha de alergia alimentaria y se realizaron las determinaciones de anticuerpos anti-transglutaminasa e IgE específica frente a gluten.

**Resultados:** Se recibieron 100 muestras de pacientes con sospecha de alergia alimentaria. Encontramos que 4 de los pacientes presentaron positividad para los anticuerpos antitransglutaminasa IgA y, por otra parte otros 4 frente a transglutaminasa de clase IgG (en total un 8%). En una segunda fase del estudio, se detectaron otros 8 pacientes con positividad para IgE específica frente a gluten (1/8 de clase 3, 5/8 de clase 2 y 2/8 de clase 1).

**Conclusión:** Bajo el término de alergia alimentaria pueden camuflarse otras patologías que, en la práctica clínica, podrían ser fácilmente identificables gracias al diagnóstico inmunológico. Nuestro estudio refleja la dificultad de clasificar patologías con sintomatología tan pareja por cuanto un 8% de los pacientes presentaron marcadores muy específicos de enfermedad celíaca. Curiosamente otros 8 pacientes presentaron una IgE específica a gluten, con lo cual parece razonable presumir que presentarían la sintomatología que motivó la consulta en un contexto clínico similar al de un paciente celíaco tipo. Con todo, podemos sugerir que en aquellos pacientes con sintomatología de enfermedad celíaca y/o alergia alimentaria habría que considerar la determinación de IgE frente al gluten, en caso de negatividad de los marcadores serológicos de celiaquía.

**87. MUTACIONES EN EL GEN NEMO EN INCONTINENTIA PIGMENTI. EXPERIENCIA DEL HOSPITAL SON DURETA EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA.** *Martínez-Pomar N, Muñoz-Saa I, Pujalte P, Heine-Suñer D\*, Matamoros N. Servicio de Inmunología., \*Servicio de Genética. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.*

**Introducción:** La Incontinentia Pigmenti (IP) es una enfermedad genética ligada al cromosoma X, letal en varones. Las mujeres sobreviven gracias a la dizigosis del cromosoma X y a la selección negativa de las células que expresan el cromosoma X mutado. La mutación más frecuente es una deleción de los exones 4 al 10 del gen NEMO, aunque se han descrito otras mutaciones. Las mutaciones del gen NEMO que no anulan totalmente la actividad del factor NF- $\kappa$ B permiten sobrevivir a los varones, originando una variante alélica de la IP denominada displasia ectodérmica hipohidróica e inmunodeficiencia (HED-ID).

**Objetivos:** El objetivo de este trabajo multicéntrico es realizar el diagnóstico genético de las/los pacientes diagnosticados de IP/HED, y analizar la expresión del gen NEMO.

**Pacientes y Metodología:** Hemos analizado 9 pacientes afectados de IP. Dada la alta frecuencia de la deleción común, el primer abordaje es su determinación mediante PCR. En caso de resultado negativo nos centramos en la búsqueda de nuevas mutaciones mediante secuenciación automática de ADN de los exones. Paralelamente analizamos el patrón de inactivación del cromosoma X, que es sesgado en un alto porcentaje de pacientes con IP. Dado que hay un 15% de pacientes afectados de IP que no muestran mutaciones en el gen NEMO analizamos su expresión mediante citometría de flujo en sangre periférica.

**Resultados:** Los resultados muestran que aproximadamente el 50% de las pacientes presentan la deleción común y un patrón de inactivación del cromosoma X sesgado. En las demás pacientes analizadas no encontramos mutaciones en los exones del gen NEMO, lo que sugiere que puede haber mutaciones en regiones no codificantes, o en otros

genes que afecten a la función del NF- $\kappa$ B pero que no alteran la expresión del gen NEMO.

Han colaborado: Dr Vicente García-Patos Briones. Servicio de Dermatología. Hospital Vall d'Hebrón; Dra E. Gean. Servicio de Genética. Hospital San Joan de Deu; Dr. Oscar de la Calle. Servicio de Inmunología. Hospital Sant Pau; Dra. Montse Gilaberte. Servicio Dermatología. Hospital Sant Pau.

**88. DESCRIPCIÓN DE UN CASO: PACIENTE CON LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA Y ESTUDIO FAMILIAR.** *García Astudillo LA, Crespo del Pozo J, Castellanos A\*, San Segundo Arribas D, Mazurra F\*\*, Leyva Cobián F, López Hoyos M. Servicios de Inmunología, \*Pediatría y \*\*Anatomía patológica. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

Presentamos el estudio familiar realizado a partir de una niña fallecida a los 6 meses de edad por fallo multiorgánico e infección generalizada por *A. fumigatus*. Por el análisis histopatológico de la necropsia se concluyó el diagnóstico de linfocitosis hemofagocítica familiar (FHL).

**Objetivos:** Estudio mutacional del gen de la perforina (PRF1) de la paciente diagnosticada de FHL. Estudios genéticos y funcionales de sus progenitores y rastreo de la mutación en la familia para determinar la existencia de los portadores.

**Metodología:** La caracterización de la mutación se llevó a cabo por secuenciación de los exones 2 y 3 del gen PRF1. Se realizaron análisis de citotoxicidad por células NK ( $^{51}$ Cr) y análisis fenotípico de expresión de perforina en los progenitores y familiares mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Inicialmente se descartó la existencia de infección por EBV, causa más frecuente de FHL adquirida. Se comprobó en la paciente la existencia de una mutación homocigota en el exón 3 del gen de la PRF1 asociada a FHL y correspondiente a un cambio en la posición 1442 A>C, codón 385. No se realizaron estudios funcionales y fenotípicos puesto que sólo se dispuso de muestra de necropsia. El DNA se obtuvo de ganglio congelado. Ambos progenitores fueron heterocigotos para la mutación y están sanos. El padre sufrió recientemente una neumonía extrahospitalaria por *S. pneumoniae* con curso agudo y agresivo y respuesta a antibioterapia retardada. El padre expresó niveles normales de perforina tanto en CD8+ como en NK. En el análisis de citotoxicidad presentó una actividad reducida de células NK. La madre no expresó perforina en linfocitos CD8+ siendo normal la expresión en células NK. El análisis funcional de citotoxicidad fue normal. Dos tíos maternos y uno paterno fueron heterocigotos para la mutación aunque no demostraron cambios fenotípicos ni funcionales.

**Conclusiones:** Se confirmó genéticamente el diagnóstico de FHL en la paciente y se describió la mutación causante. Los datos se utilizaron para realizar el consejo genético a los padres y familiares portadores de la mutación.

**89. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE TNFR1, TNFR2 Y TNF- $\alpha$  EN SUBPOBLACIONES CELULARES DE PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN (IVC).** *Iglesias J, Pujalte F, Pons J, Ferrer JM, Matamoros N. Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.*

**Introducción:** La Inmunodeficiencia Variable Común (IVC) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada por una deficiente producción de anticuerpos e infecciones bacterianas respiratorias de repe-

tación. Un número significativo de pacientes además de la hipogammaglobulinemia característica, presentan alteraciones en los linfocitos T, entre las que se incluyen, entre otras, la linfopenia a expensas principalmente de la población T CD4 CD45RA+. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han demostrado un aumento en la expresión de la proteína CD95 y de la apoptosis espontánea en las células T CD4 CD45RA+ de un subgrupo de pacientes IVC, caracterizados por una linfopenia severa en sus poblaciones T CD4+ y T CD4 CD45RA+. También se demostró la imposibilidad de inducir apoptosis *in vitro* a través de la molécula CD95 en las células T CD4+ de los pacientes IVC linfopénicos a pesar de presentar una mayor expresión de CD95.

**Objetivos:** Estudiar la expresión en membrana del TNF- $\alpha$  y de sus receptores (TNFR1, TNFR2) en diferentes subpoblaciones celulares de pacientes con IVC y el estudio en suero de las formas solubles de estas moléculas, en pacientes con IVC.

**Pacientes y métodos:** Se estudió mediante citometría de flujo la expresión en membrana de TNF- $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2 en las subpoblaciones celulares T CD4+, T CD4 CD45RA+, T CD4 CD45RO+, T CD8 y CD19+ de 7 pacientes IVC linfopénicos (< 600 células CD4+/mm<sup>3</sup> y CD4+ CD45RA+ < 160 células/mm<sup>3</sup>), 6 pacientes IVC no linfopénicos (> 700 células CD4+/mm<sup>3</sup> y CD4+ CD45RA+ > 300 células/mm<sup>3</sup>) y 15 controles sanos. También se estudió mediante técnica de ELISA la concentración en suero de las formas solubles de estas moléculas.

**Resultados y Conclusiones:** No se encontraron diferencias significativas entre los controles sanos y los pacientes IVC en cuanto a los porcentajes de expresión de TNF- $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2 en las diferentes subpoblaciones celulares estudiadas. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración sérica de TNF- $\alpha$ , TNFR1 y TNFR2 entre los grupos de pacientes IVC y los controles sanos.

Hace falta profundizar en el estudio de la vía TNF- $\alpha$ /TNFRs determinando el papel funcional de ambos receptores y su posible contribución a la linfopenia presente en los pacientes IVC.

**90. COLONIZACIÓN POR *HELICOBACTER PYLORI* EN LA INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN. Pérez-Castellano M, Sanz E\*, Escobar D, Pons, J, Alemany G\*, Vega F\*, Milá J, Matamoros N. Servicio de Inmunología. \*Unidad de Radiofarmacia, Sección de Medicina Nuclear. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca. Illes Balears.**

**Introducción:** La inmunodeficiencia variable común (IVC) es una inmunodeficiencia primaria predominantemente de anticuerpos en la que los pacientes presentan infecciones respiratorias y/o digestivas de repetición y un riesgo elevado de sufrir cáncer gástrico. *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) es un bacilo gram negativo implicado en la etiología del carcinoma gástrico. A través de una técnica no invasiva (test del aliento) podemos detectar la colonización gastroduodenal por *H. pylori*.

**Objetivo:** Estudiar la presencia de manifestaciones gástricas y su relación con la colonización por *H. pylori* en un grupo de pacientes con IVC.

**Metodología:** Se estudia en 15 pacientes adultos (20-55 años), diagnosticados de IVC, 6 de los cuales presentan manifestaciones dispépticas, la presencia de *H. pylori* mediante test del aliento con urea marcada con <sup>13</sup>C. Se comparan los resultados con los obtenidos en un estudio retrospectivo realizado en nuestra comunidad en 952 adultos (20-50 años) con el mismo patrón de molestias gastroduodenales.

**Resultados:** El test del aliento resultó positivo en un 40% de los pacientes con IVC, incrementándose la positividad hasta el 83% en los

pacientes que presentaban molestias digestivas (n=6). Si comparamos este porcentaje de positividad (83%) en pacientes con IVC y molestias digestivas con el porcentaje de individuos control de 20 a 50 años (61.24%) con manifestaciones clínicas superponibles, pero no afectos de IVC, a los que se les ha realizado el test del aliento en el servicio de medicina nuclear de nuestro hospital durante los últimos 5 años, se evidencia que la presencia de *H. pylori* en los pacientes con IVC y molestias digestivas es claramente superior a la población no inmunodeficiente con dispepsia (83% vs. 61.24%).

**Conclusiones:** Aunque el grupo de pacientes con IVC estudiados es reducido, nuestros resultados concuerdan con estudios previos obtenidos mediante métodos invasivos, en los que existe una clara relación entre patología gastroduodenal dispéptica e infección por *H. pylori* en la IVC. La gran variabilidad geográfica de la prevalencia de esta patología, hace difícil realizar estudios comparativos. Resultados previos situarían la prevalencia de *H. pylori* en la Comunidad Balear en torno al 21%, cifra que equivale a la mitad de la de nuestra población con IVC, que es del 40%. Si se tiene en cuenta la baja prevalencia de la IVC en la población general (1:10.000 -1:20.000) y la elevada incidencia de cáncer gástrico en estos pacientes, sería recomendable, a la luz de estos resultados, la realización de un test práctico, fiable y no invasivo, como es el del aliento, en aquellos pacientes con IVC que presenten clínica gástrica para descartar una infección por *H. pylori* y realizar tratamiento específico.

**91. DEFICIENCIA DE IRAK-4 EN TRES FAMILIARES EN CUARTO GRADO. Cárdenes MP, Santiago E, Bernuth H, Puel A, Ku C-L, García-Saavedra A, Alvarez-Santana MC, Casanova JL, García-Laorden MI, Rodríguez-Gallego JC. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario de Gran Canaria Doctor Negrín.**

La deficiencia de IRAK-4 es una inmunodeficiencia primaria autosómica recesiva descrita recientemente. IRAK-4 es una quinasa que media la transmisión de señal de los "Toll-like receptors", y los receptores de la IL-1 y la IL-18.

Se presenta el estudio retrospectivo de las características clínicas, microbiológicas, inmunológicas y genéticas de tres pacientes con esta inmunodeficiencia.

El caso índice (P1) fue un niño de 7 1/2 años que desde los primeros meses de vida presentó infecciones invasoras de repetición por *S. pneumoniae* y múltiples infecciones cutáneas por la misma cepa (confirmación genética) de *S. aureus*. Además de presentar 3 episodios de faringoamigdalitis por *S. pyogenes* (2) y *S. equi* (1). Una tía-abuela (P2) del paciente había fallecido de meningitis a la edad de dos años tras múltiples episodios de infecciones por *S. aureus* y *P. aeruginosa*. Un hermano de P2 había fallecido de una meningitis por *P. aeruginosa* tras un episodio de meningitis y artritis por *S. pneumoniae*. Los tres pacientes presentaron una respuesta inflamatoria (biológica y clínica) y febril muy disminuida o ausente.

El estudio inmunológico en el caso índice puso de manifiesto un déficit de producción de citocinas inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL8, IL-10, IL-12) en respuesta a agonistas de TLRs y a *S. pneumoniae*, *S. enteritidis* y BCG *in vitro*. Otros estudios inmunológicos, incluida la respuesta a vacunación con polisacáridos de neumococo, fue normal. La producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a IL-18 fue nula. El estudio genético mostró una mutación, E402X, en homocigosis. Al ser analizadas muestras de biopsias de P1 y P2, ambos pacientes fueron homocigotos para la misma mutación. Sin embargo su padre era heterocigoto

y su madre homocigota para el alelo normal, indicando una isodisomía segmentaria uniparental (ISU)

Los TLRs son redundantes en la defensa frente a Salmonelas y micobacterias. La deficiencia de IRAK-4 debe ser sospechada en pacientes con infecciones recurrentes por Gram-positivos capsulados (y también algunos Gram-negativos), especialmente si presentan una respuesta inflamatoria y febril reducida. La existencia de una herencia que sugiera dominancia no debe excluir la sospecha de inmunodeficiencia de IRAK-4. La ISU tiene además implicaciones en el consejo genético.

*Financiación:* RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11 Y RTICCC-C03/10.

**92. DIVERSIDAD GENOTÍPICA Y FENOTÍPICA EN UNA COHORTE DE 19 PACIENTES ESPAÑOLES AFECTOS DEL SÍNDROME AUTOINFLAMATORIO TRAPS (SD. PERIODICO ASOCIADO AL RECEPTOR 1 DEL TNF).** *Aróstegui JJ<sup>1</sup>, Campistol JM<sup>2</sup>, Solís P<sup>3</sup>, Antón J<sup>4</sup>, Rius J<sup>1</sup>, Plaza S<sup>1</sup>, Vives J<sup>1</sup>, Yagüe J<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Clínic. Barcelona. <sup>2</sup>UTR. Hospital Clínic. Barcelona. <sup>3</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Universitario. Valladolid. <sup>4</sup>Servicio de Reumatología Pediátrica. Hospital Sant Joan de Deu. Barcelona.

El síndrome TRAPS es un trastorno autoinflamatorio debido a mutaciones del gen que codifica para el receptor 1 del TNF. Presenta un patrón de herencia autosómico dominante, y clínicamente se caracteriza por episodios febriles prolongados con afectación ocular, muscular, cutánea, articular y digestiva. Las mutaciones que afectan a cisteínas han sido asociadas con un mayor riesgo de amiloidosis secundaria.

**Objetivos.** Verificar el espectro mutacional del gen *TNFRSF1A* en 19 pacientes con clínica compatible con TRAPS. Analizar las posibles correlaciones genotipo-fenotipo.

**Métodos.** Análisis mutacional del gen *TNFRSF1A* mediante SBT. Cuantificación de la forma soluble del receptor 1 del TNF (sTNFR1), durante y entre los episodios agudos. Cuantificación de los reactantes de fase aguda.

**Resultados.** Se han identificado 3 pacientes sin historia familiar portadores de mutaciones en heterocigosis (C30R, G36E y C43Y), y 16 individuos afectados en 3 generaciones de una misma familia portadores de la mutación C52R. El estudio genético de miembros sanos de las familias permitió identificar 2 mutaciones *de novo* (C30R y G36E) y la existencia de 2 individuos portadores asintomáticos (C43Y y C52R), sugiriendo penetrancia incompleta. En 7 pacientes de la familia portadora de la mutación C52R se ha objetivado depósito amiloide renal, con afectación funcional. Los niveles plasmáticos de sTNFR1 no sufren una modulación al alza durante los episodios agudos en ninguno de los pacientes, que sí es objetivada en los individuos sanos. La fuerte reacción de fase aguda durante los episodios agudos permite afirmar la presencia de un proceso inflamatorio disregulado.

**Conclusiones.** La sospecha diagnóstica de TRAPS debe basarse en la sintomatología clínica, asociada a la ausencia de etiología infecciosa, neoplásica y autoinmune. La ausencia de historia familiar no debe ser un factor excluyente. La presencia de mutaciones en cisteínas parece estar asociado a un mayor riesgo de amiloidosis secundaria, no pudiendo descartarse otros factores genéticos. La cuantificación del sTNFR1 no es un buen parámetro de cribado del síndrome TRAPS, dada su falta de correlación con las mutaciones en el gen *TNFRSF1A*, así como su variabilidad en función de la reacción de fase aguda.

*Financiación:* Beca 003110 de Marato-TV3

**93. VARÓN DE DOS AÑOS DE EDAD CON INFECCIÓN FULMINANTE POR VIRUS DE EPSTEIN-BARR Y FRACASO MULTISITÉMICO.** *Delgado-Pérez L, Rodríguez-Gutiérrez JF, Quintero S\*, Hernández-González A\*, Brieva JA, Nieto A, Sampalo A.* Servicio de Inmunología y \*Servicio de UCI Pediátrica. Hospital Puerta del Mar. Cádiz

Varón de 2 años de edad ingresado en UCI pediátrica por disminución brusca del nivel de conciencia y crisis convulsiva en el contexto de una mononucleosis infecciosa de evolución desfavorable.

Una semana antes se había demostrado la presencia de Acs IgM frente a VEB en el transcurso de un síndrome febril con exantema, diarreas y decaimiento, que evolucionó con dificultad respiratoria, adenopatías y hepato-esplenomegalia.

Paulatinamente se desarrolla un empeoramiento del estado general con anemia, leucocitosis moderada, elevación considerable de las transaminasas y crisis convulsiva, por lo cual se consulta al Servicio de Inmunología.

Pese a la instauración de medidas de soporte con ventilación mecánica e intubación y de *tratamiento específico conforme a sospecha clínica\**, el paciente mostró una evolución desfavorable con signos de fallo hepático agudo, insuficiencia respiratoria y derrame pleural, encefalopatía aguda, insuficiencia renal aguda, pancitopenia, C.I.D. y finalmente exitus.

La evolución tan severa del cuadro de mononucleosis infecciosa en un varón, pese a que no constaban antecedentes personales ni familiares de interés, sugirió la posibilidad de una respuesta inmune anormal al virus de Epstein-Barr que cabría englobar en el contexto del Síndrome clínico de Enfermedad linfoproliferativa ligada a X (XLP) con o sin mutación en el gen SH2D1A.

Al tratamiento con corticoides se añadió Ganciclovir, IGIV y *anticuerpos monoclonales anti-CD20 (Rituximab)* previa autorización como medicamento de uso compasivo. Pese a ello y a la descripción reciente de la utilidad del Rituximab publicada en dos casos previos de XLP, no se pudo modificar el curso ya muy avanzado de la enfermedad.

El estudio molecular del gen SH2D1A mostró la presencia de la mutación R55X que da lugar a una proteína truncada en el exón 2 y que confirmó el diagnóstico de **síndrome linfoproliferativo ligado a X**.

Pese a la baja frecuencia de este síndrome, destacamos la necesidad de considerarlo en pacientes con evolución desfavorable tras infección por EBV, aun en ausencia de datos familiares sugerentes.

**94. ALTERACIÓN DE LOS MECANISMOS REGULADORES DE LA APOPTOSIS EN LAS CÉLULAS T DE PACIENTES CON SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH.** *Srivastava GK, Ruiz MC, Molina IJ.* Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

El Síndrome de Wiskott-Aldrich se caracteriza por una profunda inmunodeficiencia en la que típicamente se aprecia una linfopenia que evoluciona de manera progresiva con la edad. Igualmente, de entre los defectos más relevantes de la enfermedad destaca la alteración en las respuestas proliferativas y de polimerización de actina de los linfocitos T en respuesta a estimulación mediada por CD3. Al objeto de explorar la posible participación de los mecanismos de apoptosis en el desarrollo de linfopenia y defectos celulares relacionados con CD3, hemos utilizado 5 líneas celulares aloespecíficas procedentes de pacientes diagnosticados con WAS. Estas líneas celulares fueron estimuladas con anti-

cuerpos anti-CD3 entrecruzados, mostrando en todos los casos una profunda alteración en la respuesta proliferativa a estimulación mediada por CD3 pero no a la aloestimulación específica. Esta alteración en la respuesta proliferativa afectaba también a la madre de dos pacientes, portadora obligatoria de la enfermedad. Al objeto de evaluar los mecanismos de apoptosis, las líneas de aloespecíficas de los pacientes con WAS y las de dos individuos normales fueron estimuladas con PHA, CD3, CD95, TRAIL y dexametasona. La apoptosis fue evaluada tras 24 horas de cultivo mediante análisis de ciclo celular con tinción con Yoduro de Propidio y citometría de flujo. Hemos detectado que las células de WAS son significativamente más sensibles a la apoptosis mediada por PHA y estimulación específica, mientras que se comportan de manera equivalente a los controles tras estimulación con anticuerpos anti-CD95 y TRAIL. Esta mayor sensibilidad a la apoptosis tras estimulación específica de las células T puede contemplarse en el contexto de los mecanismos que provocan en los pacientes la linfopenia progresiva.

**95. VECTORES LENTIVIRALES DIRIGIDOS TRANSCRIPCIONALMENTE MEDIANTE EL PROMOTOR DE WASP TRANSDUCEN EFICIENTEMENTE PROGENITORES HEMATOPOYÉTICOS.** Frecha C<sup>1</sup>, G<sup>a</sup> Toscano M<sup>2</sup>, Thrasher A<sup>3</sup>, Molina IP, Martin F<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra. CSIC. Granada. <sup>2</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. <sup>3</sup>Molecular Immunology Unit. Institute of Child Health. University College, London.

En trabajos anteriores, hemos descrito la generación de vectores lentivirales para el desarrollo de protocolos de terapia génica en el Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) con los que se obtiene una expresión fisiológica y restringida del gen WASP a células hematopoyéticas. Esta expresión se encuentra regulada a través de las secuencias proximales del promotor del gen WASP que controlan la transcripción del gen terapéutico contenido en el vector lentiviral WW (WASP promotor-WASP gen). Al objeto de comprobar si los vectores lentivirales regulados por el promotor proximal de WASP son capaces de transducir eficientemente progenitores hematopoyéticos, hemos aislado células pluripotenciales procedentes de la médula ósea de ratones WASP KO y de progenitores hematopoyéticos humanos obtenidos de sangre de cordón umbilical. Las células progenitoras fueron obtenidas mediante inmunoselección magnética positiva con anticuerpos anti Sca-1 (progenitores murinos) y CD34 (progenitores humanos). Los progenitores hematopoyéticos fueron transducidos con los vectores lentivirales expresando WASP, WW y SW (promotor constitutivo SFFV), así como con los vectores equivalentes expresando GFP (vectores WE y SE). Los progenitores hematopoyéticos fueron expandidos en medio Stem-Span y/o diferenciadas en Methocult. Los progenitores y las colonias formadas fueron evaluadas para la expresión de WASP o GFP. Hemos demostrado que los vectores WW y WE transducen de manera eficiente a los progenitores hematopoyéticos aunque los niveles de expresión en las colonias derivadas tras su diferenciación son substancialmente menores que con los vectores SW y SE. Sería interesante determinar si los niveles de expresión conseguidos con el promotor WASP (vectores WE y WW) se relacionan con los niveles de WAS expresado por los diferentes tipos de colonias mieloides. Concluimos por tanto que los vectores WW y WE, aunque alcanzan niveles de expresión del transgen menores que los vectores SW y SE, son igualmente capaces de transducir progenitores, y mantener la expresión tras la diferenciación de las mismas a células hematopoyéticas maduras. Esto demuestra que los vectores WW repre-

sentan una herramienta eficaz y segura para el desarrollo de protocolos de terapia génica en el Síndrome de Wiskott-Aldrich.

**96. SÍNDROME DE HIPER IgM LIGADO AL X (XHIM) DEBIDO A UNA DELECCIÓN DEL GEN DEL CD40 LIGANDO.** Martínez-Martínez L<sup>1</sup>, González-Santesteban C<sup>1</sup>, Giner-Muñoz M<sup>2</sup>, Tuset E<sup>2</sup>, Rodríguez-Sánchez JL<sup>1</sup>, de la Calle-Martín O<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospital de Sant Pau. <sup>2</sup>Hospital Sant Joan de Déu. Barcelona.

**Introducción:** El síndrome de Hiper IgM ligado al X (XHIM) es una inmunodeficiencia combinada causada por alteraciones en el gen TNFSF5, que codifica la proteína CD40 ligando. Se presenta el caso de dos pacientes de XHIM debido a una gran delección de dicho gen.

**Materiales y Métodos:** Se estudiaron 2 hermanos varones, de 5 y 2 años de edad, que habían sufrido infecciones recurrentes y mostraban un déficit severo de IgG e IgA, acompañado de neutropenia. En la actualidad están en tratamiento con inmunoglobulinas endovenosas. El hermano mayor se presentó con niveles elevados de IgM (895 mg/dl), mientras que en el pequeño estaban dentro de la normalidad, probablemente como consecuencia del inicio temprano de la terapia. Para confirmar el diagnóstico, se analizó la expresión de CD40L en las células T CD4<sup>+</sup> tras la estimulación de células mononucleares con PMA y ionomicina en ambos pacientes y sus familiares directos (padre, madre y abuela materna).

**Resultados:** Las células T CD4<sup>+</sup> estimuladas de ambos pacientes mostraban una incapacidad para expresar CD40L. Las células de la abuela materna y del padre expresaban CD40L correctamente, mientras que en la madre se observaban dos poblaciones de linfocitos T CD4<sup>+</sup>, unos que expresaban CD40L y otros que no, en una proporción aproximada del 50%. Para comprobar si esta ausencia se justificaba por alteraciones a nivel genético se pasó a estudiar el gen TNFSF5. El estudio a partir de mRNA mostró una ausencia de cDNA de tamaño correcto así como de formas de *splicing alternativo* en ambos pacientes, mientras que en los familiares, al igual que en los controles, obteníamos una banda de 1kb. Tras el estudio individual de los exones a partir de DNA genómico vimos que los pacientes carecían de los exones 1, 2 y 3 así como de la región reguladora situada a 5'. El estudio a nivel intrónico nos permitió acotar el extremo distal de la delección que afectaba casi completamente al intrón 3.

**Conclusiones:** Ambos pacientes presentan una delección de más de 10kb del gen TNFSF5 que es responsable de la enfermedad, ya que impide la expresión de la proteína. Los datos obtenidos en la estimulación con PMA y ionomicina hacen suponer que la madre es portadora de la delección mientras que la abuela materna no lo sería. Por tanto, suponemos que esta mutación se habría generado en la línea germinal a partir de la madre. Para comprobarlo, en estos momentos se está ampliando el estudio al resto de familiares de la rama materna.

## SESIÓN 6: TUMORES

**Moderadores:** Francisco Ruiz Cabello (H.U. Virgen de Las Nieves, Granada), Ignacio Melero Bermejo (Clínica Universitaria Pamplona)

**97. DISTINTOS PATRONES DE EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA EN LÍNEAS DE MELANOMA CORRELACIONAN CON EL NIVEL DE EXPRESIÓN DE GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO Y PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA.** Rodríguez Ruiz T, Méndez Vales R, Del Campo Alonso A, Monge

**Moreno E, Jiménez P, Ruiz-Cabello F, Garrido F.** Servicio Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

La respuesta antitumoral va a depender entre otras cosas de un delicado balance de señales activadoras e inhibitoras sobre las células T citotóxicas y NK. El nivel de expresión de los genes de HLA de clase Ia/Ib va a influir de manera notable en el reconocimiento de las células tumorales. En este sentido tanto la baja expresión como en algunos casos la alta expresión pueden determinar vías de escape a los mecanismos efectores antitumorales. Nosotros hemos investigado como el nivel de expresión en superficie parece estar regulado de forma coordinada a través de la expresión de los genes implicados en la maquinaria de procesamiento y presentación antigénica. Hemos estudiado un total de 36 líneas celulares de melanoma por PCR cuantitativa a tiempo real para la expresión de HLA-ABC/ $\beta$ 2m, LMP2, LMP7, TAP1, TAP2. Se ha encontrado una expresión bastante heterogénea en varios componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM),  $\beta$ 2m y cadena pesada de las moléculas HLA de clase I. En general, una baja expresión de moléculas HLA en superficie se correlacionó con una baja regulación de HLA-ABC,  $\beta$ 2m y LMPs y aparentemente fue independiente de TAP. Los resultados fueron significativos al comparar los niveles de transcripción entre la cadena pesada y  $\beta$ 2m ( $p < 0.01$ ) y la cadena pesada y LMPs ( $p < 0.01$ ). En contraste, los niveles de TAP no se correlacionaron con la expresión en superficie de HLA de clase I. Finalmente, hemos comprobado que la si bien la pérdida total de expresión es infrecuente 2% y debida a mutaciones estructurales, la baja expresión es un fenómeno regulatorio normalmente reversible tras tratamiento con interferón. Interesantemente, dos líneas con muy alta expresión de HLA en superficie no presentaron niveles altos de mRNA de HLA-ABC/ $\beta$ 2m. Las implicaciones que pueden derivarse de estos distintos patrones de expresión de HLA en melanomas (bajo y alta expresión) en el contexto de la inmunoterapia no han sido exploradas.

**98. CAMBIOS EN NIVEL DE EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS HLA DE CLASE I DURANTE LA PROGRESIÓN DEL CÁNCER RENAL METASTÁSICO.** Cantón J, Cózar J\*, Méndez Vales R, Del Campo Alonso A, Rodríguez T, Jiménez P, Tallada M\*, Cabrera T, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Servicio Análisis Clínicos, Inmunología, y \*Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

La progresión tumoral está en muchos casos asociada a cambios en la inmunogenicidad de las células tumorales. Con frecuencia son detectadas alteraciones en la expresión de antígenos de histocompatibilidad y a pérdidas de antígenos tumorales que han sido relacionadas con escape a la inmunovigilancia. La aparición de estas clonas inmunorresistentes se considera una etapa avanzada que se considera muy posterior a etapas en donde es previsible que el sistema inmune pueda controlar el crecimiento tumoral. Hemos comparado los niveles de expresión de cadena pesada HLA y de  $\beta$ 2m tejido normal y tumoral de pacientes con cáncer renal. La expresión de HLA-ABC/ $\beta$ 2m fue investigada a nivel transcripcional mediante RT-PCR cuantitativa. Se han analizado un total de 27 piezas de pacientes con cáncer renal. Hemos observado un incremento en los niveles de expresión de HLA en tumores localizados con respecto a los metastásicos, que fue de casi 4 veces ( $p < 0.001$ ) en lo referente a la cadena pesada y más de 10 veces la expresión de  $\beta$ 2m ( $p < 0.001$ ). En los pacientes con tumores avanzados (M1+) los niveles de expresión fueron ligeramente superiores a los

observados en tejido normal. La mayor expresión de los genes HLAABC/ $\beta$ 2m observada en tumores localizados puede ser secundaria a la mayor presencia de IFN- $\gamma$  y quimiocinas IP-10 e I-Tac y MIP1- $\alpha$  y RANTES lo cual puede favorecer el desarrollo de respuestas inmunitarias específicas. Con independencia de la aparición de tumores con pérdidas total de antígenos HLA, que fueron escasas, el incremento en la expresión de los niveles basales de HLA en tumores no avanzados (M1-) debe de entenderse en el contexto de favorecer el reconocimiento de los linfocitos T citotóxicos. En los tejidos pacientes con tumores más avanzados se observa el fenómeno opuesto: cambio en la composición del infiltrado inflamatorio, una menor producción de IFN- $\gamma$  y por consiguiente una menor expresión de antígenos HLA de clase I lo cual puede favorecer el escape inmunológico.

**99. LOS LINFOCITOS T DE LOS PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC-B) TIENEN UNA ELEVADA SUSCEPTIBILIDAD A LA APOPTOSIS EX VIVO.** Sánchez MA<sup>1</sup>, Prieto P<sup>1</sup>, Villaroel M<sup>1</sup>, Hernández A<sup>1</sup>, Díaz D<sup>1</sup>, Barcenilla H<sup>1</sup>, Acuña ML<sup>1</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Reyes E<sup>1</sup>, Monserrat J<sup>1</sup>, García-Suárez J<sup>2</sup>, Burgaleta C<sup>2</sup>, Álvarez de Mon M<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Unidad mixta CSIC-Dpto. de Medicina U.A.H. <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias.

**Introducción:** Los pacientes con leucemia linfática crónica de células B (LLC-B) muestran numerosas alteraciones fenotípicas y funcionales en sus células T. Estudios de la respuesta proliferativa y de la apoptosis sufrida por las células T en estos pacientes pueden ayudar a la explicación de las alteraciones observadas en los pacientes con LLC-B.

**Objetivo:** Estudiar el grado de apoptosis que sufren las diferentes poblaciones de linfocitos T en pacientes de LLC-B.

**Material y Métodos:** Se realizó el estudio de la apoptosis sufrida por diferentes poblaciones de linfocitos T de sangre periférica de 11 pacientes de LLC-B y 11 controles sanos. Para estudiar la viabilidad de las distintas poblaciones se procedió al marcaje de las células con anticuerpos monoclonales y con Anexina V-FITC. El estudio de la viabilidad se realizó a tiempo basal y tras 24 horas de cultivo con medio completo en presencia y ausencia de phytohemaglutinina (PHA) estudiando así la apoptosis espontánea e inducida. Para determinar el grado de apoptosis se realizó enumeración celular por citometría de flujo obteniéndose los parámetros siguientes: índice de apoptosis (apoptotic index, AI) que nos da información de la proporción de células que sufren apoptosis en un momento determinado y tasa de apoptosis (apoptotic ratio, AR) que nos indica la proporción de células que sufren apoptosis con respecto a las células sembradas inicialmente.

**Resultados:** Los datos obtenidos de tasa de apoptosis muestran un aumento significativo de la apoptosis en todas las poblaciones de linfocitos T de los pacientes con leucemia linfática crónica en comparación con las poblaciones de linfocitos T en controles sanos. Los linfocitos T con fenotipo memoria CD45RO+ tanto de poblaciones CD4+ y CD8+ muestran porcentajes de tasa de apoptosis significativamente mayores ( $p < 0.01$  y  $p < 0.05$  respectivamente) a los obtenidos en los linfocitos T con fenotipo naïve CD45RA de las poblaciones CD4+ y CD8+.

**Conclusión:** Los linfocitos T de pacientes con leucemia linfática crónica tienen una elevada susceptibilidad a sufrir apoptosis *in vitro*. Las poblaciones con mayor grado de apoptosis registrada son las células memoria, mientras que las células naïve se muestran más resistentes a la hora de sufrir apoptosis tanto de manera espontánea como inducida por mitógenos.

**100. VIABILIDAD MEDIADA POR CD5 EN LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA.** Pérez-Chacón G<sup>1</sup>, Vargas JA<sup>2</sup>, González F<sup>3</sup>, Jordá J, Morado M<sup>5</sup>, Pérez-Aciego P<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Fundación LAIR; <sup>2</sup>Medicina Interna y <sup>3</sup>O.R.L, Hospital Universitario Puerta de Hierro; <sup>4</sup>Hematología, Hospital Universitario Clínico San Carlos; <sup>5</sup>Hematología, Hospital Universitario La Paz, Madrid, España.

**Introducción.** La leucemia linfocítica crónica de célula B (LLC-B) es una enfermedad de etiología desconocida caracterizada por una expansión clonal de linfocitos B que expresan CD5 en superficie. Se sabe que este receptor actúa como molécula coestimuladora o inhibidora del receptor de antígeno de la célula B (BCR) y que, además, tiene una cascada propia de señalización. En la LLC-B, el significado biológico de esta molécula todavía no se ha esclarecido.

**Objetivo.** Analizar las consecuencias funcionales de la cascada de señalización iniciada a través de CD5 en los linfocitos B de LLC-B.

**Metodología.** Se aislaron y purificaron linfocitos B de sangre periférica de 44 pacientes de LLC-B, mediante centrifugación en gradiente y selección negativa por métodos inmunomagnéticos. Se cuantificó la viabilidad celular tras el cultivo *in vitro* en presencia o ausencia de un anticuerpo anti-CD5, mediante tinción con anexina V/Ioduro de propidio y análisis por citometría de flujo. En estas mismas células, se analizó la expresión génica y proteica de proteínas de la familia de Bcl-2 y de citocinas como de interleucina (IL)-2 e IL-10. Por último, se determinó la implicación de la proteína quinasa C (PKC) en esta vía de señalización mediante la inhibición específica de la molécula con bisindolilmaleimida I (Bis I).

**Resultados.** Se observó que el tratamiento de linfocitos B de 44 pacientes de LLC-B con anticuerpos anti-CD5 inducía apoptosis en tan sólo 4 de los individuos analizados y proporcionaba viabilidad a 19 ( $p < 0,0001$ ), mientras que en el resto de los pacientes no se apreció ningún cambio en la viabilidad. El posterior estudio de la vía de señalización indicó que dicho anticuerpo disparaba la fosforilación de proteínas-quinasas e inducía la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1, así como de la citosina IL-10. Dicha inducción era revertida casi completamente en presencia del inhibidor específico de la PKC.

**Conclusiones.** La estimulación a través de CD5 produce un aumento de la viabilidad en los linfocitos B de un grupo de pacientes de LLC-B, mediante un mecanismo dependiente de PKC y mediado por la producción de IL-10, citocina inmunorreguladora que podría actuar como factor autocrino para los linfocitos B leucémicos, contribuyendo así a la prolongada supervivencia de estas células.

**101. EFECTO ANTITUMORAL DEL ANTICUERPO MONOCLONAL HUMANO H24.** Pérez-Estévez D, Doménech N, Magadán S, Amorín E, Valladares M, Gambón F, González-Fernández Á. Área de Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo.

**Introducción:** El H24 es un anticuerpo monoclonal completamente humano obtenido tras inmunizar con células humanas U937, a un ratón transgénico portador de los genes humanos para IgM  $\kappa/\lambda$ . Previamente hemos mostrado que el H24 reconoce a monocitos y granulocitos humanos, líneas tumorales (U937, Jurkat y HMY), y a células tumorales de pacientes con leucemias mieloides y linfomas no Hodgkin. Sin embargo no reconoce a linfocitos en reposo, hematíes, plaquetas, ni tampoco a las líneas K562 y Daudi.

**Objetivos:** Analizar el reconocimiento por parte del anticuerpo sobre otras líneas tumorales humanas, incluyendo líneas de mieloma

humano (MGG, U266 LR7, U266 DOX4, RPMI 8226, MM144, MM1S, MM1R), y diversas líneas tumorales, incluyendo la PC3 de próstata. Decidimos también estudiar el reconocimiento por parte del anticuerpo sobre células de sangre periférica y cortes de tejido de mono, así como ensayos de proliferación *in vitro*, con el fin de estudiar la posible utilización del anticuerpo en el ámbito clínico, en el tratamiento de procesos proliferativos y para su posible uso en combinación con algún fármaco.

**Metodología:** Las técnicas empleadas para determinar la especificidad fueron la citometría de flujo en células en suspensión (tumorales o de sangre periférica) e inmunohistoquímica sobre cortes congelados y parafinados. Los ensayos de proliferación celular se realizaron *in vitro* por la técnica de MTT, incubando las células en presencia o ausencia del anticuerpo. Además analizamos la sinergia con doxorubicina, un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, como los de próstata. Se realizó una cinética incluyendo variaciones en número de células, días y dosis de droga, con el propósito de ver efecto antitumoral y posible sinergia o potenciación de la respuesta en presencia del anticuerpo.

**Resultados:** El anticuerpo H24 no reconoce a ninguna de las líneas de mieloma humano testadas, pero lo hace en alta intensidad sobre la línea PC3. El patrón de reconocimiento en células de mono es semejante al encontrado en humanos, y no presenta reactividad cruzada en otros tejidos analizados. H24 presenta actividad antitumoral sobre las células PC3, inhibiendo su proliferación. Este efecto está mediado directamente por H24 y no por complemento. Además, H24 induce un efecto sinérgico anti-tumoral, observando un mayor descenso de la proliferación cuando las células son expuestas al H24 junto a la doxorubicina.

**Conclusión:** El anticuerpo IgM humano H24 tiene actividad antitumoral per se y cabe la posibilidad de usarlo junto a fármacos como Doxorubicina, lo que permitiría disminuir las dosis de la droga, minimizando así sus efectos secundarios.

**102. EL INMUNOMODULADOR PSK PRESENTA INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO IN VITRO DE LÍNEAS CELULARES TUMORALES.** Jiménez E, Schanoski A, Paco L, Salaya G, Martínez M, García-Lora A, Garrido F. Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.

PSK es un polisacárido unido a proteínas obtenido del hongo *Coriolus versicolor*, que ha sido usado como agente inmunoterapéutico contra el cáncer. Estudios anteriores de nuestro grupo han mostrado que PSK produce un incremento de la proliferación y de la actividad citotóxica de la línea NKL. En este estudio hemos investigado su acción *in vitro* sobre la proliferación de líneas celulares tumorales.

Se ha realizado un estudio dosis-respuesta para establecer la acción sobre la proliferación. Diferentes líneas tumorales se trataron con PSK durante 48-96 horas, y después de este periodo se cuantificó la incorporación de BrdU y se realizó el recuento de las células viables con Trypan Blue. Se analizó la repercusión del extracto en el ciclo celular con la incorporación de BrdU y el marcaje con 7-amino-actinomicina D por citometría de flujo. La apoptosis fue evaluada mediante la expresión por FACS de anexina-V y de caspasa 3.

Los resultados muestran que PSK presenta una inhibición directa del crecimiento de líneas tumorales derivadas de tumores sólidos, en un rango del 45-80%. Esta acción no se observa en PBLs humanos ni

en líneas celulares leucémicas. Se ha observado una ralentización del ciclo celular y una acumulación de células en la fase G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>. En algunas de las líneas celulares hemos observado un aumento de las células apoptóticas.

En conclusión, PSK muestra una actividad inmunomoduladora en células NK y una directa inhibición del crecimiento *in vitro* del líneas tumorales derivadas de tumores sólidos. Estos resultados podrían explicar su mecanismo de acción como adyuvante en protocolos clínicos inmunoterapéuticos contra el cáncer.

**103. DESCENSO COORDINADO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y DE HLA-ABC/β2M EN CARCINOMAS DE LARINGE COMO CAUSA DE LA BAJA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CLASE I.** Romero JM, Cabrera T, Lara E, Jiménez P, Salinero J\*, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Servicio de Análisis Clínicos, \*Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.

La baja expresión de moléculas HLA de clase I es un fenómeno bastante extendido de escape tumoral frente a respuestas antitumorales específicas mediadas por linfocitos T. Estas alteraciones pueden influir en el desarrollo clínico del tumor. La finalidad de este estudio es determinar el mecanismo molecular por el cual se produce esta baja expresión de moléculas HLA-ABC en el carcinoma de laringe. Con esta finalidad hemos estudiado 5 casos con pérdida de expresión de todas las moléculas HLA de clase I por inmunohistoquímica de entre un total de 70 carcinomas de laringe. Como controles usamos 4 carcinomas sin pérdida de expresión de HLA de clase I y 4 mucosas de laringe. Para cuantificar el grado de expresión génica de HLA-ABC, β2m y componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y tapasina) y secuenciar el transcrito de β2m en busca de mutaciones, se obtuvo ARN de nidos tumorales microdisectados mediante láser. Nuestros resultados descartan mutaciones en β2m como causa de la pérdida de expresión de HLA-ABC en carcinomas de laringe pero demuestran una baja regulación coordinada de la transcripción de HLA-ABC, β2m y componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico en los tumores de baja expresión. Este mecanismo puede ser importante en tumores de laringe e influir en el reconocimiento tumoral por linfocitos T citotóxicos. Este mecanismo puede ser reversible mediante tratamiento con interferón gamma y por tanto se debe de tener en cuenta cuando se emplee inmunoterapia que potencie la respuesta T citotóxica antitumoral.

**104. METÁSTASIS MHC DE CLASE I POSITIVAS GENERADAS EN RATONES NUDE MUESTRAN UNA ALTA INMUNOGENICIDAD INMUNIZANDO CONTRA METÁSTASIS MHC DE CLASE I NEGATIVAS.** Martínez MS, Soares-Schanoski A, Salaya G, Algarrá I, Jiménez E, Paco L, García-Lora A, Garrido F. Servicio Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Virgen de las Nieves, Granada.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo tumoral murino compuesto por diferentes líneas celulares metastásicas, derivadas desde un clon de un fibrosarcoma inducido por metilcolantreno, que presentan diferente fenotipo MHC de clase I dependiendo del estado inmune del huésped: MHC de clase I negativas en rato-

nes inmunocompetentes, y MHC de clase I positivas en ratones nude. Estas últimas son altamente inmunógenas cuando son inyectadas en ratones inmunocompetentes, siendo los tumores finalmente rechazados por el animal. Esta inmunogenicidad se pierde en ratones nude.

Hemos realizado ensayos de inmunización en ratones inmunocompetentes, inyectando s.c. desde 5 x10<sup>5</sup> a 2 x10<sup>6</sup> de las líneas celulares MHC de clase I positivas, para ver si inmunizaban contra las células MHC de clase I negativas. Se han realizado ensayos de protección cruzada, e inyección simultánea de dos líneas celulares con diferente fenotipo MHC en el mismo sitio o en diferentes sitios.

Los resultados obtenidos mostraron que en los ensayos de protección cruzada se producía inmunización, siendo los tumores MHC de clase I negativos rechazados en el 75% de los casos. Cuando las células se inyectaron simultáneamente en el mismo sitio se alcanza una protección del 50%, no existiendo protección cuando los tumores fueron inyectados simultáneamente en diferentes sitios.

Estos resultados indican que en este sistema tumoral las metástasis MHC de clase I positivas generadas en ratones nude producen una respuesta inmune fuerte, inmunizando a los animales contra el crecimiento de los tumores MHC de clase I negativos.

**105. MECANISMOS DE APOPTOSIS EN CELULAS DE ADENOCARCINOMA DE COLON.** Royo-Cañas M\*, Anel A\*\*, Sáez-Gutiérrez B\*, Lasiera P\*, Larrad L\*, Martínez-Lorenzo MJ\*. \*Servicio de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa e Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud, Zaragoza. \*\*Departamento de Bioquímica. Facultad de Ciencias. Universidad de Zaragoza.

**Introducción:** La apoptosis o muerte celular programada juega un importante papel en la regulación de células normales. Hoy en día se sabe que diversas patologías son debidas, al menos en parte, a fallos en los mecanismos de apoptosis. Así pues, diversos tumores malignos son resistentes a la apoptosis a través de la expresión de receptores de muerte y de ligandos como FasL y APO2L/TRAIL. En el caso de algunos tumores, la sobreexpresión de FasL parece correlacionarse con la agresividad del tumor y el mal pronóstico. Se ha descrito que APO2L/TRAIL induce apoptosis en un gran número de tumores, lo que ha estimulado el interés de APO2L como agente terapéutico tumoral.

Algunos autores han descrito que las células de cáncer de colon son capaces de expresar FasL y atacar a las células linfoides que expresan Fas, sin embargo, otros resultados contradictorios indican que FasL no se expresa en la superficie de estos tumores.

**Objetivos:** Analizar la expresión de FasL, APO2L/TRAIL y sus correspondientes receptores (FAS, DR4 y DR5), así como el análisis de la sensibilidad a la muerte inducida por anticuerpos anti-Fas y por APO2L recombinante en diferentes líneas celulares de cáncer de colon.

**Metodología:** La expresión de Fas, FasL, APO2L/TRAIL, DR4 y DR5 se determinó por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. La muerte celular se cuantificó mediante análisis de la exposición de fosfatidilserina y por medida del potencial mitocondrial. Los estudios de sensibilidad a los diferentes inductores apoptóticos se llevaron a cabo por el método de Mossman (Test del MTT).

**Resultados:** Las líneas celulares HT-29, LoVo y HCT-116 expresaron niveles elevados de Fas en membrana (80%) mientras que SW480 y CaCo-2 lo hicieron en menor porcentaje (30% y 2% respectivamente).

te). Sin embargo, todas estas líneas celulares apenas fueron sensibles a anticuerpos anti-Fas en los estudios de viabilidad realizados (<10%). En el análisis de la expresión de FasL, todas las líneas expresaron FasL en su interior (≈90%), y sin embargo, la expresión de esta proteína en membrana osciló entre 30% y 85% según la línea celular analizada.

Todas las líneas expresaron DR4 y DR5 en membrana (≈80%). En cuanto a la sensibilidad inducida por APO2L recombinante, osciló desde el 19% de la línea celular CaCo-2, hasta el 33% de la línea celular LoVo. APO2L se expresó mayoritariamente en el interior en todas las líneas analizadas con muy baja expresión en membrana (<10%).

**Conclusiones:** Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que las líneas celulares analizadas no son sensibles a anticuerpos anti-Fas. Sin embargo, si son sensibles a APO2L recombinante, el cual podría ser utilizado como terapia en la patología de cáncer de colon

**106. UTILIDAD DE LOS MARCADORES INMUNOLÓGICOS EN EL DIAGNÓSTICO DE RECIDIVA TUMORAL POSTIMECTOMÍA: A PROPÓSITO DE UN CASO Y REVISIÓN DE LA LITERATURA.** *Álvarez S, Sánchez-Ramón S, Gil J, De La Torre J, Rodríguez-Mahou M, Carbone J, Oliver D, Mora R, Simón C, Fernández-Cruz E. Unidad de Inmunología Clínica, Servicios de Inmunología, Radiodiagnóstico y Cirugía Torácica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid.*

**Introducción:** La causa más frecuente de atención médica en los timomas es la aparición de fenómenos autoinmunes paraneoplásicos, entre ellos la miastenia gravis y a mayor distancia anticuerpos antinucleares (ANAs) y anti-ADN asociados o no a clínica de lupus.

**Objetivo:** 1) Presentar un paciente asintomático, con extirpación de un timoma hace 4 años, cuyo seguimiento ha permitido diagnosticar recidiva tumoral. 2) Discutir la utilidad del seguimiento inmunológico y clínico postimectomía.

**Resultados:** Varón de 73 años de edad, diagnosticado de un timoma como hallazgo casual durante una intervención cardiaca por enfermedad severa de tres vasos (mayo de 2001), siendo sometido a timectomía total (4x3 cm) en el mismo acto quirúrgico. La biopsia demostró un timoma tipo mixto (clasificación AB de la WHO). El paciente presentaba en el momento del diagnóstico ANAs positivos a título bajo (1/40) con patrón homogéneo y anti-ADN nativo (>200 UI/ml, rango, 0-15). En estudios seriados durante 4 años postimectomía total se demostró un incremento del título de ANAs (1/160), persistencia de anticuerpos positivos anti-DNA, aparición de novo de anticuerpos anti-músculo estriado (2003), sin manifestaciones clínicas que sugieran la existencia de una enfermedad autoinmune sistémica (conectivopatía, vasculitis) ni de miastenia gravis. En el último estudio se detectó una expansión de células T-LGL (CD3+CD56+CD16-) del 21% y carácter policlonal. Se realizó un CT toracoabdominal para descartar recurrencia del timoma, observándose una lesión ovalada de 23 mm de diámetro con densidad de partes blandas en mediastino anterosuperior, la primera posibilidad a considerar sería la de una recidiva de su timoma previo. Adenopatía paratraqueal izda en el límite de lo patológico.

**Conclusión:** Marcadores inmunológicos, como la persistencia de autoanticuerpos positivos tras varios años postimectomía con incremento del título y la expansión de linfocitos T-LGL podrían servir de sospecha clínica de recurrencia tumoral, antes de su confirmación por métodos de imagen.

**107. ESTUDIO DE LA ACCIÓN DE LOS COMPONENTES MINORITARIOS DEL ACEITE DE OLIVA VIRGEN EXTRA SOBRE CÉLULAS TUMORALES PER SE Y EN COMBINACIÓN CON QUIMIOTERÁPICOS.** *Warleta F, Ruiz J, Campos M, Serrano MJ, Gaforio JJ. Área de Inmunología. Dpto Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.*

**Objetivo:** Demostrar el efecto *in vitro* de algunos componentes de la fracción minoritaria del Aceite de Oliva Virgen Extra (Escualeno, Tirosol e Hidroxitirosol) *per se* y en combinación con quimioterápicos (Adriamicina, Paclitaxel y Gemcitabina) sobre células tumorales de mama (MCF 7 y MDA-MB-231), colon (HT-29 y CaCo-2) y no tumorales (MCF-10A).

**Metodología:** Las técnicas descritas a continuación se realizan sobre las diferentes líneas celulares utilizando diversas combinaciones y a diferentes concentraciones de quimioterápicos y componentes minoritarios del aceite de Oliva Virgen Extra: Ensayo de citotoxicidad y proliferación celular por colorimetría en placa de 96 pocillos con XTT; estudio del ciclo celular por citometría de flujo mediante marcaje fluorimétrico con Ioduro de Propidio.; estudio de la apoptosis mediante anexina V/Ioduro de Propidio con citometría de flujo; detección de la producción de Especies Reactivas del Oxígeno (ROS) mediante el fluoróforo DCFH-DA por citometría de flujo y en lector fluororimétrico en placa; estudio de la expresión de diferentes genes implicados en el proceso de apoptosis con marcadores inmunocitoquímicos por citometría de flujo y por inmunoblotting.

**Resultados:** Aunque preliminares, los resultados muestran una tendencia a un incremento de la proliferación en células tumorales de mama al ser tratadas con diferentes concentraciones de la fracción insaponificable del Aceite de Oliva Virgen Extra, así como una disminución en la muerte celular en combinación con los diferentes quimioterápicos empleados. Los componentes minoritarios del aceite de oliva hasta ahora analizados presentan un efecto proliferativo de las células tumorales de mama *per se* y ejercen un efecto protector ante los quimioterápicos estudiados. De estos resultados podemos especular que la acción antioxidante de los derivados del aceite de oliva es responsable de la inhibición de la función de c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK), proteína responsable de la inhibición de Bcl-2 cuya acción es impedir/bloquear la liberación de citocromo c desde la mitocondria, señal de activación de la cascada apoptótica.

**Conclusiones:** Aunque preliminares, los resultados parciales obtenidos hasta el momento muestran que los componentes minoritarios presentes en el aceite de oliva y estudiados hasta la presente tienen un efecto protector sobre las células tumorales tratadas al mismo tiempo con quimioterápicos. Estos resultados difieren de los resultados publicados hasta la fecha por algunos grupos de investigación.

**108. ESTUDIO INMUNITARIO DE LA TRISOMÍA 8 CONSTITUCIONAL EN MOSAICO.** *Galán F<sup>1</sup>, Martí S<sup>2</sup>, Casero J<sup>3</sup>, Eikermann SM<sup>4</sup>, Rubio G<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Pediatría, <sup>2</sup>Bioquímica, <sup>3</sup>Inmunología, Universidad Miguel Hernández, Hospital Universitario de Sant Joan, Alicante. <sup>4</sup>University of Missouri-Columbia.*

**Introducción:** La trisomía 8 constitucional en mosaico (CT8M) es una trisomía rara cuyo origen en los nacidos vivos sería la ganancia somática de un cromosoma 8 en etapas tardías del desarrollo de un cigoto normal. Aunque se asocia a un riesgo elevado de enfermedades neoplásicas, no se encuentran en la bibliografía datos sobre la función inmunitaria de estos pacientes.



**Objetivos:** Análisis citogenético e inmunitario de un caso de CT8M.

**Pacientes y Métodos:** Se presenta el caso de una mujer de 29 años de origen asiático, diagnosticada de CT8M. Utilizando monoclonales específicos y dynabeads se han separado células de los diferentes linajes leucocitarios y mediante hibridación in situ fluorescente (FISH) se ha determinado la presencia de trisomía 8. Se han llevado a cabo determinaciones rutinarias de inmunoglobulinas, respuesta específica y de expresión de marcadores de diferenciación leucocitarios.

**Resultados y Conclusión:** En la tabla se muestran los datos citogenéticos.

Células seleccionadas	Cariotipo	
	46,XX (% 2 señales)	47,XX+8 (% 3 s.)
Pan leucocitario	38	62
Linfocitos B	64	36
Th	39	61
CTL	83	17
NK	0	100
Monocitos	30	70
TOTAL	46	65

Los datos de expresión de CD3, CD4, CD8, CD11a/CD18, CD20, CD29, CD43, CD45, CD54, CD56, CD58 y TCR $\gamma\delta$ , pueden considerarse normales. Los niveles de IgG, A, M y E están en rangos de normalidad. La respuesta específica de IgM (isohemaglutininas) e IgG (anti-rubéola) y la respuesta proliferativa a mitógenos, son igualmente normales. Destaca el hecho de que la totalidad de las células NK de sangre periférica analizadas sean trisómicas. Su significado funcional está en estudio.

**109. DESCENSO COORDINADO DE LA EXPRESIÓN DE GENES DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO Y DE HLA-ABC/ $\beta$ 2M EN CARCINOMAS DE LARINGE COMO CAUSA DE LA BAJA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS CLASE I. Romero JM, Cabrera T, Lara E, Jiménez P, Salinero J\*, Ruiz-Cabello F, Garrido F. Servicio de Análisis Clínicos, \*Servicio de Otorrinolaringología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada.**

La baja expresión de moléculas HLA de clase I es un fenómeno bastante extendido de escape tumoral frente a respuestas antitumorales específicas mediadas por linfocitos T. Estas alteraciones pueden influir en el desarrollo clínico del tumor. La finalidad de este estudio es determinar el mecanismo molecular por el cual se produce esta baja expresión de moléculas HLA-ABC en el carcinoma de laringe. Con esta finalidad hemos estudiado 5 casos con pérdida de expresión de todas las moléculas HLA de clase I por inmunohistoquímica de entre un total de 70 carcinomas de laringe. Como controles usamos 4 carcinomas sin pérdida de expresión de HLA de clase I y 4 mucosas de laringe. Para cuantificar el grado de expresión génica de HLA-ABC,  $\beta$ 2m y componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico (LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y tapasina) y secuenciar el transcrito de  $\beta$ 2m en busca de mutaciones, se obtuvo ARN de nidos tumorales microdisectados mediante láser. Nuestros resultados descartan mutaciones en  $\beta$ 2m como causa de la pérdida de expresión de HLA-ABC en carcinomas de laringe pero demuestran una baja regulación coordinada de la transcripción de HLA-ABC,  $\beta$ 2m y componentes de la maquinaria del procesamiento antigénico en los tumores de baja expresión. Este mecanis-

mo puede ser importante en tumores de laringe e influir en el reconocimiento tumoral por linfocitos T citotóxicos. Este mecanismo puede ser reversible mediante tratamiento con interferón gamma y por tanto se debe de tener en cuenta cuando se emplee inmunoterapia que potencie la respuesta T citotóxica antitumoral.

**110. ¿PUEDE UTILIZARSE LA DOSIFICACIÓN NEFELOMÉTRICA DE CADENAS LIGERAS LIBRES COMO CRIBAJE EN EL ESTUDIO DE COMPONENTE MONOCLONAL EN ORINA? Carulla M, Caro P, Mantecón S, Blanco M, Bernaus O, Llopis MA, Pujol-Borrell R, Juan M, Herrero MJ, Martínez-Cáceres EM. Laboratorio de Inmunología (LIRAD)-CTBT. HUGTiP. Badalona (Barcelona).**

**Introducción:** Las gammapatías monoclonales se caracterizan por la producción de una proteína monoclonal o paraproteína, reflejo de la proliferación de un clon de células plasmáticas. Es extremadamente importante diferenciar entre un incremento monoclonal o policlonal de la concentración de inmunoglobulinas, porque el incremento monoclonal se asocia con un proceso maligno o potencialmente maligno. Ante la sospecha de existencia de un componente monoclonal, el análisis de suero u orina requiere un método de cribaje sensible, rápido y reproducible.

**Objetivo:** Valorar la utilización de la dosificación nefelométrica de cadenas ligeras libres en orina como método de cribaje en el estudio de paraproteinuria (proteinuria de Bence Jones).

**Pacientes y Métodos:** Se analizaron un total de 442 muestras de orina de pacientes que llegaron a nuestro laboratorio entre Julio 2001 y Junio 2004 para realización de estudio de proteinuria de Bence Jones. A todas las muestras se les realizó la dosificación nefelométrica de cadenas ligeras libres (NSC<sup>®</sup>), uroproteinograma (en aquellos con concentración proteica superior a 0,4 g/L) e inmunoelectroforesis (IEF) con AcMo Dako<sup>®</sup>, confirmándose esta última, en caso de duda, por inmunofijación (IFIX) (Sebia<sup>®</sup>).

**Resultados:** De las 442 muestras, la dosificación nefelométrica fue: a) negativa ( $\kappa=0$  mg/dl;  $\lambda=0$  mg/dl) en 141 (31,9%). De ellas, se confirmó la negatividad por IEF (y/o IFIX) en 134 (95%). De las siete positivas, 4 muestras tenían también componente monoclonal en suero, no identificándose en las otras 3 (2,1%); b) con valores de  $\kappa$  entre 0-0,5 mg/dl ( $\lambda$  negativo) se obtuvieron 40 muestras, de las que 37 dieron negativo y 3 positivo por IEF (todas con componente monoclonal en suero); c) con dosificación  $\kappa=0$  mg/dl y  $\lambda$  0-0,5 mg/dl se obtuvieron 17, de las que 11 fueron negativas, y 6 mostraron la existencia de cadenas  $\lambda$  libres en orina (2 de ellas con componente monoclonal en suero); d) con cadenas  $\kappa$  o  $\lambda$  entre 0,5 y 1 mg/dl (n=62), se detectó la existencia de paraproteinuria en 22 de ellas (35,48%); e) con  $\kappa$  o  $\lambda$  > 1 mg/dl (n=182), se observó un incremento en el porcentaje de positividad: el 71,98% de las muestras (n=131) mostraron por IEF o IFIX la existencia de paraproteinuria.

**Conclusión:** Pensamos que la determinación nefelométrica de cadenas ligeras libres en orina puede ser una técnica de cribaje siempre y cuando se tenga en cuenta: 1) En orinas con valores de  $\kappa$  y  $\lambda$  indetectables y sin componente monoclonal en suero no suelen detectarse cadenas ligeras monoclonales, aunque es posible que se pierda alguna positividad; 2) En pacientes con paraproteína en suero, es conveniente hacer IEF y/o IFIX de orina, aunque los valores nefelométricos de  $\kappa$  y  $\lambda$  sean negativos; 3) Frente a cualquier valor positivo de  $\lambda$ , o con valores de  $\kappa$  >0,5 mg/dl es recomendable en todos los casos completar el estudio con IEF y/o IFIX.

**111. ANTÍGENOS ABH Y LECTINAS QUE RECONOCEN GALACTOSA EN CÁNCER DE CÉRVIX.** *Guzmán Bistoni MC, Evora Soto N, Sánchez Ruano A G, Mosquera G, García Tamayo J\*, Szurba AR\*, Blasco Olaetxea E. Instituto de Investigación y Ciencia de Puerto del Rosario, Fuerteventura. Islas Canarias. \*Novopath. Laboratorio de Patología Molecular. Maracaibo, Venezuela. Instituto Canario de Investigación en Cáncer. Canarias.*

Mediante inmunohistoquímica se estudió la expresión de los epitopos de los grupos sanguíneos ABH y la expresión de p16 en biopsias de cérvix con diversos tipos de displasias y carcinomas. Además, se evaluó su posible relación con las alteraciones en epitopos con Galactosa (Gal) reconocidos por las lectinas vegetales *Arachis hipogea*, *Amaranthus caudatus*, *Arthocarpus integrifolia* y *Viscum album* mediante lectinohistoquímica. En la zona displásica, se observó la pérdida de expresión de los antígenos ABH en las células más profundas del epitelio, mientras que las superficiales lo expresaron. En casos de carcinomas invasores, la expresión de ABH fue negativa. En zonas de displasia y carcinoma, se observó una sobreexpresión de p16, que se relacionó con una expresión disminuida de epitopos reconocidos por las lectinas, dando imágenes especulares. Se observó marcaje diferencial entre las cuatro lectinas ensayadas. La pérdida de los antígenos A y B incrementa la motilidad celular, mientras que la presencia de H incrementa la resistencia a la apoptosis por mecanismos que aún no son claros. Ha sido demostrado que glicoproteínas de membrana que contienen epitopos o criptoepitopos con Gal o GalNAc juegan un rol importante en la carcinogénesis, es por esto la importancia de su estudio en la expresión en los tejidos normales y con cáncer. Nosotros pensamos que la pérdida de expresión de los epitopos de grupos sanguíneos reconocidos por las lectinas está relacionado con la sobreexpresión de p16. El estudio de las alteraciones en la expresión de los antígenos de los grupos sanguíneos y su relación con otros marcadores tumorales, pueden proveer una información útil que ayude a entender los cambios malignos y sirva como potencial marcador de agresividad en carcinomas de cuello de útero.

**112. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN TUMORAL DE TGF- $\beta$ 1 Y DE LA PROPORCIÓN DE LINFOCITOS T REGULADORES EN UN GRUPO DE CARCINOMAS DE MAMA.** *Olivares N, de Juan MD, Sáez R, Echaniz P, Cuadrado E. Hospital Donostia, San Sebastián.*

Material de estudio y objetivos: Se han estudiado 85 carcinomas de mama al tiempo de diagnóstico, excluidos los casos de carcinomas diseminados e "in situ", y 21 muestras de sangre de sujetos normales como grupo control de células T reguladoras (Treg). Como objetivos nos planteamos: 1) analizar la correlación de los niveles de TGF- $\beta$ 1 en el tumor con la proporción de células T reg en sangre, y 2) analizar la correlación de ambas variables con los indicadores utilizados en clínica para caracterizar estos tumores.

**Metodología:** Extracción de RNAm de muestras tumorales, síntesis de cDNA y PCR cuantitativa de TGF- $\beta$ 1 a tiempo real; análisis fenotípico de la población Treg por citometría de flujo; análisis univariante de las variables consideradas mediante los tests estadísticos adecuados (análisis de varianza y no paramétricos).

**Resultados:** 1) Células T reg: Encontramos una correlación directa entre la expresión de TGF- $\beta$ 1 en el tumor y las células Treg en sangre.

2) Observamos un aumento no significativo de cel Treg circulantes en el grupo de pacientes respecto a los controles.

3) Contrariamente a lo esperado, observamos un aumento de células Treg en los casos cuyo N = 0 (sin ganglios afectos), frente a los demás estadios N.

4) No encontramos una clara correlación entre la expresión tumoral del TGF- $\beta$ 1 y las variables clínico-patológicas más relevantes en la definición del tumor.

**Conclusión:** No hemos encontrado correlación significativa entre las variables investigadas y las características clínico-patológicas; queda por investigar su significación pronóstica en el seguimiento clínico de las pacientes.

## SESIÓN 7: CITOQUINAS Y SEÑALIZACIÓN

**Moderadores:** Ignacio Moneo (Hospital Carlos III, Madrid), Marcos López Hoyos (H.U. Marqués de Valdecilla, Santander)

**113. ANÁLISIS DE INHIBIDORES DEL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN STAT6.** *Cortés JR, Pérez-G. M, Fernández C, Zamorano J. Unidad de Investigación, H. San Pedro de Alcántara. Cáceres.*

La IL-4 es una citoquina implicada en enfermedades como alergia, autoinmunidad y cáncer. El papel de IL-4 está mediado a través del factor de transcripción STAT6 por lo que su inhibición podría ser útil en el control de enfermedades. En un estudio reciente, demostramos que los salicilatos inhibían la activación de STAT6 por la IL-4. Sin embargo, esta inhibición fue parcial y las dosis de salicilatos requeridas elevadas. El objetivo de este trabajo fue investigar inhibidores más específicos de STAT6. De esta forma, mediante síntesis orgánica a partir del ácido salicílico y el empleo de análisis computacionales se obtuvieron nuevos inhibidores de STAT6. Se seleccionaron aquellos con mayor capacidad inhibidora, alrededor de 500 veces más eficaces que los salicilatos, y menor toxicidad. La caracterización bioquímica determinó tres tipos de inhibidores. El primero, JRC-688 bloqueaba la activación de STAT6 mediante la inhibición de la quinasa Src de manera similar a los salicilatos. El segundo inhibidor, JRC-706 actuaba inhibiendo JAK1. Este compuesto no bloqueaba la activación *in vivo* de Src por la IL-4 pero si la activación de JAK1, JAK3 y STAT6. Análisis *in vitro* determinó que JRC706 inhibía JAK1 pero no JAK3 ni Src. El tercer grupo, JRC-KR, actuaba inhibiendo específicamente JAK3. De esta forma, JRC-KR inhibía *in vivo* la activación de JAK1, JAK3 y STAT6 en células linfoides pero no afectaba la activación de Src. El análisis *in vitro* determinó que JRC-KR inhibe la actividad enzimática de JAK3 pero no de Src y JAK1. Interesantemente, JRC-KR no afectaba la activación de STAT6 inducida por la IL-13, una citoquina que no señala a través de JAK3. Dada la eficacia para inhibir la activación de STAT6, estos compuestos podrían ser útiles para el control de enfermedades como asma y cáncer donde STAT6 tiene un papel importante.

Este trabajo está financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria: FIS 02/1150, FIS 99/3082.

**114. LA EXPRESIÓN DE QUIMIOCINAS PROINFLAMATORIAS EN TEJIDO DE CÁNCER RENAL CORRELACIONA CON EL ESTADIO Y CON UN PATRÓN TH1 DE INFILTRADO INFLAMATORIO.** *Romero JM, Cantón J, Cózar J\*, Méndez Vales R, Del Campo Alonso A, Rodríguez T, Jiménez P, Tallada M\*, Cabrera T, Aptsuari N, Garrido F, Ruiz-Cabello F. Servicio Análisis Clínicos, Inmunología, y \*Urología. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada. España.*

El cáncer renal y el melanoma constituyen dos prototipos de tumores en donde la progresión tumoral transcurre con cierto grado de inmunidad aunque el balance final generalmente favorece el desarrollo de mecanismos de resistencia a la apoptosis y a la aparición de clones celulares resistentes a los mecanismos efectores de la inmunidad.

En nuestro estudio hemos analizado el infiltrado inflamatorio y la producción de un grupo de quimiocinas que pueden controlar el desarrollo de respuestas antitumorales, la infiltración celular y la angiogénesis en el cáncer renal metastático. A partir de tejidos microdisectados se ha analizado la expresión de IP-10, I-TAc, SDF-1, RANTES, MIP-1alfa, MCP-1, VEGF $\alpha$ , TGF- $\beta$  y las citocinas IFN- $\gamma$  e IL10 en 27 muestras de cáncer renal y en 12 tejidos autólogos derivados del mismo paciente. El nivel de expresión fue calculado mediante RT-PCR a tiempo real.

Nuestros resultados muestran una notable diferencia en la expresión de estas quimiocinas con respecto al tejido normal, donde las cantidades detectadas en muchos casos fueron casi indetectables. SDF-1 por el contrario se encontró incrementado en los tejidos normales. La expresión de IP-10, SDF1 y de IFN- $\gamma$  fue significativamente menor en pacientes con tumores avanzados (M1+). Estos datos coinciden con una mayor grado de infiltración de linfocitos T CD4 con fenotipo (CXCR3/CCR5+) TH1 en los tumores menos avanzados.

Estos resultados apoyan un mayor control inmunológico en el cáncer renal localizado debido probablemente a la mayor producción de quimiocinas proinflamatorias y al mayor reclutamiento de células T efectoras.

#### 115. CD106 SOLUBLE CONTENIDO EN EL PLASMA MEDULAR REGULA LA ACTIVACIÓN DE LA INTEGRINA CD29 EN ERITROBLASTOS DE MÉDULA ÓSEA HUMANA. *Villarrubia N, García-Trujillo JA, Rodríguez-Martín E, Coll J, López-Jiménez J\*, Bootello A, Roldán E. Servicios de Inmunología y \*Hematología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.*

**Introducción:** Nuestro grupo ha descrito previamente que la integrina CD29 se expresa en su forma activa o de alta afinidad en eritroblastos de médula ósea (MO) humana, estando regulada dicha expresión por uno o varios factores solubles contenidos en el plasma medular.

**Objetivos:** 1) Identificar el factor soluble del plasma medular que regula la expresión de la forma activa de CD29 en eritroblastos; 2) caracterizar el mecanismo de activación de CD29 por el factor soluble y 3) efecto del factor soluble en la activación de CD29 en eritroblastos de pacientes con síndrome mielodisplásico (SMD) que expresan niveles anormalmente bajos de la forma activa de la integrina.

**Métodos:** Incubación de MO lavada en presencia de plasma medular, cationes divalentes o factores solubles (rhCD106 soluble o rhSDF-1). Neutralización del plasma medular con anticuerpos anti-CD106 o anti-citoquinas. Detección de CD29 activado por citometría de flujo con el AcMo HUTS21.

**Resultados:** La preincubación del plasma medular autólogo con Ac neutralizantes anti-CD106 redujo la expresión de CD29 activado en eritroblastos. En presencia de concentraciones subóptimas de Mn2+, la incubación de los eritroblastos con rhCD106 soluble indujo la expresión de CD29 activado de forma dosis dependiente. La unión de rhCD106 soluble a la membrana del eritroblasto fue específica, ya que se inhibió por completo con AcMo anti-CD49d (clon HP2/1) y no con AcMo anti-CD44. *In vivo*, estos resultados fueron corroborados por la unión citofílica del CD106 contenido en el plasma medular a la membrana del eritroblasto. La utilización de diferentes inhibidores de trans-

ducción de la señal no redujo los niveles de CD29 activado inducidos por el plasma. Los eritroblastos de pacientes con SMD mostraron una respuesta deficiente a rhCD106 soluble o Mn2+.

**Conclusiones:** El CD106 soluble contenido en el plasma medular regula la expresión de CD29 activado en eritroblastos, al que se une citofílicamente. La activación de CD29 por CD106 soluble requiere de cationes divalentes y parece independiente de señalización intracelular. La respuesta deficiente de los eritroblastos de pacientes con SMD a estos factores sugiere un defecto intrínseco en las células eritroides.

#### 116. EJE IL-12/INF- $\gamma$ EN PACIENTES INFECTADOS POR MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS. *Garet E, Felpeo P, del Campo V, Montes J, Gambón F, González-Fernández A. <sup>1</sup>Área de Inmunología, Facultad de Biología, Universidad de Vigo. Servicios de <sup>2</sup>Medicina Preventiva, <sup>3</sup>Medicina Interna e <sup>4</sup>Inmunología, del Hospital do Meixoeiro, Vigo.*

**Antecedentes:** La inmunidad mediada por células es la principal línea de defensa frente a patógenos intracelulares, como es el *Mycobacterium tuberculosis*. Tras infectar macrófagos, éstos liberan IL-12 que induce la proliferación de células T y su diferenciación hacia linfocitos Th1. La subpoblación Th1 produce INF- $\gamma$ , el cual, además de estabilizar el fenotipo Th1, activa a macrófagos potenciando su capacidad de destruir al patógeno. La mayoría de las células linfoides expresan CD119 (la subunidad R1 del receptor de INF- $\gamma$ , mientras que células T y NK activadas expresan las cadenas  $\beta$ 1 y  $\beta$ 2 del receptor de IL-12. Este eje IL-12/ INF- $\gamma$  es crucial en la defensa frente a patógenos intracelulares y cualquier defecto en esta vía puede llevar a infecciones bacterianas severas.

**Objetivo:** Iniciar un estudio del eje IL-12/INF- $\gamma$  en pacientes infectados por *M. tuberculosis* (con tuberculosis pulmonar) y comparar con sujetos sanos (tanto PPD positivos como negativos) del sur de Galicia, donde la infección tuberculosa presenta una alta incidencia.

**Materiales y métodos:** Muestras de sangre anticoagulada y suero fueron obtenidas a partir de voluntarios sanos, tanto PPD positivos como negativos, y de enfermos con tuberculosis pulmonar. Se obtuvieron poblaciones leucocitarias por separación con gradiente de Ficoll, y posterior separación de monocitos mediante adherencia al plástico. Se realizó la prueba de Mantoux (a PPD) a todos ellos, midiendo la reacción cutánea a las 72 horas. Se analizó la expresión de diversos marcadores leucocitarios (CD4, 8, 3, 14, 69 y 23), así como la de los receptores para interferón gamma (INF- $\gamma$ R1) y para interleuquina 12 (IL-12R,1) mediante citometría de flujo, tanto a nivel basal como tras incubación de las células con PHA y PPD, durante 3 y 7 días respectivamente. Los sobrenadantes de cultivo y los sueros de los pacientes fueron testados por ELISA para medir niveles de INF- $\gamma$ .

**Resultados:** Los resultados indican que mientras en controles sanos (tanto PPD+ como PPD-) y en pacientes con largo tiempo de tratamiento (>6 meses) los niveles de INF- $\gamma$  son indetectables (sensibilidad del ELISA 4,2 picogramos/ml), el 75% de los pacientes con tuberculosis pulmonar recién diagnosticados presentan INF- $\gamma$  basalmente en suero. En todos los casos, los niveles de INF- $\gamma$  se incrementan tras la activación *in vitro* de las células, pero de forma más significativa en los controles sanos. Con respecto a los receptores IL-12R $\beta$ 1 e INF- $\gamma$ R1 se encontró baja tinción en células sin activar, tanto en sanos como enfermos. Sin embargo, tras la activación celular, el incremento de la expresión de ambos receptores fue mucho mayor en controles sanos que en enfermos.

**Conclusión:** Se requiere ampliar el estudio a mayor número de casos, pero los datos preliminares indicarían alteraciones en el eje IL-12/INF- $\gamma$  en pacientes con tuberculosis pulmonar activa, siendo sus

células menos susceptibles a producir IFN- $\gamma$  y a expresar los receptores IL-12R $\beta$ 1 e INF- $\gamma$ R1 tras su activación *in vitro*, comparadas con aquellas de controles sanos.

**117. NIVELES SÉRICOS DE INTERLEUCINA 6 EN PACIENTES CON CÁNCER VESICAL.** Fernández Suárez A, Menéndez López V\*\*, Fatela Cantillo D\*, Galán Llopis JA\*\*, Jiménez Jiménez LM\*. Servicios de Inmunología y \*Análisis Clínicos. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. \*\*Servicio de Urología. Hospital Universitario General de Elche. Elche, Alicante.

**Objetivos.** El objetivo del presente estudio es determinar los niveles séricos de interleucina 6 (IL-6) en pacientes con cáncer vesical, e intentar establecer alguna relación entre las concentraciones de IL-6 y las principales variables pronósticas (estadio y grado) de este tipo de tumor.

**Metodología.** Se recogieron muestras de suero a 119 pacientes diagnosticados de cáncer vesical y tratados mediante resección transuretral. La distribución en función del estadio fue de 97 tumores superficiales (30 T<sub>a</sub> y 67 T<sub>1</sub>) y 22 infiltrantes (10 T<sub>2</sub>, 10 T<sub>3</sub> y 2 T<sub>4</sub>). En cuanto al grado de diferenciación tumoral se observaron 27 de grado I, 61 de grado II y 31 de grado III. Además, se consideraron otras variables clínicas, como tumor primario o recurrente, el aspecto macroscópico (papilar o sólido) y la focalidad (único o múltiple). Para la medida de la IL-6 sérica se utilizó un método de ELISA llamado IL-6 EASIA (Biosource Europe S.A, Nivelles, Bélgica). Los niveles séricos de IL-6 no seguían una distribución normal. Los datos se analizaron mediante el programa SPSS, versión 11.0.

**Resultados.** La mediana de los niveles séricos de IL-6 en la población estudiada fue de 20.44 pg/ml (percentil 25, 13.67 - percentil 75, 35.60). Al analizar los resultados en función del estadio, no se encontraron diferencias estadísticas, obteniendo las siguientes medianas: T<sub>a</sub> 21.34 pg/ml (10.84-54.95), T<sub>1</sub> 18.58 pg/ml (13.61-29.06), T<sub>2</sub> 21.72 pg/ml (15.42-78.00), T<sub>3</sub> 38.36 pg/ml (22.18-58.83) y T<sub>4</sub> 30.56 pg/ml (21.24-39.88); no obstante, si se apreciaron diferencias significativas ( $p=0.02$ ) en las concentraciones de IL-6 entre tumores superficiales (19.24 pg/ml, 11.95-31.88) e infiltrantes (35.43 pg/ml, 18.43-53.79). En cuanto al grado de diferenciación, los niveles de IL-6 observados fueron de 20.44 pg/ml (13.88-39.91), 18.58 pg/ml (11.67-27.50) y 32.47 pg/ml (16.29-54.18), para los grados I, II y III respectivamente ( $p=0.043$ ). Los pacientes con tumores papilares presentaron menor cantidad de IL-6 sérica que los que mostraban tumores sólidos ( $p=0.042$ ). Por último, no existieron variaciones significativas de IL-6 entre tumores primarios o recurrentes, o en la focalidad de los mismos.

**Conclusiones.** Los niveles séricos de IL-6 son más elevados en pacientes con tumores de mayor grado y estadio, sobre todo en los tumores infiltrantes. Esta relación con las principales variables pronósticas de la enfermedad sugiere una posible utilidad de la IL-6 como marcador pronóstico.

**118. INDUCCIÓN DE CITOQUINAS INTRACELULARES MONOCITARIAS (TNF-ALFA E IL-8) EN PACIENTES EN HEMODIÁLISIS QUE RECIBEN HIERRO (FE) SACAROSA INTRAVENOSO. EFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEINA (NAC).** Echeverría-Balda A<sup>1</sup>, García-Fernández N<sup>2</sup>, Merino J, Moreno C<sup>1</sup>, Pastor F<sup>1</sup>, Vallés I<sup>1</sup>, Sánchez-Ibarrola A<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Servicio de Nefrología de la Clínica Universitaria de Navarra. Universidad de Navarra.

**Introducción:** Los suplementos de hierro intravenoso (iv) en los pacientes de hemodiálisis son necesarios para conseguir una adecuada respuesta a la eritropoyetina (EPO) y conseguir así el nivel de hemoglobina recomendado (mayor ó igual a 11g/dL). Las preparaciones del Fe i.v. son componentes bioactivos y tienen un potencial que induce daño inflamatorio. Las diferencias en cuanto a seguridad, tolerancia y toxicidad de las preparaciones de Fe son conocidas. El Fe sacarosa parece ser tolerado pero también se ha descrito cierta toxicidad en estudios *in vitro*. La toxicidad *in vivo* y el efecto de la administración de este preparado de Fe no han sido estudiados.

**Objetivos:** Analizar el efecto de la administración de Fe sacarosa iv en pacientes en hemodiálisis crónica sobre la producción de citoquinas intracelulares monocitarias TNF- $\alpha$  e IL-8. Estudiar si la administración previa de NAC (antioxidante conocido) atenúa dichos efectos.

**Métodos:** Se han incluido 32 pacientes en programa regular de hemodiálisis durante al menos 3 meses con 3 sesiones/semana y dializados con membrana de polisulfona. Todos estaban con dosis de Fe sacarosa iv (100 mg/2 semanas) durante al menos los dos meses previos al estudio. El estudio se ha realizado el día de la administración de Fe (100 mg en 100 ml de salino 0,09%), con o sin infusión i.v. de NAC previa (2 g en 50 ml de Dextrosa 5%), durante la segunda hora de hemodiálisis (sesión de mitad de semana). Las muestras sanguíneas han sido tomadas de vena: inmediatamente antes de inicio de la sesión de HD, a los 60 min y 240 min después de administrar el Fe i.v. sacarosa (100 mg con o sin infusión previa de NAC). Hemos determinado las citoquinas intracelulares monocitarias: TNF- $\alpha$  e IL-8. Para la determinación de dichas citoquinas se ha utilizado sangre total heparinizada y el procedimiento a seguir ha sido el siguiente: Se ha incubado sangre total con 100 ng/mL de LPS + 10 ng/mL de Brefeldina A + Medio RPMI 1640 durante 4 horas y en una atmósfera de 5% CO<sub>2</sub> a 37°C. Fenotipo utilizado: anticuerpos monoclonales anti-CD14 APC (Becton Dickinson (BD)) en membrana y anti-TNF- $\alpha$  FITC (BD) y anti-IL8 PE (BD) en citoplasma. Se ha analizado por citometría de flujo (FACSCalibur).

**Resultados:** El análisis estadístico realizado es un anova multifactorial en el que se han determinado como factores fijos (tiempo y tratamiento) y aleatorios (grupo y paciente). Respecto al tiempo no se han encontrado diferencias significativas. Los valores presentados son las medias de los tres tiempos de cada tratamiento. Los resultados preliminares se presentan en la siguiente tabla. (Los datos se expresan como IMF: Intensidad Media de Fluorescencia).

	Placebo	NAC	Fe 100	Fe 100 +NAC
IMF TNF- $\alpha$	47,15(3,00)*	52,66(4,5)*	53,68(6)*	49,51(4)*
IMF IL-8	36,36(2,00)**	39,08(2,00)**	43,37(3,00)**	41,61(3,5)**

\*  $p < 0.05$  Fe100+NAC y placebo vs NAC y Fe100.

\*\* $p < 0.05$  Fe100+NAC vs Fe100.

**Conclusiones:** En pacientes en hemodiálisis el tratamiento con Fe 100 mg sacarosa i.v. induce significativamente la producción de citoquinas intracelulares monocitarias como TNF- $\alpha$  e IL-8 con respecto a la sesión de diálisis propiamente dicha. TNF- $\alpha$  disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se administró Fe100+NAC y placebo vs NAC y Fe 100. Respecto a la IL-8, ésta disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) cuando se administró Fe100+NAC, NAC y placebo vs Fe 100. Parece ser que dichos efectos del Fe 100 mg sacarosa i.v. son atenuados cuando se administra en combinación con NAC.

**119. EVALUACIÓN DE LA INMUNOMODULACIÓN DURANTE EL PUERPERIO CON LA INGESTA DE LECHE FERMENTADA CON LACTOBACILLUS CASEI.** Ortiz Andrellucchi A<sup>1</sup>, Rodríguez-Gallego C<sup>2</sup>, Saavedra Santana P<sup>1</sup>, Ramírez García O<sup>3</sup>, García Hernández JA<sup>3</sup>, Cobo JM<sup>4</sup>, Serra Majem L<sup>1,3</sup>. <sup>1</sup>Universidad de Las Palmas de Gran Canaria. <sup>2</sup>Hospital Dr. Negrín de Gran Canaria. <sup>3</sup>Complejo Hospitalario Materno-Insular de Gran Canaria. <sup>4</sup>Danone S.A. Barcelona.

Los probióticos han entrado en el capítulo de los alimentos funcionales por cumplir acciones diana sobre órganos y sistemas, sin limitarse a la actividad puramente nutricional de sus contenidos. Los géneros bacterianos más utilizados como probióticos son los lactobacilos y bifidobacterias, siendo las bacterias ácido-lácticas (BAL) las que más se usan para este fin. En la actualidad existe una amplia literatura sobre la acción saludable que ejercen las BAL y los productos obtenidos a partir de su fermentación. Estos efectos son debidos no sólo a sus propiedades nutricionales y su influencia sobre el medio gastrointestinal, sino también a su acción sobre el sistema inmune.

La mujer embarazada sufre una serie de cambios inmunológicos sistémicos debidos fundamentalmente a la función endocrina y paracrina de diferentes hormonas y citocinas sintetizadas en el área placentaria, así como a las células y antígenos de origen fetal extravasados en la circulación materna.

Los rasgos principales dentro de las modificaciones observadas durante el embarazo son: por un lado aumento generalizado de la respuesta inmune innata y por otro un desvío de la respuesta inmune adquirida hacia la inducción de la respuesta humoral, de tipo Th2, junto con un descenso o inhibición de la respuesta inmune celular o proinflamatoria, de tipo Th1.

Con el fin de determinar si los probióticos administrados durante 6 semanas en mujeres con parto reciente durante el periodo de lactancia son capaces de modular el sistema inmune, se realizó un estudio de intervención nutricional con grupos paralelos, doble ciego, aleatorizado y controlado

Se consideró como criterio primario de evaluación el perfil Th1/Th2 mediante el cociente del porcentaje de Linfocitos T CD4 productores de INF- $\gamma$  e IL4. La técnica utilizada para el análisis fue la detección de citocinas intracelulares por citometría de flujo.

En la visita 2 (entre 7 y 10 días posteriores al inicio del consumo de los productos del estudio) se obtuvieron de forma aleatoria 59 pacientes en el grupo experimental y 42 pacientes en el grupo control. La mediana del perfil en el grupo experimental (5,62), fue superior a la mediana observada en el grupo control (4,60). Esta diferencia fue cercana a la significación ( $p = 0,075$ ). Se observa una tendencia hacia una recuperación más temprana a favor de un perfil Th1 en el grupo experimental.

**120. HIPERPRODUCCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DEL ENDOTELIO VASCULAR, INTERLEUCINA 6 Y AUTOANTICUERPOS EN EL MIXOMA CARDIACO ESPORÁDICO Y EN EL ASOCIADO AL COMPLEJO DE CARNEY.** García-Astudillo LA<sup>1</sup>, Hornero-Cimiano C<sup>1</sup>, Sánchez-Velasco P<sup>1</sup>, Revuelta JM<sup>2</sup>, Leyva-Cobián F<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Cirugía Cardiovascular, Hospital Universitario "Marqués de Valdecilla", Santander

El mixoma cardíaco es la tumoración más común del corazón. Se trata de neoplasias benignas de proliferación muy lenta. Tiene una presentación clínica variable y se asienta en las aurículas (izquierda, 75%;

derecha, 25%) y es más frecuente en mujeres. Es muy probable que determinados herpesvirus (herpes simple, virus de Epstein-Barr y herpesvirus asociado al sarcoma de Kaposi) participen en las causas de la tumoración. Existen dos modalidades, el mixoma esporádico sin anomalías genéticas y el mixoma hereditario (autosómica recesiva, complejo de Carney: mixomas+endocrinopatías+lentiginosis) con mutaciones en el gen PRKAR1a (codificador de la subunidad reguladora de la protein-cinasa A dependiente de cAMP). Esta comunicación presenta un estudio en 18 individuos con mixoma esporádico y con complejo de Carney en los que se han evaluado una serie de parámetros que teóricamente están involucrados en la angiogénesis. En estos pacientes, tanto en sangre circulante como en los sobrenadantes de cultivos de células de mixoma hay producción elevada de diversas citocinas (principalmente IL-6 y VEGF) pero no de otras. Por otra parte, aproximadamente el 40% de los pacientes con mixoma esporádico y complejo de Carney presentan autoanticuerpos circulantes contra diversas estructuras (núcleo, nucleolo, mieloperoxidasa, proteinasa 3, etc) que en la mayor parte de los casos desaparecen meses después de la extirpación quirúrgica del tumor.

**121. LA PROTEÍNA DEL CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B PROTEGE A LOS RATONES FRENTE AL DAÑO HEPÁTICO AGUDO INDUCIDO POR CONCANAVALINA A.** Ochoa-Callejero L, Berraondo, P, Crettaz, J, Vales A, Olagüe C, Lasarte JJ, Prieto J, González-Aseguinolaza G. Centro de Investigación Médica Aplicada, Pamplona.

**Introducción:** Pacientes con hepatitis crónica B presentan niveles ligeramente elevados y constantes de interferón gamma (IFN- $\gamma$  en hígado. Sin embargo, el virus persiste indicando que los hepatocitos infectados, no responden a la acción antiviral del IFN- $\gamma$ .

**Objetivo:** Determinar el papel del virus y/o los antígenos virales implicados en este mecanismo.

**Métodos:** Construimos dos vectores adenovirales que expresan, el antígeno de superficie (AdSuperficie) y del core (AdCore) del virus de la hepatitis B (VHB). Una vez producidos y caracterizados, se inyectaron por vía intravenosa a ratones BALB/c. 24 horas más tarde se les administró concanavalina A (ConA). La ConA induce aumento de IFN- $\gamma$  y daño hepático agudo. Tras la administración de ConA se analizaron los niveles de transaminasas y de IFN- $\gamma$  séricos. Además se determinó el grado de apoptosis en hígado mediante la técnica de TUNEL.

**Resultados:** Tras la administración de la ConA los niveles de IFN- $\gamma$  séricos se elevaron en todos los grupos por igual. Sin embargo, el análisis de los niveles de transaminasas en suero mostraron altos niveles de las mismas en los ratones que habían recibido previamente: PBS, AdSuperficie o AdLuciferasa, no así en los ratones inyectados con el AdCore. Estos resultados se correlacionan con el análisis de TUNEL, los ratones que habían recibido el AdCore apenas mostraban células en apoptosis en el hígado, mientras que en el resto de los grupos aparecían un gran número de células apoptóticas. El análisis del nivel de fosforilación de STAT-1 no muestra diferencias entre los distintos grupos.

**Conclusiones:** La proteína del core del VHB es capaz de inhibir el daño hepático inducido tras la administración de ConA. Esto se ve reflejado en la ausencia de transaminasas en suero y de apoptosis en el hígado. Esta propiedad del antígeno del core puede representar el mecanismo utilizado por el virus para permitir la persistencia viral y puede estar íntimamente relacionado con el desarrollo de hepatocarcinoma. En cuanto al mecanismo de acción, el análisis de STAT-1 mues-

tra que en principio el antígeno del core no inhibe la señalización de IFN- $\gamma$  a ese nivel de la cascada. Actualmente se están realizando estudios para dilucidar el mecanismo implicado en la protección hepática asociada a la expresión de la proteína del core del VHB.

**122. IDENTIFICACIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN QUE INTERVIENEN EN LA REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE BLIMP-1.** *Mora-López F, Foncubierta E, Brieva JA, Campos-Caro A. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.*

**Introducción:** El factor de transcripción Blimp-1 es el regulador maestro de la diferenciación del linfocito B en célula plasmática (CP). Se trata de un represor transcripcional capaz de inhibir la expresión de numerosos genes del linfocito B, permitiendo así la expresión del programa genético de la CP. Poco se conoce de los factores que regulan la expresión del gen de Blimp-1. En nuestro laboratorio hemos estudiado las regiones promotora y/o reguladoras de dicho gen.

**Objetivos:** El objetivo del presente trabajo es identificar regiones reguladoras en "trans" y factores de transcripción en "cis" que intervengan en la regulación de la transcripción del gen Blimp-1.

**Métodos:** Con el fin de identificar los elementos "cis" capaces de regular la expresión de Blimp-1, distintos fragmentos del gen se clonaron en el vector pGL3, que contiene el gen de la luciferasa. Las construcciones se transfirieron en distintas líneas celulares linfoides (B, T y CP) y no linfoides y se midió la actividad luciferasa. Para estudiar los posibles factores de transcripción (elementos "trans") además de las mutaciones en los elementos "cis" previamente caracterizados se utilizaron técnicas de geles en retardo (EMSA) para identificación de dichos factores. Se estudiaron distintas construcciones así como distintos fragmentos de la región promotora que fueron mutadas y utilizadas tanto para ensayos de luciferasas como de competición en EMSAs.

**Resultados:** Se han encontrado posibles elementos "cis" dentro de la región promotora del gen de Blimp-1 así como en el 1<sup>er</sup> exón y en el 1<sup>er</sup> intrón. De los elementos "trans" se podría decir que están implicados factores de transcripción, posiblemente de la familia de Sp1, así como de una familia de factores de transcripción que se unen a cajas E-box y que podría incluir a diferentes familias de factores de transcripción que intervienen en procesos de diferenciación y/o proliferación como es el caso de la activación del gen de Blimp-1 durante la diferenciación de linfocitos B a CP.

**123. EFECTO DE LA OXIDACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD INMUNOSUPRESORA DEL PLASMA SEMINAL.** *Badia R, Iborra A, Antich M, Martínez P. Unidad Inmunología, Instituto de Biotecnología y de Biomedicina, Universidad Autónoma de Barcelona*

**Introducción:** El plasma seminal presenta componentes con funciones inmunosupresoras que inhiben la respuesta inmunitaria frente a los espermatozoides en el tracto genital femenino. La alteración del equilibrio oxidativo en el plasma seminal se asocia a un descenso de la capacidad fecundante del espermatozoide y a una alteración de las propiedades inmunosupresoras del plasma seminal, lo que puede contribuir al establecimiento de la esterilidad en la pareja.

**Objetivos:** Valorar la capacidad inmunosupresora del plasma seminal de pacientes estériles en función de su grado de oxidación.

**Materiales y Métodos:** El análisis de la capacidad inmunosupresora del plasma seminal se realiza mediante el estudio de la proliferación de linfocitos en cultivo, en presencia o ausencia del plasma seminal. La determinación del estado oxidativo del plasma seminal se realiza por cuantificación de malondialdehído (MDA) unido a proteína.

**Resultados:** Los niveles de proteínas oxidadas son más elevados en el plasma seminal de pacientes estériles, lo que se correlaciona con un descenso de la capacidad inmunosupresora del plasma seminal. Asimismo, la inducción *in vitro* de un estado oxidativo del plasma seminal reduce sus propiedades inmunosupresoras.

**Conclusiones:** La alteración *in vivo* o *in vitro* del estado oxidativo de las proteínas del plasma seminal disminuye sus propiedades inmunosupresoras.

**124. LA DISMINUCIÓN DE LOS LINFOCITOS CD3+CD8+CD62L+ Y CD3+CD8+CD28+ DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES CON FRACASO MULTIORGÁNICO ES SIMBOLO DE BUÉN PRONÓSTICO.** *Montserrat J, Rodríguez-Zapata M<sup>1,3</sup>, de Pablo R<sup>2</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Reyes E<sup>1</sup>, Díaz D<sup>1</sup>, Barcenilla H<sup>1</sup>, Sánchez C<sup>1</sup>, Hernández A<sup>1</sup>, Sotelo N<sup>1</sup>, Alvarez-Mon M<sup>1,4</sup>.* <sup>1</sup>Laboratorio de enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Unidad Asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Madrid, España. <sup>2</sup>Unidad de Cuidados intensivos Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid España. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, España. <sup>4</sup>Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid España.

**Introducción:** La sepsis severa es una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos (UCI).

**Objetivos:** Estudiar el papel que tienen los cambios en cifra y en porcentaje de linfocitos CD3+CD4+(Th) y CD3+CD8+(Tc) de sangre periférica en pacientes con SS, y valor predictivo de estas subpoblaciones sobre el desenlace de estos pacientes.

**Materiales y Métodos:** Hemos estudiado células mononucleares de sangre periférica en 34 pacientes con SS. Hemos clasificado los pacientes según su supervivencia. Hemos incluido 36 controles sanos. La extracción de las muestras se realizó en el momento del ingreso del paciente en la UCI (tiempo basal), a 3, 7 y 28 días.

**Resultados:** El porcentaje de células Th de los pacientes que sobrevivieron fue significativamente mayor que los encontrados en los que fallecieron y que en los controles. El porcentaje de linfocitos Tc en los pacientes que sobrevivieron estaba disminuido con respecto a los que fallecieron y con respecto a los controles sanos. La cifra de linfocitos de las subpoblaciones Th y Tc de los pacientes que sobrevivieron disminuyó con respecto a los controles sanos. El ratio CD4/CD8 se incrementó solo en el grupo de pacientes que sobrevivieron con respecto a los controles sanos, pero no en aquellos pacientes que fallecieron. En los pacientes que sobrevivieron, la disminución de la cifra de linfocitos CD4+ se normalizó a los 14 días, a los 28 días la cifra de linfocitos CD8 no se había normalizado. Los pacientes con menor número de linfocitos CD3+CD8+CD28+ y CD3+CD8+CD62L+ son los que tuvieron mejor pronóstico. Hemos encontrado un patrón diferente en el comportamiento de marcadores de activación: la cifra de células CD4+CD45RA+CD45RO está disminuida respecto de los controles en todas las determinaciones, pero en contraste la cifra de CD4+CD45RA-CD45RO+ estaba disminuida a 0, 3 y 7 días, pero se incremento a partir del día 14.

**Conclusiones:** Estos datos indican que la linfopenia T afecta de diferente manera a los linfocitos CD4 de los CD8, el descenso en el número de CD8 en los pacientes que sobrevivieron fue más alto que el observado en los CD4 en el momento del ingreso en la UCI. Los pacientes con menos número de CD8 novatos tienen un mejor desenlace.

**125. LOS PATRONES DE PRODUCCIÓN DE CITOCINAS INTRACELULARES TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2 EN LINFOCITOS T CD4 Y CD8 ESTÁN ASOCIADOS CON EL DESENLAJE CLÍNICO DE PACIENTES CON FRACASO MULTIÓRGÁNICO.** *Monserrat J, Rodríguez-Zapata M<sup>1,3</sup>, de Pablo R<sup>2</sup>, Prieto A<sup>1</sup>, Reyes E<sup>1</sup>, Díaz D<sup>1</sup>, Barcenilla H<sup>1</sup>, Sánchez C<sup>1</sup>, Hernández A<sup>1</sup>, Sotelo N<sup>1</sup>, Alvarez-Mon M<sup>1,4</sup>.* <sup>1</sup>Laboratorio de enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Unidad Asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Departamento de Medicina, Universidad de Alcalá, Madrid, España. <sup>2</sup>Unidad de Cuidados intensivos Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid España. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, España. <sup>4</sup>Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid España.

El fracaso multiórgánico (FMO) es una de las principales causas de muerte en las unidades de cuidados intensivos (UCI).

**Objetivos:** Determinar la producción de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2 por parte de las células T CD4+ y CD8+ de los pacientes con FMO en un estudio prospectivo.

**Materiales y Métodos:** Hemos estudiado células mononucleares de sangre periférica en 34 pacientes con FMO. Hemos clasificado los pacientes según su supervivencia. Hemos incluido 36 controles sanos. La extracción de las muestras se realizó en el momento del ingreso del paciente en la UCI (tiempo basal), a 3, 7 y 28 días. La producción de citoquinas se valoró mediante citometría de flujo.

**Resultados:** En el momento del ingreso, en todos los pacientes, el porcentaje de linfocitos CD45RA+CD8+ productores de TNF $\alpha$  fue significativamente mayor que los encontrados en los controles. En esta subpoblación, el porcentaje de células productoras de TNF $\alpha$  a 3 días fue significativamente menor que en el momento del ingreso. El porcentaje de células CD45RO+CD8+ productoras de TNF $\alpha$  fue significativamente mayor en los pacientes que fallecieron que en los controles sanos. También hemos encontrado un aumento significativo en el porcentaje de células CD45RO+CD4+ productoras de TNF $\alpha$  a 3 y 7 días en los pacientes que fallecieron con respecto a los que sobrevivieron y los controles sanos. El porcentaje de linfocitos CD45RA+CD8+ productores de IFN $\gamma$  fue significativamente más alto en todos los pacientes en el momento del ingreso comparado con los controles. En los pacientes que sobrevivieron, nosotros hemos encontrado a 3 y 7 días una disminución de porcentajes de células productoras de IFN $\gamma$  tanto en la población CD45RA+CD8+ como en la CD45RO+CD8+. Los porcentajes a 3 y 7 días de células CD45RO+CD4+ productoras de IFN $\gamma$  en los pacientes que sobrevivieron fueron significativamente más bajos que los que encontramos en aquellos que fallecieron. Igualmente obtuvimos resultados similares en los porcentajes de linfocitos productores de IL-6, IL-4 e IL-2.

**Conclusiones:** Los patrones de producción de citoquinas entre pacientes que sobrevivieron y los que murieron son claramente diferentes. Existen alteraciones en el porcentaje de linfocitos Th productores de TNF $\alpha$  CD45RO+ y linfocitos Tc productores de TNF $\alpha$  CD45RA+ y CD45RO+.

de IFN $\gamma$ , IL-6, IL-4 e IL-2. Los resultados obtenidos en la valoración del porcentaje de células productoras de todas estas citoquinas nos demuestran que los linfocitos Tc presentan una disregulación que diferencia el desenlace de los pacientes con fracaso multiórgánico.

## SESIÓN 8: MHC

**Moderadores:** Rafael Solana (H. Univ. Reina Sofía, Univ. de Córdoba), Carlos López Larrea (Hospital Central de Asturias)

**126. ORIGEN EUROPEO CELTA/VIKINGO DE LA MUTACIÓN C282Y (Y OTRAS) EN LA HEMOCROMATOSIS.** *Arnaiz-Villena A, Moscoso J, Zamora J, Serrano-Vela JJ, Distante S<sup>1</sup>, Robson KJH<sup>2</sup>, Graham-Campbell<sup>3</sup>, Brissot P<sup>4</sup>, Worwood M<sup>5</sup>.* Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid. <sup>1</sup>Hepatology Unit, Aker University Hospital, Oslo (Noruega). <sup>2</sup>MRC Molecular Haematology Unit, Weatherall Institute of Molecular Medicine, Oxford (Reino Unido). <sup>3</sup>Institute of Archaeology, University College London, London (R. Unido). <sup>4</sup>Clinique des Maladies du Foie, INSERM U522 CHU, Rennes (Francia). <sup>5</sup>Department of Haematology, University of Wales College of Medicine, Cardiff, CF14 4XN, (Reino Unido).

**Objetivos:** La mutación responsable de la mayoría de los casos de Hemocromatosis en Europa (HFE C282Y) parece haberse originado como un único evento en un cromosoma que portaba el haplotipo HLA-A3-B7. Esta mutación se conoce como "mutación Celta", originaria de la población Celta de Europa Central, que se ha extendido hacia el Oeste y el Norte debido a migraciones poblacionales. También se ha sugerido que las migraciones Vikingas fueron responsables en gran medida de la distribución de esta mutación. Los objetivos son analizar las frecuencias de la mutación C282Y en el gen HFE y los haplotipos extendidos HLA-A-B, estableciendo mapas de frecuencia europeos.

**Metodología:** Determinación estándar por PCR-RFLPs de las mutaciones. Determinación de los alelos HLA de clase I. Computación por programa Arlequín.

**Resultados:** Se obtienen gradientes de frecuencia de las mutaciones del gen HFE en Europa y se comparan con los gradientes de las mutaciones del gen de la fibrosis quística.

**Conclusiones:** Concluimos que la mutación C282Y se originó en el continente europeo antes del año 4000 AC, basándonos en los cálculos sobre la antigüedad de la mutación por el desequilibrio de ligamiento. Se discute su ventaja selectiva, su importancia en las migraciones poblacionales y en los cambios culturales desde la transición al Neolítico en Europa.

**127. CARACTERIZACIÓN DEL GEN MHC-F EN EL BONOBO, EL GORILA Y EL ORANGUTÁN.** *Rojo R, Castro MJ, Morales P, Martínez Laso J, Serrano Vela JJ, Moscoso J, Zamora J, R-A-Cachafeiro JJ, García Berciano M, Arnaiz-Villena A.* Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid.

**Objetivos:** MHC-F es un gen de histocompatibilidad de clase I no clásico que presenta un polimorfismo reducido. La función de la proteína que expresa no está clara, aunque se le supone un papel inmunomodulador similar al de los genes HLA-G y HLA-E humanos sobre

células NK y linfocitos T citotóxicos. El objetivo es identificar el gen MHC-F en varias especies de primates y realizar un estudio comparado de su secuencia así como de la proteína que expresan.

**Metodología:** Se han aislado los productos de transcripción de los genes MHC-F de especies de primates cercanas al hombre, obteniendo sus secuencias a partir de cDNA.

**Resultados:** Se han encontrado secuencias ortólogas del gen MHC-F humano (HLA-F) en el bonobo (*Pan paniscus*), el gorila (*Gorilla gorilla*) y el orangután (*Pongo pygmaeus*). También se han encontrado transcritos del gen MHC-F en líneas celulares de estos monos. Los productos proteicos teóricos de este gen muestran que los residuos clave están muy conservados en la región de unión al péptido en las tres especies.

**Conclusiones:** Se discute la función del gen MHC-F, que se encuentra conservado en todos los primates superiores (*Pongidae*).

**128. EL POBLAMIENTO DEL ARCHIPIÉLAGO DE MADEIRA SEGÚN LOS GENES HLA.** Castro MJ, Martínez Laso J, Moscoso J, Zamora J, Serrano Vela JJ, R-A-Cachafeiro JJ, Arnaiz-Villena A. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid.

**Objetivos:** Madeira fue un archipiélago importante para las rutas comerciales hacia América y África en el siglo XV y ya aparece reflejado en algunos mapas del siglo XIV. Está formado por las islas de Madeira y Porto Santo, y por los archipiélagos de Desertas y Selvagens. El archipiélago de Madeira pudo haber sido colonizado por diferentes grupos étnicos, principalmente europeos y africanos. El objetivo es determinar los genes HLA introducidos en Madeira por grupos colonizadores e identificar su procedencia.

**Metodología:** Se han estudiado los genes HLA de 120 individuos de Madeira no emparentados y se han comparado con los de poblaciones europeas, africanas y mediterráneas mediante el cálculo de distancias genéticas y la construcción de dendrogramas Neighbor-Joining (NJ) y análisis de correspondencia. También se han estudiado haplotipos extendidos.

**Resultados:** Se ha encontrado una presencia importante de alelos HLA españoles, portugueses y norteafricanos (incluidos los de origen bereber).

**Conclusiones:** Parece confirmado que Madeira fue colonizado por varias poblaciones diferentes, probablemente en distintos momentos de la historia, no encontrándose genes HLA típicos negroides.

**129. ESTUDIO DEL SNP -88 EN EL PROMOTOR DEL GEN MxA INDUCIBLE POR INTERFERON ALFA EN LA POBLACIÓN DE MÁLAGA.** Ibáñez A, Fernández-Arcás N, Blanco A, Nyqvist M, Alonso A. Servicio de Inmunología, Hospital Regional Carlos Haya (Málaga).

**Introducción:** La proteína A de resistencia a mixovirus (proteína MxA) presenta acción antiviral frente a virus de RNA de varias familias. Su expresión es inducida específicamente por interferones tipo I ( $INF\alpha/\beta$ ), ya que contiene en su promotor un elemento de respuesta estimulado por INF (ISRE). El hallazgo de un polimorfismo simple (SNP) en el nucleótido -88 (G/T) del promotor del gen MxA ha sido relacionada con la respuesta al tratamiento con  $INF\alpha$ .

**Objetivos:** Determinación de las frecuencias alélicas y genotípicas del SNP-88 (G/T) del promotor del gen MxA en la población de

Málaga. Predecir la respuesta al tratamiento con  $INF\alpha$  en pacientes con hepatitis crónica por VHC (virus de hepatitis C).

**Material y Métodos:** Análisis por PCR a tiempo real, caracterizando por curvas de "melting" los genotipos (G/T) del SNP -88 del promotor del gen MxA de una muestra poblacional de 190 individuos sanos y un grupo de pacientes afectados de hepatitis crónica por VHC.

**Resultados:** En la siguiente tabla se presentan las frecuencias alélicas y genotípicas halladas en el grupo control. Los datos referentes al grupo de pacientes con infección crónica por VHC están siendo analizados.

Muestra poblacional (N=190)		
<b>Frecuencias alélicas</b>	Alelo G	349 (0.92)
	Alelo T	31 (0.08)
<b>Frecuencias genotípicas</b>	GG	160 (84%)
	GT	28 (15%)
	TT	2 (1%)

**Conclusiones:** El genotipo GG se presenta con una frecuencia mucho mayor que los genotipos portadores del alelo mutado (GT y TT), en la población de Málaga, tanto en individuos sanos como en individuos afectados de hepatitis crónica por VHC. Estos resultados indican que nuestra población es diferente a la población oriental donde aproximadamente la mitad de los individuos son portadores del alelo mutado.

Cambios en determinados nucleótidos dentro del ISRE pueden dar lugar a una alteración en la unión de factores de transcripción por tanto en la expresión de la proteína.

**130. MODO DE EVOLUCIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC EN CANARIOS (GÉNERO SERINUS).** Lowy E, Zamora J, R-A-Cachafeiro JJ, Moscoso J, Serrano-Vela JJ, Arnaiz-Villena A. Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Hospital 12 Octubre, Universidad Complutense, Madrid.

**Objetivos:** Secuenciar el DNA de las moléculas MHC de clase I de los canarios eurasiáticos y africanos, deducir la estructura terciaria proteica de las moléculas MHC y comprobar el modelo de selección de las moléculas.

**Metodología:** Secuenciación de los alelos de clase I de canarios; modelización de estructura terciaria proteica. Las especies seleccionadas cubren todo el rango de existencia de canarios hoy día. La modelización molecular se hizo con el programa Swiss-Model.

**Resultados:** Mientras los bolsillos A y F de la molécula presentan variaciones respecto a las moléculas humanas y de pollo, los bolsillos B, C, D y E no las presentan. El estudio de las sustituciones sinónimas y no sinónimas en el sitio de unión al antígeno, demuestran que las moléculas MHC de clase I de canarios no están sujetas a una variación dirigida por una selección diversificadora. En este sentido su evolución es parecida a las moléculas de MHC-G humano.

**Conclusiones:** Las moléculas de histocompatibilidad de clase I de estos pequeños pájaros de canto tienen una evolución distinta a las correspondientes humanas y al pollo. Se discuten los hallazgos en base al distinto biotopo que ocupan los tipos de especies animales comparadas.



**131. FRECUENCIA DE LOS ALELOS HLA EN PACIENTES CON MELANOMA CUTÁNEO. HLA-DQB1\*0301 Y PRONÓSTICO.** Campillo JA, Martínez-Escribano JA, Muro M, Marín LA, Moya-Quiles MR, Montes-Ares O, Frías JF, Sánchez-Pedreño P, Corbalán R, Lozano JA, García-Alonso AM, Álvarez-López MR. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia.

**Introducción:** En la actualidad existen datos contradictorios a cerca de la relación entre el HLA y la susceptibilidad al desarrollo de melanoma cutáneo. Sin embargo, el alelo HLA-DQB1\*0301 ha sido asociado con el desarrollo de metástasis en pacientes con melanoma en diferentes poblaciones.

**Objetivos:** Estudiar la asociación entre determinados genes HLA y melanoma en nuestra población y averiguar si el alelo HLA-DQB1\*0301 podría comportarse como un indicador pronóstico.

**Pacientes y Métodos:** Se ha realizado el tipaje de HLA-A y -B mediante técnicas serológicas y el tipaje de HLA-DRB1 y -DQB1 mediante PCR-SSP en 172 pacientes con melanoma y 227 controles sanos. Las variables clínicas analizadas han sido los subtipos histológicos de melanoma, el espesor del tumor, el sexo, el desarrollo de metástasis regionales linfáticas al diagnóstico, y la evolución de la enfermedad. Para el análisis estadístico, se han empleado el test de Chi-cuadrado, el test exacto de Fisher y Log-rank, el análisis de supervivencia de Kaplan Meier, el análisis multivariable de regresión logística y la corrección de Bonferroni. Fueron considerados como significativos aquellos valores de  $p < 0.05$ .

**Resultados:** No se observa asociación entre los genes HLA de clase I o de clase II y la susceptibilidad a la enfermedad. Sin embargo, los pacientes portadores del alelo HLA-DQB1\*0301 desarrollan metástasis regionales linfáticas con mayor frecuencia que aquellos que carecen de dicho alelo ( $p = 0.016$ ; OR=5.6). Es de destacar, que el alelo HLA-DQB1\*0301 se comporta como un indicador pronóstico independiente ( $p = 0.04$ ; OR=4.5) y se asocia con una baja tasa de supervivencia a 7 años ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones:** Los resultados revelaron que el HLA no parece condicionar la susceptibilidad al melanoma en nuestra población. Sin embargo, el alelo HLA-DQB1\*0301 puede influir en el riesgo de progresión de la enfermedad.

**132. TIPAJE GENÓMICO DE ALTA RESOLUCIÓN DEL GEN HLA DQB1\* CON ADN AMPLIFICADO MEDIANTE DOP-PCR.** Cacho JL, León VJ, Gamazo S, Fernández-Calvo B. Servicio de Neurología, <sup>1</sup>Servicio Bioquímica. Hospital Universitario de Salamanca.

**Introducción:** El método SSP empleado normalmente en las técnicas de tipaje molecular del sistema HLA requieren cantidades de ADN del orden de 50 ng/ml por pocillo, esto hace que se necesiten cantidades de unos 15 mcg de ADN para un tipaje molecular completo de clase I y II, este requerimiento dificulta el estudio HLA de muestras hipocelulares como la aplasia medular y con células de cordón umbilical.

Para superar este inconveniente hemos recurrido a la amplificación previa de la muestra utilizando la técnica de DOP-PCR, basada en la amplificación mediante primers degenerados, que componen un panel de oligonucleótidos que van a tener como blanco de hibridación segmentos fijos en las cadenas de ADN genómico, pudiéndose multiplicar todo el ADN de la muestra, obteniendo de esta manera la cantidad de material genómico suficiente para aplicarlo al estudio completo del gen DQB1\* del sistema HLA.

**Material y métodos:** 40 muestras, de 50 ng a 1 mcg de ADN, fueron amplificadas empleando el Kit DOP-PCR, Roche, obteniendo 100

mcg a una concentración superior a 500 mcg/ml. Paralelamente, ADN procedente de los mismos sujetos, obtenido por salting-out, han sido empleados como control. Para el estudio genómico del gen DQB1\* hemos empleado los kits de tipaje de baja y alta resolución de Dynal.

**Resultados y conclusiones:** Las pruebas efectuadas nos han dado idénticos resultados en los ensayos paralelos empleando ADN normal y amplificado por DOP-PCR.

**133. DISTRIBUCIÓN DEL GEN DQD1\* EN ENFERMEDADES NEUROLÓGICAS.** Sevillano MD, Rodríguez-Pérez R, León VJ, Cacho JL, Contador I. Servicio de Neurología, <sup>1</sup>Servicio de Bioquímica. Hospital Universitario de Salamanca.

**Introducción:** Los estudios epidemiológicos han correlacionado ciertos alelos HLA con la susceptibilidad ó resistencia a ciertas enfermedades, así la presencia de alelo HLA particular modula la presentación antigenica inhibiendo ó activando la respuesta inmune frente a exo ó autoantígenos. Hemos estudiado el polimorfismo del gen DRB1\* en un grupo de enfermos neurológicos con un claro componente autoinmune, enfermedad de Alzheimer EA, y otros que no presentan este componente OEN, frente a un grupo control GC.

**Material y Métodos:** 20 pacientes diagnosticados de Probable EA según criterios NINCDS-ADRDA, 29 OEN y 60 sujetos sanos control, fueron el objeto de nuestro estudio. El ADN fue extraído mediante el kit DNA direct II (Dynal) fundamentado en una resina con núcleo metálico que permite separar el complejo ADN-resina mediante un imán. El gen DQB1\* fue estudiado mediante el Kit DQB\*1 (Dynal).

**Resultados:** La distribución alelica para DQB1\*02,\*03, 04\*, 05\* y 06\* en el GC; 29,7; 27,3; 2,3; 19 y 21,4%. 36,3; 19,6; 1,5; 24,2 y 18,1% en EA.; 17,6; 33,8; 1,3; 22,0 y 26,5% en OEN. El test Chi cuadrado mostró diferencias de al menos  $P < 0.005$ , entre los tres grupos estudiados.

**134. DISTRIBUCIÓN DE ALELOS DE HLA DE CLASE II EN UNA POBLACIÓN DE PACIENTES DE LEPRO DEL ESTADO DE GOIÁS, EN BRASIL.** LavadoValenzuela R<sup>1</sup>, Bravo Romero MJ<sup>2</sup>, Moreno C<sup>2</sup>, Junqueira Kipnis AP<sup>2</sup>, Alonso Ortiz A<sup>1</sup>, Caballero González A<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga, España. <sup>2</sup>Dpto. de Microbiología Médica, Middlesex and Royal Free Medical School, The Windeyer Institute, London, UK. <sup>3</sup>Dpto. de Microbiología, Inmunología, Parasitología y Patología, Universidad Federal de Goiás, Goiania, Brasil.

**Objetivos:** La lepra o enfermedad de Hansen es una infección crónica causada por un microorganismo intracelular. La mayoría de casos (80%) se dan en países tropicales (India, Indonesia, Brasil, Nigeria). La predisposición genética a la enfermedad ha sido postulada desde hace muchos años. En este estudio hemos pretendido determinar si existe susceptibilidad a la lepra y sus diferentes tipos ligada a HLA.

**Metodología:** Se tiparon las variantes genotípicas de HLA clase II (-DR y -DQ) en 70 pacientes (31 lepra dimorfa, 17 lepra lepromatosa, 2 lepra tuberculosa y 20 tipo intermedio) por el método PCR-SSP y se compararon con un grupo de 57 contactantes y 77 controles sanos, todos pertenecientes a la misma etnia del norte de Brasil.

**Resultados:** Hemos encontrado una sobre expresión del alelo HLA-DRB1\*11 en pacientes con lepra lepromatosa respecto a controles ( $p = 0.013$ , RR = 4.1, 95% CI). Igualmente, este mismo alelo se encuentra

disminuido en contactantes respecto a pacientes lepromatosos ( $p = 0.004$ ,  $RR = 0.15$ , 95% CI).

**Conclusiones:** Nuestros resultados sugieren, por lo tanto, que el alelo HLA-DRB1\*11 podría estar relacionado con susceptibilidad a la enfermedad en su forma lepromatosa.

**135. UN CLON DE cDNA DEL GEN HLA-B\*1302 RETIENE EL INTRÓN 1.** *Paco L, Maleno I, Jiménez E, Vilchez JR, Palacios JA, García Lora A, López-Nevot MA, Garrido F. Serv. Análisis Clínicos e Inmunología. Hospital Universitario. Virgen de las Nieves, Granada.*

Con el fin de restablecer la expresión de la molécula HLA-B\*1302 en una línea de melanoma que había perdido la expresión de este gen, se clono el cDNA de dicho gen. Se seleccionó mediante tipaje genómico, una línea celular linfoblástica transformada con el virus EBV (M-32-EBV) cuyos alelos B eran HLA-B\*1302, 1401. Tras aislar el mRNA de la línea M32-EBV, se sintetizó cDNA y se amplificó el locus B. El primer 5' fue común para los locus HLA-A, -B y C; y el 3' fue específico para el locus HLA-B y se localizó a unas 349pb aguas abajo de la región 3' no traducida. El producto de PCR se clonó en el vector de expresión pcDNA3.1, bajo el control del promotor viral CMV y el gen de resistencia a la geneticina para su posterior selección en células humanas.

Se aislaron varios clones de cDNA que fueron secuenciados correspondiendo la secuencia con la del gen HLA-B\*1302 (AJ 295278) en todos sus exones (1-7) y también en la región 3' no traducida en la que presentaba un splicing desde la base 3002 a 3170. Sin embargo, estos cDNAs habían retenido la secuencia completa del intrón 1 (81pb). Se comprobó que en los puntos de splicing donadores (GT) y aceptores (AG) no había ninguna alteración y no se apreció ninguna mutación o microdelección en la secuencia. Esta fue la única secuencia que se encontró para B1302, no encontrándose la secuencia sin el intrón. Para determinar si esto ocurría únicamente en la línea celular M-32-EBV, aislamos el cDNA de B1302 desde linfocitos normales, encontrando de nuevo únicamente la secuencia con el intrón 1 para el B1302. El intrón 1 no introduce ningún codon stop y no modifica la pauta de lectura de la proteína, sino que daría lugar a una proteína en la que habría 27 aminoácidos más que en la proteína normal. Para conocer si este cDNA da lugar a la expresión en superficie de la molécula B1302 se está llevando a cabo la transfección del gen HLA-B\*1302 en la línea celular ANDO-2.

Es la primera vez que se ha aislado un cDNA procedente de un alelo HLA-B que retiene un intrón sin que exista ninguna alteración estructural en la secuencia. Ha sido descrito previamente la presencia del intrón 1 por un splicing aberrante, la delección de 10 pb cerca del extremo 3', que origina un nuevo alelo nulo en el HLA-B\*1501.

**136. REEXPRESIÓN DE GENES HLA DE CLASE I EN UNA LÍNEA DE MELANOMA CON PÉRDIDA DE HAPLOTIPO.** *Paco L, Jiménez-Medina J, Maleno I, Cabrera C, Vilchez JR, García-Lora A, López-Nevot MA, Coulie P\*, Garrido F. Serv. Análisis Clínicos e Inmunología. Hospital U. Virgen de las Nieves, Granada. \*Unité de Génétique Cellulaire, Université de Louvain, Bruxelles.*

En líneas celulares tumorales y en tumores sólidos se encuentran frecuentemente alteraciones en la expresión de moléculas del MHC de clase I, lo que supone un gran obstáculo a la inmunoterapia basada en células T. La reexpresión de genes HLA en estas células tumorales puede dar lugar al rescate de antígenos tumorales inmunodominantes que

pueden ser presentados de nuevo a los linfocitos T. Por ello, nos planteamos la reexpresión de los genes HLA-A2, HLA-B13 y HLA-Cw6 mediante transfección génica, en la línea de melanoma ANDO-2 que presenta una pérdida de haplotipo.

Se realizó extracción de mRNA y amplificación de los cDNAs para los genes A2, B13 y Cw6, después se procedió a la clonación direccional de los mismos en dos vectores de expresión, pcDNA3.1 y pcDNA3.2, ambos bajo el control del promotor viral CMV y que contienen el gen de resistencia a la geneticina para su selección posterior en células humanas. De este modo se crearon las construcciones pcDNA3.1-A2, pcDNA3.2-B13 y pcDNA3.2-Cw6.

Las células fueron transfectadas transitoriamente con cada uno de los vectores recombinantes mediante electroporación y se comprobó mediante citometría de flujo que la expresión de los tres genes transfectados era similar a la expresión de estos genes en la línea autóloga. La línea ANDO-2 se transfectó de manera estable mediante el uso de liposomas en la transfección del gen A2 y, mediante electroporación para los genes B13 y Cw6. Tras el proceso de selección con geneticina se estudiará la respuesta inmune generada contra los genes HLA-A\*0201, -B\*1302 y Cw\*0602 mediante el análisis de precursores de CTLs.

Los resultados obtenidos nos permitirán comparar la respuesta inmune antitumoral restringida por los alelos HLA-A, -B o -Cw, así como si ha existido en el paciente un proceso de inmunoselección de variantes tumorales HLA negativas.

**137. EFECTO PROTECTOR DEL EPITOPO HLA-BW4180 Y DE KIR3DS1 CONTRA EL DESARROLLO DE CARCINOMA HEPATOCELULAR EN LA INFECCIÓN POR HCV.** *López-Vázquez A<sup>1</sup>, Rodrigo L<sup>2</sup>, Martínez-Borra J<sup>1</sup>, Pérez R<sup>2</sup>, Rodríguez M<sup>2</sup>, Fdez.-Morera JL<sup>1</sup>, Fuentes D<sup>2</sup>, Rodríguez-Rodero S<sup>1</sup>, González S<sup>3</sup>, López-Larrea C<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Digestivo. Hospital Universitario Central de Asturias. Oviedo. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional. Universidad de Oviedo. Oviedo.*

Las células Natural Killer (NK) proporcionan la defensa contra infecciones virales produciendo citocinas y causando citotoxicidad. Esta capacidad depende del equilibrio entre receptores de activación y de inhibición. Los genes de los receptores Ig-like de las células NK (KIR) codifican para un grupo de las proteínas que se expresan en las células de NK y en algunas células de T. Estos receptores KIRs se relacionan con la activación y la inhibición de las células NK, y pueden desempeñar un papel importante en la respuesta inmune innata contra infecciones virales tales como HCV.

El objetivo de este estudio fue investigar la posible implicación de los de los receptores KIR en la progresión al carcinoma hepatocelular (HCC) en 152 pacientes infectados con HCV.

Encontramos que el alelo HLA-Bw4180 estaba aumentado notablemente en pacientes con enfermedad hepática mínima comparada con aquellos que eran portadores de un carcinoma hepatocelular (49.01% vs. 12.96%), y las diferencias alcanzaron significación estadística ( $p=0.0003$ ,  $OR=6.45$ ). KIR3DS1 estaba también aumentado en los portadores de HCV comparados con los pacientes con carcinoma hepatocelular ( $p=0.008$ ,  $OR=2.97$ ). Por otra parte, estas asociaciones no eran independientes entre si. La asociación KIR3DS1/ Bw4-180 estaba también claramente incrementada en los portadores de HCV ( $OR=24.22$ ). Ninguno de los genes KIR2Ds estudiados tenían una asociación significativa con los diversos grupos estudiados.

Aunque la interacción receptor-ligando entre los alelos de HLA-B que llevan el epitopo Bw4I80 y 3DS1 no se ha demostrado, es posible sugerir un modelo en el cual la interacción entre estas moléculas conduce a una mejor activación de las células NK y T CD8+, que podría proporcionar una eliminación más adecuada de las células infectadas por el HCV.

**138. SECUENCIACIÓN DE LOS INTRONES 2 Y 3 DE DQA1: SBT DEL GEN DQA1 Y CARACTERIZACIÓN DE UN MICROSATÉLITE EN EL INTRON 3 DE DQA1\*0505. Balas A, Aviles MJ, Alonso-Nieto M, Zarapuz L, Blanco L, García-Sánchez F, Vicario JL. Histocompatibilidad. Centro de Transfusión de Madrid.**

El gen HLA de clase II DQA1 codifica para la cadena  $\beta$  del heterodímero HLA-DQ. El tipaje HLA basado en secuenciación es el método más resolutivo descrito. Sin embargo, la mayoría de los procedimientos de SBT desarrollados para los genes HLA de clase II no son capaces de definir completamente el exon 2. Debido a ello nos propusimos caracterizar los intrones 2 y 3 de la mayoría de alelos del gen DQA1 con el fin de diseñar procedimientos de amplificación que fueran capaces de obtener las secuencias completas de los exones 2 y 3 del gen DQA1. La obtención mediante secuenciación de los exones 2 y 3 además de polimorfismos en regiones no codificantes nos permitió reducir el número de ambigüedades en el tipaje del gen DQA1.

La caracterización de los intrones 2 y 3 del gen DQA1 demostró la presencia de dos polimorfismos intra-alelicos para alelos del grupo DQA1\*05. Distintas muestras que incluían el alelo DQA1\*050101 demostraron un polimorfismo en la posición 53 del intron 2 (G53T). Análisis haplotípicos adicionales sugieren la posible asociación del alelo T53 con el haplotipo extendido Ax-Cw5-B18-DR17-DQ2. Por otro lado, la secuenciación del intron 3 de distintas muestras que incluían el alelo DQA1\*0505 demostró la existencia de un microsatélite (TTTC/AAAG)<sub>n</sub> localizado en posición 126 del intron 3. Análisis de fragmentos de este microsatélite reveló la existencia de un elevado polimorfismo para este STR (short tandem repeat) definido como 0505STR con número de acceso en el GenBank BV212285, pudiéndose definir alelos que comprendían desde 8 a 20 repeticiones en nuestra población.

**139. EXPRESIÓN DE NOVO DE MOLÉCULAS DE MHC CLASE I NO CLÁSICAS EN METÁSTASIS PULMONARES MURINAS. Soares-Schanoski A, Salaya G, Algarra I, Martínez M, Jiménez E, Paco L, García-Lora A, Garrido F. Servicio Análisis Clínicos e Inmunología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.**

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo tumoral constituido por diferentes líneas celulares derivadas de clones de un fibrosarcoma inducido por metilcolantreno en ratones Balb/c. Resultados anteriores han mostrado que uno de estos clones, B9, origina variantes metastásicas con una expresión de moléculas clásicas MHC de clase I diferente del clon del que provienen. Quisimos determinar si este fenómeno ocurría con otros clones durante el proceso metastásico.

Se realizaron ensayos de metástasis espontáneas con el clon GR9C5, que presenta expresión de moléculas MHC clase I clásicas, no teniendo expresión de moléculas MHC clase I no clásico, ni de moléculas de clase II. Se inyectaron 1x10<sup>6</sup>/50  $\mu$ l de células de GR9C5 en la pata de ratones BALB/c, cuando el tumor primario alcanzó 8-10 mm el tumor fue extirpado. A los 30 días los animales fueron sacrificados y las metástasis obtenidas fueron adaptadas a cultivo. Una vez las líneas celulares

metastásicas fueron establecidas se estudio la expresión de moléculas MHC de clase I clásicas y no clásicas, y de moléculas de clase II mediante inmunofluorescencia y citometría de flujo.

Los resultados mostraron que las metástasis obtenidas presentan dos tipos distintos de fenotipos de MHC: 1) uno de ellos similar al del clon GR9C5, con expresión de moléculas MHC de clase I clásicas; 2) el otro fenotipo fue distinto, presentando mayor expresión de las moléculas de MHC clase I clásicas K, D y L, y presentando expresión de novo de moléculas no clásicas, Qa1b y Qa2b, y de moléculas de clase II (IA/IE).

Nuestros datos muestran que durante el proceso metastásico se producen variaciones en la expresión de moléculas del MHC, y que la expresión de novo de moléculas MHC de clase I no clásicas puede ser un fenómeno relacionado con el proceso metastásico. Además, este modelo tumoral puede ser usado para investigar los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la expresión de moléculas MHC clase I no clásicas.

**140. SECUENCIA COMPLETA DEL cDNA de los alelos HLA-DRB1\*14011, \*1402, \*1403 Y \*1404. Nocito M<sup>1</sup>, Cox ST<sup>2</sup>, Gutiérrez E<sup>3</sup>, Soteriou B<sup>2</sup>, Ramón D<sup>2</sup>, Madrigal JA<sup>2</sup>, Marsh SGE<sup>2</sup>, Corell A<sup>2,3</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Microbiología e Inmunología, Hospital Clínico Universitario, Valladolid. <sup>2</sup>Anthony Nolan Research Institute, The Royal Free Hospital, London, UK. <sup>3</sup>Departamento de Pediatría e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Valladolid.**

**Objetivos:** La secuenciación de los genes que codifican los antígenos HLA de clase II (y en particular de los alelos de HLA-DR) se ha centrado fundamentalmente en el exón 2 de la cadena beta, por ser este el más polimórfico. En este trabajo nos proponemos realizar la secuenciación completa del cDNA de cuatro alelos de DR14 (supra-grupo DR52) por primera vez.

**Metodología:** Se crecieron 4 líneas linfoblastoideas B (transformadas por EBV), cada una siendo la línea internacional de referencia para cada uno de los 4 alelos en estudio: DRB1\*1401 (TEM), \*1402 (AMALA), \*1403 (MI) y \*1404 (KGU). Se extrajo RNA mensajero por procedimientos convencionales, y se sintetizó cDNA utilizando un oligo (dT)<sub>15</sub> como cebador. De cada cDNA se realizaron dos amplificaciones independientes por PCR utilizando cebadores que anillaban en las porciones 5'UT y 3'UT del gen DRB1 respectivamente. Los amplificados se purificaron y se insertaron en un vector de clonaje (pCR2000, Invitrogene). El vector se creció en *E. coli* y se secuenciaron en las 2 direcciones al menos 3 clones de cada uno de los alelos, utilizando como cebadores los mismos usados en la amplificación así como un nuevo primer interno diseñado (en ambos sentidos) sobre una región muy conservada del exón 3.

**Resultados:** Los alelos HLA-DRB1\*1402 y \*1403 resultaron idénticos (en los exones 1, 3, 4, 5 y 6) al previamente conocido HLA-DRB1\*13011 (también del mismo supra-grupo DR52). Los alelos HLA-DRB1\*14011 y \*1404 también resultaron idénticos a \*13011 en los exones 1, 4, 5 y 6. Sin embargo mostraban características específicas en el exón 3:

- Ambos alelos presentaban una sustitución sinónima ("C" a "G") en la tercera base del codon 114.
- Además, el alelo HLA-DRB1\*14011 presentaba una sustitución no sinónima ("C" a "T") en la primera base del codon 112, lo que suponía un cambio de aminoácido de histidina a tirosina.

**Conclusiones:** 1) Se presentan por primera vez las secuencias completas de 4 alelos del gen HLA-DRB1, las cuatro pertenecientes a subtipos de DR14. 2) Dos de las secuencias obtenidas (HLA-DRB1\*1402 y \*1403) son idénticas a la ya conocida de HLA-DRB1\*13011 en todos los

exones, salvo en el exón 2, que es el más altamente polimórfico. 3) En cambio, para los alelos HLA-DRB1\*14011 y \*1404 se han encontrado secuencias con cambios (sinónimos y no sinónimos) que se describen por primera vez en todos los alelos de los genes beta de clase II (no sólo en DR). 4) En particular la sustitución no sinónima en el codon 112, pone de manifiesto la importancia de realizar secuenciaciones completas del cDNA en vez de exclusivamente el exon-2, para el conocimiento del alcance real del polimorfismo de clase II.

**141. TIPAJE HLA EN UN BANCO DE CORDÓN UMBILICAL DEL SURESTE DE ESPAÑA: DISTRIBUCIÓN DE FRECUENCIAS, HAPLOTIPOS INUSUALES Y CONTROL DE CALIDAD INTERNO.** *Planelles D, Solves P, Vila E, Jarque D, Suñer L, Rodríguez M, Rodríguez R, Puig N, Roig R, Montoro J.* Unidad de Biología Molecular-Histocompatibilidad y \*Banco de Cordón Umbilical del Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana.

**Introducción:** En respuesta al creciente uso de sangre de cordón umbilical (SCU) como fuente de precursores hematopoyéticos para trasplante, en los últimos años se han establecido bancos de SCU en diversos lugares del mundo.

**Objetivo:** El objetivo de este trabajo ha sido analizar el polimorfismo del sistema HLA en las unidades procesadas en el Banco de Cordón Umbilical de Valencia. Además, se ha evaluado la utilidad del tipaje HLA como parte del programa de control de calidad interno de nuestro Banco.

**Metodología:** Entre junio de 1999 y noviembre de 2004 se han tipificado 1826 unidades de SCU. El tipaje HLA se ha realizado por micro-linfocitotoxicidad (clase I) o biología molecular de baja resolución (clase I y II). Para el control de calidad, una vez al mes se realizó el tipaje HLA en alícuotas descongeladas de un criotubo satélite y un segmento integral de una bolsa de SCU, así como en una muestra de la sangre materna correspondiente.

**Resultados y Conclusiones:** En el 5.9% de las unidades se detectó una asociación inusual para la población caucásica entre los loci DRB1 y DQB1, aunque la distribución de frecuencias HLA (ver tabla) fue similar a la de nuestra población control de donantes de órganos y de médula.

HLA-A	%	HLA-B	%	HLA-DRB1*%	HLA-DQB1* %
1	19.8	5	18.3	01	19.6
2	43.6	7	14.8	0103	2.3
3	20.3	8	10.4	15	16.4
23	7.0	12	34.2	16	4.7
24	17.9	13	3.0	03(17)	22.1
25	2.3	14	12.2	03BC	0.2
26	7.2	15	9.5	04	27.2
34	0.3	16	10.5	11	24.7
66	1.5	17	6.5	12	2.1
11	13.4	18	14.2	13	22.2
29	17.2	21	13.2	14	5.1
30	11.4	22	3.5	07	32.5
31	4.3	27	6.1	08	5.6
32	8.4	35	18.3	09	1.7
33	4.5	37	2.7	10	3.0
28	7.4	40	9.0	Blancos	11.9
80	0.7	Otros	5.9		
Blancos	13.1	Blancos	7.9		

**SESIÓN 9: INMUNIDAD INNATA Y PRESENTACIÓN DE ANTÍGENO**

**Moderadores:** Miguel López Botet (Univ. Pompeu Fabra, Barcelona), Dolores Jaraquemada (Univ. Autónoma Barcelona)

**142. DISMINUCIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA SISTÉMICA, ASOCIADA AL PROCESO DE PANCREATITIS AGUDA, MEDIANTE LA INHIBICIÓN GENÉTICA Y FARMACOLÓGICA DE LAS POLI-ADP-RIBOSA POLIMERASAS.** *Mota RA<sup>1</sup>, Sáenz Mateo LJ<sup>1</sup>, Tornel PL<sup>1</sup>, Jimeno J<sup>1</sup>, Martínez Torrano AJ<sup>1</sup>, Hernández-Espinosa D<sup>1</sup>, Parrilla P<sup>1</sup>, Sánchez-Bueno F<sup>1</sup>, Yélamos J<sup>2</sup>.* <sup>1</sup>Hospital Universitario "Virgen de la Arrixaca. <sup>2</sup>Departamento de Biología Química, Biología Molecular B e Inmunología. Universidad de Murcia.

**Introducción:** Las enzimas nucleares Poli-ADP-ribosa polimerasa-1 (PARP-1) y -2 (PARP-2), en respuesta al daño en el ADN, sintetizan y transfieren ADP-ribosa a proteínas aceptoras, incluyendo PARPs, histonas, factores de transcripción y proteínas de reparación. La poli-ADP-ribosilación finaliza tras la liberación de las moléculas de PARP ribosiladas del ADN. Los polímeros de ADP-ribosa son posteriormente degradados mediante la poli-ADP-ribosa glicohidrolasa. La poli-ADP-ribosilación es, por tanto, una modificación rápida, covalente pero transitoria de proteínas nucleares. Estudios recientes han demostrado que PARP-1 está involucrada en la regulación a nivel nuclear de la ruta de señalización mediada por NF-κB que conduce a la expresión de mediadores inflamatorios. Así, los ratones PARP-1<sup>-/-</sup> están protegidos frente a diferentes procesos inflamatorios como el shock endotóxico mediado por LPS. El objetivo del estudio es determinar en un modelo murino de pancreatitis aguda necrotizante (proceso inflamatorio cuya evolución puede inducir un Síndrome de Respuesta Inflamatoria Sistémica), el efecto en la respuesta inflamatoria del bloqueo de la actividad de PARP-1 y -2, genéticamente (PARP-1<sup>-/-</sup> y PARP-2<sup>-/-</sup>) y farmacológicamente (PJ34).

**Método:** Se administró 12 inyecciones intraperitoneales (IP) espaciadas 1 hora en el tiempo con una dosis supramáxima (50 µg/Kg) de "ceruleína" en ratones (PARP-1<sup>-/-</sup> y PARP-2<sup>-/-</sup>) y ratones control de cepa silvestre de seis semanas de edad. La inhibición farmacológica se llevó a cabo mediante un tratamiento previo con PJ34 (10 mg/kg) 1 hora antes de la inducción experimental de la pancreatitis. La severidad de la pancreatitis fue evaluada cuantificando los niveles séricos de enzimas pancreáticas y el daño tisular ocasionado. La valoración de la respuesta inflamatoria sistémica se determinó por el nivel sérico y tisular de varias citoquinas y el infiltrado leucocitario del parénquima pulmonar.

**Resultados:** El bloqueo genético y farmacológico de PARP disminuye el nivel de amilasaemia y lipasaemia, el edema, la necrosis y el infiltrado inflamatorio tisular en páncreas y en pulmón.

**Conclusiones:** Nuestros resultados indican que el bloqueo de la actividad PARP, puede representar una nueva estrategia terapéutica que atenúe la severidad de la pancreatitis y los efectos sistémicos mediados por la respuesta inflamatoria exacerbada.

**143. EFECTO DE CITOCINAS SOBRE MONOCITOS INFECTADOS CON MYCOBACTERIUM AVIUM.** *Rivero Lezcano OM, Antolín Ayala MI.* Unidad de Investigación del Hospital de León.

**Objetivo:** Determinar mediante un diseño estadístico factorial el efecto sobre monocitos infectados con *Mycobacterium avium* (*M. avium*) de combinaciones de seis citocinas: factor de necrosis tumoral alfa

(TNF $\alpha$ ), interferón gamma (IFN $\gamma$ ), factor de estimulación de colonias de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), factor de estimulación de colonias de macrófagos (M-CSF), interleucina 2 (IL-2) e interleucina 3 (IL-3).

**Metodología:** Monocitos humanos fueron purificados mediante gradientes de Ficoll y posterior unión a perlas magnéticas acopladas a anti-CD14. Se infectaron en medio sin suero de macrófagos con alicuotas de un aislado clínico de *M. avium* (HL70A) congelado a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Los monocitos infectados fueron inoculados en placas de 96 pocillos a los que previamente se había añadido una mezcla de citocinas. La composición de la mezcla en cada pocillo fue determinada aleatoriamente mediante un diseño factorial para seis citocinas. Al cabo de siete días los monocitos fueron lisados por sonicación, y las bacterias liberadas fueron incubadas en medio 7H9 en placas de 96 pocillos. Seis días más tarde se contaron las microcolonias bajo un microscopio óptico invertido.

**Resultados:** Los monocitos infectados con esta cepa de *M. avium* son incapaces de mostrar un efecto bactericida, aunque sean activados con varias citocinas. Se ha observado, sin embargo, que el grado de multiplicación intracelular depende en gran medida de la combinación de citocinas a que se ven expuestos durante la infección. En pocillos inoculados sin monocitos las bacterias se multiplicaron más de 1.000 veces, mientras que en monocitos infectados y activados lo hicieron en menor medida, de 5 a 500 veces. Algunas citocinas (IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ ) inhibieron significativamente la multiplicación de *M. avium*. M-CSF, IL-2 e IL-3, aunque individualmente mostraron un efecto inapreciable, interfirieron con las citocinas inhibitorias facilitando la división intracelular de la micobacteria. Aunque GM-CSF ejerció una acción bacteriostática, no fue estadísticamente significativa.

**Conclusiones:** Varios grupos de investigación han determinado el efecto bacteriostático frente a *M. avium* de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  y GM-CSF. Nosotros lo hemos confirmado en nuestros experimentos para IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  y, en menor medida, para GM-CSF. Pero inesperadamente, IL-2, IL-3 y, sobre todo, M-CSF, no solo facilitaron la multiplicación de la micobacteria (aunque estadísticamente de forma no significativa), sino que interfirieron en el efecto bacteriostático de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , siendo esta última la más afectada. Curiosamente, estas citocinas son capaces de activar monocitos frente a otros patógenos como *Candida albicans* o *Legionella pneumophila*. Finalmente queremos destacar el efecto sinérgico de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ . Cuando ambas citocinas actuaron conjuntamente, la actividad bacteriostática fue máxima.

**144. EFECTO DE LA INFECCIÓN POR CITOMEGALOVIRUS HUMANO EN EL REPERTORIO DE RECEPTORES DE CÉLULAS NK.** Gumá M\*, Angulo A\*\*, Vilches C\*\*\*, Gómez-Lozano\*\*\*, Malats N\*\*\*\*, López-Botet M\*. \*Unidad Immunopatología Molecular. Universitat Pompeu Fabra (DCEXS). Barcelona. Spain. \*\*Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Barcelona. \*\*\*Servicio de Inmunología, Clínica Puerta de Hierro. Madrid. \*\*\*\*Institut Municipal d'Investigacions Mèdiques (IMIM). Barcelona.

Hemos realizado un análisis sistemático de la expresión del receptor activador CD94/NKG2C en linfocitos de sangre periférica de donantes adultos sanos (n=70). Consideramos la infección por citomegalovirus (CMVh) así como el genotipo KIR y del HLA-E como variables potencialmente relacionadas con la expresión del receptor CD94/NKG2C. En paralelo se estudió la distribución de otros receptores expresados en células NK (CD94/NKG2A, KIR, CD85j, CD161, NKp44, NKp46, NKp30 y NKG2D).

Las proporciones de linfocitos NKG2C+ variaron ampliamente (<0.1-22.1%), y se observó una correlación significativa ( $p < 0.001$ ) entre los porcentajes de células NK y T NKG2C+. Las proporciones elevadas de células NKG2C+ se asociaron significativamente a la serología positiva para CMVh, pero no a la de otros herpes virus (Epstein-Barr y Herpes Simplex), sin presentar ninguna relación aparente con los genotipos KIR ni HLA-E. Los linfocitos en sangre periférica de donantes CMVh+ mostraron una expresión reducida de los receptores activadores NKp46 y NKp30 en células NK y un aumento de las proporciones de células ILT2+ y KIR2D+. Se observó que la población CD94/NKG2C expresa bajos niveles de NKP30, NKp46 e incluye proporciones de células KIR+ y ILT2+ más elevadas que la población CD94/NKG2A+.

Estos datos sugieren que la infección por CMVh puede modificar el repertorio de los receptores expresados en células T y NK. Los factores que determinan la expansión de los linfocitos CD94/NKG2C+ y su posible relevancia en el control de la infección y/o reactivación deben ser estudiados con más detalle.

**145. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN Y DE LAS MUTACIONES SOMÁTICAS DE GENES IgVH PRESENTES EN CÉLULAS PLASMÁTICAS HUMANAS DE AMÍGDALA.** Jiménez-Gómez G, Gómez-Perales JL, Medina F, Campos-Caro A, Segundo C, González-García I, Brieva JA. Servicio de Inmunología y Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Las células plasmáticas (CP), estadio final de diferenciación B, son las células secretoras de inmunoglobulinas (Ig). Tras un primer reconocimiento del antígeno (Ag), se produce la activación de linfocitos B que migran a órganos linfoides secundarios produciéndose una expansión clonal y una alteración estructural de los genes IgVH denominado hipermutación somática, dando lugar a que aquellas células que generan Ig que se unen al Ag de mayor afinidad son seleccionadas positivamente. Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado la existencia en amígdala humana de dos poblaciones de CP: una que se obtiene sólo mediante disgregación mecánica del órgano (CP-A), y otra que se recoge tras digestión de los restos disgregados tras tratamiento con colagenasa (CP-A-COL). Estas CP se distinguen por diferencias en el isotipo predominante de Ig secretado y el fenotipo. En primer lugar se purificaron ambos tipos de CP usando métodos inmuno-magnéticos y "sorting" de células CD38++. Se ha comparado la expresión de ciertos factores de transcripción de estas poblaciones mediante RT-PCR, demostrándose que ambos tipos expresan igualmente Blimp 1, pero sólo las CP-A expresan BSAP. Estos datos unidos a los mencionados, revelan que CP-A son menos maduras que CP-A-COL. Además, se ha secuenciado el ADNc codificante de las regiones IgVH6 e IgVH3 procedentes de ambos tipos de CP, secretoras de IgM, IgG, e IgA, obtenidas de 3 muestras (n= 230 y 449, respectivamente). Los resultados muestran que no existen diferencias notables en cuanto a las mutaciones somáticas (nº, localización, etc.) presentes en los genes mencionados entre ambos tipos de CP, lo que sugiere que esta característica no parece implicada en el programa de maduración de las CP. Estos genes aparecen más mutados en los CDRs que en los FRs, de acuerdo con lo descrito. Sin embargo, la comparación entre las mutaciones presentes en los distintos isotipos reveló gran cantidad de diferencias. En ambas poblaciones el isotipo IgA presenta el mayor número de mutaciones, IgM, el menor, e IgG oscila entre las dos. Este patrón se mantiene para la región FR1, FR2, FR3, CDR1 y CDR2, tan-

to para mutaciones R como S. Además CDR2 presenta más mutaciones que CDR1, y mayor porcentaje de ellas en secuencias con motivos canónicos RGYW/WRCY. En todos los casos FR2 muestra ser el fragmento menos mutado. El análisis de las diferencias entre isotipos revela características previamente desconocidas de la respuesta inmune humoral humana.

**146. FILOGENIA DEL SISTEMA INMUNE. EVOLUCIÓN Y GÉNESIS DE LOS 5 ISOTIPOS DE LOS MAMÍFEROS.** *Sánchez Espinel C, Valdueza Beneitez J, Garet Fernández E, Gambón Deza F. Unidad de Inmunología, Hospital do Meixoeiro. Vigo.*

**Objetivos:** Existe un gran número de anticuerpos secuenciados de diferentes especies de vertebrados. Con estas secuencias se estudió el posible origen y evolución de las regiones constantes de los anticuerpos del os mamíferos.

**Metodología y Resultados:** Se realizaron alineaciones de cada dominio individual de las regiones constantes con los homólogos en diferentes especies de mamíferos. Los árboles filogenéticos a partir de las secuencias de los 5 isotipos de los mamíferos indican la procedencia común de la IgG e IgE. Probablemente la IgA procede de una duplicación de la antigua IgM. Estos datos se corresponden con los hallazgos experimentales de la presencia de Y en aves que debería corresponder al ancestro de la IgG y la IgE. No está dilucidado el origen de la IgA. La IgA encontrada en aves, molecularmente no enraza con la IgA del os mamíferos.

Estos datos dirigen el estudio hacia los anticuerpos de los reptiles (a partir de los cuales se originaron los mamíferos y las aves) como claves para conocer el origen de los 5 isotipos de los mamíferos. Hemos comenzado la secuenciación del locus genético de un reptil (*Eublepharis macularis*), del cual tenemos la secuencia de un gen de un anticuerpo.

**Conclusiones:** Del estudio de las secuencias de los anticuerpos concluimos que la IgG y la IgE tienen uno rigen común. La IgA procede de una duplicación antiguad el gen del a IgM primaria.

**147. LA PROTEÍNA ADAPTADORA 3BP2 INTERACCIONA CON LA PROTEÍNA DE MEMBRANA CD244 AUMENTANDO LA CITOTOXICIDAD DE LA CÉLULA NK DEBIDA A ESTE RECEPTOR.** *Saborit-Villarroya I\*, Del Valle JM\*, Romero X\*, Esplugues E\*\*, Lauzurica P\*\*, Engel P\*, Martín M\*. \*Unidad de Inmunología, Fundación IDIBAPS-Universidad de Barcelona. \*\*Departamento de Fisiología, Universidad de Barcelona.*

**Introducción:** El adaptador 3BP2 se expresa preferentemente en células del sistema inmune. Está constituido de: un dominio C-terminal de homología a plextrina, otro central rico en prolinas y un dominio SH2 en el N-terminal. Se ha descrito que regula la citotoxicidad mediada por la célula NK. El receptor CD244, miembro de la familia del CD150 (SLAM), es una glicoproteína de membrana que se expresa en NK, linfocitos CD8<sup>+</sup> y células mieloides. Al igual que toda la familia del CD150, el CD244 interacciona con la proteína SAP/SH2D1a (*SLAM associated protein*) cuya deficiencia es la responsable de la enfermedad linfoproliferativa asociada al cromosoma X (XLP).

**Objetivos:** En este trabajo, describimos la interacción del 3BP2 con la cola citoplasmática del CD244 y la repercusión fisiológica de esta unión.

**Metodología:** La cola citoplasmática del CD244 se usó como cebo para el cribaje de una librería de cDNA de células B humanas median-

te la técnica del triple híbrido en levaduras. Se llevó a cabo mutagénesis dirigida así como técnicas bioquímicas para determinar la interacción. También se realizaron ensayos funcionales tales como liberación de citocinas y citotoxicidad en una línea humana de NK, YT

**Resultado y Conclusiones:** La técnica del triple híbrido permitió detectar un clon que codificaba para el adaptador 3BP2. Esta interacción se da entre la tirosina 337 fosforilada por la cinasa Fyn en la cola citoplasmática del CD244 y el dominio SH2 del 3BP2. La activación del CD244 induce fosforilación del 3BP2 y reclutamiento de Vav a este adaptador. La sobreexpresión del 3BP2 aumenta en magnitud y duración la fosforilación de ERK vía CD244. Este incremento es concomitante con un aumento en citotoxicidad, pero no afecta a la producción de IFN $\gamma$ . Estos resultados refuerzan la hipótesis que en células NK humanas la citotoxicidad y la producción de IFN $\gamma$  vía CD244 están controlados por rutas de señalización diferentes.

**148. EL ESTRÉS OXIDATIVO DE LOS LEUCOCITOS PERITONEALES DE RATONES VIEJOS ES DEBIDO PRINCIPALMENTE A LOS MACRÓFAGOS.** *Puerto M, Medina S, Baeza I, Alvarado C, Álvarez P, Arranz L, De la Fuente M. Dpto. Fisiología (Fisiología Animal II). Facultad de CC. Biológicas. U.C.M.*

**Introducción:** Con el envejecimiento se produce un aumento en el estrés oxidativo celular, debido a una mayor producción de radicales libres y a una disminución de las defensas antioxidantes. Las células inmunitarias son especialmente sensibles a este estrés oxidativo puesto que necesitan producir radicales libres para poder llevar a cabo muchas de sus funciones. Además, en trabajos previos con leucocitos peritoneales murinos, hemos comprobado que la presencia o ausencia de los linfocitos influye decisivamente en las funciones de los macrófagos.

**Objetivos:** Estudiar cuál de las dos poblaciones mayoritarias del peritoneo, macrófagos o linfocitos B, influye en mayor medida en el estrés oxidativo que se observa en los leucocitos peritoneales de ratones viejos.

**Material y Métodos:** Se emplearon leucocitos peritoneales de ratones hembra adultos (24 $\pm$ 2 semanas) y viejos (72 $\pm$ 2 semanas). A partir de la suspensión peritoneal se purificaron macrófagos y linfocitos B mediante selección positiva con anticuerpos monoclonales conjugados con bolas magnéticas. Se valoraron los niveles de glutatión reducido (GSH) y oxidado (GSSG) mediante espectrofotometría, así como la relación entre ambos (GSSG/GSH) y los niveles de malondialdehído (MDA) mediante HPLC, en la población total y en los macrófagos y linfocitos B purificados.

**Resultados y Conclusiones:** En los adultos, los valores de GSSG/GSH y de MDA en macrófagos y linfocitos B purificados son mayores que en la población total lo que parece indicar una influencia mutua entre estas células a la hora de controlar el estrés oxidativo de la suspensión peritoneal. Sin embargo, en los animales viejos, la relación GSSG/GSH es similar en los macrófagos, los linfocitos y la población total, lo que podría deberse a un deterioro en la comunicación entre dichas células que conduce a un incremento del estrés oxidativo en la población total. Además, los resultados indican que este aumento se debe principalmente a los macrófagos, puesto que los valores de GSSG, GSSG/GSH y MDA son significativamente mayores en estas células cuando proceden de animales viejos, mientras que los linfocitos B de ratones adultos y viejos no muestran diferencias en ninguno de los parámetros estudiados.

**Financiación:** Este trabajo ha sido financiado por un proyecto del MCYT (BFI 2001-1218).

**149. LA SUPLEMENTACIÓN EN LA DIETA CON POLIFENOLES MEJORA LA FUNCIÓN DE LOS LEUCOCITOS PERITONEALES DE RATONES CON SHOCK ENDOTÓXICO.** Alvarez P, Alvarado C, Puerto M, Baeza I, Medina S, Jiménez L\*, De la Fuente M. Departamento Fisiología Animal, Facultad de Biología, Universidad Complutense de Madrid (España). \*Danone, Francia.

**Introducción:** El shock endotóxico es una de las principales causas de mortalidad en los pacientes de las unidades de cuidado intensivo. Las endotoxinas bacterianas producen una respuesta excesiva por parte de las células inmunitarias, con una producción y liberación masiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y mediadores proinflamatorios que desencadenan el elevado estrés oxidativo que conduce al deterioro inmunológico, al fallo multiorgánico y a la muerte del individuo. Estudios previos, algunos de nuestro grupo, han demostrado que la administración de antioxidantes, como la N-acetilcisteína, es eficaz para neutralizar ese estrés oxidativo, mejorar la función inmunitaria y aumentar la supervivencia en modelos murinos de endotoxemia. Actualmente, hay cada vez más evidencia del alto poder antioxidante de los polifenoles, compuestos naturales presentes en la dieta.

**Objetivos y Métodos:** Investigar los efectos de la suplementación en la dieta durante 20 semanas (20% p/p) con cuatro tipos diferentes de fracciones de cereales ricas, de forma natural, en polifenoles (ácido gálico, ácido p-hidroxibenzoico, ácido vanílico, ácido sináptico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico, quercetina, catequina, rutina y orizanol) a los que se han denominado B, C, D y E, en diversas funciones inmunitarias de leucocitos peritoneales de ratones a los que se indujo un shock endotóxico (SE) mediante inyección intraperitoneal de LPS de *E. coli* (25 mg/kg). Las valoraciones se efectuaron a tiempo 0, a las 2 y 24 horas (la mortalidad de los animales aparece a las 26 horas) tras la administración del LPS. El grupo control fue tratado igual que los experimentales pero alimentado con dieta estandar.

**Resultados:** Los leucocitos peritoneales de ratones con SE y suplementados con dichas fracciones, muestran un aumento de su quimiotaxis, capacidad microbicida, linfoproliferación en respuesta al mitógeno Con A y secreción de IL-2 en comparación con los controles (en los que estas funciones disminuyen significativamente respecto al tiempo 0, fundamentalmente en las funciones de linfocitos). Todos los cereales tuvieron el mismo efecto a las 2 h de inyectar LPS, y los cereales B y C mostraron algo más de efecto a las 24 horas de establecer el SE.

**Conclusiones:** La suplementación en la dieta con antioxidantes polifenólicos, mejora el funcionamiento del sistema inmunitario en ratones con un estrés oxidativo agudo como lo es el shock endotóxico, acercando los valores de las funciones estudiadas a los de los animales sanos. Productos elaborados con fracciones ricas en polifenoles pueden ser útiles para modular la función inmunitaria en individuos con sepsis, mejorando su supervivencia.

**150. EFECTO ANTIINFLAMATORIO DE LBP Y CD14 EN LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL PULMÓN DE LOS FUMADORES.** Campos MA<sup>1,2</sup>, Regueiro V<sup>1</sup>, Pérez C<sup>1,2</sup>, Sauleda J<sup>3</sup>, Bengoechea JA<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Investigación, Hospital Son Dureta. <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad Islas Baleares. <sup>3</sup>Servicio de Neumología, Hospital Son Dureta, Palma Mallorca.

**Introducción.** Existe amplia evidencia documentando que en el reconocimiento de los patógenos intervienen LBP, CD14 y los receptores "Toll-like" (TLR). Las células epiteliales del pulmón desempeñan

un papel crítico en la defensa del pulmón frente a las infecciones. Si bien es relativamente conocido el papel de los TLRs en la activación de estas células todavía no existen trabajos estudiando el papel de LBP y CD14. Además tampoco ha sido estudiado si el hábito tabáquico afecta al reconocimiento de los patógenos por estas células.

**Objetivos.** Estudiar el papel de LBP y CD14 en la activación de las células epiteliales pulmonares. Comprobar si el tabaco puede alterar la activación de estas células.

**Métodos.** Se utilizó como modelo de los neumocitos de tipo II la línea celular A549. La translocación de NF-κB al núcleo así como la expresión IκBα se determinaron mediante "Western blot". La secreción de IL-8 se cuantificó mediante la técnica de ELISA. La expresión de LBP y CD14 se determinó mediante ELISA y PCR semicuantitativa.

**Resultados.** La concentración de LBP y CD14 es 100 veces mayor en el lavado broncoalveolar de fumadores (n=12) que en el lavado de sujetos no fumadores (n=10). Estas concentraciones de LBP y CD14 inhiben la secreción de IL-8 así como la activación de NF-κB tras una infección de las células A549 con *Haemophilus influenzae*. Las propias células epiteliales del pulmón pueden ser la fuente de LBP y CD14 en el lavado ya que un estímulo inflamatorio (10 ng/ml IL-6) o el propio humo del tabaco activan la expresión y secreción de estas proteínas.

**Conclusiones.** El tabaco eleva las concentraciones de LBP y CD14 en el pulmón de los fumadores siendo una de las fuentes de estas proteínas las células epiteliales. Estas concentraciones de LBP y CD14 inhiben la activación de las células epiteliales pulmonares tras una infección con *Haemophilus influenzae*.

**151. LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES "TOLL-LIKE" 2 Y 4 SE INCREMENTA EN LAS CÉLULAS EPITELIALES DEL PULMÓN TRAS UNA INFECCIÓN.** Regueiro V<sup>1</sup>, Llompart C<sup>1,2</sup>, Campos MA<sup>1,2</sup>, Bengoechea JA<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Investigación, Hospital Son Dureta; <sup>2</sup>Departamento de Biología, Universidad Islas Baleares, Palma Mallorca.

**Introducción.** Las células epiteliales del pulmón desempeñan un papel crítico en la defensa del pulmón frente a las infecciones. Así actúan respuestas defensivas como la secreción de IL-8 en un proceso dependiente de la activación de los receptores "Toll-like" (TLR) y del factor de transcripción NF-κB. Sin embargo, todavía es poco conocido si las células epiteliales regulan la expresión de estos receptores tras una infección.

**Objetivos.** Estudiar si las células epiteliales del pulmón regulan la expresión de los TLRs 2 y 4 tras una infección con un típico patógeno pulmonar como *Klebsiella pneumoniae*.

**Métodos.** Se utilizó como modelo de los neumocitos de tipo II la línea celular A549. La expresión de los TLRs 2 y 4 se estudió mediante citometría de flujo. La translocación de NF-κB al núcleo así como la expresión IκBα y de la MAP quinasa p38 se determinaron mediante "Western blot". La secreción de IL-8 se cuantificó mediante la técnica de ELISA.

**Resultados.** La infección de las células A549 con *K. pneumoniae* causó un incremento en la expresión de los receptores TLR2 y 4 en un proceso dependiente de la presencia de CD14 soluble. Este incremento en la expresión de los TLRs se correlacionó con una mayor secreción de IL-8 tras la estimulación con agonistas específicos de los TLRs2 y 4. Se comprobó que este incremento en la expresión de los TLRs fue parcialmente dependiente de la activación de NF-κB mientras que la activación de la MAP quinasa p38 tuvo un efecto inhibitorio.

**Conclusiones.** La infección de las células A549 con *K. pneumoniae* en presencia de CD14 soluble causa un incremento en la expresión

si3n de los TLRs 2 y 4. La expresi3n de los TLRs 2 y 4 est3 controlada por el balance entre la activaci3n de NF- $\kappa$ B y de la MAP quinasa p38.

**152. LAS C3LULAS NK INDUCEN APOPTOSIS Y NECROSIS EN LAS C3LULAS DECIDUALES HUMANAS.** *Tirado I, Mu1oz-Fern3ndez R, Blanco O, Garc3a Olivares E.* Unidad de Inmunolog3a, Departamento de Bioqu3mica, Facultad de Medicina, Granada.

**Introducci3n:** La decidua es el tejido materno en intimo contacto con el trofoblasto fetal. Durante el embarazo normal se desarrollan a nivel de la decidua, mecanismos de tolerancia inmunol3gica de la madre hacia el feto; mientras que en el aborto espont3neo, se activan mecanismos de reacci3n inmunol3gica que lesionan el trofoblasto. As3, en el embarazo normal hay una producci3n local de citoquinas Th2; sin embargo, en el aborto espont3neo hay una producci3n de citoquinas Th1. Las c3lulas dendr3ticas (DC, dendritic cells) deciduales probablemente son las responsables de la diferenciaci3n hacia Th1 o Th2. Nosotros hemos observado la formaci3n de conjugados de c3lulas NK y DC en la decidua humana normal.

**Objetivos:** Estudiar el significado funcional de la asociaci3n de DC-NK en la decidua humana de primer trimestre de embarazo

**Pacientes y M3todos:** La conjugados NK-DC han sido estudiados mediante citometr3a de flujo utilizando anticuerpos monoclonales frente CD56, que identifica las NK deciduales y frente a DC-SING, que identifica las DC. Las c3lulas en apoptosis han sido detectadas mediante la t3cnica TUNEL. Las c3lulas en necrosis fueron detectadas mediante tinci3n con yodo de propidio.

**Resultados y Conclusiones:** Hemos observado que una proporci3n importante de las c3lulas dendr3ticas, identificadas mediante la expresi3n de DC-SING, eran TUNEL+, IP+. Estos resultados indican que las DC son eliminadas por las NK deciduales mediante apoptosis y necrosis. Este fen3meno podr3a formar parte del proceso de tolerancia materno-fetal. Al eliminar las DC, estas no emigrar3an a los ganglios locales, evitando la presentaci3n a Th1, que a su vez activar3an c3lulas potencialmente citot3xicas para el trofoblasto.

**153. EL GEN FHIT PUEDE ESTAR MPLICADO EN LA EN LA REGULACI3N COORDINADA DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIG3NICO.** *Mart3nez MS, Soares-Schanoski A, Salaya G, Algarra I, Jim3nez E, Paco L, Garc3a-Lora A, Garrido F.* Servicio An3lisis Cl3nicos e Inmunolog3a, Hospital Virgen de las Nieves. Granada.

Estudios anteriores de nuestro grupo con el sistema tumoral B9, derivado de un fibrosarcoma inducido qu3micamente con metilcolantreno (GR9), mostraron fenotipos distintos de variantes metast3sicas dependiendo del estado inmune del hu3sped. As3 en ratones BALB/c inmunocompetentes las variantes metast3sicas presentaban un fenotipo H-2 de clase I (-), mientras que en ratones nude presentaban un fenotipo H-2 de clase I (+). Los estudios moleculares revelaron una baja expresi3n coordinada de diferentes componentes de la maquinaria de procesamiento antig3nico (APM) en las metast3sis H-2 de clase I (-), expres3ndose normalmente estos componentes del APM en las metast3sis H-2 de clase I (+).

Para investigar los genes implicados en la diferente expresi3n de los componentes del APM hemos construido bibliotecas de sustrac-

ci3n de c-DNA comparando poblaciones de mRNA derivadas de las distintas variantes metast3sicas.

Las librer3as de sustracci3n se realizaron comparando los mRNAs de las diferentes metast3sis H-2 de clase I (+) (MN4.1 y MN4.5) con las metast3sis H-2 de clase I (-) (MP12 y MP5). Los resultados mostraron que cada librer3a estaba compuesta por varios fragmentos de c-DNA los cuales fueron clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon en diferentes base de datos de c-DNA (NCBI Blast, Sanger). De los diferentes genes encontrados debemos destacar que en las metast3sis con expresi3n normal de los componentes de la maquinaria de procesamiento antig3nica se expresa el gen supresor de tumores FHIT, cuya expresi3n se pierde en las metast3sis que presentan perdida de expresi3n de los componentes de la APM.

Los resultados muestran que la expresi3n del gen FHIT puede estar implicada en la regulaci3n coordinada de la maquinaria de procesamiento antig3nico.

**154. LOS LINFOCITOS B CXCR3+ CIRCULANTES HUMANOS SON C3LULAS DE MEMORIA RECIENTE REACTIVOS A CPG.** *Oca1a E, Gonz3lez-Garc3a I, Brieva JA.* Unidad de Investigaci3n y Servicio de Inmullg3a. Hospital Universitario Puerta del Mar. C3diz.

La expresi3n de CXCR3 se vincula fundamentalmente a linfocitos T y otros leucocitos que migran, gracias a este receptor, a zonas de inflamaci3n donde se producen sus ligandos. Se ha descrito que una peque1a subpoblaci3n de linfocitos B humanos de sangre expresan dicho receptor, si bien su papel es desconocido.

**Objetivo.** Analizar la subpoblaci3n de linfocitos CD19 CXCR3+, tanto fenot3pica como funcionalmente.

**M3todos.** Se estudi3 la expresi3n de una variedad de mol3culas mediante marcaje con Ac monoclonales fluorescinados y citometr3a de flujo con 4 colores. Se estudiaron estas poblaciones tras la inmunizaci3n con toxoide tet3nico (tet), detect3ndose la expresi3n de IgG anti-tet mediante el uso de tet-FITC. Se analiz3 la respuesta a CpG en cultivos.

**Resultados.** La mayor3a de los linfocitos B son CD19+ CD27- CXCR3- (54%  $\pm$  4), linfocitos B naive IgM+ IgD+, seguido por la poblaci3n CD19+ CD27+ CXCR3- (20%  $\pm$  3) IgM+ IgD+, parcialmente IgA+ y, por 3ltimo, la poblaci3n CD19+ CD27+ CXCR3+ (17%  $\pm$  1), que contiene c3lulas IgM+ IgD+ y todas las IgG+ y la mayor3a de las IgA+. Esta 3ltima poblaci3n no se detecta en sangre de cord3n, es muy escasa en las primeras edades, alcanzando su m3ximo en ni1os mayores y adultos. Fenot3picamente, se caracteriza por la expresi3n mayoritaria de CD80, CD86 y CD95, y carencia de CD23. Adem3s se diferencian en la expresi3n de diferentes mol3culas de adhesi3n, y en marcadores de proliferaci3n, Ki 67, y muerte celular, Bcl-2.

Tras la inmunizaci3n, un grupo de linfocitos expresando IgG-tet se detecta de forma creciente a partir de la segunda semana, llegando al m3ximo al mes tras el booster, y bajando su detecci3n a niveles pre-boost a los 6 meses. Estos linfocitos B IgG-tet est3n restringidos a la subpoblaci3n CD19+ CD27+ CXCR3+. Estas c3lulas expresan TLR-9, y producen IgG-tet al ser cultivadas en presencia de ODN conteniendo CpGs.

**Conclusiones.** Este trabajo describe una nueva poblaci3n de linfocitos B de memoria, que contiene la mayor3a de las c3lulas post-switched, e incluye los linfocitos B de memoria inducidos recientemente *in vivo* y con capacidad a responder a ligandos de TLR9.



**155. ACTIVIDAD CITOLÍTICA NK INDEPENDIENTE DE PERFORINA / GRANZIMAS. REGULACIÓN POR MOLÉCULAS DE ADHESIÓN.** *Ramirez-Garrido F<sup>1</sup>, Irazo A<sup>1</sup>, Melehi M<sup>1</sup>, Eikermann SM<sup>2</sup>, Martí S.<sup>3</sup> Rubio C.<sup>3</sup>* <sup>1</sup>Hospital Universitario de Elche, <sup>2</sup>University of Missouri-Columbia, <sup>3</sup>Inmunología, Universidad Miguel Hernández, Sant Joan, Alicante.

**Introducción:** La actividad citolítica de las células NK depende de moléculas de adhesión que posibilitan la interacción con células diana. El papel de las integrinas  $\beta 2$  y de otras moléculas de membrana se ha determinado empleando líneas celulares muy sensibles derivadas de leucemias. El análisis de la participación de éstas y otras moléculas de membrana en la conjugación y actividad lítica frente a tumores sólidos, viene dificultado por el hecho de que con frecuencia son dianas resistentes en ensayos convencionales de 4h y liberación de  $^{51}\text{Cr}$ , que mide lisis por necrosis mediada por secreción de perforinas/granzimas. No existen ensayos estandarizados, no radiactivos y de larga duración, para la medida de la citotoxicidad NK mediada por apoptosis, en condiciones en que se manipulan moléculas de adhesión.

**Objetivos:** Establecer un modelo experimental para estudiar la regulación por moléculas de adhesión de la lisis NK mediada por ligandos de la familia del factor de necrosis tumoral (TNF) inductores de apoptosis (FasL y TRAIL), frente a tumores de estirpe no hematopoyética.

**Metodología:** Se han empleado células NK aisladas de sangre periférica, la línea NKL (Robertson), dependiente de IL-2, y tumores sólidos de distinta estirpe y que se diferencian en la expresión de moléculas de adhesión. Los ensayos de citotoxicidad se han llevado a cabo mediante una técnica de microcitotoxicidad (MCA) adaptada a 48 h, distinguiendo las células adherentes de las efectoras mediante un sistema de análisis digital de imágenes. Los ensayos incluyen el pretratamiento de células diana y/o NK con mAb frente a distintos epítopos de moléculas de adhesión.

**Resultados y Conclusiones:** Los resultados obtenidos nos han permitido seleccionar las líneas celulares HubCA504 (carcinoma de mama), HepG2 (carcinoma hepatocelular Fas<sup>+</sup>) y C2BBE1 (adenocarcinoma colorectal) por su sensibilidad a la línea NKL incluso a dosis bajas de rIL-2 (<50 U/ml). Los resultados preliminares sugieren un papel instrumental de moléculas VLA- $\beta 1$  en la regulación de estas vías de citotoxicidad por ligandos de la familia del TNF / independientes de secreción.

**156. IDENTIFICACIÓN DE LIGANDOS INTRACELULARES DE CD84 Y SU FUNCIÓN DIFERENCIAL EN LINFOCITOS Y MASTOCITOS.** *Oliver Vila I, Saborit Villarroya I, Martín Andorra M.* Unidad de Inmunología. IDIBAPS. Universidad de Barcelona.

**Introducción:** CD84 es una molécula de adhesión que se expresa en linfocitos T y B, células memoria, células dendríticas, plaquetas, mastocitos, monocitos y macrófagos.

CD84 es ligando de sí mismo y pertenece a la familia de receptores linfocitarios CD150. Los miembros de esta familia se caracterizan por su interacción con SAP, proteína citosólica cuya mutación o delección es la responsable del síndrome linfoproliferativo asociado al cromosoma X (XLP). El receptor CD84 es el único miembro de la familia del CD150 que se expresa en mastocitos

**Objetivo:** Identificación de ligandos intracelulares del receptor CD84 y estudio funcional de este receptor en la activación de linfocitos y mastocitos.

**Metodología:** Transfección de CD84 y cinasas c-fyn y lck en células COS. Ensayos bioquímicos. Generación de mutantes de CD84 en la línea de rata RBL. Análisis de liberación de citocinas en linfocitos y mastocitos.

**Resultados y Conclusiones:** CD84 contiene motivos consenso para la interacción con la cinasas c-Fyn y Lck. De hecho, ambas cinasas coprecipitan con CD84 en células COS transfectadas. Además, esta interacción no viene mediada por la presencia de SAP. Las tirosinas 241 y 278 de la cola citoplasmática de CD84 son las responsables de la interacción de SAP y SHP2 respectivamente. Esta doble mutación no afecta la interacción de c-Fyn y Lck. Así, CD84 podría señalar a través de c-Fyn y Lck independientemente de SAP. CD84 actúa como molécula coestimuladora incrementando los niveles de secreción de citocinas proinflamatorias en linfocitos. En contraposición, RBL transfectadas con CD84 inhiben la secreción de serotonina debida a IgE. Este efecto se revierte en células transfectadas con un mutante de CD84 sin cola citoplasmática. La expresión de SAP en mastocitos es negativa. Todo ello indicaría un papel relevante de CD84, independiente de SAP, en la inmunidad adaptativa e innata.

**157. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FUNCIONAL DE IREM-3, UN NUEVO MIEMBRO ACTIVADOR DE LA FAMILIA DE RECEPTORES IREM.** *Martínez-Barriocanal A, Sayós J.* Unidad de Inmunopatología Molecular/DCEXS. Universidad Pompeu Fabra.

En los últimos años se ha puesto de manifiesto la existencia de diversas familias multigénicas de receptores inmunológicos de tipo inmunoglobulina con función activadora e inhibidora. En este contexto encontramos la recientemente descrita familia de inmunoreceptores IREM (immunoreceptor expressed on myeloid cells). Localizada en la región cromosómica 17q25.1, la familia IREM consta actualmente de dos genes codificantes para receptores de carácter inhibidor (IREM-1 e IRp60), dos genes codificantes para receptores de carácter activador (IREM-2 y IREM-3) y un cuarto gen codificante para un receptor con características que no permiten clasificarlo dentro de ninguno de los dos grupos (CMRF35).

Mediante técnicas de RT-PCR amplificamos y clonamos el cDNA de IREM-3 a partir de una librería de células sanguíneas mononucleadas activadas. La proteína para la que codifica es de 201 Aa y se organiza en un único dominio extracelular de tipo inmunoglobulina homólogo a los receptores de su misma familia así como los TREMs y NKp44, un fragmento transmembrana con un residuo cargado positivamente (Lys<sup>+</sup>) y una cola citoplasmática de 29 aminoácidos con un motivo de unión a Grb-2.

Experimentos de transfección transitoria de células COS-7 con el receptor IREM-3 fusionado a un epítopo HA, la quinasa Fyn y las moléculas adaptadoras clásicas DAP12, Dap10, CD3 $\zeta$  y Fc $\gamma$ RI $\zeta$ , muestran no sólo la capacidad de IREM-3 de interactuar con DAP12 sino de además ser fosforilado en residuos tirosina por la quinasa Fyn únicamente en presencia de este adaptador.

Utilizando líneas RBL con expresión estable de la molécula IREM-3 HA sola o IREM-3 HA + Dap12 hemos llevado a cabo experimentos de transfección transitoria de elementos respuesta a NF-AT/AP-1 fusionados al gen de la luciferasa y posterior estimulación con anticuerpos monoclonales anti-HA. El incremento de la actividad del promotor al estimular las células con el anticuerpo anti-HA, tanto en presencia como en ausencia de Dap12, demuestra el carácter activador del receptor y parece indicar que IREM-3 no sólo sería capaz de señalar median-

te su asociación a moléculas adaptadoras como los receptores activadores clásicos, sino que parece podría estar utilizando su cola citoplasmática para el reclutamiento de mediadores que desencadenen igualmente una respuesta de tipo activadora.

En la actualidad se están llevando a cabo RT-PCRs a partir de cDNA de líneas celulares y cultivos primarios así como inmunizaciones de ratones Balb/C con proteína de fusión IREM-3-mIgG2a con la finalidad de producir anticuerpos monoclonales, para abordar la expresión del receptor IREM-3 tanto a nivel de mRNA como proteína.

#### 158. ANÁLISIS FENOTÍPICO Y FUNCIONAL DE CÉLULAS NK EN UN CASO DE TRISOMÍA 8 CONSTITUCIONAL EN MOSAICO.

**Martí S<sup>1</sup>, Galán F<sup>2</sup>, Casero J<sup>3</sup>, Eikermann SM<sup>4</sup>, Rubio G<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Immunología, <sup>2</sup>Pediatría, <sup>3</sup>Bioquímica, Universidad Miguel Hernández, Hospital Universitario de Sant Joan, Alicante, <sup>4</sup>University of Missouri-Columbia.

**Introducción:** La trisomía 8 constitucional en mosaico (CT8M) es una anomalía cromosómica rara, presumiblemente originada en los nacidos vivos por una no disyunción mitótica. La CT8M se muestra con una gran variabilidad fenotípica y se asocia a un riesgo elevado de neoplasias. En un estudio previo, nuestro grupo ha descrito un caso en el que el 100% de las células NK (CD56+) de sangre periférica muestran trisomía 8, en contraste con el mosaicismo observado en el resto de los leucocitos.

**Objetivos:** Análisis fenotípico y funcional de las subpoblaciones NK en un caso de CT8M.

**Metodología:** Células mononucleares de sangre periférica se han marcado con anticuerpos monoclonales (mAb) frente a marcadores de diferenciación NK y se han analizado por citometría de flujo de 4 fluorescencias. Las subpoblaciones marcadas (FL2-4) se han separado mediante sorting y se han determinado las isotermas de conjugación a células K562.S5, subclón obtenido por nuestro grupo que carece de receptor para Fc de inmunoglobulinas (CD32-), marcadas con el marcador CA-AM (FL1). La actividad lítica de cada subpoblación se ha determinado en ensayos de 4 h marcando el subclón .S5 con DioC18 y análisis por citometría de flujo.

**Resultados y Conclusiones:** Del estudio de subpoblaciones NK destaca el aumento en el número absoluto y relativo de células NK CD56+ de expresión moderada, no así de las CD56+ intensas. La distribución de subpoblaciones determinadas por la expresión conjunta de CD16, CD56 y CD94 muestra un patrón igualmente característico de la inmunosenescencia (al compararlas con mujeres sanas de su mismo grupo de edad (29±5) y con ancianos (80±10) que no consumen fármacos que modulen el sistema inmunitario). La respuesta *in vitro* a IL-2 ha sido, sin embargo, normal. Se presentan datos de la afinidad de conjugación y citotoxicidad de cada una de las subpoblaciones.

#### 159. CARACTERIZACIÓN GENÓMICA Y EXPRESIÓN DE S5D-SRCRB, UN NUEVO MIEMBRO DEL GRUPO B DE LA SUPERFAMILIA SRCR. **Roselló S, Sarrias MR, Padilla O, López-de la Iglésia A, Vives J, Serra-Pagès C, Lozano F.** *Servei d'Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona.*

**Introducción:** La superfamilia de receptores con dominios extracelulares tipo *scavenger* (SF-SRCR) es un grupo de proteínas de mem-

brana y/o secretadas caracterizada por la presencia de uno o varios dominios ricos en cisteínas (SRCR). Tiene representantes a lo largo de toda la escala filogenética y algunos de sus miembros participan en el desarrollo del sistema inmunitario y en la regulación de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas. Miembros de la SF-SRCR se expresen en células hematopoyéticas pero también en epitelios de los tractos digestivo, respiratorio y genitourinario. Este dato junto a sus propiedades multiadhesivas hace que posiblemente jueguen un papel relevante en la defensa de mucosas. Dentro de la SF-SRCR se diferencian dos grupos (A y B) según el número de cisteínas presentes en sus dominios SRCR y el número de exones codificantes para este dominio.

**Objetivo:** Identificación de nuevos genes del grupo B de la SF-SRCR mediante el rastreo de bases de datos nucleotídicas (GenBank), utilizando como cebo la secuencia aminoacídica de CD5 y/o CD6.

**Resultados:** Se ha identificado un nuevo miembro del grupo B de la SF-SRCR, denominado S5D-SRCRB (soluble 5 domains-SRCR group B), cuyo gen se localiza en el cromosoma 7 murino y en la región ortóloga del cromosoma 19 humano. El gen murino (*ms5d-srcrb*) se compone de 14 exones y la secuencia de cDNA más larga identificada es de 4286nt, codificando para una proteína soluble de 1371aa, con un peso molecular estimado de 144,6 kDa. Dicha secuencia murina revela un elevado grado de similitud aminoacídica (60%) con la secuencia humana (hS5D-SRCRB). El cDNA murino ha sido clonado y expresado con éxito en células eucariotas (*human embryonic kidney cells*, HEK EBNA-293) mediante un vector de expresión episomal (pCEP-Pu) fusionado a una cola de histidinas (6x). El análisis de la expresión por SDS-PAGE y Western blot de la proteína recombinante reveló una banda de peso molecular superior al estimado, sugestivo de posibles modificaciones postraduccionales.

**Conclusión:** Se ha identificado, clonado y expresado S5D-SRCRB, un nuevo miembro del grupo B de la altamente conservada superfamilia de receptores SRCR. La disponibilidad de proteína S5D-SRCRB recombinante permitirá posteriores estudios estructurales y funcionales.

#### 160. GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTISUEROS POLICLONALES Y MONOCLONALES CONTRA S4D-SRCRB, UN MIEMBRO SOLUBLE DE LA SUPERFAMILIA SRCR. **Roselló S<sup>1</sup>, Sarrias MR<sup>1</sup>, Padilla O<sup>1</sup>, Monreal Y<sup>2</sup>, Yelamos J<sup>2</sup>, Vives J<sup>2</sup>, Lozano F<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Servei d'Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona, Barcelona. <sup>2</sup>Unidad de Trasplante, Servicio de Cirugía, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

**Introducción:** S4D-SRCRB es un gen recientemente identificado por nuestro equipo que codifica una proteína perteneciente al grupo B de la superfamilia de receptores con dominios extracelulares ricos en cisteína tipo *scavenger* (SF-SRCR). El gen *S4D-SRCRB* se localiza en la región cromosómica 7q11,23 humana y se halla altamente expresado en riñón y placenta, dando lugar a una proteína soluble formada por 4 dominios SRCR separados por polipéptidos ricos en Pro, Ser y Thr.

**Objetivo:** Obtención de antisueros policlonaes y monoclonales contra la proteína S4D-SRCRB para la realización de estudios estructurales y funcionales.

**Resultados:** Se ha expresado en células eucariotas humanas (HEK EBNA-293) una forma recombinante soluble de S4D-SRCR (rS4D-SRCRB) fusionada a una cola de hemaglutinina, mediante el sistema de expresión episomal pCEP-Pu. La proteína recombinante ha sido

purificada por cromatografía de afinidad y analizada su pureza por SDS-PAGE y Western blot, para su ulterior utilización como inmunógeno. De esta forma se ha generado un antisuero policlonal en conejo que reconoce rS4D-SRCR tanto por Western blot (desnaturalizada) como por inmunoprecipitación (nativa). También se han obtenido cinco hibridomas murinos que producen anticuerpos monoclonales (AcMos) de isotipo IgG1 kappa, que reconocen todos ellos la proteína nativa en ensayos de ELISA y de inmunoprecipitación. Solo dos de ellos reconocen la proteína desnaturalizada en ensayos de Western blot. Un estudio epitópico preliminar realizado con formas recombinantes que contienen diferentes dominios de la proteína S4D-SRCRB, indican que los cinco AcMos generados reconocen no menos de tres epítopes independientes de la molécula.

**Conclusión:** Se han obtenido por primera vez antisueros policlonales y monoclonales contra un miembro recientemente descrito de la SF-SRCR, la molécula S4D-SRCRB humana, que constituyen una herramienta esencial para el estudio estructural y funcional de la misma.

**161. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ DE INDIVIDUOS JÓVENES Y ANCIANOS ESTIMULADAS *IN VITRO*.** *Peralbo E, De la Rosa O, Gayoso I, Pita ML, Casado JG\*, Peña J, Tarazona R\*, Solana R. Dpto. Biología celular, Fisiología e Inmunología. Secc. Inmunología. H.U. Reina Sofía. Universidad de Córdoba (Córdoba). \*Dpto. de Fisiología e Inmunología. Secc. Inmunología. Facultad de Veterinaria. Universidad de Extremadura (Cáceres).*

**Introducción:** Ha sido descrito que el proceso de inmunosenescencia afecta a distintas subpoblaciones celulares del sistema inmune, principalmente a los linfocitos T. Sin embargo, las alteraciones relacionadas con este proceso no han sido descritas en la población NKT humana. Las células NKT son células T $\alpha\beta$  caracterizadas por la coexpresión del receptor NK CD161 y un TCR constituido por una cadena  $\alpha$  invariable definida por los segmentos génicos V $\alpha$ 24-J $\alpha$ Q asociada preferentemente a la cadena V $\beta$ 11. Este TCR reconoce antígenos glucolipídicos presentados por la molécula CD1d como la  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer) que es un potente activador de las células NKT.

**Objetivos:** Analizar y comparar fenotipo y funcionalidad (capacidad proliferativa y citotóxica) en células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ humanas de sangre periférica de individuos sanos jóvenes y ancianos, así como establecer un modelo de expansión y senescencia *in vitro* de estas células.

**Metodología:** El análisis fenotípico de las células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ de donantes sanos jóvenes y ancianos *ex vivo* e *in vitro* se realizó mediante fluorescencia multiparamétrica. Para la expansión y el análisis de la capacidad proliferativa *in vitro* de las células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+, PBMCs de los donantes sanos jóvenes y ancianos fueron expandidos *in vitro* con  $\alpha$ -GalCer e IL2 durante varias semanas. Tras 14 días de cultivo, las células NKT fueron aisladas por separación inmunomagnética y cultivadas con IL2 reestimuladas cada 7 días con células 221 transfectadas con CD1d, preincubadas con  $\alpha$ -GalCer e irradiadas. Para el estudio de la capacidad citotóxica de estas células se emplearon como dianas las líneas celulares humanas 221 transfectada con CD1d y 221 Mock carente de su expresión.

**Resultados y conclusiones:** Las células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ de jóvenes y ancianos se expandieron significativamente *in vitro* aunque las células NKT de jóvenes presentaron una capacidad proliferativa mayor. Por otro lado, se observó una disminución de la expresión en superficie de la molécula CD28 en las células NKT expandidas y cultivadas

*in vitro*. Esto nos permite pensar que las células NKT humanas se ven afectadas por el proceso de envejecimiento *in vivo* e *in vitro*.

En los ensayos de lisis se observó que las células NKT no presentaban actividad citotóxica frente a las células 221 Mock pero sí frente a las células 221-CD1d+ preincubadas o no con  $\alpha$ -GalCer, aunque las células incubadas con  $\alpha$ -GalCer fueron más sensibles a la lisis (lisis>80%) que las no incubadas, por lo que la actividad citotóxica de las células NKT V $\alpha$ 24+V $\beta$ 11+ en este modelo es dependiente de la interacción TCR-CD1d, y el ligando  $\alpha$ -GalCer incrementa la citotoxicidad de las mismas.

**162. LA INTERLEUQUINA-10 “RELAJA” LAS CÉLULAS FOLICULARES DENDRÍTICAS HUMANAS.** *Muñoz Fernández R, Tirado I, Blanco O, Frecha C, Martín F, García Olivares E. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.*

**Introducción:** Las células foliculares dendríticas (FDC, Follicular Dendritic Cells), son células del folículo linfoide implicadas en la respuesta secundaria de las células B. Aunque su origen y linaje se encuentra mal definido, nuestro grupo ha demostrado que estas células están relacionadas con el precursor estromal de médula ósea, y que, al igual que los miofibroblastos, expresan  $\alpha$ -SM actina

**Objetivos:** Estudiar el efecto de distintas citoquinas sobre la contractilidad de las FDC.

**Métodos:** Se empleó el método de contracción en geles para determinar la actividad contráctil de las FDC, y la microscopía confocal para estudiar la expresión de la  $\alpha$ -SM actina en las FDC

**Resultados y Conclusiones:** Citoquinas como el PDGF y TGF $\beta$ , capaces de producir la contracción de los miofibroblastos, indujeron la contractilidad de las FDC, incrementando la incorporación de la  $\alpha$ -SM actina a las fibras de estrés. La interleuquina-10, sin embargo, relajó las FDC, inhibiendo la incorporación de esta proteína a las fibras de estrés de las FDC. Se especula sobre la importancia de la contractilidad celular en el desarrollo de las funciones de las FDC.

**163. CARACTERIZACIÓN DEL PATRÓN DE ISOFORMAS DEL REGULADOR DEL COMPLEMENTO FACTOR H EN GELES BIDIMENSIONALES.** *Abarrategui Garrido C<sup>1</sup>, Goicoechea Aranguren E<sup>2</sup>, López Trascasa M<sup>1</sup>, Rodríguez de Córdoba S<sup>2</sup>, Sánchez-Corral P<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología. Hospital Universitario La Paz, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología. Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.*

Factor H es el principal regulador de la Vía Alternativa del Complemento. Su función resulta fundamental para evitar una activación excesiva del Complemento, e impedir que éste dañe a las células del propio organismo. La deficiencia o disfunción de factor H se asocia con una mayor susceptibilidad a procesos infecciosos y a patologías renales como la Glomerulonefritis Membranoproliferativa de tipo II y el Síndrome Hemolítico-Urémico (SHU).

Factor H es una glicoproteína plasmática de 150 kDa. Técnicas de isoelectroenfoque identificaron dos isoformas con distinto punto isoelectro, que corresponden a dos variantes polimórficas que se diferencian en un aminoácido localizado en el dominio SCR7 de la molécula. Recientemente, una de estas isoformas se ha asociado con un mayor riesgo de padecer AMD (*Age-related macular degeneration*). El análisis de polimorfismos en el gen de factor H sugiere, no obstante,

la existencia de múltiples isoformas cuya naturaleza y concentración relativa en plasma no se ha establecido.

Nuestro estudio tiene como objetivo determinar el patrón de isoformas de factor H en plasma, y establecer si existe correlación entre las distintas isoformas y el polimorfismo genético de factor H. Para ello, hemos analizado plasmas de individuos sanos y factor H purificado en geles bidimensionales (isoelectroenfoque en la primera dimensión y SDS-PAGE en la segunda). La detección de factor H se ha realizado mediante tinción con Azul Coomassie o Plata, o mediante Western-Blot empleando anticuerpos anti-factor H mono- y policlonales. Nuestros resultados muestran que existen al menos 7 isoformas de factor H en suero, en concentraciones similares. Un anticuerpo monoclonal específico de la región C-terminal de factor H reconoce preferentemente dos de las 7 isoformas. Este resultado puede tener relevancia para el estudio del SHU asociado a factor H, ya que en esta región se localizan el 90% de las mutaciones descritas hasta la fecha. Para mejorar la separación entre las isoformas hemos digerido factor H con distintas enzimas proteolíticas. Por otro lado, puesto que factor H es una proteína glicosilada, hemos estudiado también el efecto de la deglicosilación en el patrón de isoformas. En cada una de las condiciones empleadas el patrón de isoformas es muy reproducible, por lo que el análisis de factor H en geles bidimensionales puede resultar útil para identificar polimorfismos, mutaciones o modificaciones postraduccionales con posible relevancia fisiopatológica.

**164. EXPRESIÓN DE NKG2 EN LINFOCITOS DECIDUALES DE PRIMER TRIMESTRE EN EMBARAZO NORMAL Y EN ABORTO ESPONTÁNEO.** *Unciti JD, Tirado I, Romero Z, Molina II, García Olivares E. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.*

**Introducción.** La decidua es el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Es en la decidua donde probablemente radican los mecanismos que regulan la interacción inmunológica entre la madre y el feto. Los linfocitos más abundantes de la decidua son células NK con un fenotipo CD56+++CD16-, cuya función no está aún establecida. Nuestro grupo ha demostrado que los linfocitos deciduales eliminan las célula trofoblásticas mediante apoptosis, pero no mediante necrosis. Esta actividad, que se desarrolla en el embarazo normal, y puede ser un mecanismo para controlar la invasión trofoblástica, se intensifica en el aborto espontáneo, lo que probablemente determina una eliminación masiva de células trofoblásticas que implica la terminación del embarazo.

El trofoblasto expresa HLA-C, G y E que interactúan con los receptores activadores e inhibidores de las células NK, lo que probablemente regula la interacción NK-trofoblasto en el embarazo normal y patológico. Las células NK deciduales expresan CD94/NKG2A con mayor intensidad que las NK convencionales de sangre periférica. Estas moléculas, al unirse a HLA-E con la secuencia líder de HLA-G/C inhiben la citotoxicidad de las NK, constituyendo esto un mecanismo importante de la tolerancia materno-fetal en el embarazo normal, pero desconocemos que ocurre en el aborto espontáneo.

**Objetivo.** El objetivo del presente trabajo es estudiar la expresión de moléculas NKG2 en linfocitos deciduales de aborto espontáneo.

**Métodos.** Se han extraído linfocitos de deciduas de primer trimestre procedentes de terminación voluntaria de embarazo y de abortos espontáneos. Estos linfocitos han sido estudiados mediante anticuerpos frente a CD56, CD94, NKG2A, NKG2C y NKGD y citometría de flujo.

**Resultados y Conclusiones.** Conforme a lo publicado anteriormente, hemos confirmado que una proporción importante de los linfocitos deciduales de embarazo normal expresa CD94 y NKG2A, mientras que las moléculas activadoras NKG2C y D no se detectaban o solo en una población muy reducida de células. En los linfocitos procedentes de aborto espontáneo hemos encontrado comparativamente un descenso de la proporción de linfocitos NKG2A+ y un incremento de linfocitos NKG2D+. Estos resultados sugieren que los linfocitos de aborto espontáneo "quedan liberados" para eliminar las células trofoblásticas y terminar el embarazo.

**SESIÓN 10: INMUNODEFICIENCIAS SECUNDARIAS**

**Moderadores:** Ana M<sup>a</sup> García Alonso (H.U. Arrixaca, Murcia), Margarita López Trascasa (H.U. La Paz, Madrid)

**165. PERSISTENCIA DE ALTERACIONES EN EL NÚMERO, FENOTIPO Y FUNCIONALIDAD DE CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES VIH-1+ TRAS UN AÑO DE TERAPIA ANTIRRETROVIRAL.** *Almeida M<sup>1,2</sup>, Cordero M<sup>2,3</sup>, Almeida J<sup>1,2</sup>, Orfao A<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Citometría y Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca. <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna y Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.*

**Objetivos:** A pesar de sus efectos beneficiosos, la terapia antirretroviral (ART) no logra inducir una erradicación completa del VIH-1, ni una recuperación total de la funcionalidad de los linfocitos T en pacientes VIH-1+ en estadios intermedios/avanzados de la enfermedad. Actualmente, la información disponible sobre el efecto de la ART sobre las células dendríticas (DCs) en la infección por el VIH-1 es escasa. El objetivo del presente estudio ha sido analizar el efecto de la ART sobre la distribución numérica, la expresión de receptores de quimiocinas y la producción de citocinas inflamatorias *ex vivo* por parte de los monocitos y CDs de sangre periférica (SP) de pacientes VIH-1+.

**Metodología:** Se estudiaron un total de 30 pacientes VIH-1+ asintomáticos, no tratados anteriormente. Los estudios se realizaron previamente a la instauración de la ART, y a las 2, 4, 8, 12 y 52 semanas desde el inicio de la misma. Además, se analizaron muestras de SP de 10 adultos sanos como grupo control. Los estudios se realizaron específicamente para cada población celular a partir de muestras de SP mediante citometría de flujo.

**Resultados:** Aunque el inicio de la ART llevó a una reducción de la carga viral en plasma hasta niveles indetectables en todos los pacientes, el tratamiento no consiguió una reconstitución numérica completa del compartimiento de células T, permaneciendo el número absoluto de linfocitos T-CD4+ por debajo de los valores normales, a la vez que el número absoluto de linfocitos T-CD8+ estaba significativamente incrementado incluso después de un año de tratamiento (p<0.05). Además, el número absoluto de CDs CD16+ y de monocitos se encontraba también anormalmente incrementado tras un año de ART (p<0.05), a la vez que la expresión de los receptores de quimiocinas CXCR2 y CXCR4 en CDs mieloides permanecía significativamente alterada en este punto del tratamiento (p<0.05 vs sanos). Por otra parte, las CDs CD16+ y los monocitos de SP seguían produciendo de forma espontánea en cultivo cantidades significativas de citocinas inflamatorias, tras un año de ART (p<0.05). Merece destacar que las alteracio-

nes encontradas en la distribución, expresión de receptores de quimiocinas y patrón de producción de citocinas inflamatorias por los monocitos y CD8 de SP eran más pronunciadas en aquellos pacientes VIH-1+ que presentaban <200 linfocitos T-CD4<sup>+</sup>/μL de SP en el momento de su inclusión en el estudio, lo que podría deberse a la persistencia de replicación viral no detectada y a una activación prolongada del sistema inmune.

**Conclusiones:** Pese a los efectos beneficiosos sobre el sistema inmune de la instauración de ART en pacientes VIH-1+, persisten alteraciones numéricas, fenotípicas y funcionales en los compartimentos de CD8 y monocitos de SP, incluso después de un año de tratamiento, siendo estas anomalías más acentuadas en pacientes en estadios avanzados de la enfermedad.

*Financiación:* MSD España y BMS S.L. M.A. es becaria del MEC (Ref. AP2000-3818).

**166. POTENCIACIÓN DE LA RESPUESTA ANTIVIRAL FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C MEDIANTE LA INMUNIZACIÓN CON UN ADENOVIRUS QUE EXPRESA LA PROTEÍNA NS3 SEGUIDA DE LA INYECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CD137.** *Arribillaga L, Arina A, Sarobe P, Gorraiz M, Muriello O, Borrás-Cuesta F, Ruiz J, Prieto J, Melero I, Lasarte JJ. Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA), Facultad de Medicina y Clínica Universitaria. Universidad de Navarra, Pamplona.*

**Introducción:** La respuesta inmunitaria celular frente a las proteínas del virus de la hepatitis C (VHC) desempeña un papel importante en el aclaramiento viral. Por ello, la búsqueda de estrategias de inmunización capaces de inducir una respuesta celular eficaz frente a las proteínas VHC sería de gran importancia para el desarrollo de vacunas frente a esta infección. Una estrategia de potenciación de la respuesta inmunitaria consiste en el aumento de las señales de coestimulo para incrementar la respuesta primaria CD8<sup>+</sup>. La activación de los linfocitos a través de la interacción de CD137 (4-1BB) y su ligando podría permitir la potenciación del efecto antiviral de un adenovirus que expresa la proteína NS3 (RAAdNS3).

**Objetivos:** En este trabajo estudiamos *in vivo*, el efecto inmunopotenciador de la administración de un anticuerpo monoclonal agonista anti-CD137 tras la vacunación previa con RAAdNS3. Analizamos el efecto protector de esta inmunización frente a la infección *in vivo* por un virus vaccinia recombinante replicativo que expresa las proteínas del VHC (virus vHCV1-3011).

**Material y Métodos:** Inmunizamos grupos de ratones BALB/c con diferentes dosis de RAAdNS3, seguidos de la administración i.p. de 100 microgramos de un anticuerpo monoclonal anti-CD137. A los 10 días se sacrificaron los animales y se midió la respuesta inmune celular helper CD4<sup>+</sup> (producción de IL-2) y citotóxica CD8<sup>+</sup> (actividad lítica y producción de IFN- $\gamma$ ) frente a NS3, mediante el uso de proteína recombinante y péptidos sintéticos. Paralelamente, los ratones inmunizados fueron inoculados con 5x10<sup>6</sup> pfu del vaccinia recombinante vHCV1-3011. A los 3 días se sacrificaron los animales y se cuantificó la carga viral en los ovarios (pfu/mg de tejido).

**Resultados.** La inmunización con RAAdNS3 seguida de la administración de anticuerpos anti-CD137 potenció la respuesta inmunitaria celular helper y citotóxica frente al VHC en comparación con la obtenida tras la administración de RAAdNS3 sólo. La respuesta inducida por RAAdNS3 en combinación con anti-CD137 fue capaz de proteger eficazmente a los animales frente al inóculo de 5x10<sup>6</sup> pfu de vHCV1-

3011 a dosis de RAAdNS3 que eran incapaces de proteger frente al virus en ausencia de coestimulo (tratado con un anticuerpo control).

**Conclusiones.** La estimulación vía CD137 en combinación con el adenovirus recombinante RAAdNS3 podría constituir una estrategia eficaz para la vacunación frente al VHC.

**167. RECEPTORES REGULADORES DE LA CITOTOXICIDAD EN INDIVIDUOS VIH-1+ CON TARGA.** *Cabello A<sup>1</sup>, Jurado A<sup>2</sup>, De La Rosa O<sup>1</sup>, Lozano JM<sup>1</sup>, Rivero A<sup>2</sup>, González R<sup>1</sup>, Camacho A<sup>2</sup>, Luque, J<sup>1</sup>, Santamaría M<sup>1</sup>, Solana R<sup>1</sup>, Kindelán JM<sup>2</sup>, Peña J<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Unidad de Infecciosos, Hospital Reina Sofía, Córdoba. <sup>3</sup>Servicio de Hematología, Hospital del SAS de Jerez de la Frontera, Cádiz.

**Introducción:** El TARGA ha supuesto un gran avance en el control de la infección VIH-1 ya que consigue una sustancial disminución de la carga viral y cierta reconstitución del sistema inmune. Sin embargo existen ciertas limitaciones en este tratamiento por los efectos secundarios que provoca, por no poder erradicar el virus y por que no sabemos como contribuye a la mejora de la capacidad citotóxica. Se podría pensar que la regulación de los receptores reguladores de la citotoxicidad esta relacionada con las disfunciones encontradas en los individuos infectados por VIH-1. Por todo esto nos hemos propuesto estudiar la influencia del TARGA sobre estos receptores en linfocitos T CD8 y en células NK de individuos VIH-1 +.

**Metodología:** Hemos seleccionado 18 individuos VIH-1+, 8 de ellos con TARGA desde hace al menos 2 años y respondedores y los 10 restantes naive. Siete voluntarios sanos se han incluido como control. La expresión de los receptores reguladores de la citotoxicidad y sus ligandos fue analizada en células CD8 y CD3<sup>+</sup>CD56<sup>+</sup> de sangre periférica por citometría de flujo utilizando los anticuerpos monoclonales: anti-human CD94-FITC, NKG2C-PE, anti-human CD158 puro (anti-human KIR), anti-human CD158a puro (KIR2DL1), anti-human CD158i puro (KIR2DS4) (RD system), CD85j-PE (Becton Dickinson), anti-human HLA-G puro (MEM-G/9) y anti-human HLA-E puro (MEM-E/6) (EXBIO, Praga) mediante citometría de flujo utilizando un FACSVantage SE (Becton Dickinson).

**Resultados:** En los individuos VIH-1 con TARGA encontramos: (a) un descenso significativo de ILT-2 en células NK y T CD8, (b) valores similares de CD94 a los encontrados en sanos en células NK y T CD8, (c) una ligera disminución de NKG2C en células T CD8, (d) un descenso significativo de la expresión del receptor activador KIR2DS4 en células NK, (e) un incremento significativo de la expresión del receptor inhibidor KIR2DL1 en células NK, (f) un descenso de la expresión de HLA-G en células T CD8 y (g) un aumento de la expresión de HLA-E en células NK y T CD8. Mientras que en individuos VIH-1 no tratados se observa: (a) un aumento significativo de ILT-2 en células T CD8 y un descenso significativo en células NK, (b) un descenso significativo de CD94 en células NK y un incremento en células T CD8, (c) una ligera incremento de NKG2C en células T CD8, (d) un ligero incremento de KIR2DS4 en las células T CD8, (e) un incremento significativo de la expresión del receptor inhibidor KIR2DL1 en células NK, (f) un descenso de la expresión de HLA-G en células T CD8 y (g) un aumento de la expresión de HLA-E en células NK y T CD8.

**Conclusiones:** Por todo esto, podemos llegar a la conclusión de que, aunque el TARGA consiga, como se ha demostrado en numerosas ocasiones, un aumento del número de células citotóxicas, los cambios observados en los receptores reguladores de la citotoxicidad, parecen indicar que no se consigue restaurar la capacidad citotóxica de las mismas.

**168. EL AZT INDUCE LA EXPRESIÓN DE HLA-G EN LÍNEAS CELULARES.** Herencia C<sup>1</sup>, López JC<sup>1</sup>, Madueño J<sup>2</sup>, Cabello A<sup>1</sup>, Marín J<sup>1</sup>, Luque J<sup>1</sup>, González R<sup>1</sup>, Rivero A<sup>3</sup>, Lozano JM<sup>1</sup>, Camacho A<sup>3</sup>, Santamaría M<sup>1</sup>, Solana R<sup>1</sup>, Peña J<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Nefrología y <sup>3</sup>Unidad de Infecciosos, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

**Introducción:** Trabajos previos en nuestro laboratorio han demostrado que los pacientes VIH-1+ que reciben TARGA tienen un aumento en el número de monocitos que expresan la molécula HLA-G en membrana. Nuestro objetivo consiste en comprobar que componente del tratamiento provoca el incremento de esta molécula tolerogénica. Concretamente nos hemos propuesto estudiar el efecto del AZT sobre la expresión de HLA-G en diferentes líneas celulares.

**Metodología:** Se seleccionaron líneas celulares monocíticas (U937, THP-1) y líneas de melanoma transfectadas con la isoforma HLA-G5 (M8G5) y su plásmido control PC. Estas líneas se cultivaron con concentraciones crecientes de AZT (0-3700 $\mu$ M) a distintos tiempos (24 a 72 horas). Se determinó la expresión de la molécula HLA-G por citometría de flujo indirecta empleando anti-HLA-G (MEM/G9, Exbio, Praga) con un FACSVantage SE (Becton Dickinson) y la cuantificación del ARNm por RT-PCR

**Resultados:** Nuestros datos indicaron que el AZT estaba implicado en el aumento de expresión HLA-G en las líneas U937, THP-1, M8Pc y M8G5 al recibir el tratamiento. Existía también un incremento de expresión a nivel de ARNm. Además, vimos una relación dosis dependiente entre la expresión génica y la concentración de AZT administrada en el cultivo.

**Conclusión:** El AZT incrementa los niveles de HLA-G en cultivos *in vitro*. Este efecto se correlaciona con los resultados obtenidos *in vivo* y ofrece una nueva perspectiva inmunológica del TARGA, la cual puede ser considerada en futuras aplicaciones terapéuticas.

**169. LA RESPUESTA DE CÉLULAS CD8+ ESPECÍFICAS FRENTE A NEF SE ASOCIA CON UN MEJOR CONTROL DE LA REPLICACIÓN VIRAL DURANTE LAS INTERRUPCIONES ESTRUCTURADAS DE TRATAMIENTO EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA POR VIH.** Benito JM, López M, Ballesteros C, Barreiro P, Soriano V. Hospital Carlos III, Madrid.

**Introducción:** La mayoría de las interrupciones estructuradas de tratamiento (STI) han sido realizadas en pacientes previamente tratados con terapia TARGA convencional. Y han analizado la evolución de la respuesta de células T durante los ciclos de interrupción. En la mayoría de los trabajos se ha observado un incremento de dicha respuesta, aunque su relevancia en el control de la replicación viral es controvertida. No existen, sin embargo, estudios de STI en pacientes que han sido previamente tratados con un antirretroviral y un inmunomodulador (hidroxiurea). En el presente trabajo hemos analizado la evolución de la respuesta VIH específica de células CD4 y CD8 durante un protocolo de STI en un grupo de pacientes previamente tratados con la combinación ddI más hidroxiurea (HU).

**Métodos:** Se han incluido 31 pacientes que habían sido tratados durante 12 meses con la combinación ddI más HU y que completaron un protocolo de 3 ciclos de STI consistente en dos meses sin ningún tratamiento y dos meses con la combinación ddI+HU. Se analizó la respuesta de células CD8 empleando un ensayo de producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a un panel de 125 péptidos divididos en 5 grupos según

la proteína de procedencia (Gag, Pol, Env, Nef, y péptidos reguladores). La respuesta CD4 se evaluó empleando un ensayo de linfoproliferación frente a antígenos de recuerdo (PPD, TT, SK) y a dos proteínas de VIH (p55 Gag y gp120 Env). Cada parámetro se midió con una periodicidad de dos meses con un total de seis mediciones por paciente.

**Resultados:** A nivel basal todos los pacientes tenían respuesta CD8 detectable frente a al menos alguno de los grupos. La media de respuesta total CD8 (suma de las repuestas frente a cada grupo de péptidos) fue de 2.6% $\pm$ 0.5%. Los porcentajes de pacientes con respuesta positiva frente a PPD, TT, SK, Gag y Env fueron 97%, 70%, 53%, 20% y 23% respectivamente. Los rebotes de carga viral (CV) tras cada interrupción fueron similares en los tres ciclos. Los niveles de respuesta frente a cada grupo de péptidos fueron estables y no se incrementaron durante las STI, siendo los niveles de respuesta CD8 total al inicio y al final de las STI similares (2.6 $\pm$ 2.8 y 2.5 $\pm$ 2.6 respectivamente). La contribución media de cada uno de los grupos a la respuesta total permaneció también constante durante las STI. Por otra parte, la respuesta linfoproliferativa a antígenos de recuerdo y proteínas de VIH tendió a disminuir durante los ciclos de STI. Empleando un modelo multivariante, encontramos que tanto un mayor nivel de CV basal como un mayor porcentaje de contribución de Nef a la respuesta CD8 total, estaban independientemente asociados con menores rebotes de CV durante los ciclos de interrupción de tratamiento.

**Conclusiones:** en pacientes previamente tratados con ddI+HU la respuesta de células CD8 frente a VIH no se incrementa durante un protocolo de STI, probablemente como consecuencia de un elevado nivel de respuesta presente ya a nivel basal. Una mayor contribución de los péptidos de Nef a la respuesta de células CD8 podría contribuir a un mejor control de la replicación viral durante los ciclos de STI.

**170. GENERACIÓN DE UNA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE A gp120 UTILIZANDO COMPLEJOS POLIETILENIMINA-ADN.** Rodrigo-Garzón M<sup>1</sup>, Berraondo P<sup>1</sup>, Crettaz J<sup>1</sup>, Ochoa L<sup>1</sup>, Vera M<sup>1</sup>, Lasarte JJ<sup>1</sup>, Vales A<sup>1</sup>, Van Rooijen N<sup>2</sup>, Ruiz J<sup>1</sup>, Prieto J<sup>1</sup>, Javier Zulueta J<sup>1</sup>, González-Aseguinolaza G<sup>1</sup>. <sup>1</sup>División de Hepatología y Terapia Génica, Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA), Universidad de Navarra, Pamplona, España. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Vrije Universiteit Medical Center, Amsterdam, The Netherlands.

**Introducción.** La generación de linfocitos T CD8+ secretores de IFN- $\gamma$  y de anticuerpos neutralizantes, son piezas claves en la prevención de la transmisión y en la erradicación de la infección por el VIH. Las vacunas génicas (DNA desnudo) son capaces de inducir tanto respuestas humorales como celulares frente a los antígenos del VIH en ratón, sin embargo, la magnitud y eficacia de estas respuestas en ensayos clínico, hasta el momento, ha sido baja.

**Objetivos.** Nuestro objetivo es el desarrollo de métodos que mejoren la respuesta inmune obtenida tras vacunación génica mediante su vehiculización utilizando el polímero catiónico polietileimina. Así mismo, se analizaron los posibles mecanismos implicados en la inducción de la respuesta inmune.

**Métodos.** Concretamente en este trabajo se ha analizado la capacidad de los complejos formados por el polímero catiónico, polietilenimina (PEI), y un plásmido portador del gen que codifica la glicoproteína 120 de la envoltura del VIH (PEI-gp120), para inducir respuestas celulares y humorales antígeno-específicas. Analizamos la respuesta CD8 mediante ELISPOT y la respuesta humoral mediante ELI-

SA. Tras la administración del PEI-gp120, se midieron los niveles en suero de la citoquinas IL-12 e IFN- $\gamma$ . También comprobamos si la inmunización con PEI-gp120 era capaz de proteger frente a la infección por el virus vaccinia recombinante que expresaba dicho antígeno, administrado por vía sistémica o a través de la mucosa. Por otro lado, se analizó la toxicidad hepática derivada de la administración de los complejos mediante análisis de los niveles de transaminasa en suero.

**Resultados y Conclusiones.** Tras administrar por vía intravenosa distintas cantidades de los complejos PEI-pGp120 a ratones Balb/c, comprobamos que tanto la respuesta inmune celular como humoral eran dosis dependiente. La dosis óptima de los complejos era una relación N/P de 4 y 100  $\mu$ g de DNA. La administración de dosis mayores se asociaba a la elevación de transaminasas y menor respuesta inmune. Comprobamos que a las pocas horas de la administración de los complejos se producía una elevación de la concentración en suero de IL-12 e IFN- $\gamma$  producidos por macrófagos, y que eran esenciales para la generación de la respuesta inmune. Por último, la inmunización con PEI-gp120 protegía a los ratones de la infección por vaccinia administrado tanto por vía intraperitoneal como intranasal.

#### 171. LOS VALORES PLASMÁTICOS DE INTERLEUCINA-7 ANTES DE LA TARGA PUEDEN PREDECIR LA RECUPERACIÓN DE LAS CÉLULAS T CD4+ EN NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH. *Resino S<sup>1</sup>, Pérez A<sup>1</sup>, Álvaro-Meca A<sup>1</sup>, León JA<sup>2</sup>, Gurbindo MD<sup>3</sup>, Muñoz-Fernández MA<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Laboratorio de Inmunobiología Molecular del Hospital Gregorio Marañón (Madrid); <sup>2</sup>Servicio de Pediatría-Infecciones del Hospital Virgen del Rocío (Sevilla); <sup>3</sup>Servicio de Inmunología-Pediatría del Hospital Gregorio Marañón (Madrid).

**Antecedentes:** La neolinfopoyesis en el timo y el incremento en el número de células T CD4+ vírgenes, se ha propuesto como el principal mecanismo en la regeneración de las células T CD4+ en niños infectados por el VIH-1. En este mecanismo, la interleucina-7 (IL-7) juega un papel importante. Se sabe que los pacientes VIH tienen anormalmente incrementados los valores plasmáticos de IL-7 y que se asocian con bajos niveles de CD4+. Esto sugiere que el bajo número de CD4+ podría estimular a las células dendríticas periféricas y a los ganglios linfáticos para producir IL-7, en un intento de activar los mecanismos que permitan la repoblación celular.

**Objetivo:** Establecer el papel de la IL-7 plasmática antes de la TARGA como marcador pronóstico de la recuperación de las células T CD4+ en niños VIH+ en primera línea de TARGA.

**Población de estudio y diseño:** En un estudio longitudinal retrospectivo, entre 1996 y 2002, se estudiaron 27 niños VIH+. Criterios de inclusión: a) comenzar TARGA con un inhibidor de la proteasa; b) CD4+  $\leq$ 20% a la entrada del estudio; c) seguimiento de al menos 6 meses; d) más de un año de edad. Se hicieron 2 grupos con los niños VIH+ de acuerdo con su percentil 75 de IL-7 plasmática pre-HAART (momento basal) (P75=11.97 pg/ml), para clasificar a los niños VIH en alta o baja producción de IL-7: a) Baja IL-7: 21 niños VIH+ en tratamiento con TARGA con IL-7  $\leq$  P75 en el momento basal; b) Alta IL-7: 6 niños VIH+ en tratamiento con TARGA con IL-7 > P75 en el momento basal. Se consideró como momento basal del estudio la visita previa al comienzo de la TARGA.

**Métodos:** La respuesta a la terapia se evaluó cada 3 meses, mediante medidas de %CD4+, %CD8+ y carga viral (CV); la función tímica se estudió mediante la cuantificación de TRECs en CMSPs, por PCR cuantitativa a tiempo real; la cuantificación de los valores plasmáticos de IL-7 se hizo mediante un ensayo ELISA.

**Resultados:** El grupo con baja IL-7 ( $\leq$ 11.97 pg/ml) tuvo valores de TRECs significativamente más altos que el grupo con alta IL-7 (>11.97 pg/ml). Además, los niños VIH+ con IL-7 >11.97 pg/ml alcanzaron un porcentaje de células T CD4+  $\geq$ 25% más rápido (en 10.6 meses; IC95%: 0; 23.1) que los niños VIH+ con IL-7  $\leq$ 11.97 pg/ml (en 37.1 meses; IC95%: 4.7; 69.4) (p =0.017); con una proporción relativa (PR) de alcanzar más del 25% de CD4+ de 3.24 (IC95%: 1.16; 9.0) para el grupo con alta IL-7. Sin embargo, los niños VIH+ con IL-7 >11.97 pg/ml alcanzaron CV  $\leq$ 400 copias/mL de forma más lenta que los niños VIH+ con IL-7  $\leq$ 11.97 pg/ml, con una PR de 3.92 (IC95%: 1.15; 13.4) para el grupo con alta IL-7.

**Conclusiones:** Nuestros datos indican que la IL-7 antes del inicio de la TARGA puede ser un buen marcador pronóstico en la reconstitución de las células T CD4+ en niños infectados por el VIH-1 en tratamiento con TARGA.

#### 172. PARADA DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL EN NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH-1 "TRATADOS PREMATURAMENTE". *Seoane Reula ME<sup>1</sup>, León-Leal JA<sup>2</sup>, Leal M<sup>3</sup>, Obando F<sup>3</sup>, Muñoz-Fernández MA<sup>1</sup>.* <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario "Gregorio Marañón", Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Pediatría Hospital Universitario "Virgen del Rocío" y <sup>3</sup>Unidad Hepatitis y SIDA, Hospital Universitario "Virgen del Rocío" Sevilla.

**Introducción:** Las terapias antirretrovirales tienen múltiples efectos secundarios y tóxicos (lipodistrofia, alteraciones en el metabolismo lipídico y de los hidratos de carbono). Este problema es más acusado en los niños infectados verticalmente por el VIH-1 y que deben estar en TARGA toda su vida. Por eso son muchas las estrategias de interrupción del tratamiento que se están probando en los pacientes adultos infectados por el VIH. En la actualidad, no hay ninguna información de cómo podrían responder los niños a las estrategias de interrupción de tratamiento.

**Objetivo:** Estudiar la seguridad de la interrupción de los antirretrovirales, en contexto de una interrupción guiada por los CD4, en un grupo de niños tratados precozmente según las guías terapéuticas del año 1996 y que según las guías actuales, año 2004, no sería tratados.

**Criterios de inclusión:** a) Tratamiento estable con TARGA desde al menos seis meses antes de comenzar el estudio, b) Linfocitos T CD4+ > 25% y carga viral (CV)  $\leq$ 50 copias/ml durante al menos 12 meses antes de comenzar el protocolo, c) Estar clínicamente asintomático y nunca haber cumplido criterios de sida.

**Resultados:** La media de tratamiento con ART antes de la interrupción fue 8.5 años (rango 6-10 años). La media de duración de la interrupción tratamiento fue 57 semanas (rango 40-80 semanas). La mitad de los pacientes tuvieron un nadir (definido como el número más bajo de linfocitos T CD4+ de cada niño previamente haya tenido) entre 17% y 25% de linfocitos T CD4+, en este grupo los linfocitos T CD4+ cayeron hasta un 17% durante las primeras 4 semanas de interrupción y después de 4 semanas aumentaron hasta un 20%. En este grupo la CV siempre fue < 4.000 copias/ml. El otro grupo de pacientes tuvieron un nadir de 13% y durante las primeras semanas sin tratamiento los linfocitos T CD4+ descendieron aunque siempre se mantuvieron por encima de 15% CD4 (18-20%). En este grupo la CV aumentó aunque fue siempre < 100.000 copias/ml. El rebote de CV fue mayor en el grupo de pacientes que tuvieron un nadir de linfocitos T CD4+ < 15% sugiriendo alguna influencia de los linfocitos T CD4+ previos al tratamiento. Los niños presentaron siempre un porcentaje de linfocitos T CD4+ seguro (> 15%) y se mantuvieron asintomáticos durante todo el periodo del estudio.

**Conclusión:** Nuestros resultados indican que es seguro parar la TARGA en estos niños infectados por el VIH, que en la actualidad y según sus características pre-tratamiento, no cumplirían criterios para iniciar el tratamiento.

**173. DIFERENTE PERFIL DE RECONSTITUCIÓN INMUNE ENTRE NIÑOS Y ADULTOS INFECTADOS POR EL VIH EN TERAPIA ANTIRRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD. Resino S<sup>1</sup>, Seoane E<sup>1</sup>, Pérez A<sup>1</sup>, Ruiz-Mateos E<sup>2</sup>, Galán I<sup>1</sup>, Leal M<sup>2</sup>, Muñoz-Fernández MA<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. <sup>2</sup>Grupo de Estudio Hepatitis Virica y SIDA, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

**El objetivo:** Evaluar el perfil de reconstitución inmune después de tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) en niños y adultos infectados por el VIH.

**Población de estudio y diseño:** Se realizó un estudio transversal en el que los pacientes VIH fueron clasificados en distintos grupos de acuerdo a la evolución clínica e inmunológica anterior al momento del estudio. Así, se incluyeron: a) 9 adultos y 8 niños VIH asintomáticos con CD4<sup>+</sup> >500 células/μL y que siempre fueron asintomáticos; b) 9 adultos y 10 niños VIH que reconstituyen su sistema inmunológico, en categoría C y con CD4<sup>+</sup> ≤300 células/μL en algún momento del seguimiento, y que respondieron a la TARGA con CD4<sup>+</sup> >500 células/μL; c) 15 adultos y 20 niños sanos de edades equivalentes a los pacientes VIH. Los dos grupos control se utilizaron para estandarizar (Z-score) los valores de niños y adultos. La función tímica se estudió mediante la cuantificación de TRECs en CMSPs, por PCR cuantitativa a tiempo real; la cuantificación de los valores plasmáticos de IL-7 se hizo mediante un ensayo ELISA, y las subpoblaciones por citometría de flujo.

**Resultados:** Los dos grupos de niños VIH tuvieron valores más elevados de TRECs, porcentaje y número absoluto de células CD4<sup>+</sup> vírgen, número absoluto de células CD8<sup>+</sup> vírgen, y valores más bajos de IL-7 plasmática que los dos grupos de adultos VIH (p <0.05). Sin embargo, los dos grupos de niños VIH tuvieron valores similares del porcentaje de células CD8<sup>+</sup> vírgen, número absoluto de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> de memoria que los adultos VIH de los dos grupos. Cuando se estandarizaron los valores por el grupo control, los niños VIH con reconstitución inmune tuvieron valores más bajos de células vírgen CD8<sup>+</sup> que los adultos con reconstitución inmune (p =0.055). También, los niños VIH asintomáticos tuvieron valores más bajos de células vírgen y memoria de células CD8<sup>+</sup> que los adultos asintomáticos (p =0.055). Además, no hubo diferencias en valores de IL-7 y TRECs entre niños y adultos VIH.

**Conclusión:** La recuperación de células CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> en pacientes adultos infectados por el VIH parece ser consecuencia de una expansión periférica antígeno-independiente, aunque el papel del timo en esta reconstitución inmune no es descartable.

**Palabras clave:** VIH-1, niños, adultos, TARGA, células T vírgen, IL-7, TRECs, reconstitución.

**174. FALTA DE RESPUESTA DE LOS LINFOCITOS NK A UN ODN-CpG CLASE A EN PACIENTES INFECTADOS POR VIH: CORRELACIÓN CON EL NUMERO DE CÉLULAS DENDRÍTICAS MIELOIDES Y LA PRODUCCIÓN DE IL-12. Sáez R, Echaniz P, Olivares N, de Juan MD, Iribarren JA, Cuadrado E.** Hospital Donostia San Sebastián

**Objetivo:** Analizar los mecanismos que conducen a la disfunción de los linfocitos NK en pacientes infectados por VIH.

**Metodología:** Estimulación de células de sangre periférica con un ODN-CpG de clase A; análisis de las poblaciones pCD y mCD y de la producción intracelular de IFN $\gamma$  en las células NK por citometría de flujo, y de la secreción de IL12 e interferon alfa por elisa.

**Resultados:** Hemos analizado la producción de citocinas en respuesta a un ODN- CpG de Clase-A en sujetos infectados por virus VIH con diferente evolución clínica y encontramos que, todos aquellos con signos de progresión clínica o analítica muestran una profunda disminución de la producción de IFN $\gamma$  en respuesta a dicho estímulo, en comparación a lo observado en los sujetos infectados con larga evolución asintomática, o en sujetos sanos no infectados.

Esta alteración funcional no es secundaria a una respuesta deficiente de las células dendríticas plasmocitoides, ya que no se correlaciona con el número de éstas ni con los niveles de interferon alfa secretados en cultivos paralelos. En cambio, observamos que la producción de IFN $\gamma$  por las células NK se correlaciona significativamente con la cantidad de IL-12 secretada y con el número de células dendríticas mieloides.

En conclusión, los pacientes infectados por virus VIH tienen un defecto funcional de las células NK caracterizado por una mala respuesta al ODN-CpG, secundaria a un defecto de la actividad de las CDM que se traduce en un fallo de la producción de IL12.

**175. INFLUENCIA DEL GENOTIPO MBL-2 (MANNOSE-BINDING LECTIN 2) EN EL CURSO DE LA INFECCIÓN POR HIV. González RA\*, Rivero A\*\*, Camacho A\*\*, Cantisán S\*, Miró M\*, Cabello A\*, Herencia C\*, Luque J\*, Peña J\*.** \*Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. \*\*Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

**Introducción:** Los factores de riesgo que influyen en el desarrollo de la clínica y el tiempo de supervivencia en individuos infectados por HIV está pobremente estudiado. Una gran cantidad de evidencias sugieren que factores genéticos del huésped juegan un importante papel en la susceptibilidad a la infección por HIV y en la progresión a SIDA. Entre los genes propuestos que pueden determinar el curso de la infección por HIV están el HLA, MBL-2, etc. En presencia de calcio la MBL puede unirse a un gran espectro de oligosacáridos a través de dominios lectina. Tal unión a la superficie de diferentes gérmenes activa el complejo MASP y MASP2 y por tanto la vía del complemento. Mutaciones en este gen puede disminuir la inmunidad natural en pacientes infectados por HIV y favorecer la progresión a SIDA.

**Objetivo:** Estudiar la importancia del polimorfismo de los genes MBL2 en el curso de la infección por HIV.

**Pacientes y Métodos:** Se han estudiado 100 pacientes HIV+ seguidos en la Unidad de Infecciosos del Hospital Reina Sofía de Córdoba. Se analizaron los polimorfismos de MBL-2 mediante la amplificación de ácidos nucleicos del promotor y el exón 1 (INNO-LIPA MBL-2). La reacción se realiza mediante PCR múltiple. Este sistema discrimina entre los haplotipos HYP A, LYPA, LXPA, LYQA, HYPD, LYPB, LYQC. Se dividieron los pacientes en diferentes grupos en función del tiempo desde el contagio, padecer SIDA o no, NADIR de CD4, lipodistrofia, tiempo en tratamiento y con cada fármaco etc. También se estudiaron 100 controles sanos.

**Resultados y Conclusiones:** La frecuencia de los alelos y genotipos MBL2 varían entre los pacientes HIV+ y controles sanos. También



se observaron diferencias significativas entre diferentes grupos de pacientes infectados.

Por tanto podríamos concluir que la presencia de mutaciones en el gen MBL2 en pacientes infectados por HIV puede suponer un factor de riesgo añadido para desarrollar SIDA y podría ayudarnos a conocer desde el principio de la infección aquellos pacientes que pueden tener una evolución peor.

**176. RELACIÓN ENTRE LA EXPRESIÓN DE CD38 EN LINFOCITOS T Y MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES VIH-1+ Y LA RESPUESTA A LA TERAPIA ANTIRRETROVIRAL.** Almeida M<sup>1,2</sup>, Cordero M<sup>2,3</sup>, Almeida J<sup>1,2</sup>, Orfao A<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Citometría y Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca. <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna y Sección de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

**Objetivos:** La infección por el VIH-1 se ha asociado a una expresión anormalmente incrementada del antígeno CD38 en la superficie de los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> de sangre periférica (SP), lo que a su vez se ha relacionado con un pronóstico adverso en pacientes VIH-1+ no tratados. El estudio de la expresión de CD38 en monocitos de SP de pacientes VIH-1+ y de los cambios inducidos por la terapia antirretroviral (ART) sobre dicha expresión ha recibido menor atención. El objetivo del presente estudio ha sido analizar el efecto de la ART sobre la expresión de CD38 en linfocitos T-CD8<sup>+</sup>, linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y monocitos de SP de pacientes VIH-1+ con infección crónica, no tratados previamente.

**Metodología:** Se estudiaron 30 pacientes VIH-1+ asintomáticos, no tratados. Los estudios se realizaron previamente a la instauración de

la ART, y a las 2, 4, 8, 12 y 52 semanas desde el inicio de la misma. Como controles se analizaron en paralelo 10 adultos sanos. La expresión de CD38 se cuantificó específicamente para cada población celular a partir de muestras de SP analizadas por citometría de flujo, empleando un marcaje simultáneo para CD3/CD38/CD8/CD4 y el reactivo QuantiBRITE™ (Becton Dickinson Biosciences).

**Resultados:** Previamente al inicio de la ART, la expresión de CD38 estaba significativamente aumentada en los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup>, así como en los monocitos de SP de pacientes VIH-1+ ( $p < 0.05$ ). Aunque se observó un descenso significativo de los niveles de CD38 tras el inicio de la ART, la expresión de dicho antígeno continuaba anormalmente incrementada en los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> y monocitos de SP en pacientes VIH-1+ con carga viral indetectable incluso después de un año de tratamiento ( $p < 0.05$ ). Los cambios precoces inducidos tras el inicio de la TAR sobre el patrón de expresión de CD38 variaban en función del tipo celular analizado, lo que podría estar relacionado con una redistribución del compartimiento de linfocitos T y monocitos. El análisis combinado de la expresión de CD38 en los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> y CD4<sup>+</sup> y los monocitos de SP mostró valor predictivo para la respuesta al tratamiento evaluado como reducción de la carga viral en plasma a niveles indetectables; aquellos pacientes VIH-1+ en los que se observó un cambio más pronunciado en la expresión de CD38 tras el inicio de la ART mostraron una mejor respuesta al tratamiento.

**Conclusiones:** La evaluación cuantitativa de la expresión de CD38 en los linfocitos T-CD8<sup>+</sup> de SP, así como en los linfocitos T-CD4<sup>+</sup> y monocitos constituye un marcador potencialmente útil para predecir la respuesta a ART y monitorizar sus efectos en pacientes VIH-1+.

**Financiación:** MSD España y BMS S.L. M.A. es becaria del MEC (Ref. AP2000-3818).

# Índice de autores

---

## A

Abadía Molina AC, 147  
Abarrategui Garrido C, 179  
Abian J, 95, 113  
Aceves M, 109  
Acuña ML, 103, 123, 129, 157  
Aguarón A, 132  
Aguilar Reina J, 133  
Aguilera Montilla N, 102, 139  
Aguinaga Barrilero A, 139  
Alarcón B, 82, 118, 124  
Alba A, 93, 97  
Alba F, 132  
Álcover A, 93  
Alecsandru D, 85, 86  
Alegre R, 110  
Alemany G, 154  
Alemany S, 149  
Alfaro C, 104  
Alfaro D, 123  
Algarra I, 159, 171, 176  
Allende L, 148  
Allende LM, 125, 149  
Almarza S, 141  
Almeida J, 121, 180, 184, 185  
Almeida M, 180, 184, 185  
Alonso A, 168, 88  
Alonso C, 92  
Alonso Nieto M, 112, 114  
Alonso Nieto M, 93, 171  
Alonso Ortiz A, 135, 169  
Alvarado C, 174, 175  
Alvarez A, 148  
Álvarez AJ, 150  
Álvarez de Mon M, 103, 123, 129, 157  
Álvarez Doforno R, 101, 143, 144  
Álvarez Doval A, 93, 119  
Álvarez I, 84, 95, 113, 117  
Álvarez L, 143  
Álvarez López MR, 89, 122, 138, 169  
Álvarez López R, 90  
Alvarez Márquez A, 133  
Álvarez Mon M, 166, 167  
Álvarez P, 174, 175  
Álvarez R, 90, 91, 92, 138  
Álvarez S, 117, 160  
Álvarez Santana MC, 100, 154  
Álvaro Meca A, 132, 183  
Alves H, 92  
Ambrós C, 113  
Amérigo González MA, 139  
Amorín E, 158  
Ampudia R, 93, 97  
Anaya Baez B, 131, 132  
Andrés A, 125, 149  
Andrés Martín A, 137  
Anel A, 94, 159  
Angulo A, 173  
Antich M, 166  
Antolín Ayala MI, 172  
Antón E, 99  
Antón J, 101, 155  
Aptsuari N, 162  
Aramendi Ramos M, 139

Arcas I, 106  
Argüelles F, 101  
Arguello JR, 110  
Arias M, 109, 127, 141  
Arina A, 104, 181  
Aristimuño C, 119, 127  
Arizón JM, 91  
Armengol MP, 96, 117  
Arnaiz Villena A, 110, 167, 168  
Aróstegui JJ, 101, 155  
Arranz L, 174  
Arribillaga L, 181  
Arroyo R, 137  
Arruda VA, 106  
Asensi V, 99  
Asensio A, 125  
Aumente MD, 91  
Ausín Ortega F, 99, 109, 127  
Aviles MJ, 112, 171  
Azpilikueta A, 104

## B

B. Del Campo Alonso A, 102  
Badia R, 166  
Baeza I, 174, 175  
Baeza ML, 98  
Balas A, 112, 114, 171  
Ballester S, 142  
Ballesteros C, 182  
Ballina J, 133  
Balsa A, 84, 135  
Bárcena P, 121  
Barcenilla H, 103, 129, 157, 166, 167  
Barquintero J, 95, 97  
Barrasa A, 120  
Barreiro O, 117  
Barreiro P, 182  
Barrero Villar M, 118  
Barrientos Guzmán A, 89  
Barroso S, 150  
Bart PA, 150  
Bas J, 121  
Beares I, 142  
Bello R, 122, 126  
Bendandi M, 105  
Bengoechea JA, 175  
Benito JM, 120, 182  
Benito MJ, 142  
Benito Almazán MJ, 127  
Bermejo J, 89, 122, 138  
Bernaus O, 113, 161  
Bernuth H, 154  
Berraondo P, 119, 165, 182  
Bhan A, 147  
Blanch A, 152, 168  
Blanco E, 87  
Blanco Gelaz MA, 112  
Blanco L, 112, 114, 171  
Blanco M, 161  
Blanco O, 132, 147, 176, 179  
Blasco Olaetxea E, 162  
Bofill M, 110  
Bohórquez JC, 108, 136  
Bolívar A, 142, 152

Bolland S, 98  
Bonilla G, 144  
Bootello A, 104, 163  
Borrás Cuesta F, 181  
Borrás FE, 114  
Borrega P, 107  
Borro J, 92  
Bosque A, 94  
Botella C, 89, 90, 138  
Bouza E, 90, 119  
Bové M, 113  
Bowakin D, 135  
Bravo Romero MJ, 135, 169  
Brieva JA, 103, 108, 115, 136, 146, 155, 166, 173, 176  
Briones R, 88  
Brissot P, 167  
Bruges Armas J, 112  
Buendía E, 121  
Burgaleta C, 103, 157

## C

Caballero A, 87, 88  
Caballero González A, 135, 169  
Cabello A, 181, 182, 184  
Cabello A, 91  
Cabrera C, 170  
Cabrera T, 106, 157, 159, 161, 162  
Cabrero JR, 107  
Cacho JL, 135, 169  
Calleja S, 148  
Callejas Rubio JL, 83  
Calopa M, 121  
Calvino M, 123  
Calvo P, 119  
Camacho A, 181, 182, 184  
Camarero C, 125  
Cambra A, 100, 136  
Caminal L, 141  
Camino I, 119  
Campillo JA, 89, 169  
Campistol JM, 155  
Campos A, 139  
Campos Caro A, 103, 166, 173  
Campos Esteban J, 137  
Campos J, 149  
Campos M, 105, 160  
Campos MA, 175  
Campos Martín Y, 89, 111, 116  
Canals F, 84, 113  
Candela M, 90  
Cantisán S, 134, 184  
Cantó E, 128  
Cantón J, 121, 157, 162  
Cantón Robles J, 102  
Caragol I, 148  
Carbone J, 90, 119, 144, 151, 160  
Carbonell F, 92  
Cárdaba B, 98, 150  
Cárdenes M, 87  
Cárdenes MP, 100, 154  
Carin M, 110  
Caro P, 161  
Carrascal M, 95, 113  
Carrascosa AL, 107

Carrillo J, 93, 97  
 Carulla M, 161  
 Casado JG, 81, 121, 124, 179  
 Casanova JL, 154  
 Casero J, 160, 178  
 Castañer Alabau JL, 137  
 Castañer JL, 148  
 Castañón S, 128  
 Castellanos A, 153  
 Castillo M, 95  
 Castro MJ, 149, 167, 168  
 Castro P, 133  
 Cejalvo T, 126, 128  
 Chara L, 129  
 Chevarría J, 129  
 Civantos E, 98, 150  
 Clemente J, 148  
 Clotet B, 110, 119  
 Cobo JM, 165  
 Codina E, 84  
 Coll J, 163  
 Collado MD, 134  
 Colmenares M, 116, 118  
 Colmenero JD, 135  
 Colobran R, 117  
 Coma G, 110  
 Comabella M, 147  
 Conejero Hall L, 98  
 Contador I, 169  
 Corbalán R, 169  
 Corbi A, 116  
 Corbi AL, 115, 116, 118  
 Cordero M, 180, 184, 185  
 Corell A, 171  
 Corral J, 106  
 Corral R, 112  
 Correro F, 146  
 Cortegano I, 91  
 Cortés JR, 107, 162  
 Cortezón S, 149  
 Cos J, 114  
 Costa M, 84  
 Couceiro R, 92  
 Coulie P, 170  
 Couto AR, 112  
 Cox S, 110  
 Cox ST, 171  
 Cózar J, 157, 162  
 Crespo del Pozo J, 141, 142, 152, 153  
 Crespo Guardo A, 130  
 Crettaz J, 119, 165, 182  
 Cruz Adalia A, 107  
 Cuadrado E, 162, 184

**D**

De Andrés B, 91  
 De Andrés C, 127  
 De Arriba G, 123  
 De Francisco A, 141  
 De Gracia J, 148  
 De Juan MD, 162, 184  
 De la Calle H, 135  
 De la Calle O, 97  
 De la Calle Martín O, 131, 156  
 De la Fuente M, 174, 175

De la Rosa O, 81, 121, 124, 181, 179  
 De la Sen M, 139  
 De La Torre J, 1660  
 De la Torre M, 92  
 De las Heras V, 137  
 De Lazzari E, 120  
 De Ojeda G, 81  
 De Pablo R, 84, 166, 167  
 De Pablos P, 149  
 De Vries B, 86  
 Del Campo Alonso A, 156, 157, 162  
 Del Campo V, 163  
 Del Pozo V, 98, 150  
 Del Romero J, 120  
 Del Valle JM, 174  
 Delgado Cerviño E, 101, 143, 144  
 Delgado J, 96, 97  
 Delgado L, 103  
 Delgado Pérez L, 155  
 Delgado R, 116  
 Delgado Rodríguez M, 105  
 Detková D, 148  
 Dianzani U, 126  
 Díaz C, 96, 97  
 Díaz D, 103, 129, 157, 166, 167  
 Díaz de Espada F, 140  
 Díaz Rubio M, 86  
 Díez B, 126, 128  
 Díez Martín JL, 93  
 Diller S, 110  
 Distant S, 167  
 Doménech N, 158  
 Domínguez Acosta A, 87, 100  
 Domínguez O, 93, 130  
 Domínguez Soto A, 116  
 Domínguez Villar M, 131, 132  
 Dorado B, 142  
 Dueñas A, 109

**E**

Echaniz P, 162, 184  
 Echeverría Balda A, 164  
 Echevarría Vierna S, 142  
 Eikermann SM, 160, 177, 178  
 Eixarch H, 95, 97  
 Engel P, 174  
 Escobar D, 100, 154  
 Español T, 148  
 Espejo C, 95  
 Espinosa G, 136  
 Esplugues E, 174  
 Evora Soto N, 162

**F**

Faner R, 113  
 Farnós M, 82  
 Fatela Cantillo D, 164  
 Feito MJ, 122  
 Felpeto I, 163  
 Fernández A, 140  
 Fernández Arcas N, 88, 168  
 Fernández Arquer M, 85, 135  
 Fernández B, 112  
 Fernández C, 162  
 Fernández Calvo B, 169

Fernández Chacón T, 139  
 Fernández Cruz E, 90, 93, 119, 127, 144, 151, 160  
 Fernández E, 82, 124  
 Fernández Fresnedo G, 141  
 Fernández M, 150  
 Fernández MA, 96  
 Fernández Morera JL, 111, 133, 170  
 Fernández Suárez A, 151, 164  
 Fernández Yáñez J, 90  
 Ferreira A, 98, 149  
 Ferrer B, 148  
 Ferrer Francesch X, 117  
 Ferrer JM, 153  
 Figuera LE, 110  
 Figueredo MA, 140  
 Flandes J, 128  
 Flores E, 93  
 Flores N, 142  
 Foncubierta E, 166  
 Fontán Casariego G, 101, 143, 144  
 Fontán G, 98, 149, 152  
 Formoso MJ, 92  
 Francés A, 100  
 Frecha C, 101, 156, 179  
 Fresno M, 107  
 Frías JF, 169  
 Fuentes D, 170

**G**

Gaforio JJ, 105, 160  
 Galán F, 160, 178  
 Galán I, 184  
 Galán Llopis JA, 164  
 Galera Moreno G, 139  
 Gallardo S, 98, 150  
 Gallart T, 120  
 Gamazo S, 169  
 Gambón Deza F, 174  
 Gambón F, 158, 163  
 Garcés S, 95  
 García A, 85, 134  
 García Alonso A, 90, 138  
 García Alonso AM, 122, 138, 169  
 García Astudillo LA, 109, 127, 153, 165  
 García Berciano M, 167  
 García Ceca J, 123  
 García Consuegra J, 101  
 García Cózar FJ, 131, 132  
 García F, 120  
 García Fernández N, 164  
 García Hernández JA, 165  
 García Laorden MI, 87, 100, 154, 158, 159  
 García Lora A, 105, 125, 170, 171, 176  
 García Olivares E, 132, 147, 176, 179, 180  
 García Ortiz JE, 110  
 García Rodríguez C, 109  
 García Rodríguez MC, 98, 149  
 García Saavedra A, 87, 154  
 García Saavedra AD, 100  
 García Salgado G, 148  
 García Sánchez F, 93, 112, 114, 171  
 García Sancho L, 102  
 García Sepúlveda CA, 110  
 García Suárez J, 103, 157

- García Tamayo J, 162  
 García Toscano M, 101, 156  
 García Trujillo JA, 104, 163  
 García-V. A, 145, 146  
 Garet E, 163  
 Garet Fernández E, 174  
 Garrido F, 102, 105, 106, 121, 125, 157, 158, 159, 161, 162, 170, 171, 176  
 Garrido P, 121  
 Garrido S, 152  
 Gaspar ML, 91  
 Gatell JM, 120  
 Gayoso I, 81, 121, 179  
 Geisler C, 125  
 Gil Herrera J, 93  
 Gil J, 119, 151, 160  
 Gimferrer I, 82  
 Giner Muñoz M, 156  
 Goicoechea Aranguren E, 179  
 Gómez C, 109  
 Gómez de la Concha E, 85, 86, 87, 135, 137  
 Gómez del Moral M, 82, 89, 111  
 Gómez Escalonilla C, 139  
 Gómez García C, 152  
 Gómez García M, 136  
 Gómez I, 92  
 Gómez J, 94, 140, 149  
 Gómez Jiménez V, 119, 127  
 Gómez Lozano, 173  
 Gómez M, 94  
 Gómez Mateo J, 122, 138  
 Gómez Perales JL, 173  
 Gómez Rial J, 137  
 Góngora R, 108  
 González Aseguinolaza G, 104, 119, 165, 182  
 González Casado I, 101  
 González Enseñat MA, 101  
 González Escribano MF, 84, 85, 133  
 González F, 158  
 González Fernández Á, 158, 163  
 González García I, 115, 173, 176  
 González Gay MA, 84  
 González Gujel E, 139  
 González L, 148, 149  
 González Lahoz J, 119, 120  
 González Molina M, 88  
 González R, 91, 181, 182  
 González RA, 134, 184  
 González S, 90, 111, 112, 133, 170  
 González Santesteban C, 156  
 Gordón Alonso M, 117, 118  
 Gorraiz M, 181  
 Gozalbo López B, 89, 111, 116  
 Gozalbo López B  
 Gracia Bouthelher R, 101  
 Graham-Campebel, 167  
 Granell FJ, 102  
 Granell R, 92  
 Granja AG, 107  
 Guardo AC, 124, 125  
 Guerra N, 89, 138  
 Guerrero MA, 142  
 Gumá M, 173  
 Gurbindo MD, 132, 183  
 Gutiérrez A, 102  
 Gutiérrez C, 94, 133, 140, 141  
 Gutiérrez E, 171  
 Gutiérrez Frías C, 126, 128  
 Guzmán Bistoni MC, 162  
 Guzmán Espinosa C, 151
- H**  
 Heine Suñer D, 153  
 Herencia C, 91, 182, 184  
 Hernández A, 103, 123, 157, 166, 167  
 Hernández Espinosa D, 106, 172  
 Hernández González A, 155  
 Hernández López C, 126, 128  
 Hernández M, 148  
 Herrera Mozo I, 148  
 Herrero MD, 145, 146  
 Herrero MJ, 113, 161  
 Hierro L, 143  
 Higaki Y, 98  
 Horcajada JP, 87  
 Hornero Cimiano C, 165  
 Hortells JL, 143  
 Huarte E, 104  
 Hurtado C, 107
- I**  
 Ibáñez A, 82, 168  
 Iborra A, 166  
 Iborra S, 82  
 Iglesias J, 153  
 Inogés S, 105  
 Iranzo A, 177  
 Iribarren JA, 184
- J**  
 Jara Vega P, 143  
 Jaraquemada D, 84, 95, 113  
 Jarque D, 172  
 Javier Zulueta J, 182  
 Jensenius JC, 87  
 Jerez J, 99  
 Ji H, 147  
 Jiménez Alonso J, 84, 134  
 Jiménez E, 105, 123, 125, 158, 159, 170, 171, 176  
 Jiménez Gómez G, 173  
 Jiménez J, 134, 146  
 Jiménez Jiménez LM, 164  
 Jiménez L, 175  
 Jiménez Medina J, 170  
 Jiménez P, 157, 159, 161, 162  
 Jiménez Periañez A, 81  
 Jimeno J, 172  
 Jordá J, 158  
 Juan M, 93, 96, 113, 161  
 Juárez C, 96, 97, 148  
 Julià E, 147  
 Julià MR, 136  
 Junqueira Kipnis AP, 169  
 Jurado A, 181
- K**  
 Kilic SS, 124  
 Kindelán JM, 181  
 Ku C-L, 154
- L**  
 Lahoz C, 98, 150  
 Lamana A, 94  
 Lamas R, 144  
 Lara E, 106, 159, 161  
 Lara Ruiz JM, 151  
 Larrad L, 94, 143, 159  
 Larrauri J, 143  
 Lasa I, 102  
 Lasala F, 116  
 Lasarte JJ, 104, 119, 165, 181, 182  
 Lasierra P, 94, 143, 159  
 Lauzurica P, 174  
 Lavado Valenzuela R, 135, 169  
 Leal JA, 116  
 Leal M, 183, 184  
 Lemos C, 92  
 León AJ, 112  
 León F, 125  
 León JA, 183  
 León Leal JA, 183  
 León VI, 112, 135, 169  
 Leyva Cobián F, 99, 109, 127, 153, 165  
 Lillo R, 128  
 Lima M, 121  
 Little AM, 110  
 Llanes E, 98, 150  
 Llompert C, 175  
 Llop C, 113, 117  
 Llopis MA, 161  
 López Álvarez MR, 122, 138  
 López Álvarez R, 89, 138  
 López Alperi M, 133  
 López Arbesú R, 133  
 López Botet M, 173  
 López de Castro JA, 88, 113  
 López de Castro JA, 88  
 López de la Iglesia A, 178  
 López Díaz de Cerio A, 105  
 López E, 98, 150  
 López Granados E, 149  
 López Hoyos M, 99, 141, 142, 152, 153  
 López JC, 182  
 López Jiménez J, 163  
 López Larrea C, 90, 111, 112, 133, 170  
 López Longo FJ, 144  
 López M, 97, 120, 182  
 López Nevot MA, 121, 135, 170  
 López Núñez M, 111, 116  
 López P, 94, 140  
 López Rubio F, 91  
 López S, 140  
 López Santalla M, 102, 139  
 López Sañudo S, 140  
 López Soto A, 133  
 López Trascasa M, 150, 152, 179  
 López Vázquez A, 90, 111, 112, 133, 170  
 Lorenzo JJ, 120  
 Loureiro J, 91  
 Lowy E, 168  
 Loza E, 140  
 Lozano Doncel M, 144  
 Lozano F, 82, 87, 120, 178  
 Lozano JA, 169  
 Lozano JM, 91, 181, 182

Lozano S, 120  
 Luque A, 136  
 Luque J, 91, 181, 182, 184

**M**

Madrigal JA, 110, 171  
 Madueño J, 182  
 Magadán S, 158  
 Malats N, 173  
 Maldonado Torres H, 110  
 Maleno I, 106, 170  
 Mancebo E, 149  
 Mantecón S, 161  
 Manzanares Secades C, 139  
 Manzarbeitia F, 98  
 Maradona JA, 119  
 Marco Castro E, 144  
 Marco FM, 139  
 Marcos Gutiérrez MJ, 144  
 Marcos MAR, 91  
 Marín J, 91, 182  
 Marín J  
 Marín L, 89, 90, 138  
 Marín LA, 122, 169  
 Marín Moreno I, 122, 138  
 Marsh SGE, 110, 171  
 Martí M, 84  
 Martí S, 160, 177, 178  
 Martín AB, 130  
 Martín Andorrà M, 177  
 Martín Cofreces N, 107  
 Martín F, 101, 156, 179  
 Martín Fernández JM, 125, 130  
 Martín Gayo E, 115  
 Martín Ibáñez J, 135  
 Martín J, 84, 85, 134, 136  
 Martín L, 146  
 Martín M, 174  
 Martín MC, 86, 140  
 Martín Mola E, 144  
 Martín N, 108  
 Martín Saavedra FM, 142  
 Martín Villa JM, 102, 139  
 Martínez A, 85, 86, 87, 137  
 Martínez Barriocanal A, 177  
 Martínez Borra J, 90, 111, 112, 133, 170  
 Martínez Cáceres E, 117, 161  
 Martínez del Hoyo G, 94  
 Martínez Doncel A, 135  
 Martínez E, 113  
 Martínez Escribano JA, 169  
 Martínez Gallo M, 131  
 Martínez Laso J, 110, 167, 168  
 Martínez López MM, 101  
 Martínez Lorenzo MJ, 94, 143, 159  
 Martínez M, 105, 125, 158, 171  
 Martínez MA, 96, 97  
 Martínez Martínez L, 156  
 Martínez MS, 159, 176  
 Martínez Naves E, 89, 111, 116  
 Martínez P, 166  
 Martínez Pomar N, 153  
 Martínez Torrano AJ, 172  
 Mas A, 87, 137  
 Mas Fontao A, 85

Mata JA, 84  
 Matamoros N, 100, 136, 153, 154  
 Mazurra F, 153  
 Medina F, 173  
 Medina S, 174, 175  
 Melehi M, 177  
 Melero I, 104, 105  
 Melero I, 181  
 Melgosa M, 144  
 Méndez Vales R, 102, 121, 156, 157, 162  
 Mendoza JL, 85, 86  
 Menéndez López V, 164  
 Mensa J, 87  
 Merino E, 113  
 Merino J, 164  
 Mestre M, 121  
 Meza N, 89  
 Micheloud D, 144, 151  
 Miguel T, 98  
 Milà J, 100, 136, 154  
 Milla V, 113  
 Minguela A, 90, 122, 138  
 Miñano A, 106  
 Mirabet V, 92  
 Miranda JM, 88  
 Mirapeix E, 145  
 Mirapeix Vicens E, 146  
 Miras M, 89, 122, 138  
 Miró JM, 120  
 Miró M, 134, 184  
 Modesto C, 101  
 Molina IJ, 101, 131, 155, 156, 180  
 Monge Moreno E, 156  
 Monreal Y, 106, 178  
 Monserrat J, 103, 123, 129, 157, 166, 167  
 Monserrat V, 113  
 Montalban X, 95, 147  
 Montes Ares O, 89, 169  
 Montes J, 163  
 Montes O, 138  
 Montoro J, 92, 172  
 Moñux G, 87  
 Mora R, 151, 160  
 Mora López F, 166  
 Morado M, 158  
 Morales J, 147  
 Morales JC, 82  
 Morales P, 148, 149, 167  
 Moreno C, 164, 169  
 Moreno F, 124  
 Moreno Pelayo MA, 124  
 Moreno S, 119  
 Moscardó F, 92  
 Moscoso J, 110, 167, 168  
 Mosquera G, 162  
 Mota RA, 106, 172  
 Moya Quiles MR, 89, 138, 169  
 Moya R, 90, 138  
 Mozo L, 133, 141  
 Muixí L, 95, 113  
 Muñoz A, 87  
 Muñoz C, 139  
 Muñoz Fernández MA, 116, 117, 118, 132, 183, 184  
 Muñoz Fernández R, 132, 176, 179  
 Muñoz JJ, 123

Muñoz P, 83, 90, 130  
 Muñoz Robles J, 148, 149  
 Muñoz Saá I, 100, 136, 153  
 Muñoz Suano A, 131, 132  
 Mur E, 148  
 Murillo O, 104, 181  
 Muro M, 89, 90, 138, 169

**N**

Naranjo M, 114  
 Navarro A, 88  
 Navarro Blasco FJ, 139  
 Navarro J, 119, 127  
 Navarro Merino M, 151  
 Navarro MN, 83  
 Navarro Pelayo F, 83  
 Nevado R, 121  
 Nielsen BL, 125  
 Nieto A, 136, 146, 155  
 Nocito M, 171  
 Nogal ML, 107  
 Nomdedéu M, 120  
 Núñez C, 85, 86  
 Núñez Peña JR, 89  
 Núñez Roldán A, 84, 85, 133, 150, 151  
 Nyqvist M, 168

**O**

Obando I, 183  
 Ocaña E, 103, 108, 136, 176  
 Ocaña I, 119  
 Ocaña L, 114, 119, 182  
 Ochoa Callejero L, 165  
 Oguz F, 110  
 Ojeda G, 122, 126  
 Olagüe C, 165  
 Olivares N, 162, 184  
 Oliver D, 160  
 Oliver J, 136  
 Oliver Vila I, 177  
 Oliveros E, 148  
 Orellana Miguel MA, 139  
 Orfao A, 121, 180, 184, 185  
 Orozco G, 84, 85, 134  
 Ortega A, 128  
 Ortega-B. M, 145, 146  
 Ortega C, 131, 145, 146  
 Ortega de la O C, 144  
 Ortega E, 85  
 Ortego Centeno N, 83  
 Ortego N, 84  
 Ortiz Andrellucchi A, 165  
 Osório E, 92

**P**

Pacho A, 149  
 Paco L, 105, 125, 158, 159, 170, 171, 176  
 Padilla O, 178  
 Palacios B, 91  
 Palacios JA, 170  
 Palacios S, 90  
 Pallarés L, 136  
 Paloma P, 148  
 Palomino P, 98, 150  
 Palomo J, 90

- Palou E, 113  
 Paravisini A, 151  
 Parra T, 123  
 Parrilla P, 89, 106, 122, 138, 172  
 Pascual E, 139  
 Pascual Salcedo D, 84, 135, 140  
 Pastor F, 105, 164  
 Pastor X, 93, 97  
 Pavón EJ, 83, 130  
 Payeras A, 100  
 Paz Artal E, 148, 149  
 Pena S, 86  
 Peña J, 81, 91, 124, 134, 179, 181, 182, 184  
 Peña R, 110  
 Peñaranda M, 100  
 Peralbo E, 81, 121, 124, 179  
 Peralbo E  
 Pérez A, 132, 183, 184  
 Pérez Aciego P, 158  
 Pérez Blas M, 102, 139  
 Pérez C, 175  
 Pérez Castellano M, 100, 154  
 Pérez Chacón G, 158  
 Pérez de Diego R, 98, 149  
 Pérez E, 148  
 Pérez Estévez D, 158  
 Pérez Flores V, 124  
 Pérez-G. M, 107, 162  
 Pérez J, 123  
 Pérez Pérez G, 151  
 Pérez R, 170  
 Pérez Requena J, 108  
 Pérez V, 130  
 Periañez A, 130  
 Picazo L, 144  
 Pini E, 81, 126  
 Piñero A, 136, 146  
 Pita ML, 81, 121, 179  
 Plana M, 120  
 Planas R, 93, 97  
 Planelles D, 92, 172  
 Plaza A, 140  
 Plaza S, 101, 155  
 Podzamaczer D, 119  
 Pons J, 153, 154  
 Portolés P, 81, 122, 126  
 Pozo M, 149  
 Prieto A, 103, 123, 129, 157, 166, 167  
 Prieto J, 119, 165, 181, 182  
 Prieto P, 123, 157  
 Pruneda L, 99, 112  
 Puel A, 154  
 Puertas MC, 93, 97  
 Puerto M, 174, 175  
 Puig Kroger A, 116, 118  
 Puig N, 172  
 Pujalte F, 100, 153  
 Pujalte P, 153  
 Pujol Borrell R, 93, 96, 97, 113, 114, 117, 161  
 Pulgar M, 82  
 Puy G, 131
- Q**  
 Queiroz MLS, 106  
 Quesada E, Molina II, 84
- Quintero S, 155  
 Quiralte J, 150  
 Quirce S, 150
- R**  
 R A Cachafeiro JJ, 110, 167, 168  
 Ramírez C, 82, 130  
 Ramírez García O, 165  
 Ramírez Garrido F, 177  
 Ramírez P, 122  
 Ramírez Sandoval L, 110  
 Ramón D, 171  
 Rangel Villalobos H, 110  
 Raulet D, 104  
 Raya Álvarez E, 83  
 Real LM, 106  
 Recio Hoyas MJ, 125, 130  
 Recio MJ, 124  
 Regueiro JR, 82, 124, 125, 130  
 Regueiro V, 175  
 Reiné J, 125, 130  
 Resino S, 132, 183, 184  
 Revilla Y, 107  
 Revuelta JM, 165  
 Rey C, 92  
 Reyes E, 103, 157, 167  
 Reynoso MF, 146  
 Riera M, 100  
 Rieubland C, 150  
 Riol Blanco L, 115  
 Risueño RM, 124  
 Rius F, 101  
 Rius J, 155  
 Rivas MD, 107  
 Rivero A, 181, 182, 184  
 Rivero Lezcano OM, 172  
 Robles R, 138  
 Robson KJH, 167  
 Roche O, 152  
 Rodrigo Garzón M, 119, 182  
 Rodrigo L, 170  
 Rodrigo MJ, 148  
 Rodríguez Arias JM, 131  
 Rodríguez Bayona B, 146  
 Rodríguez C, 108, 120, 146, 149  
 Rodríguez Calabia E, 109, 127  
 Rodríguez Calvillo M, 105  
 Rodríguez de Castro F, 87  
 Rodríguez de Córdoba S, 179  
 Rodríguez Fernández JL, 115  
 Rodríguez Gallego C, 87, 165  
 Rodríguez Gallego JC, 100, 154  
 Rodríguez Gutiérrez JF, 155  
 Rodríguez Iglesias MA, 131, 132  
 Rodríguez Juan C, 139  
 Rodríguez López RM, 82  
 Rodríguez M, 170, 172  
 Rodríguez MA, 112  
 Rodríguez Mahou M, 144, 160  
 Rodríguez Martín E, 104, 163  
 Rodríguez Molina JJ, 90, 144, 151  
 Rodríguez Pérez N, 139  
 Rodríguez Pérez R, 135, 146, 169  
 Rodríguez R, 145, 150, 172  
 Rodríguez Reynoso MF, 134
- Rodríguez Rodero S, 111, 133, 170  
 Rodríguez Ruiz T, 102, 156  
 Rodríguez Sainz C, 93, 119  
 Rodríguez Sánchez JL, 96, 97, 128, 131, 148, 156  
 Rodríguez T, 157  
 Rodríguez T, 162  
 Rodríguez Zapata M, 166, 167  
 Roig R, 172  
 Rojo JM, 81, 122, 126  
 Rojo JM  
 Rojo Jurado MT, 151  
 Rojo R, 167  
 Roldán E, 104, 163  
 Romero JM, 106, 159, 161, 162  
 Romero X, 174  
 Romero Z, 131, 180  
 Romo E, 149  
 Rosell A, 110  
 Roselló S, 178  
 Rossi N, 130  
 Rossi NE, 82, 125  
 Roy G, 125  
 Royo Cañas M, 94, 143, 159  
 Rúa Figueroa I, 87  
 Rubio G, 160, 177, 178  
 Rubio García M, 137  
 Rubio I, 108  
 Rubio M, 98, 149  
 Rubio R, 119  
 Rueda B, 85  
 Ruiz Cabello F, 102, 106, 121, 157, 159, 161, 162  
 Ruiz de Alegría C, 99, 140  
 Ruiz J, 105, 119, 160, 181, 182  
 Ruiz JC, 141  
 Ruiz Magaña MJ, 132  
 Ruiz Mateos E, 184  
 Ruiz MC, 155  
 Ruiz Ruiz C, 82, 147  
 Rupérez P, 95
- S**  
 Saavedra Santana P, 165  
 Sabater L, 96  
 Sabin Domínguez P, 93  
 Sabina P, 149  
 Sabina Villar P, 144  
 Saborit Villarroya I, 174, 177  
 Saboya M, 152  
 Sacedón R, 126, 128  
 Sádaba MC, 104  
 Sáenz Mateo LJ, 172  
 Sáez Gutiérrez B, 94, 143, 159  
 Sáez R, 162, 184  
 Sala Valdés M, 108  
 Salas ML, 107  
 Salaya G, 105, 125, 158, 159, 171, 176  
 Salcedo Moreno C, 101  
 Salinero J, 159, 161  
 Sampalo A, 155  
 San José E, 118  
 San Segundo Arribas D, 141, 142, 152, 153  
 San Vicente E, 109  
 Sanal O, 125  
 Sánchez B, 150  
 Sánchez Bueno F, 89, 138, 172

Sánchez C, 166, 167  
 Sánchez Calvín MT, 139  
 Sánchez Corral P, 179  
 Sánchez Crespo M, 109  
 Sánchez E, 84, 134  
 Sánchez Espinel C, 174  
 Sánchez F, 146  
 Sánchez Fructuosos A, 89  
 Sánchez Ibarrola A, 105, 164  
 Sánchez L, 125  
 Sánchez MA, 103, 123, 129, 157  
 Sánchez Madrid F, 94, 107, 108, 117, 118, 124  
 Sánchez Mateos P, 115  
 Sánchez P, 92  
 Sánchez Pedreño P, 169  
 Sánchez Pérez M, 108  
 Sánchez Ramón S, 127, 15, 160  
 Sánchez Rovira P, 105  
 Sánchez Ruano A G, 162  
 Sánchez Ruiz F, 134  
 Sánchez Sabater E, 143  
 Sánchez Sánchez B, 151  
 Sánchez Sánchez N, 115  
 Sánchez Velasco P, 99, 109, 127, 165  
 Sancho D, 94, 117  
 Sancho J, 83, 130  
 Santamaría B, 119  
 Santamaría M, 131, 145, 146, 181, 182  
 Santiago Álvarez JL, 135  
 Santiago E, 100, 154  
 Santos E, 82  
 Sanz E, 154  
 Sanz G, 92  
 Sarmiento E, 90, 151  
 Sarobe P, 104, 181  
 Sarrias MR, 178  
 Sastre B, 98, 150  
 Sastre J, 150  
 Sauleda J, 175  
 Sayós J, 177  
 Schadendorf D, 102  
 Schanoski A, 105, 125, 158  
 Segundo C, 173  
 Sempere Ortells JM, 139  
 Senent L, 92  
 Seoane C, 98, 150  
 Seoane E, 132, 184  
 Seoane Reula ME, 183  
 Serra A, 136  
 Serra Majem L, 165  
 Serra Pagés C, 82  
 Serrano C, 128  
 Serrano FJ, 87  
 Serrano Gómez D, 116, 118  
 Serrano MJ, 105, 160  
 Serrano Vela JI, 110, 167, 168  
 Serra Pagès C, 178  
 Setièn Baranda EF, 111  
 Sevillano MD, 169  
 Sierra Filardi E, 118  
 Simón C, 160  
 Sinde Monteiro M, 92  
 Soares Schanoski A, 159, 171, 176  
 Solana R, 81, 121, 124, 179, 181, 182

Solé J, 87  
 Soler P, 148  
 Solís P, 155  
 Solves P, 92, 172  
 Soria E, 105  
 Soriano A, 120  
 Soriano V, 120, 182  
 Sotelo N, 166, 167  
 Soteriou B, 171  
 Soto M, 82  
 Srivastava GK, 155  
 Stark L, 91  
 Suárez A, 94, 133, 140, 141  
 Suárez Álvarez B, 90, 112  
 Suárez B, 87  
 Suárez J, 110  
 Subirá D, 128  
 Subiza JL, 106  
 Suela J, 116  
 Suela Rubio J, 89, 111  
 Suñer L, 172  
 Szurba AR, 162

**T**

Tallada M, 157, 162  
 Tarazona R, 81, 121, 124, 179  
 Teixeira J, 92  
 Tejedor A, 115  
 Terhorst C, 147  
 Thrasher A, 156  
 Tirado I, 132, 176, 179, 180  
 Tirapu I, 104  
 Toribio García ML, 115  
 Toribio ML, 82, 83  
 Torío A, 89, 92  
 Tornel PL, 172  
 Torre Alonso JC, 112  
 Torres A, 115  
 Torres B, 84, 85  
 Torres M, 91  
 Tricas L, 99  
 Tudela JI, 106  
 Tuset E, 156

**U**

Unciti JD, 131, 180  
 Urban S, 148  
 Urcelay E, 85, 86, 87, 135, 137  
 Urcelay García E, 135  
 Ursa A, 118

**V**

Valdivia A, 140  
 Valdivia Pérez A, 135  
 Valdueza Beneitez J, 174  
 Valenzuela A, 117  
 Valenzuela Fernández A, 118  
 Valeri Lozano A, 102, 139  
 Vales A, 119, 165, 182  
 Valladares M, 158  
 Vallés I, 164  
 Valor L, 119  
 Van Rooijen N, 119, 182  
 Varas A, 126, 128

Varela Nieto I, 98  
 Varela P, 148  
 Vargas Alarcón G, 110  
 Vargas JA, 158  
 Vázquez AC, 149  
 Vázquez García MN, 88  
 Vázquez González A, 137  
 Vega F, 154  
 Vega MA, 116  
 Velástegui A, 144  
 Velilla J, 143  
 Vera M, 119, 145, 182  
 Vera Rivera M, 146  
 Verdaguer J, 93, 97  
 Vicario JL, 112, 114, 171  
 Vicario Moreno JL, 93  
 Vicente A, 126, 128  
 Vicente Manzanares M, 107  
 Vicente V, 106  
 Viciano P, 119  
 Vidal F, 95  
 Vidal J, 100  
 Vidal S, 96, 97, 128  
 Vila E, 92, 172  
 Vilches C, 112, 173  
 Vilchez JR, 170  
 Villar LM, 104  
 Villaroel M, 103, 123, 129, 157  
 Villarrubia N, 104, 163  
 Viñas Gomis O, 146  
 Viñas O, 145  
 Vives F, 132  
 Vives J, 82, 87, 101, 155, 178  
 Vives Pi M, 93, 97

**W**

Warleta F, 105, 160  
 Weiss E, 130  
 Wichmann I, 150  
 Worwood M, 167

**X**

Xufre C, 84  
 Yagüe J, 101, 136, 155

**Y**

Yáñez MÓ M, 108, 117  
 Yáñez Pereira F, 143  
 Yélamos J, 106, 172, 178

**Z**

Zabalegui H, 105  
 Zaldivar I, 118  
 Zamora J, 110, 167, 168  
 Zamorano J, 107, 162  
 Zapata A, 123  
 Zapata AG, 126, 128  
 Zarapuz Fraile L, 114  
 Zarapuz L, 112, 171  
 Zayat M, 147  
 Zubeldia JM, 98  
 Zubiaur M, 83, 130  
 Zulueta J, 119

