

SESIÓN 1: AUTOINMUNIDAD-1

Moderadores: M^a Carmen Gelpí Sabater (Barcelona),
Enrique García Olivares (Granada)

INDUCCIÓN DE TOLERANCIA INMUNOLÓGICA MEDIANTE LA CREACIÓN DE QUIMERISMO MOLECULAR EN UN MODELO ANIMAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE: LA TERAPIA GÉNICA COMO HERRAMIENTA. *Espejo C¹, Eixarch H, Mansilla MJ¹, Castiello M¹, Gómez A², George M², Vidal F³, Montalban X¹, Barquinero J¹.*
¹Unidad de Neuroinmunología Clínica. Hospital Universitario Vall d'Hebron. Barcelona. ²Banco de Sangre y Tejidos. Centro de Tejidos y Terapia Celular. Barcelona. ³Banco de Sangre y Tejidos. Unidad de Diagnóstico y Terapia Molecular. Barcelona

Introducción. En el campo de la terapia génica, el quimerismo molecular en el sistema hematopoyético se asocia con la tolerancia inmunológica frente a los productos del transgen. La encefalomielitis autoinmune experimental (EAE), un modelo de esclerosis múltiple, es una enfermedad inflamatoria y desmielinizante mediada por células T que se induce en animales susceptibles tras la inmunización con proteínas o péptidos de la mielina lo que provoca una parálisis ascendente en los animales. Nuestra hipótesis es que la expresión de un autoantígeno, el péptido encefalitogénico MOG 40-55, en el sistema hematopoyético murino induce tolerancia inmune específica frente a este antígeno, previniendo o mejorando la enfermedad ya establecida.

Métodos. Construimos un vector retroviral bicistrónico que contenía la EGFP y la cadena invariante murina (CD74), en la cual la región CLIP se reemplazó por la secuencia que codifica para el autoantígeno (MOG 40-55) para dirigir la presentación del péptido MOG 40-55 a la vía de MHC clase II. Los ratones se acondicionaron con una dosis no mieloablativa de busulfan y se transplantaron 0,8-1,6x10⁶ células de médula ósea transducidas con el vector que contenía el autoantígeno o el vector control. En el abordaje preventivo, la EAE se indujo 3 semanas después del trasplante, mientras que en el terapéutico el trasplante se realizó 16 días después de la inmunización, tras la aparición de los signos clínicos. Los animales se siguieron clínicamente durante 30-90 días tras la inmunización.

Resultados. En el brazo preventivo, los ratones transplantados con células de médula ósea transducidas con el autoantígeno quedaron protegidos frente a la enfermedad. Se observó protección incluso en animales que tenían niveles de microquimerismo molecular (<1% de células expresando el transgen). En el brazo terapéutico, se observó una reducción significativa de la puntuación clínica en los animales transplantados con células de médula ósea que contenían el autoantígeno.

Conclusión. La creación de quimerismo molecular en el sistema hematopoyético mediante terapia génica constituye una herramienta útil para inducir tolerancia frente al producto del transgen y podría utilizarse para el tratamiento de enfermedades autoinmunes.

LA DEFICIENCIA DE RIP2 EXACERBA LA ENCEFALITIS AUTOINMUNE EXPERIMENTAL. *Fenutría R, Fairhead T, McCully ML, Lemke CD, Davis B, Lozano F, Strejan G, Madrenas J.* The FOCIS Centre of Clinical Immunology and Immunotherapeutics, Robarts Research Institute and the Departments of Microbiology and Immunology and Medicine, the University of Western Ontario, London Ontario, Canada, and Hospital Clinic, Universitat de Barcelona, Barcelona, Spain.

RIP2 (Receptor interacting protein 2), una potencial serin-treonin cinasa, es un modulador de la respuesta inmunitaria tanto innata como adaptativa. Los ratones deficientes de RIP2 (RIP2^{-/-}) presentan una alteración de la señalización a través de la vía de NF-κB, así como defectos en la respuesta mediada por células Th-1.

Dado que se ha relacionado tanto la vía de señalización de NF-κB como la respuesta mediada por Th-1 con el modelo de Encefalitis Autoinmune Experimental (EAE), nosotros hipotetizamos que la falta de RIP2 podría afectar el curso de dicha enfermedad experimental.

Para llevar a cabo nuestra hipótesis, se indujo EAE inmunizando ratones C57Bl6 silvestres (wt) como RIP2^{-/-} con el péptido MOG 35-55. Los ratones RIP2^{-/-} presentaron una respuesta exacerbada de EAE al compararla con los ratones wt, tanto a nivel de la valoración de los parámetros clínicos como anatomo-patológicos (desmielinización). Los ratones RIP2^{-/-} no presentaban diferencias respecto a los wt, en parámetros como el día de inicio de la enfermedad ni en el priming de las células T. Mediante experimentos de transferencia celular se demostró que la inducción de la enfermedad en nuestros ratones era dependiente de células T. La exacerbación de EAE en ratones RIP2^{-/-} fue asociada al alto porcentaje de células T productoras de IL-17 (Th-17) presentes tanto a nivel periférico como infiltrantes en el sistema nervioso central (SNC), mientras que el porcentaje de células productoras de IFN-γ era similar en ambos tipos de ratones.

Nuestros datos sugieren que RIP2 es clave en la regulación de los fenómenos autoinmunes asociados a las células Th-17 en el SNC, posiblemente debido a su papel regulador de la vía de NF-κB.

ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN Y SUPERVIVENCIA DE CÉLULAS DENDRÍTICAS CIRCULANTES MIELOIDES Y LINFÓIDES EN PACIENTES CON ESCLEROSIS MÚLTIPLE. *López C¹, Tintoré M¹, Martín R^{1,2}, Montalban X¹, Comabella M¹.* ¹Institut de Recerca, Unitat de Neuroinmunología Clínica, Hospital Universitari Vall d'Hebron, Barcelona. ²Institut Català de Recerca i Estudis Avançats (ICREA), Barcelona.

Introducción. Las Células Dendríticas (CD) podrían estar implicadas en la patogenia de la esclerosis múltiple (EM). Las CD se clasifican en CD mieloides (CD1), y CD plasmacitoides (CD2), responden a diferentes estímulos, y pueden generar tanto respuestas de tipo Th1 como Th2.

Objetivos. Comparar la expresión de moléculas implicadas en la migración, adhesión y supervivencia de CD, entre pacientes con EM con y sin tratamiento con interferón-beta (IFN- β), así como con controles sanos (CS).

Métodos. La expresión de receptores de quimiocinas (CCR5 y CXCR3), moléculas de adhesión (LFA-1 y CD49), y marcadores de apoptosis (Fas y Bcl-2) se determinó mediante citometría de flujo en 47 pacientes con EM [10 pacientes con EM remitente-recurrente (EMRR), 10 con EM secundariamente progresiva (EMSP), 14 con EM primariamente progresiva (EMPP), y 13 con EMRR en tratamiento con IFN- β] y 19 CS.

Resultados. Se observó un aumento de expresión de Fas en CD2 de pacientes con EM respecto a los CS. El tratamiento con IFN- β aumentó el porcentaje de CD1-CCR5+ y CD2-CCR5+ a la vez que disminuyó la expresión de Bcl-2 en la población CD1.

Conclusiones. El aumento de expresión de Fas en CD2 de pacientes con EM podría indicar una alteración en la maduración de estas células. El IFN- β ejercería su efecto beneficioso favoreciendo la migración hacia el SNC de las CD-CCR5+ y disminuyendo la supervivencia de las CD1, las cuales inducen principalmente respuestas de tipo Th1.

EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS MHC DE CLASE I «NO CLÁSICAS» (MIC) Y DE SU RECEPTOR NKG2D EN PLACAS DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. *Fdez-Morera JL, Tuñón A, Astudillo A, Rodríguez-Rodero S, Rodrigo L, Martínez-Borra J, González S, López-Vázquez A, Lahoz CH, López-Larrea C. Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias.*

MICA y MICB son moléculas «no clásicas» pertenecientes al Complejo Mayor de Histocompatibilidad de clase I (MHC) con una distribución tisular altamente limitada condiciones no patológicas y que son reconocidas por el receptor NKG2D.

Para determinar el papel de la MICA, MICB y NKG2D en la esclerosis múltiple (EM), investigamos su expresión en muestras del tejido cerebral de pacientes con esta enfermedad (n = 9) y muestras de SNC de controles no patológicos (n = 6). Por técnicas de inmunohistoquímica se demostró que MIC y el receptor NKG2D se expresaban intensamente en especímenes del cerebro de pacientes con EM, mientras que eran raramente perceptibles en las muestras de controles no patológicas. Se observó tinción positiva para MIC en placas activas crónicas, en áreas perilesionales y una tinción intensa para NKG2D en los linfocitos que infiltraban las lesiones de EM.

Por otra parte, los niveles IL-15 fueron medidos en sueros de pacientes con EM (n= 27) encontrándose relación entre los niveles más altos con la actividad de la enfermedad (p< 0,01). Para analizar la capacidad de estos sueros de inducir la expresión MICA se incubaron con ellos dos líneas celulares neurales. Se observó un incremento de expresión de MICA y se comprobó que la IL-15 era la responsable parcialmente de esta inducción, probablemente a través de una ruta relacionada con NF-kB.

La demostración de la expresión de las moléculas MIC en las células del SNC y de su receptor NKG2D en el infiltrado mononuclear en lesiones de EM, los altos niveles IL-15 encontrados en sueros de los pacientes del MS relacionados con la actividad de la enfermedad y la expresión inducida de MICA a través de una ruta NF-kB, sugiere el posible papel de la interacción de MIC-NKG2D en la inmunopatogénesis de la EM.

ESTUDIO COMPARATIVO EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA Y SUECA DE LA PRESENCIA DE SÍNTESIS INTRATECAL DE BOC IgM FRENTE A LÍPIDOS DE LA MIELINA. *Gómez-Rial J, Thangarajh M, Alcalá I, Hillert J, Masterman T, Villar LM. ¹Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid. ²Department of Clinical Neuroscience, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Stockholm, Sweden.*

La presencia de Bandas Oligoclonales (BOC) de IgM en LCR constituye un marcador pronóstico desfavorable en pacientes con Esclerosis Múltiple (EM).

En anteriores estudios habíamos demostrado que la presencia intratecal de anticuerpos IgM anti-lípidos de la mielina constituía un marcador temprano para predecir una evolución agresiva de la enfermedad, siendo la fosfatidilcolina el lípido reconocido más frecuentemente en nuestra población.

En colaboración con el Instituto Karolinska (Estocolmo) hemos realizado un estudio ciego en el que hemos analizado la presencia de BOC de IgM en el suero y LCR de 106 pacientes (EM y controles) en la población sueca. Los resultados que se obtuvieron fueron que de 81 pacientes diagnosticados con EMRR, 24 presentaban BOC de IgM frente a los lípidos de la mielina (L+), representando el 30% de los pacientes estudiados, siendo la fosfatidilcolina el lípido más frecuentemente reconocido. Estos resultados son similares a los que habíamos encontrado previamente en la población española.

Se estudió la evolución de los pacientes de modo retrospectivo. Los pacientes con BOC de IgM frente a lípidos de la mielina (L+) alcanzaron antes una discapacidad de 4 en la escala EDSS (p= 0,001) y una forma secundariamente progresiva de la enfermedad (p= 0,01). Así mismo la discapacidad final de los pacientes fue superior en el grupo con IgM frente a fosfatidilcolina (p= 0,02)

Estos resultados corroboran en un estudio ciego y en una población diferente los anteriormente descritos por nuestro grupo sobre el valor pronóstico de estos anticuerpos.

ANÁLISIS PROTEÓMICO COMPARATIVO ASOCIADO A LA EXPRESIÓN DE AIRE EN CÉLULAS EPITELIALES DE TIROIDES. *Álvarez I, Collado J, Colomé N, Canals F, Jaraquemada D. Unidad de Inmunología. U.A.B. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. U.A.B.*

El timo es el órgano donde madura y se genera el repertorio de linfocitos T. Para ello, los timocitos sufren una exhaustiva selección en la que los receptores funcionales de células T (TCRs) deben ver múltiples complejos HLA-péptido, sobreviviendo aquellos linfocitos T que reconocen complejos HLA-péptido con baja afinidad. Los péptidos presentados a los timocitos por las moléculas de HLA en el timo deben ser una muestra representativa de las proteínas propias. Anteriormente se consideraba que los mecanismos de tolerancia periférica eran más efectivos que la tolerancia central en la inhibición de la respuesta celular frente a proteínas de expresión restringida a tejidos periféricos. En los últimos años, sin embargo, se ha detectado la expresión de antígenos específicos de tejido en el timo (expresión promiscua), cuyo control se ha atribuido a la expresión de la proteína AIRE (AutoImmune REgulator). Consecuentemente, la pérdida de la función de AIRE se asocia de forma monogénica recesiva con una enfermedad autoinmune denominada APECED (Autoimmune PolyEndocrinopathy-Candidiasis-Ectodermal Dystrophy), que afecta a múltiples tejidos.

AIRE se expresa principalmente en células epiteliales medulares tímicas (mTECs) y en células dendríticas (DCs). Tiene una localización mayoritariamente nuclear, aunque, al menos en células transfectadas, presenta también una localización filamentosa en el citoplasma. Como se ha comentado, se ha descrito AIRE como el punto de control principal de la expresión promiscua de antígenos restringidos, y debido a su expresión en mTECs y DCs, se ha postulado que está implicada en la selección negativa y, por tanto, a la generación de tolerancia frente a dichos antígenos. Se conoce la influencia de la expresión de AIRE sobre la expresión de otros genes a nivel de RNA pero se desconocen tanto su efecto a nivel proteico como su mecanismo de acción.

En este trabajo hemos realizado un análisis de proteómica comparativa mediante DIGE y geles bidimensionales comparando los proteomas de una línea celular epitelial de tiroides transfectada con AIRE frente al control sin transfectar. Se han observado 85 spots con una expresión diferenciada en el transfectante respecto del control, de los cuales se han podido identificar 57. Entre otras proteínas, en el transfectante se ha visto aumentada la expresión de las chaperonas HSP70 y HSP27, mientras que disminuye la de proteínas relacionadas con el esqueleto de actina-miosina. Estos datos sugieren que la expresión de AIRE en células epiteliales puede modificar el contenido del citoesqueleto, lo que podría estar implicado en la función de dicha proteína.

PREVENCIÓN DE LA ACELERACIÓN DE LA DIABETES AUTOINMUNE MEDIANTE DEPLECIÓN DE CÉLULAS NATURAL KILLER. *Clemente X, Alba A, Planas R, Carrillo J, Puertas MC, Pastor X, Ampudia R, Juan M, Borràs FE, Pujol-Borrell R, Verdager J, Vives-Pi M. Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques, Banc de Sang i Teixits. Fundació Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona.*

La diabetes tipo 1 está causada por la destrucción autoinmune de las células beta pancreáticas. Un modelo experimental de esta enfermedad es el ratón NOD transgénico que expresa IFN-beta en las células productoras de insulina. Estos ratones presentan inflamación e infiltrado insular con inicio clínico de la enfermedad a partir de las tres semanas de edad, momento equivalente a la infancia en humanos. Estudios previos demuestran que las células Natural Killer (NK), mediadoras de la defensa contra células infectadas y tumorales, contribuyen al proceso autoinmune de la diabetes. El objetivo de este trabajo es determinar el papel de las células NK en la diabetes tipo 1 y su aceleración.

Se ha caracterizado la insulinitis en el modelo transgénico NOD RIP-IFNbeta (citometría de flujo) así como la presencia de citocinas y quimiocinas en el tejido diana (LCM, RT-PCR y arrays proteicos). Se ha detectado un aumento significativo de células NK en los islotes de los ratones NOD RIP-IFNbeta en el momento del inicio clínico de la enfermedad (3 semanas), en comparación ratones NOD diabéticos adultos (12 semanas), de un 18% frente a un 3,6%. Este aumento de células NK correlaciona inversamente con la proporción de linfocitos B presentes en la insulinitis. El incremento de células NK va acompañado de un aumento en la expresión de quimiocinas atrayentes de células NK (CCL5 y CXCL10), de citocinas producidas por dichas células -entre otras- (IFNgamma, CCL3 y CCL5) así como de un aumento de IL-12, citocina proinflamatoria que promueve la proliferación de células NK, todas ellas relacionadas con la función y/o activación de NK. Además, la administración *in vivo* de anticuerpo deplecionante de las células NK (anti-asialo GM1), resulta en la prevención total de la forma acelerada de diabetes.

Este ratón representa un modelo en el que una afectación inicial de la célula beta por infección o stress induce la producción de IFN-beta, causa inflamación y acelera la autoinmunidad mediada por células del sistema immune. Entre otros, uno de los múltiples efectos del IFNbeta es inducir la proliferación de las células NK, las cuales a su vez pueden liberar citocinas inflamatorias. Nuestros resultados demuestran que la forma de diabetes acelerada por la citocina antiviral IFN-beta es dependiente de células NK.

ELEVADA FRECUENCIA DE UN REORDENAMIENTO NO PRODUCTIVO EN CÉLULAS T EXPANDIDAS A PARTIR DEL INFILTRADO LINFOCITARIO DE UN PANCREAS DIABÉTICO. *Codina E, Costa M, Planas R, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D, Martí M. Universitat Autònoma de Barcelona*

Los modelos experimentales de diabetes en animales sugieren una cierta restricción del TCR expresado por las células del infiltrado en etapas tempranas de la enfermedad. Sin embargo, los resultados del análisis de células T periféricas obtenidos de pacientes diabéticos no han demostrado restricción alguna. En este contexto, hemos analizado el repertorio de los TCRs expresados por una batería de clones y líneas de células T obtenidas del infiltrado de un páncreas diabético (PB100) procedente de un donante de 19 años que murió tras su diagnóstico (Somoza et al, 1994). Se generaron dos líneas celulares usando dos protocolos de estimulación: AcMo soluble anti-CD3 (L1) o con extracto crudo de islotes extraídos de tejido sano (L2). Las líneas L1 y L2 fueron subclonadas y analizadas para el estudio de las familias V alfa y beta y de la región CDR3 mediante spectratyping. L2 mostró un repertorio más diverso que la línea L1, en la que sólo unas pocas familias resultaron expandidas. La expansión con extracto de islotes generó una mayor diversidad en los TCRs similar a la observada cuando se examinó el repertorio de familias Va y b en dos muestras de un bloque del tejido original congelado. Las líneas oligoclonales obtenidas de ambas expansiones mostraron una combinación dominante de dos familias a y dos b, difícil de explicar por azar del clonaje: Va1, Va22, Vb11, Vb13.1. El subclonaje y análisis de estas células demostró que solamente un TCR se expresaba (Va1, Vb13.1). La secuenciación de los CDR3 de las 4 familias mostró que Va22 era producto de un reordenamiento no-productivo generándose un codón de stop y la expresión en superficie de Vb11 no pudo detectarse por FACS, sin mostrar defectos en su secuencia. No obstante, a pesar de ser un TCR defectivo en dos reordenamientos, esta combinación se ha mantenido después de varios clonajes realizados a partir de las líneas originales. Por otra parte, se han detectado los mismos genes V con idéntico tamaño de CDR3 en el tejido pancreático original, aunque no son cuantitativamente dominantes. Las características estructurales y funcionales de estos TCRs aparentemente no funcionales en las células del infiltrado de un páncreas diabético están siendo evaluadas.

CÉLULAS T EFECTORAS Y REGULADORAS EN EL INFILTRADO LINFOCITARIO DE UN PANCREAS DIABÉTICO. *Costa M, Codina E, Pujol-Borrell R, Jaraquemada D, Martí M. Universitat Autònoma de Barcelona*

La diabetes de tipo I (DT1) es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de células beta del páncreas productoras de insulina. La respuesta inmune es conducida por células T autorreactivas, activadas probablemente en los nódulos linfáticos proximales por un estímulo

hasta ahora desconocido, que cuando infiltran el tejido diana ejercen su función efectora destructiva. La especificidad de las células T que dirigen el ataque autoinmune en la DT1 en humanos es desconocida aunque se han sugerido probables candidatos como la insulina, la descarboxilasa del ácido glutámico, etc. En cambio el mecanismo efector y la capacidad reguladora del infiltrado es desconocido. Hemos analizado el fenotipo, el patrón de citocinas secretado y la capacidad reguladora de una batería de clones y líneas de células T obtenidas del infiltrado de un páncreas diabético (PB100) procedente de un donante de 19 años que murió tras su diagnóstico (Somoza et al, 1994). El fenotipo del infiltrado observado en tinciones de tejido era 12% CD8+ y 5% CD4+. Se generaron dos líneas celulares policlonales usando dos protocolos de estimulación: AcMo soluble anti-CD3 (L1) o extracto crudo de islotes de tejido sano (L2). Para poder estudiar en detalle las células componentes del infiltrado, se realizó una dilución límite de L1 y L2. Todas las líneas/clones procedentes de la expansión con L1 (n=20) eran CD4+ y tan sólo se obtuvieron 2/24 líneas CD8+ a partir de L2. El patrón de citocinas expresado por las líneas analizado mediante CBA (Cytometry Beads Assay, Becton Dickinson) muestra una tendencia hacia un patrón Th2 ya que en general estas líneas expresan elevadas cantidades de IL-5 e IL-4. Cuantitativamente las células son pobres productoras de IFN- γ . Para evaluar la presencia de células reguladoras en el infiltrado se han realizado experimentos de detección de Foxp3 por PCR cuantitativo y por FACS. La mayoría de las líneas expresan Foxp3 después de su activación tal y como se ha descrito en humanos, pero en 2/10 la expresión de Foxp3 es mayor, principalmente nuclear y mantenida, sugiriendo la presencia de células T reguladoras en el infiltrado del páncreas diabético. Se están llevando a cabo ensayos funcionales para demostrar el fenotipo regulador de estas líneas.

IDENTIFICACIÓN DE HAPLOTIPOS DE ALTA SUSCEPTIBILIDAD DEL GEN TSHR A LA ENFERMEDAD DE GRAVES BASEDOW. Colobran R, Armengol MP, Ruiz M, Martínez E, Juan M, Pujol-Borrell R. LIRAD | Banc de Sang i Teixits (BST) | Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

La enfermedad de Graves-Basedow como modelo de tiroiditis autoinmune, y causa de hipertiroidismo más común, está mediada por la producción de anticuerpos contra el receptor de la hormona estimulante de la tiroides (TSHR). El gen del TSHR se extiende unas 200 Kb, con 10 exones y con un intrón 1 de gran tamaño (~106 Kb). En este trabajo se pretende básicamente: 1) Establecer los principales alelos del gen TSHR mediante el genotipado de SNPs y posterior definición de haplotipos, y 2) Analizar si existen haplotipos (alelos) de susceptibilidad a dicha enfermedad mediante un estudio caso-control. Para ello se obtuvieron 137 gDNAs procedentes de pacientes Graves Basedow y 192 gDNAs de población control. Se realizó una secuenciación inicial de la zona promotora del gen y de la zona 3'UTR con 40 muestras para identificar los polimorfismos existentes (consideramos estas dos regiones de especial interés por su posible papel en la regulación de la expresión génica). Concretamente

se identificaron 17 polimorfismos tipo SNP y 1 tipo DIP (Deletion/Insertion Polymorphism). Posteriormente, utilizando los datos existentes sobre SNPs del proyecto HapMap y con su software asociado Haploview, se seleccionaron 31 tagSNPs (SNPs capaces de capturar la mayor diversidad genética posible) distribuidos por todo el gen. Las 329 muestras fueron genotipadas para estos 48 SNPs (17 SNPs secuenciados + 31 tagSNPs) utilizando la tecnología SNPplex, capaz de genotipar simultáneamente hasta 48 SNPs en una única mues-

tra. Los resultados del genotipado muestran un conjunto de SNPs que, analizados individualmente, presentan una distribución significativamente diferente entre el grupo de pacientes y el grupo control ($p < 0,05$), destacando especialmente 8 de ellos por su elevada significación ($p < 0,0008$ y ORs de hasta 5,94). Cabe señalar que todos estos SNPs se encuentran en una región que cubre desde -6126 de la zona promotora hasta el intrón 1, quedando el resto del gen sin ninguna asociación significativa. Más allá de este análisis individual, se han definido los haplotipos utilizando diferentes bloques de LD (desequilibrio de ligamiento) y se han encontrado distintos haplotipos de susceptibilidad a la enfermedad de Graves Basedow ($p < 0,05$), destacando uno de ellos por su alta susceptibilidad ($p = 0,0002$, OR=3,26).

ANÁLISIS DEL EXÓN 11 DEL GEN CARD15 EN UVEÍTIS IDIOPÁTICA. Rodríguez Pérez N, Gorroño MB, Aguinaga A, Pérez Blas M, Martín Villa JM. Universidad Complutense de Madrid.

Introducción. Varios factores genéticos se han implicado en la susceptibilidad a padecer uveítis. Recientemente, mutaciones en el gen CARD15 se han considerado factores de riesgo en determinadas patologías inflamatorias. En concreto, una inserción de citosina en la posición 3020 (3020Cins) del exón 11, que produce un cambio en la pauta de lectura, se ha implicado en la susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn.

Pacientes y métodos. Hemos analizado el exón 11 de este gen en 42 pacientes con uveítis idiopática, y 42 individuos sanos. Se obtuvo muestra de ADN de los pacientes y sanos. Se amplificó mediante PCR con los cebadores y condiciones previamente publicados, y se secuenció en el C.A.I de Genómica de la U.C.M. Ninguno de los pacientes y sólo dos de los controles presentaron la inserción de citosina antes mencionada. Por otra parte, el análisis de las regiones 5' y 3' flanqueantes, mostró dos polimorfismos intrónicos en fase (descritos por primera vez y depositados en el GenBank con el número de acceso #DQ869189), en el 21% de los pacientes y en el 11% de los controles (p N.S.), con lo que tampoco se pueden considerar como factores de riesgo.

Conclusión. Mutaciones en el exón 11 del gen CARD15, consideradas como factor de riesgo en ciertas patologías inflamatorias, no lo son en el caso de las uveítis.

LINFOCITOS INTRAEPITELIALES EN LA ENFERMEDAD CELÍACA ATÍPICA. Andrés A, Camarero C, Garbiñe R. Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid.

Introducción. La enfermedad celíaca es una enteropatía crónica causada por la intolerancia al gluten y cuya incidencia en nuestro medio se estima en torno al 1%.

En la actualidad su diagnóstico requiere el hallazgo de lesiones anatomo-patológicas características en la mucosa del intestino delgado proximal.

El conocimiento del espectro clínico de la enfermedad celíaca ha evolucionado notablemente en los últimos años de forma que en la actualidad se sabe que, al lado de las formas clásicas de la enfermedad, existen otras presentaciones atípicas que se agrupan en las siguientes definiciones: Latente, Potencial y Silente. Su diagnóstico constituye un reto en la práctica clínica, en pacientes mayormente asintomáticos y/o pertenecientes a grupos de riesgo, donde la presencia de marcadores serológicos es inconstante.

Objetivos. Analizar la utilidad diagnóstica y Aplicar los conocimientos adquiridos en el estudio de las sub-poblaciones de linfocitos intra-epiteliales (LIEs) de la mucosa duodenal, en el diagnóstico de la enfermedad celíaca, para la identificación de las formas latentes y potenciales, que quedan actualmente fuera de los criterios morfológicos establecidos.

Definir y evaluar nuevos parámetros inmunológicos eficientes para diferenciar las elevaciones inespecíficas de LIEs respecto de las formas iniciales y atípicas de enfermedad celíaca.

Analizar si los casos latentes y potenciales desarrollan con el tiempo las alteraciones anatomopatológicas típicas de la forma clásica de la enfermedad celíaca.

Materiales y métodos. Presentamos el estudio prospectivo de una serie de 21 pacientes que fueron incluidos en un grupo de trabajo para el diagnóstico de formas atípicas, elegidos entre 737 biopsias de niños, en función de su sospecha clínica, serológica o pertenencia a grupos de riesgo.

En el momento del diagnóstico, los 21 eran EMA positivos y su biopsia fue histológicamente normal (Marsh I o II). El análisis y cuantificación de las subpoblaciones linfocitarias se realizó por citometría de flujo.

Resultados:

- 8 de 21 pacientes terminaron desarrollando enteropatía celíaca (Marsh III).
- 17 de 21 presentaban inicialmente un incremento del número de LIEs.
- 19 de 21 presentaron disminución del porcentaje de los LIEs CD3-CD103+.
- 21/21 presentaron un porcentaje elevado de linfocitos TCRgammadelta.

Conclusiones. El incremento de los LIEs TCRgammadelta y la disminución de los LIEs CD3-CD103+, son parámetros específicos y sensibles que contribuyen a la identificación de la enfermedad celíaca latente/potencial.

El análisis de los LIEs por citometría de flujo es un procedimiento sencillo, que supone una importante técnica diagnóstica en la enfermedad celíaca clásica y, sobre todo, en los casos de presentaciones atípicas.

Los criterios anatomopatológicos diagnósticos vigentes no tienen en cuenta las lesiones de la mucosa duodenal en los estadios I y II de Marsh, mientras que los cambios en las poblaciones linfocitarias son alteraciones inmunológicas iniciales en una mucosa sensible al gluten, lo que proporciona al clínico una importante información en la identificación de estos pacientes.

SESIÓN 2: INMUNOGENÉTICA

Moderadores: Dolores Jaraquemada López (Barcelona),
Manuel Muro Amador (Murcia)

SELECCIÓN PARA LA EVOLUCIÓN INVARIANTE DE LOS GENES DE HISTOCOMPATIBILIDAD DE CANARIOS (GÉNERO SERINUS, CLASE AVES). *Serrano-Vela JI, Lowy E, Moscoso J, Ruiz-del-Valle V, Reguera R, Zamora J, Arnaiz-Villena A. Universidad Complutense y Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid.*

La calibración molecular basada en el ADN mitocondrial nos ha permitido calcular que la radiación de los canarios euroasiáticos

y africanos (género *Serinus*, clase Aves) ocurrió al final del Mioceno, hace 9 millones de años, bien en las altas cumbres asiáticas (la especie *Serinus thibetanus*, en el Tibet) o bien en el sur de África (la especie *Serinus totta*, en Ciudad del Cabo). Mediante secuenciación de ADN se han identificado alelos de histocompatibilidad de clase I en 13 especies diferentes de canarios, observándose que el polimorfismo encontrado en dichos genes es muy bajo, a pesar de la idea extendida de que la variabilidad en el sistema de histocompatibilidad se debe a la variedad de los patógenos locales así como a flujo genético aleatorio.

Esta invariabilidad afecta también al sitio de unión al péptido (PBR) hasta el punto de observarse una evolución transespecífica: un mismo alelo puede encontrarse en especies distintas. La estructura tridimensional de estas moléculas de histocompatibilidad es muy similar a la de las moléculas humanas (HLA), conservándose los residuos de unión a CD8 y los bolsillos A y F, a ambos lados del PBR. Se discute la escasa variabilidad de los genes MHC en especies salvajes, incluidos los mamíferos estudiados, así como su relevancia en la habilidad para presentar antígenos y en el desarrollo de fenómenos de autoinmunidad.

INFLUENCIA DEL GEN KIR3DS1 EN LA SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR ESPONDILITIS ANQUILOSANTE EN POBLACIONES ASIATICAS Y CAUCASOIDES HLA-B27 POSITIVAS.

Díaz-Peña R, Blanco-Gelaz MA, Díaz-Suárez B, Martínez-Borra J, López-Vázquez A, López Larrea C. Histocompatibilidad y Trasplantes. Hospital Universitario Central de Asturias.

Los diferentes loci de los receptores KIRs (Killer cell immunoglobulin-like receptors) son altamente polimórficos, y tienen como ligandos naturales distintas moléculas HLA de clase I.

En el presente estudio se ha realizado un análisis de los genotipos KIR y se ha examinado si la combinación de diferentes genes KIR junto con genotipos HLA-B27 está asociado con susceptibilidad a desarrollar espondilitis anquilosante (EA) en poblaciones caucasoides y asiáticas.

Seleccionamos dos poblaciones caucasoides, una de España (71 pacientes y 105 controles) y otra de las Islas Azores (Portugal) (55 pacientes y 75 controles). Nuestros resultados mostraron un incremento en la frecuencia del gen KIR3DS1 en pacientes con EA comparado con controles B27 ($p < 0,003$ y $p < 0,0001$ en la de las Islas Azores y española, respectivamente). También observamos una disminución del gen KIR3DL1 en pacientes respecto a los controles B27 ($p < 0,0001$ en la población española y $p < 0,003$ en la de las Islas Azores). Se realizó el mismo estudio en dos poblaciones asiáticas B27 positivas, una de China (42 pacientes y 30 controles) y otra de Tailandia (27 pacientes y 16 controles). En pacientes chinos, la frecuencia de KIR3DS1 fue 64,3%, mientras que en controles sanos B27+ fue de 26,6% ($p < 0,01$). En la población tailandesa, el gen KIR3DS1 se encontró también aumentando en pacientes con EA comparados con controles sanos (74% vs 50%), pero las diferencias no resultaron significativas, probablemente debido al bajo número de muestras. En ambas poblaciones asiáticas no se observó ninguna variación en la frecuencia del gen KIR3DL1 de los pacientes AS frente a los controles.

La presencia de KIR3DS1 en pacientes HLA-B*27 positivos parece modular el desarrollo de la enfermedad. La susceptibilidad a desarrollar EA podría estar determinada el balance activación-inhibición derivado de la interacción KIR-HLA.

PAPEL DEL GEN NOS2A EN ENFERMEDAD CELÍACA. Dema B¹, Núñez C¹, Polanco P, Maluenda C³, Figueredo MA¹. ¹Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid. ²Servicio de Gastroenterología Pediátrica, Hospital Universitario La Paz, Madrid. ³Servicio de Pediatría, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Introducción. La enfermedad celíaca es una enfermedad inflamatoria intestinal multifactorial en cuyo origen se encuentran implicados tanto factores genéticos como ambientales. Se sabe que el gluten u otras proteínas similares presentes en algunos cereales originan esta enfermedad en individuos genéticamente susceptibles.

Niveles elevados de óxido nítrico han sido observados en la mucosa de enfermos celíacos como consecuencia de un aumento en la expresión de la óxido nítrico sintasa inducible (iNOS). Nuestro objetivo es estudiar si polimorfismos en el gen NOS2A, que codifica esta enzima, están implicados en el desarrollo de la enfermedad celíaca.

Material y métodos. Se llevó a cabo un estudio caso-control, incluyendo 501 individuos con enfermedad celíaca y 550 individuos sanos empleados como control; y un estudio familiar basado en 171 familias compuestas por el individuo enfermo y ambos progenitores. Todas las muestras correspondían a individuos blancos de origen español y fueron recogidas en la Comunidad de Madrid. Se estudiaron 4 polimorfismos de un único nucleótido (SNPs), rs2779251, rs2779248, rs1137933 y rs2297518, mediante el empleo de ensayos TaqMan (C_159321263_10, C_2593688_10, C_1748185_1 y C_11889257_10, respectivamente) y un microsatélite inserción-delección (TAAA) situado en el promotor del gen, rs12720460, cuyo análisis se realizó mediante PCR seguida de electroforesis capilar en un secuenciador automático ABI 3100.

En la muestra control, los haplotipos fueron estimados mediante el algoritmo EM (*Expectation-Maximization*) que ofrece el software de Genética de Poblaciones Arlequin. En la muestra de enfermos, los haplotipos fueron estimados mediante el algoritmo EM o deducidos directamente de los datos de familias. La comparación de frecuencias en el estudio caso-control se realizó mediante el test chi-cuadrado o test exacto de Fisher cuando los valores esperados fueron menores de 5. Para el estudio familiar se aplicó un TDT (*transmission disequilibrium test*).

Resultados. El estudio caso-control no mostró ningún resultado significativo, ya fuese considerando cada marcador por separado o de forma conjunta mediante el análisis de haplotipos. Sin embargo, el estudio de familias reveló 2 haplotipos (rs2779251- rs2779248-rs12720460-rs1137933-rs2297518), C-G-del(TAAA)-C-C y C-G-ins(TAAA)-C-C, que parecían conferir susceptibilidad y protección, respectivamente, al desarrollo de la enfermedad (20 C-G-del(TAAA)-C-C transmitidos frente a 10 no transmitidos, p= 0,049; 28 haplotipos C-G-ins(TAAA)-C-C transmitidos frente a 44 no transmitidos, p= 0,038). Sin embargo, en ambos casos la significación se pierde tras aplicar la corrección de Bonferroni.

Discusión. El gen NOS2A parece desempeñar algún papel en la predisposición a padecer enfermedad celíaca. Sin embargo, posteriores análisis son necesarios para poder confirmar estos resultados.

MDR1 EN IBD: NUEVOS MARCADORES, NUEVAS CONTROVERSAS. Martín MC¹, Márquez A¹, Taxonera C², Mendoza JL², Díaz Rubio M², Urcelay E¹. ¹Servicio de Inmunología Clínica. ²Servicio de Gastroenterología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

Diversos marcadores en el gen MDR1, que codifica la proteína transportadora P-glicoprotein 170 han sido estudiados en relación con

la EII. Los marcadores C3435T y G2677TA, identificados en análisis de barrido genómico fueron los primeros en ser identificados como candidatos y los mas frecuentes en la literatura. Posteriormente otro marcador en el intrón 3 fue propuesto como polimorfismo etiológico y en los últimos meses se han publicado varios estudios que incluso ponen en entredicho la asociación del gen con la enfermedad inflamatoria intestinal (IBD).

La población de estudio comprende un grupo de 365 controles sanos del área de Madrid, una cohorte de 327 pacientes de colitis ulcerosa (CU) y otra de 328 de enfermedad de Crohn (CD) del mismo área, todos ellos caucásicos blancos. Se analizaron 3 SNPs: C3435T en el exón 27 y el rs3789243 en el intrón 3 mediante sondas TaqMan y el G2677TA en el exón 22 con SYBRGreen. La estimación y asignación de haplotipos se llevó a cabo con el software Phase2.0 y Haploview 2.32. El análisis estadístico se realizó con ayuda del paquete SPSS 13.0.

El genotipo GG en el SNP del intrón 3 parece proporcionar protección frente a CU ($\chi^2=5,28$; p=0,071; GG vs (GA+AA) p= 0,10; OR (95%CI) = 0,78 (0,57-1,07), mientras que el CC en 3435 se asocia a CD ($\chi^2=8,39$; p=0,015; CC vs (CT+TT) p= 0,004; OR (95%CI)=1,61 (1,14-2,27)). Estos tres marcadores definen los haplotipos intron3*A/2677*T/3435*T de protección a CD (p= 0,0024; OR (95%CI)= 0,67 (0,51- 0,88); pc= 0,022), intron 3*A/2677*T/3435*C de susceptibilidad a CD (p= 0,00001; OR (95%CI)=4,31 (2,06-9,27); pc= 0,00018) y el intron3*A/2677*G/3435*T, de susceptibilidad a CU (p= 0,00009; OR (95%CI)=2,69 (1,42-5,17); pc= 0,0009). El haplotipo intron3*A/2677*T/3435*T está disminuido en enfermos de CD respondedores al tratamiento con azatioprina frente a los refractarios (p= 0,14, OR (95%CI)= 0,5(0,18-1,4) vs refractarios; p= 0,018; OR(95%CI)= 0,44 (0,21- 0,93) vs controles) y aumentado en los de afectación ileal frente al resto de las formas clínicas (p= 0,16; OR (95%CI)= 0,71 (0,42-1,19) no ileales vs ileales; p= 0,001 OR (95%CI)= 0,51(0,32-0,79) no ileales vs controles).

En conclusión, los tres marcadores analizados en el gen MDR1-ninguno de los cuales puede considerarse etiológico de manera individual- forman haplotipos, cuya presencia o ausencia proporciona información acerca de la susceptibilidad tanto a CD como CU y, en el caso de CD, también de la forma clínica y de la respuesta de los pacientes a azatioprina.

INFLUENCIA DEL GEN MIF (MACROPHAGE MIGRATION INHIBITORY FACTOR) EN LA ARTRITIS REUMATOIDE. Varadé J¹, Sánchez-López M¹, Orozco G², Pascual D³, Fernández-Gutiérrez B¹, Martín J¹, Gomez de la Concha E¹. ¹Hospital Clínico San Carlos. ²Instituto de parasitología y biomedicina Lopez Neira, CSIC Granada. ³Hospital la Paz, Madrid.

El factor inhibidor de migración de macrófagos (MIF), es una citoquina implicada en varias enfermedades autoinmunes como son: la artritis reumatoide (AR), el lupus eritematoso sistémico, la glomerulonefritis, y la esclerosis múltiple. En el estudio del papel de este gen en la AR existen opiniones variadas que van desde a falta de asociación de los polimorfismos estudiados con la AR, hasta afirmar su papel en la gravedad o la susceptibilidad a la enfermedad. Ante esta controversia decidimos estudiar el papel de este gen en la AR en población española.

Analizamos dos polimorfismos situados en el promotor del gen un SNP («single nucleotide polymorphism») consistente en un cambio G/C situado en -173 y un tetranucleótido (CATT)5-8 localizado en -

794. El grupo de estudio comprendía 606 pacientes con AR, procedentes del Hospital Clínico (Madrid), del Hospital La Paz (Madrid), y del Hospital Virgen de las Nieves (Granada) y 808 controles sanos de las regiones de Madrid y Granada. El tipaje del SNP se realizó con un ensayo TaqMan en un analizador 7900HT y el microsatélite se amplificó y posteriormente se analizó con un secuenciador automático ABI Prism 3100: Las frecuencias de los haplotipos formados por estos polimorfismos se infirieron mediante el algoritmo de expectación-maximización implementado en el software Arlequin v2.0.

Como resultado del estudio caso-control observamos que tanto los portadores del alelo -173C [p= 0,01; OR= 1,3 (1,06-1,62)] o del genotipo (CAAT)*77 [p= 0,018; OR= 3,71 (1,06-16,28)] estaban asociados a un aumento de susceptibilidad a AR.

El haplotipo de riesgo (CAAT)7/-173C, que como se ha visto en estudios previos es transmitido en exceso en pacientes con artritis juvenil idiopática, al compararlo con controles es significativamente más frecuente en individuos con una edad de debut temprana (12,8%) [p= 0,0004 OR= 1,70 (1,25-2,31)] frente a los de edad de debut tardía (7,1%) [p= 0,66 OR= 0,91 (0,57-1,44)].

En conclusión, las variaciones estudiadas en el promotor del gen MIF aumentan la predisposición a padecer AR, principalmente en aquellos pacientes de edad de debut temprana.

ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACROFAGOS CON LA ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL. *Oliver J, Márquez A, Gómez-García M, Martínez A, Mendoza J, Vilchez JR, López-Nevoit MA, Piñero A, Concha EG, Nieto A, Urcelay E, Martín J. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada.*

Objetivo. La enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU) son enfermedades comunes, crónicas e inflamatorias agrupadas dentro de la enfermedad inflamatoria intestinal (EII). Estudios epidemiológicos y de ligamiento sugieren que los factores genéticos juegan un papel determinante en la susceptibilidad de la EII.

El factor inhibidor de la migración de macrófagos es una citoquina inmunomoduladora, de carácter proinflamatorio, implicada en la patogénesis de la EII.

El objetivo de nuestro estudio fue analizar la influencia de los polimorfismos del gen MIF en la susceptibilidad a la EII.

Material y métodos. Se analizaron 1295 pacientes (634 de CU y 661 de EC) y 887 controles sanos de dos poblaciones independientes (Madrid y Granada). Ambos grupos fueron genotipados para los marcadores de la región promotora del gen MIF, (CATT)n mediante PCR combinado con tecnología fluorescente y para la variante -173 G/C, el tipaje se realizó por PCR a tiempo real mediante sondas Taqman.

Resultados. Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo MIF* -173G/C muestran una fuerte asociación con la EII, especialmente el alelo MIF -173°C que se observó asociado con la susceptibilidad a padecer EII (P=0,0003; OR 1,37 IC 95% 1,1-1,6). Al estratificar los pacientes en EC y CU se observa que el alelo MIF -173°C está asociado a ambas patologías: EC (P=0,0046; OR 1,3; IC95%, 1,1-1,6) y CU (OR 1,4; P=0,001; IC 95%, 1,1-1,6). El incremento de la OR en los pacientes homocigotos muestra un efecto dosis dependiente del alelo MIF -173°C.

Conclusión. Nuestros datos sugieren que el gen MIF juega un papel relevante en la predisposición genética a la EII.

ANÁLISIS DE DOS VARIANTES GENÉTICAS FUNCIONALES DEL FACTOR REGULADOR DE INTERFERON 5 (IRF5) EN ARTRITIS REUMATOIDE. *Rueda B¹, González-Gay MA², Balsa A³, Pascual-Salcedo D⁴, Pascual M⁵, Alarcón-Riquelme ME⁵, González-Escribano MF⁶, Martín K¹.* ¹Instituto de Biomedicina López-Neyra, CSIC, Granada. ²Servicio Reumatología, Hospital Xeral-Calde, Lugo. ³Servicios de Reumatología, Hospital Universitario La Paz, Madrid. ⁴Servicio de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, Madrid. ⁵Department of Genetics and Pathology, Uppsala University, Uppsala, Suecia. ⁶Servicio de Inmunología, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.

Introducción. Datos recientes sugieren que el factor regulador de interferón (IRF5) juega un papel fundamental en numerosos procesos celulares. Es de destacar su papel de regulación de la transcripción de genes relacionados con el proceso inflamatorio como los de diversas citoquinas, entre ellas el interferón alpha (IFN- α 945). Se han descrito dos variantes genéticas del gen IRF5 (rs2004640 en el exon 1 y rs2280714 en la región 3' UTR) con importante relevancia funcional ya que afectan al procesamiento del ARNm del gen IRF5 y a sus niveles de expresión. Además, se ha descrito que estos dos polimorfismos confieren susceptibilidad al lupus eritematoso sistémico (LES). El objetivo del presente trabajo fue analizar la posible contribución del gen IRF5 en la susceptibilidad a artritis reumatoide (AR).

Métodos. Se analizaron tres cohortes caso-control independientes procedentes de España (724 pacientes de AR y 542 controles sanos), Suecia (281 pacientes de AR y 472 controles sanos) y Argentina (284 pacientes de AR y 286 controles sanos). El genotipado de los polimorfismos IRF5 rs2004640 y rs2280714 se realizó mediante PCR a tiempo real con sondas Taqman.

Resultados. En las tres cohortes estudiadas no se identificaron diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes de AR y los controles en cuanto a la distribución alélica y genotípica de los polimorfismos rs2004640 y rs2280714. El análisis de los haplotipos formados por estas dos variantes genéticas no mostró ningún haplotipo asociado con predisposición genética a la AR.

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren que los polimorfismos funcionales del gen IRF5 analizados no parecen estar implicados en la susceptibilidad a la AR.

AUTOANTICUERPOS, HLA Y PTPN22: MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD A ARTRITIS REUMATOIDE. *Orozco G, Pascual-Salcedo D, Cobo T, Martín-Mola E, Balsa A, Martín J. I.P.B. Lopez Neyra. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC).*

Hemos evaluado la combinación de la presencia de autoanticuerpos, tales como el factor reumatoide (FR) y los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (anti-PCC), alelos HLA-DRB1 y el polimorfismo 1858 C/T de la proteína tirosín fosfatasa no receptor 22 (PTPN22), como marcadores de susceptibilidad a la artritis reumatoide (AR), utilizando una cohorte de artritis de inicio.

Se incluyeron pacientes procedentes de la clínica de artritis temprana del Hospital Universitario de La Paz, Madrid. En el momento de su inclusión en la cohorte o durante el seguimiento, 155 pacientes cumplían los criterios de la ACR para AR y 136 individuos sufrían otras artropatías. El FR y los anti-PCC se detectaron en suero de pacientes mediante nefelometría y ELISA, respectivamente. Los alelos HLA de clase II se determinaron mediante reacción en cadena de

la polimerasa (PCR). El genotipaje del polimorfismo PTPN22 1858C/T se realizó mediante un ensayo de discriminación alélica TaqMan 5'.

La presencia de alelos del epítipo compartido (EC) está fuertemente asociada con la presencia en suero de anticuerpos anti-PCC ($P=0,0001$; OR 2,67, 95% CI 1,57-4,54), así como del FR ($P=0,0001$; OR 2,72, 95% CI 1,62-4,57). Sin embargo, el EC parece estar asociado primordialmente con los anti-PCC, pero no con el FR, ya que no encontramos una asociación significativa entre el EC y el FR, independientemente del estatus anti-CCP. Cuando comparamos las frecuencias alélicas o genotípicas del polimorfismo de un sólo nucleótido (SNP) del gen PTPN22 entre pacientes de AR y pacientes sin AR, no encontramos diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, la combinación de la variante 1858T y la presencia de anticuerpos anti-PCC resultó ser altamente específica de la enfermedad. Además, esta combinación está significativamente asociada a la AR ($P=0,002$; OR 6,65, 95% CI 1,21-36,55).

En conclusión, la combinación de la variante T del polimorfismo en posición 1858 del gen PTPN22 junto a la presencia de anticuerpos anti-PCC, preferentemente en un individuo EC positivo, está asociada con la AR.

EL POLIMORFISMO DE REPETICIÓN DEL GEN DE LA ASPORINA EN LA ARTRITIS REUMATOIDE. Torres B, Orozco G, García-Lozano JR, Oliver J, Fernández O, González-Gay MA, Balsa A, García A, Pascual-Salcedo D, López-Nevot MA, Núñez-Roldán A, Martín J. Servicio de Inmunología. HU Virgen del Rocío. Sevilla.

Antecedentes. La destrucción irreversible de cartílago, tendones y hueso de las articulaciones es característica de la artritis reumatoide (RA) y de la osteoartritis (OA). La RA es una enfermedad autoinmune en la que se ven afectadas numerosas articulaciones, por el contrario, la osteoartritis se produce por un exceso de uso y daño de un número pequeño de articulaciones. Sin embargo, en ambas enfermedades, las citoquinas proinflamatorias estimulan la producción de metaloproteinasas que pueden degradar los componentes de la matriz extracelular. La asporina pertenece a una familia de proteínas-glicanos ricos en repeticiones de leucina y asociados con la matriz de cartílago. Se ha descrito asociación de la OA con un polimorfismo funcional consistente en un número variable de repeticiones de ácido aspártico (D) localizado en la región del gen de la asporina (ASP) que codifica la zona N terminal de la proteína.

Objetivo. Investigar el papel de este polimorfismo funcional localizado en el gen ASPN en la susceptibilidad y evolución clínica de la RA.

Material y métodos. Se incluyeron en el estudio un total de 803 pacientes con RA y 904 controles sanos con la misma distribución de edad y sexo. El polimorfismo de repetición en el gen ASPN se genotipó en ambos grupos utilizando el módulo de análisis de fragmentos en un analizador genético Beckman Coulter CEQ 8000. Para la comparación de frecuencias se utilizó el test de χ^2 y para la comparación de medias ANOVA.

Resultados. Detectamos 10 alelos que codificarían 11-20 residuos D en nuestra población, siendo D13 el alelo más común (45,5% en controles). Solamente otros 2 alelos presentaban una frecuencia superior al 10% en nuestra población control, D14 (13,6%) y D15 (22,1%). No se observaron diferencias significativas en la distribución de ale-

los entre el grupo de pacientes RA y el grupo control. Sin embargo, al analizar la posible relación de este polimorfismo con las características clínicas del grupo de pacientes se observó que la producción de factor reumatoide era más frecuente entre los individuos D14 (85,7% vs 72,1% en el resto, $p=0,006$, OR= 2,35, 95% CI 1,21-4,50) y la media de edad de inicio de la enfermedad era más alta en el grupo de individuos D13 (50,09 \pm 13,94 vs 47,21 \pm 14,31 en el resto), aunque la diferencia no alcanzó significación estadística en este último caso ($p=0,06$).

Conclusión. Nuestros resultados indican que la asporina no se encuentra asociada con la susceptibilidad a la artritis reumatoide aunque no se puede descartar la influencia de este gen en la evolución clínica de la enfermedad.

ASOCIACIÓN DE VARIANTES GÉNICAS EN EL PROMOTOR DEL GEN FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS CON EL LUPUS ERITEMATOSO. SISTÉMICO. Sánchez E¹, Gómez LM¹, González-Gay MA², Jiménez-Alonso J³, Ortego-Centeno N⁴, Ramón E⁵, González-Escribano MF⁶, Martín J. ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra» (CSIC), Granada. ²Hospital Xeral-Calde, Lugo. ³Hospital Virgen de las Nieves, Granada. ⁴Hospital Clínico San Cecilio, Granada. ⁵Hospital Carlos-Haya, Málaga. ⁶Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.

Introducción. El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es una citoquina inmunoreguladora con actividad proinflamatoria que juega un papel crítico en la activación de células T y activa señales de proliferación de células B. Dos polimorfismos en el promotor de este gen (MIF -173G/C y MIF -794 CATTn) se han visto asociados con una mayor producción de proteína MIF y con susceptibilidad a otras enfermedades autoinmunes. Lo cual sugiere que MIF es un buen gen candidato para el estudio del lupus eritematoso sistémico (LES).

Objetivos. El objetivo de este estudio fue investigar la influencia de un polimorfismo funcional en el promotor del gen factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) con el lupus eritematoso sistémico (LES).

Metodología. Se analizó la distribución de estas dos variantes genéticas en 711 pacientes de LES y 755 controles sanos. El tipaje de MIF -173G/C se realizó mediante PCR por ensayos TaqMan de discriminación alélica prediseñados y para el microsatélite MIF -794 CATTn se usó PCR combinada con tecnología fluorescente.

Resultados. Se observaron diferencias estadísticamente significativas en la distribución del alelo MIF -173°C entre pacientes de LES (17%) y controles sanos (13,2%) ($P=0,004$, [OR] 1,34, [95% CI] 1,05-1,27). Además se vio que la frecuencia del genotipo MIF -173°C/C era mayor en pacientes de LES (4,6%) que en controles sanos (1,8%) ($P=0,002$, OR= 2,58, 95%CI= 1,32-5,10). Por el contrario, no se encontraron diferencias en la distribución del microsatélite CATTn entre pacientes de LES y controles. No obstante, al analizar los haplotipos formados por -794 CATTn -173G/C se observó que solo el haplotipo CATT7-MIF -173°C estaba asociado con susceptibilidad a LES ($P=0,001$, [OR] 1,84, [95% CI] 1,35-2,79). No se encontró asociación de estos polimorfismos de MIF y los parámetros demográficos y clínicos testados para pacientes de LES.

Conclusión. Nuestros resultados sugieren que el alelo MIF -173°C y el haplotipo CATT7-MIF -173°C, confieren susceptibilidad a LES en la población española.

UN POLIMORFISMO EN EL GEN MHC2TA SE ASOCIA FUERTEMENTE A LA PRESENCIA DE REPLICACIÓN ACTIVA DEL VIRUS HHV6 EN PACIENTES ESPAÑOLES DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE. Mas A, Álvarez-Lafuente R, García-Montojo M, Arroyo R, Martínez A. Hospital Clínico San Carlos

Introducción. Uno de los factores ambientales más importantes asociados con la Esclerosis Múltiple (EM) es la replicación activa del Herpes Virus 6 (HHV6), que aparece en el 15% de estos enfermos. En este estudio tratamos de evaluar la presencia de un polimorfismo situado en el gen MHC2TA (regulador de la expresión de los genes de HLA de clase II que se ha visto recientemente asociado con la susceptibilidad a padecer EM) en relación con la presencia o ausencia de replicación activa del HHV6.

Métodos. se realizó el análisis de 104 enfermos de EM tanto para un polimorfismo situado en el gen MHC2TA como para la presencia del virus en suero. El SNP estudiado es una transversión G/C exónica (rs4774). La presencia del virus en el suero, indicativa de replicación activa, de los pacientes se evaluó mediante PCR cuantitativa. Además se incluyó en el estudio un grupo de 405 individuos sanos españoles de la misma región, para evaluar las frecuencias alélicas en nuestra población.

Resultados. La proporción de portadores del alelo menos frecuente (C) resultó mayor en los enfermos con replicación activa del virus (74%) que en aquellos pacientes con niveles no detectables de virus en suero -o replicación negativa- (37%). Esta proporción también resultó significativamente menor en el grupo control (43%). Las frecuencias alélicas asimismo fueron diferentes (21C/25G en los pacientes positivos frente a 32C/130G en los pacientes negativos, $p=0,0004$).

Conclusiones. Nuestros resultados evidencian por primera vez la interacción entre un factor genético y la replicación del HHV6 en un grupo de enfermos españoles de Esclerosis Múltiple.

TIPIFICACIÓN STR PARA LA EVALUACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD HLA PREIMPLANTACIONAL Y DETECCIÓN DE MUTACIONES DEL GEN FANC E. *Faner R¹, Parriego M², Veiga A², Vidal F², Pujol-Borrell R¹, Palou E¹, Juan M¹.* ¹Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD), Banc de Sang i Teixits (BST), ²Institut d'Investigació en Ciències de la Salut Germans Trias i Pujol (IICSCTIP), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

En la región del MHC humano (HLA) se han descrito un elevado número de repeticiones cortas en tándem (STR) que presentan polimorfismo en su longitud. Los loci HLA y los polimorfismos de STR son heredados en bloques haplotípicos, y por tanto se puede definir un elevado desequilibrio de ligamiento entre ellos. Dicha característica, hace posible que la diversidad STR individual sea indicativa de una tipificación HLA, y que en el contexto de haplotipos HLA familiares preestablecidos sea posible utilizar la tipificación STR para inferir la tipificación HLA. El objetivo de este trabajo ha sido el desarrollo de una estrategia para la evaluación de la compatibilidad HLA en estadio pre-implantacional, a la vez que se obtiene el diagnóstico de mutaciones en el gen Fanc-E (en concreto de la inserción 1417A y la mutación 1111C>T). La finalidad del estudio, es pues, la selección de blastómeros sanos, procedentes de parejas con voluntad de concebir un descendiente HLA compatible y sano que sea donante para el trasplante a un hermano afectado por una enfermedad muy grave.

En la puesta a punto de la prueba, hemos valorado las condiciones para la genotipificación de 39 STR, que constituyen el panel para el establecimiento de los haplotipos HLA parentales. A partir de este panel inicial, grupos de 5 a 7 STR informativos (indicativos de la tipificación HLA que se busca) han sido analizados en blastómeros individuales, para evaluar la capacidad de identificación haplotípica HLA en célula única.

Para la genotipificación de mutaciones en el gen Fanc E, han sido diseñados cebadores colindantes a los exones 5 y 9, a la vez que una pareja de cebadores más interna para la secuenciación directa de dichos exones. Para validar la utilidad de dicho método de genotipificación en célula única, se han usado blastómeros sanos. Se está en proceso de optimización de las condiciones para la realización de ambas pruebas (mutaciones de Fanc E y genotipificación STR) simultáneamente en el mismo blastómero.

En conclusión, podemos decir que hemos demostrado la habilidad discriminativa y la reproducibilidad de la genotipificación STR y Fanc E en célula única, y tenemos ahora las herramientas para realizar dicha prueba en un caso de tipificación HLA con genotipificación Fanc E preimplantacional real.

GENES HLA EN LOS LAMAS DEL AMAZONAS PERUANO. *Arnaiz-Villena A¹, Seclen S², Serrano-Vela J¹, Villena A², Martínez-Laso J³, Zamora J¹, Moscoso J¹.* ¹Universidad Complutense y Centro de Transfusión de la Comunidad de Madrid. ²Universidad Cayetano Heredia, Lima, Perú. ³Instituto de Salud Carlos III.

Los Lamas son los descendientes de los Chancas del centro de los Andes peruanos que, empujados por los Quechuas, se establecieron en la ciudad amazónica de Lamas (en el distrito de Wayku, provincia de San Martín, Perú) antes de la conquista española de 1532. El perfil genético HLA de los Lamas presenta diferencias importantes cuando se compara con otras poblaciones amerindias porque: a) se han encontrado más haplotipos HLA extendidos nuevos que en otras poblaciones, entre otros HLA-A*02-B*48-DRB1*0403-DQB1*0302, A*02-B*48-DRB1*0804-DQB1*0402 y A*02-B*40-DRB1*0407-DQB1*0302; b) los alelos HLA-DRB1*0901 (frecuente en el sudeste asiático) y HLA-B*48 (típico de poblaciones siberianas, esquimales y Na-Dene) aparecen en alta frecuencia en Lamas (al igual que en Quechuas y Aymaras) pero son escasos en otras poblaciones amerindias (en especial de Centroamérica); y c) los dendrogramas Neighbor-Joining y los análisis de correspondencia indican que los Lamas (primero Chancas del altiplano peruano) pueden tener su origen en poblaciones indígenas del Amazonas que posteriormente alcanzaron la montaña andina.

EL LOCUS GENÉTICO DE LOS ANTICUERPOS DEL GECKO LEOPARDO (EUBLEPHARIS MACULARIUS). *Sanchez Espinel C, Gambón Deza F.* Complejo Hospitalario Universitario de Vigo.

Nosotros estamos secuenciando el locus genéticos de las regiones constantes de los anticuerpos del reptil gecko leopardo (*Eublepharis macularius*). En trabajos anteriores hemos descrito un anticuerpo similar a la inmunoglobulina X (IgX) de *Xenopus laevis*. Un estudio más detallado de este anticuerpo concluyó que se había formado por un proceso de recombinación entre la inmunoglobulina M (IgM) e inmunoglobulina Y (IgY).

Ahora presentamos más datos en que evidenciamos que este proceso de recombinación ha ocurrido varias veces en la evolución. De los estudios de la antigüedad de los procesos de recombinación concluimos que la IgX de *Xenopus*, la IgA de *Eublepharis* y la IgA de mamíferos son procesos de recombinación diferentes. El proceso de recombinación que dio origen a la IgA de los mamíferos es el más antiguo, el que dio lugar a la IgX de *Xenopus* ocurrió en la diferenciación de los batracios y el que dio lugar a la IgA de *Eublepharis* ocurrió recientemente y es específico de la línea de los reptiles. Por lo tanto el contexto evolutivo de la IgA estaría dentro de un proceso de evolución convergente. Además también presentamos la secuencia de dos inmunoglobulinas M presentes en el locus. Estas IgM tienen cuatro dominios con características similares a todas las IgMs descritas hasta ahora. Las dos proceden de un proceso de duplicación que ocurrió específicamente en la línea de diferenciación de los reptiles. Además también tenemos datos concluyentes de la presencia de IgD en los reptiles.

SESIÓN 3: CÉLULAS DENDRÍTICAS Y MACRÓFAGOS. PRESENTACIÓN ANTIGÉNICA. VACUNAS E INMUNOTERAPIA

Moderadores: Pedro Aparicio Alonso (Murcia),
África González Fernández (Vigo)

PAPEL DE LAS CÉLULAS PLASMACITOIDES DE TIMO HUMANO EN LA GENERACIÓN DE CÉLULAS T REGULADORAS. *Martín-Gayo E, Toribio ML. Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa» (CBMSO).*

Uno de los mecanismos responsables del establecimiento de la tolerancia inmunológica a antígenos propios es la generación de células T reguladoras (Tregs) CD4⁺ CD25⁺Foxp3⁺. El timo es uno de los principales lugares fisiológicos de generación de células Tregs. Estudios previos sugieren que algunos timocitos CD4⁺ seleccionados positivamente son capaces de evitar la selección negativa y diferenciarse a células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺, proceso que requiere la participación de las células dendríticas (DCs) tímicas. En el timo humano se han descrito dos tipos de DCs, denominadas células dendríticas convencionales (cDCs) y células dendríticas plasmacitoides (pDCs). Mientras que las cDCs parecen ser importantes en la generación de Tregs en el timo, el papel que desempeñan las pDCs en dicho proceso aún no ha sido estudiado. En este trabajo demostramos que sólo las pDCs de timo humano activadas con CD40L e IL3, que expresan altos niveles de las moléculas co-estimuladoras CD86 y CD80, so

capaces de inducir la proliferación y diferenciación de células Tregs CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ a partir de timocitos CD4⁺CD8⁺CD25⁻ tras 7-9 días de co-cultivo, a diferencia de las pDCs tímicas no estimuladas. El análisis funcional de las células CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ generadas *in vitro* demostró que eran capaces de inhibir la proliferación de linfocitos T periféricos en respuesta a anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28.

Estos datos evidencian la capacidad de las pDCs de timo humano de inducir la proliferación y diferenciación de células Treg, apoyando su relevancia funcional en dicho proceso y por tanto, en el establecimiento de la tolerancia central.

LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS DERIVADAS DE MONOCITOS INMADURAS PRODUCEN Y SECRETAN α -DEFENSINAS 1-3. *Rodríguez-García M, Oliva H, Climent N, Gatell JM, Gallart T. Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS, Barcelona.*

Las defensinas son moléculas efectoras de la inmunidad innata con actividad antimicrobiana amplia (bacterias, hongos, virus), que actúan también sobre la inmunidad adaptativa, pues son quimiotácticas para células T, monocitos y células dendríticas inmaduras. Son péptidos catiónicos pequeños, ricos en cisteínas, y según los enlaces disulfuro entre éstas, las defensinas humanas se dividen en α y β . Las α -defensinas 1-3 han sido las más estudiadas y son un constituyente notable de las proteínas totales de los neutrófilos, donde se almacenan en gránulos. Recientemente, se ha descrito también presencia de RNA de tales defensinas en otras poblaciones leucocitarias como monocitos, macrófagos, células NK y células T $\gamma\delta$. El objetivo de este trabajo ha sido investigar si las células dendríticas (CD) mieloides producen α -defensinas 1-3, una hipótesis plausible, dado su linaje y el hecho de que ello resultaría útil para su función de procesar a los patógenos capturados e iniciar la respuesta protectora T frente a los mismos. Se utilizaron CD mieloides derivadas de monocitos (CDDM) inmaduras y maduras, obtenidas de individuos normales voluntarios. Las inmaduras se generaron mediante cultivo de 5 días de los monocitos en medio libre de suero y 1% de suero humano en presencia de GM-CSF +IL-4 (CDDM inmaduras), y se hicieron madurar mediante dos días adicionales de cultivo con el cóctel madurativo convencional (IL-1 β + IL-6+ TNF- α + PGE-2). Se desarrolló y validó una RT-PCR a tiempo real para cuantificar la expresión relativa de mRNA de α -defensinas 1-3. Las defensinas secretadas en el sobrenadante se midieron mediante un ELISA y las intracelulares por citometría de flujo. Las CDDM inmaduras contenían altos niveles de mRNA, mucho mayores que los presentes en los monocitos de los que procedían. Sorprendentemente, tras dos días de cultivo con el cóctel de maduración, el mRNA se hacía indetectable. Las defensinas no se pudieron detectar mediante tinción intracelular ni en las CDDM maduras ni en las inmaduras, pero en cambio se secretaban al medio de cultivo y los niveles máximos se alcanzaban en el estadio de CDDM inmaduras. La secreción de α -defensinas 1-3 en el estadio de CDDM inmaduras fue mucho mayor que la observada con los monocitos mantenidos en cultivo durante 5 días. Además, cuando las CDDM inmaduras se estimularon con cada componente individual del cóctel de maduración se produjo un aumento en la secreción de α -defensinas 1-3 con respecto a las CDDM inmaduras, especialmente con la IL-1 β , mientras que cuando se utilizaba el cóctel completo, los niveles tendían a disminuir, sugiriendo que pudieran ser consumidas autocrínicamente. Este estudio demuestra que las CD-DM inmaduras sintetizan y secretan α -defensinas 1-3 y que esta secreción puede ser incrementada por citocinas pro-inflamatorias. Se requieren más estudios para averiguar el control de la expresión transcripcional de α -defensinas 1-3, su traducción y secreción.

IL-12 E IL-18 AUMENTAN LA SUPERVIVENCIA EN MONOCITOS DE SANGRE PERIFÉRICA. *Coma G, Peña R, Clotet B, Blanco J, Bofia M. Fundació irsicaixa.*

Los monocitos en cultivo presentan una muerte espontánea que puede ser inhibida mediante la adición al cultivo de GM-CSF, M-CSF

o IFN- γ . El trabajo que a continuación se presenta demuestra como las interleucinas IL-12 e IL-18 juntas e *in vitro* facilitan la supervivencia de monocitos en cultivo independientemente del sistema CD95/CD95L y de Bcl-2, dos de las principales vías previamente relacionadas con la apoptosis espontánea de monocitos.

Los monocitos fueron aislados a partir de sangre periférica de tres donantes sanos y se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con un 10% de SBF, IL-12, IL-18, IL-12/IL-18 o M-CSF. La supervivencia de los cultivos se determinó mediante recuento de núcleos por citometría de flujo al inicio del cultivo, 24, 48, 72 y 144 horas. La expresión de CD95 y CD95L se determinó por citometría de flujo y su funcionalidad por ensayos de citotoxicidad en cocultivos de monocitos con células THP-1 o NIH-3T3 transfectadas con CD95L humano. Los niveles de Bcl-2 se determinaron por microscopía y por ELISA a las 24 y 48 horas; los niveles de CD95L también fueron cuantificados por ELISA.

La estimulación con IL-12 e IL-18 indujo una supervivencia del cultivo similar al control positivo con M-CSF (65% de células viables a las 144 horas de cultivo) y mayor que los cultivos en medio solo o con IL-12 e IL-18 por separado (<10% de viabilidad a 144 horas). Mediante citometría de flujo y cuantificación por ELISA no se observaron diferencias en la expresión de CD95 ni CD95L en los diferentes tratamientos. En ensayos de citotoxicidad, IL-12/IL-18 no tenían ningún efecto sobre la funcionalidad de CD95 o CD95L. La supervivencia detectada en cultivos con IL-12/IL-18 tampoco se relacionó con un aumento en la expresión de Bcl-2.

A pesar de que todavía se deben elucidar las vías implicadas en el aumento de la supervivencia por IL-12 e IL-18 en monocitos en cultivo, IL-12/IL-18 tienen un efecto directo sobre éstos, aumentando su supervivencia sin variar la expresión de CD95/CD95L ni su funcionalidad, así como tampoco la expresión de Bcl-2.

LSECTIN MEDIA CAPTURA DE ANTÍGENO Y RECONOCIMIENTO DE PATÓGENOS EN CÉLULAS MIELOIDES HUMANAS. *Dominguez-Soto A, Aragoneses-Fenoll L, Martín-Gayo E, Martínez-Prats L, Colmenares M, Naranjo-Gómez M, Borrás FE, Muñoz P, Zubiaur M, Toribio ML, Delgado R, Corbí AL. Centro de Investigaciones Biológicas, CIB, CSIC.*

LSEctin (CLEC4G) es una lectina tipo C codificada en el cluster de genes L-SIGN/DC-SIGN/CD23. Esta lectina se describió como una proteína de expresión restringida a células endoteliales de sinusoides hepáticos y nódulo linfático. Sin embargo, en este trabajo describimos su expresión en linaje mielóide, concretamente en células dendríticas de sangre periférica, así como en poblaciones mieloides de timo aisladas *ex vivo*. LSEctin se expresa también en células dendríticas y macrófagos derivados de monocitos. *In vitro*, IL-4 induce la expresión de al menos tres isoformas generadas por splicing alternativo, incluyendo una forma potencialmente soluble ($\Delta 2$ isoforma), una forma con un cuello reducido ($\Delta 3/4$ isoforma) y la forma prototípica. LSEctin funciona como posible receptor de patógenos, y a que su expresión confiere a células leucémicas la capacidad de unir virus Ebola. Por otra parte, estudios de reconocimiento de azúcares muestran que LSEctin reconoce específicamente N-Acetyl-Glucosamina, no reconociendo Manosa o N-Acetyl-Galactosamina asociada a matrices de agarosa. Esta lectina presenta capacidad de internalizar, con una cinética propia de este tipo de lectinas, proceso dependiente de la integridad de motivos tirosina y diglutámico presentes

en la región citoplásmica de esta molécula. Por tanto, LSEctin podría considerarse un PAMP receptor, siendo una molécula implicada en captación e internalización de antígenos para una posterior presentación. Por todo ello, LSEctin se presenta como una posible molécula-diana para estrategias de vacunación.

ANÁLISIS DEL REPERTORIO PEPTÍDICO ASOCIADO A HLA-DR10. *Álvarez I, Collado J, Daura X, Colomé N, Rodríguez-García M, Gallart T, Canals F, Jaraquemada D. Unidad de Inmunología. U.A.B. Instituto de Biotecnología y Biomedicina. U.A.B.*

La artritis reumatoide (RA) es una enfermedad autoinmune asociada con algunos subtipos de HLA-DR4, así como con DR1 y DR10. Todos los alelos asociados con la enfermedad contienen en la tercera región hipervariable una secuencia básica, entre las posiciones aminoácidas 70 a 74. La hipótesis del epítipo compartido postula que estos residuos podrían definir los ligandos naturales asociados a estos alelos y/o estar directamente expuestos e interactuar con el TCR.

A pesar de que los alotipos relacionados con la enfermedad están identificados, no se conocen los péptidos antigénicos que éstos presentan y que podrían desencadenar o mantener la respuesta autoinmune, aunque se han propuesto varios candidatos.

Por otro lado, se han desarrollado varios modelos animales con el objeto de estudiar las respuestas autoinmunes restringidas por algunos de las moléculas de HLA asociadas a RA. En uno de ellos se ha visto que el colágeno de tipo II (CII), del cual se ha identificado un epítipo inmunodominante (CII(263-270)), puede desarrollar una enfermedad autoinmune similar a RA en ratones que expresan DR1 o DR4.

Los repertorios peptídicos asociados a DR1 y a DR4 se han estudiado extensivamente y se conocen los motivos de anclaje de los péptidos unidos a ellas. También se han resuelto las estructuras cristalográficas de DR1 y DR4 con varios péptidos, entre los cuales está el CII(263-270). Sin embargo sigue sin identificarse el repertorio peptídico asociado a DR10. Un posible solapamiento peptídico entre los repertorios asociados a los alelos de HLA asociados con RA apoyaría la hipótesis de la existencia de péptidos comunes capaces de desarrollar y mantener la respuesta autoinmune en RA.

En este trabajo hemos analizado el pool peptídico asociado a DR10 en una línea linfoblastoide homocigota por espectrometría de masas. Se han identificado 238 ligandos naturales de DR10, lo que nos ha permitido definir el motivo de anclaje de este alelo. Uno de los ligandos naturales identificados se había descrito previamente asociado a DR1 y otro se había identificado en nuestro laboratorio como ligando natural de DR4. Estos datos indican que DR10 une un repertorio peptídico solapante con DR1 y DR4.

LA VÍA SECRETORIA DE GENERACIÓN DE EPÍTOPOS DE MHC-I ES SUFICIENTE PARA GENERAR UNA RESPUESTA DE CTL ESPECÍFICOS EN RATONES DEFICIENTES EN TAP. *Medina F^{1,2}, Ramos M¹, León P¹, Rodríguez-Castro M¹, Val M de P^{1,3}. ¹Unidad de Inmunología Viral. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda (Madrid). ²Unidad de Investigación. Hospital Puerta del Mar. Cádiz. ³Centro de Biología Molecular Severo Ochoa (CSIC). Madrid.*

Antecedentes. La ausencia de infecciones víricas severas en ratones y personas deficientes en transportadores de péptidos (TAP-),

sugiere que la masiva actividad del proteasoma en la generación de epítomos de MHC de clase I (MHC-I) podría estar enmascarando la contribución de otras proteasas no citosólicas a dichos fenómenos. Tal sería el caso de la convertasa furina, localizada en la vía secretoria de la célula e implicada en la maduración de numerosas proteínas virales.

Objetivos. (1) Cuantificar *in vitro* la contribución relativa de la vía secretoria (dependiente de la furina) y la vía citosólica (dependiente del proteasoma) en la generación de un mismo epítomo de MHC-I. (2) Explorar *in vivo* la relevancia de la vía secretoria para generar una respuesta de linfocitos T citotóxicos específicos (CTL).

Metodología. (1) Se generaron virus vaccinia recombinantes (rVV) con el epítomo de ovalbumina ²⁵⁷SIINFEKL²⁶⁴ insertado en una proteína procesada por la furina (HBe). (2) Se cuantificaron los complejos de SIINFEKL con la molécula de MHC-I H-2K^b por citometría de flujo mediante el anticuerpo 25D1-16 en diversas líneas celulares infectadas con los rVV. (3) Se inmunizaron ratones TAP⁺ y TAP⁻ con los rVV para detectar la generación de CTL específicos.

Resultados. (1) En células TAP⁺ la vía secretoria dependiente de furina produce alrededor del 20% de los complejos SIINFEKL/H-2K^b. (2) Los ratones TAP⁻ inmunizados con los rVV generan un porcentaje de CTL específicos similar al de los ratones TAP⁺.

Conclusiones. La vía secretoria de procesamiento antigénico dependiente de furina (1) contribuye apreciablemente a la generación del epítomo SIINFEKL en células con una expresión normal de TAP, (2) es suficiente para generar una respuesta de CTL específicos a dicho epítomo en ratones TAP⁻, y (3) podría constituir junto con otras proteasas un sistema de generación de epítomos de MHC-I solapado al proteasoma (aunque no necesariamente redundante) que explicaría la baja incidencia de infecciones víricas severas en ausencia de TAP.

LA MOLÉCULA MR1 (MHC-RELATED 1) HUMANA SE EXPRESA EN CELULAS PLASMATICAS PRODUCTORAS DE IGA DE LA MUCOSA INTESTINAL. Gómez del Moral M¹, Gozalbo B², Abós B², Martín P³, Bellas C³, Martínez Naves E². ¹Biología Celular, ²Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense. Madrid. ³Hospital Puerta de Hierro. Madrid.

Introducción. MR1 (MHC-related 1) es una molécula HLA de clase I no clásica, codificada por un gen no polimórfico y localizado 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-CD8- y se caracterizan por poseer un TCR invariante Va7.2Ja33. La función de las células MAIT se desconoce, pero estos linfocitos parecen tener propiedades reguladoras. El ligando presentado por MR1 a estas células es desconocido. La expresión del RNA para MR1 parece ser ubicua, sin embargo la expresión de la proteína en células primarias o tejidos no ha sido caracterizada.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es analizar la expresión de la proteína MR1 en diferentes líneas celulares así como en células primarias y tejidos humanos.

Metodología. La expresión de MR1 se analizó mediante técnicas de citometría de flujo e inmunohistoquímica utilizando anticuerpos monoclonales y policlonales anti-MR1. Las líneas celulares analizadas fueron U937, NB-4, HL60 (de tipo monocítico); K562 (eritroleucemia); Peer, Molt4, Jurkat, SupT1 (Células T); Daudi, JY, C1R,

L721.221 (linfoblastoides). Además se utilizaron las líneas L721.221 y C1R transfectadas con MR1 y denominadas MR1.221 y MR1.C1R respectivamente. Los tejidos estudiados fueron obtenidos de biopsias de tubo digestivo humano sano: íleon, apéndice y colon.

Resultados. Se observó la expresión de pequeñas cantidades de MR1 en la superficie únicamente en las líneas celulares L721.221, Sup T1 y Jurkat. Las líneas transfectadas MR1.221 y MR1.C1R expresaron altos niveles de MR1 en la superficie. Además se pudo comprobar que a 26°C todas las líneas linfoblastoides expresaron MR1 en la superficie. A esta temperatura las líneas transfectadas también incrementaron la expresión de MR1 lo que sugiere que la expresión de MR1 en la superficie celular está limitada por la disponibilidad de ligandos.

Por otra parte hemos podido observar, por primera vez, células que expresan MR1 en mucosa intestinal. Mediante dobles marcajes hemos podido definir que MR1 se expresa en áreas perifoliculares de la lámina propia intestinal. Hemos podido determinar que las células MR1⁺ son células B o células plasmáticas. Todas ellas son positivas para CD38 e IgA y la mayoría son HLA-DR⁺, CD19⁺ y CD138⁺. En ningún caso hemos encontrado células CD14⁺, CD3⁺ ni CD11c⁺ que expresaran MR1.

En conclusión, la expresión *in vivo* de MR1 parece estar restringida a células plasmáticas, blastos activados de células B y a células plasmáticas productoras de IgA.

VACUNACIÓN TERAPÉUTICA DURANTE INTERRUPCIÓN ANALÍTICA DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL: IMPACTO SOBRE EL SISTEMA INMUNOLÓGICO Y LA REPLICACIÓN VÍRICA. Valor L¹, Navarro J¹, Santamaría B¹, Rodríguez Sainz C¹, Podzamczar D³, Carbone J¹, Gil J¹, Calvo P¹, Gómez V¹, Camino I¹, Moreno S², Bouza E⁴, Gonzalez Lahoz J⁵, Viciano P⁵, Ocaña I⁶, Clotet V⁷, Rubio R⁸, Pulido J⁸, Maradona JA⁹, Carton J⁹, Quereda C², Blazquez R¹⁰, Ferrer E³, Díaz M⁶, Jou A⁷, Sirena G⁷, Peña JM¹¹, Gijón P⁴, Gatell JM¹², Lopez F¹³, Desco M¹⁴, Fernández-Cruz E¹. ¹Inmunología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. ²Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ³Ciudad Sanitaria Bellvitge, Barcelona. ⁴Microbiología, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. ⁵Hospital Virgen del Rocío, Sevilla. ⁶Hospital Vall D Hebrón, Barcelona. ⁷Hospital Germans Trias i Pujol, Barcelona. ⁸Hospital 12 de Octubre, Madrid. ⁹Hospital Central de Asturias, Oviedo. ¹⁰Hospital Morales Meseguer, Murcia. ¹¹Hospital La Paz, Madrid. ¹²Hospital Clinic i Provincial, Barcelona. ¹³Nufarm 21, Departamento de Estadística, Madrid. ¹⁴Departamento de Imagen Medica, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. ¹⁵Instituto de Salud Carlos III, Madrid.

Introducción. Se ha estudiado si la inmunización terapéutica con un inmunógeno VIH-1 (Remune, REM) durante la interrupción analítica del tratamiento antirretroviral (ITA) mantiene las respuestas específicas T anti-VIH-1 en pacientes previamente inmunizados con REM y hemos evaluado su impacto en la carga viral.

Métodos. Se evaluaron 39 pacientes que habían participado en el estudio aleatorizado, doble ciego, recibiendo REM o placebo (IFA), cada 3 meses (m) durante 36 m, en combinación con ARV (STIR-2102), y que subsiguientemente recibieron REM en fase abierta por 24 m y posteriormente iniciaron ITA (REMIT). Cada 3 m, a lo largo de 48 semanas (sem) de ITA, determinamos la respuesta linfoproliferativa (LPR) VIH-1 específica, T CD4⁺ y CD8⁺ por incorporación de 3H-timidina y por CFSE (5,6-carboxyfluoresceína diacetato succinimidil

ester), la respuesta CD8+ VIH-1 específica por ELISpot y cuantificamos las subpoblaciones celulares T por citometría de flujo.

Resultados. Los pacientes incluidos en el estudio REMIT presentaban variaciones respecto al número de dosis de REM recibidas previamente a ITA: percentil (pc) 25=8 dosis(d); pc 50=12d; pc75=23 d. Observamos que los pacientes que recibieron mayor número de dosis de REM (REMalto; n=19) mostraron un incremento significativo en las LPR CD4+ y CD8+ específicas en comparación con los pacientes que recibieron un menor número de dosis (REMBajo; n=20) (%CD4 + CFSEbajo: REMalto= 5,5 vs REMbajo =1; %CD8+CFSEbajo: REM= 11,8 vs IFA= 1,9; p= 0,02). LPR VIH-1 específica por 3H-timidina mostró también incrementos significativos en el grupo REMalto (20973 ± 4397cpm) en comparación con el grupo REMbajo (9252 ± 2536; p= 0,03) a sem 48. No se encontraron diferencias significativas en respuestas específicas VIH-1 CD4+ y CD8+ entre ambos grupos REMalto y REMbajo evaluadas por ELISpot. Sin embargo, el grupo aleatorizado a REM durante ITA mostró un incremento significativo en células gag-específicas productoras de IFN-gamma (p= 0,027). Sólo aquellos pacientes pertenecientes al grupo aleatorizado REM mostraron una asociación positiva entre LPR, células VIH-1 específicas productoras de IFN-gamma (p= 0,017) y células T CD8+ efectoras finales (CD8+CD28-CD57+) (p= 0,01). También el grupo REM tuvo un incremento en el % de células T de memoria central (CD45RA-CD62L+) desde la sem 0 a la sem 48 (CD4+: 34 ± 2 vs 42 ± 2; p= 0,021 y CD8+:10±1 vs 14±1; p= 0,048). Estas respuestas inmunológicas específicas tuvieron un impacto en la carga viral: La diferencia media ajustada entre los grupos REM e IFA, determinada por Anova Mixed Model fue de 0,3 log ARN VIH (p< 0,001).

Conclusiones. La inmunización terapéutica con un inmunógeno VIH-1 durante la interrupción estructurada de tratamiento ARV resulta en una expansión de respuestas VIH-1 específicas preexistentes en pacientes previamente inmunizados con REM. El mantenimiento de respuestas inmunológicas a largo plazo se asocia al mejor control de la carga viral.

USO DEL DOMINIO EXTRA A DE LA FIBRONECTINA PARA VEHICULIZAR ANTÍGENOS A LAS CÉLULAS TLR4+. APLICACIÓN AL DESARROLLO DE UNA VACUNA FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C. Mansilla C, Casares N, Gorraiz M, Hervás-Stubbs S, Arribillaga L, Durantez MC, Llopiz D, Sarobe P, Borrás-Cuesta F, Prieto J, Leclerc C, Lasarte JJ. *Area de Hepatología y Terapia Génica, Centro de Investigación Médica Aplicada, CIMA, Pamplona; INSERM, E 352, Instituto Pasteur, Paris.*

El desarrollo de una vacuna frente al virus de la hepatitis C es necesaria para el control de esta infección. En este trabajo se plantea el uso de una proteína recombinante que contiene el dominio extra A de la fibronectina (EDA), un ligando natural de toll like receptor 4 (TLR4) unido a la proteína NS3 del virus de la hepatitis C (VHC) para inducir una respuesta inmune potente frente al virus de la hepatitis C. La utilización de la proteína EDA podría por un lado, favorecer el «targeting» del antígeno NS3 a las células dendríticas (CD) que expresan TLR4, y por otro lado favorecer la maduración de las CD para inducir una respuesta inmune celular eficaz frente a la proteína NS3 del VHC. En este trabajo demostramos que la proteína EDA se une a la molécula TLR4 activando su señalización, estimulando a las CD en su producción de citoquinas proinflamatorias como IL-12 o TNF-alfa, e induciendo su maduración *in vitro* e *in vivo*.

La unión de EDA a un epítipo citotóxico de la ovalbúmina permite la presentación eficaz de este epítipo a linfocitos T específicos e induce *in vivo* la activación de una potente respuesta citotóxica específica que protege frente a la inyección de células tumorales que expresan ovalbúmina. La inmunización de ratones transgénicos HHD, que expresan la molécula HLA-A2, con una proteína de fusión que contiene EDA y la proteína NS3 del virus de la hepatitis C induce una potente respuesta CD4 y CD8 frente a la proteína NS3. Estos resultados sugieren que la proteína recombinante de fusión entre el dominio extra A de la fibronectina y la proteína NS3 del VHC podría utilizarse en el desarrollo de una vacuna profiláctica o terapéutica frente a la infección por este virus.

SESIÓN 4: INMUNIDAD E INFECCIONES. INMUNORREGULACIÓN

Moderadores: Javier Martín Ibáñez (Granada),
Alfredo Minguela Puras (Murcia)

LA PROTEÍNA VIRAL A238L BLOQUEA LA TRANSCRIPCIÓN INDUCIBLE PARA EVADIR LA SÍNTESIS DE MEDIADORES DE LA RESPUESTA INMUNE E INFLAMATORIA. Granja AG, García-Sánchez E, Sabina P, Hurtado C, Revilla Y. *Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa».*

CBP y p300 son histona acetil transferasas (HATs) implicadas en proliferación celular, diferenciación, apoptosis y activación de la respuesta inmune, ya que interactúan con una gran variedad de factores transcripcionales, formando un complejo con la ARN polimerasa II y estabilizando así el complejo transcripcional, para activar la transcripción génica. Además, a través de su dominio HAT, CBP y p300 son capaces de acetilar histonas nucleosomales y factores de transcripción.

En el presente estudio demostramos que la proteína A238L del virus de la peste porcina africana modula la función co-activadora de la transcripción llevada a cabo por p300, impidiendo la expresión de genes inmunomoduladores, como interleuquina-2 (IL-2), factor de necrosis tumoral (TNF-alfa) y ciclooxigenasa-2 (COX-2), lo que representa un sofisticado modelo viral de evasión de la respuesta inmune.

Utilizando células T Jurkat que expresan establemente A238L, hemos observado que la proteína viral inhibe la activación de los promotores de los genes de TNF-alfa, COX-2 e IL-2, y que la sobre expresión de p300 salvaje, pero no la de una forma mutante defectiva en el dominio HAT, potenció la actividad de dichos promotores, recuperando la inhibición que ejerce A238L e implicando así de manera directa la actividad acetil transferasa de p300 en el mecanismo de evasión viral. Además demostramos, mediante ensayos de ChIP y pull-down, que la expresión de A238L en linfocitos T no permite el reclutamiento de p300 a los elementos de respuesta a NFAT/AP-1 o NFkB presentes en los promotores de dichos genes. Asimismo, observamos que la inhibición sobre la expresión génica es debida al bloqueo que A238L ejerce sobre la capacidad de trans activación de los factores transcripcionales NFAT, NFkB y c-Jun, al impedir la interacción con p300 y acetilación de estos factores por dicho co-activador.

A238L y p300 co-localizan en complejos inducibles de transcripción, en el núcleo de células estimuladas, y coprecipitan a partir de extractos nucleares de células Jurkat estimuladas con PMA/Ion.

Mediante ensayos de doble híbrido, utilizando el sistema de expresión GAL-4, demostramos que A238L se une directamente a p300 a la región amino terminal de p300, bloqueando su actividad, sin afectar a la actividad de su región carboxilo terminal.

Por último, demostramos que la interacción de A238L con p300 da lugar a un importante descenso en la actividad acetil transferasa residente en el dominio HAT de p300, reduciendo la capacidad de dicho co-activador de acetilar histonas nucleosomales y de auto-acetilarse, procesos fundamentales en el desarrollo de la transcripción génica inducible.

Tomando estos resultados en conjunto, podemos definir a la proteína viral A238L como un eficaz inmunosupresor, debido a su capacidad de bloquear la formación de complejos de transcripción inducibles sobre los promotores de genes inmunológicamente relevantes, impidiendo la incorporación del co-activador transcripcional p300 a estos complejos y bloqueando su actividad acetil transferasa, necesaria para el inicio de la transcripción de dichos genes.

EFFECTOS DE INTERFERON BETA SOBRE LA ACTIVIDAD DE CÉLULAS T CD4+ ANERGICAS. *Martín-Saavedra FM, Bravo B, Ballester S. Instituto de Salud Carlos III.*

La activación y expansión de linfocitos T son sucesos centrales en la mayoría de las respuestas inmunes. Para mantener la homeostasis inmune debe existir un balance entre el inicio y la extinción de la respuesta inmune. Una alteración en la resolución inmune puede desencadenar una inflamación crónica o un proceso de autoinmunidad.

La anergia, apoptosis, y la supresión de células T activadas mediada por células T reguladoras CD4+, son mecanismos que contribuyen a la inhibición de la respuesta inmune. El interferón beta (IFN β) es uno de los agentes terapéuticos usados de manera más frecuente como tratamiento de la esclerosis múltiple humana (EM). A pesar de que los mecanismos de acción de esta citoquina en EM son aún desconocidos, se ha demostrado que parte del efecto beneficioso de IFN β se debe a la inhibición de la actividad de las células T CD4+ encefalitogénas responsables del daño en EM y en su modelo animal, la encefalomiелitis experimental autoinmune (EAE).

Con el objetivo de averiguar como IFN β afecta a los mecanismos de control de la respuesta inmune dirigida por células T CD4+, estudiamos el efecto del fármaco durante la activación de células T CD4+ naive. En cultivos primarios de células T CD4+ naive estimuladas vía TCR con anti-CD3, encontramos que IFN β promueve un aumento de expresión del marcador de activación CD25 (cadena alpha del receptor de IL2). Además, el tratamiento *in vitro* con IFN β de estas células promueve el aumento de expresión de mRNA de Foxp3, gen que se expresa de manera constitutiva en células T reguladoras CD4+ CD25+ (células T reguladoras naturales).

Por otra parte, comprobamos que células T CD4+ naive activadas durante 72h vía TCR mediante anti-CD3 en ausencia de coestimulación, no son capaces de establecer una respuesta proliferativa eficiente tras una segunda ronda de activación del TCR en presencia de señales coestimuladoras aportadas por células presentadoras de antígeno (APC). Cuando esta población de células T CD4+ anérgicas es establecida en presencia de IFN β , registramos un aumento significativo de su actividad supresora sobre la respuesta proliferativa a anti-CD3 y APC de células CD4+CD25- naive (células respondedoras).

Por otra parte, el tratamiento *in vitro* con IFN β de células T CD4+CD25+ Foxp3+, no modifica de manera significativa la actividad supresora basal ejercida por estas células T reguladoras naturales. Sin embargo, células CD4+CD25- anérgicas que fueron expuestas a IFN β , son capaces de suprimir la respuesta proliferativa de células T respondedoras de manera más eficiente que la población control. Atendiendo a nuestros datos, IFN β es capaz de potenciar la capacidad supresora de células T CD4+ anérgicas, al margen de la actividad de células T reguladoras naturales presente en la población CD4+ total.

Estos resultados, junto a datos preliminares obtenidos en nuestro laboratorio, donde IFN β prolonga la supervivencia de células T reguladoras naturales en cultivo, podrían estar relacionados con los mecanismos por los cuales el fármaco ejerce una acción de control en el desarrollo de ciertos procesos autoinmunes orquestados por poblaciones de células T CD4+.

EL ECTODOMINIO DE CD6 SE UNE A PATRONES MOLECULARES ASOCIADOS A PATÓGENOS (PAMPS) Y PROTEGE FRENTE AL SHOCK SÉPTICO INDUCIDO POR LIPOPOLISACÁRIDO (LPS). *Sarrias MR¹, Farnós M¹, Mota R², Sánchez-Barbero F³, Ibáñez A¹, Gimferrer I¹, Casals C³, Yélamos J¹, Lozano F¹.* ¹Servicio de Inmunología, Hospital Clínico de Barcelona, Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Universidad de Barcelona, Barcelona. ²Departamento de Bioquímica, Biología Molecular e Inmunología, Universidad de Murcia, Murcia. ³Departamento de Bioquímica y Biología Molecular I, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

CD6 es una glicoproteína de membrana implicada en la modulación de las señales de activación y diferenciación linfocitarias. La región extracelular de CD6 está compuesta por tres dominios globulares ricos en cisteína tipo SRCR (Scavenger Receptor Cysteine-Rich). Dado que algunos miembros de la antigua y altamente conservada superfamilia de receptores SRCR actúan como receptores reconocedores de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), decidimos estudiar si CD6 comparte esta función. Con tal fin se ha expresado y purificado una forma recombinante soluble del ectodominio de CD6 humano (rsCD6), que es indistinguible (en peso molecular, en reactividad frente a anticuerpos y propiedades de unión a células) de una forma natural soluble presente en el suero humano (nsCD6). rsCD6 se une e induce agregación tanto de bacterias Gram-positivas como Gram-negativas, a través del reconocimiento de ácido lipoteicoico (LTA) y lipopolisacárido (LPS) capsular, respectivamente.

La Kd de la interacción LPS-rsCD6 fue de $2,69 \pm 0,32 \times 10^{-8}$ M, que es similar en magnitud a la reportada para la interacción de LPS con CD14, el principal receptor celular de LPS en mamíferos. LPS también se une a la forma de membrana de CD6 induciendo la activación de la cascada de señalización de las MAP cinasas. Experimentos *in vivo* demuestran que la administración i.p. de rsCD6 aumenta de forma significativa la supervivencia de ratones C57/BL6 frente a una inyección de una dosis letal de LPS y reduce también de forma significativa los niveles séricos de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL6, e IL-1 β) en dichos ratones. En conclusión, nuestros resultados ilustran las hasta ahora insospechadas propiedades de unión a bacterias de la región extracelular de CD6 y apoyan su potencial uso terapéutico en el shock séptico o en otros procesos inflamatorios de origen infeccioso.

ADNP (ACTIVITY-DEPENDENT NEUROPROTECTIVE PROTEIN)/NAP COMO NUEVA MOLÉCULA INMUNORREGULADORA. Pozo D, Quintana FJ, Fernández-Montesinos R, Herrera JL, González-Rey E, Delgado M, Gozes I, Cohen IR. Departamento Bioquímica Médica y Biología Molecular. Facultad de Medicina. Universidad de Sevilla.

Research aiming to characterize molecules with both neuroprotective and immunoregulatory properties are fundamentally important. The activity-dependent neuroprotective protein (ADNP) manifests neuroprotective activities *in vivo* and *in vitro*. We report the novel finding that ADNP is expressed by immune-system cells in response to stimulation with vasoactive intestinal peptide (VIP). ADNP has immune effects: NAP, a peptide corresponding to the functional core of ADNP, was found to down-regulate the expression and secretion of key pro-inflammatory cytokines by macrophages and affected adaptive T-cell function by APC-dependent and independent processes. NAP showed therapeutic effects in the adoptive transfer model of Experimental Allergic Encephalomyelitis. *In vivo*, NAP has potent therapeutical capabilities in an experimental model of neuroinflammation. The first analysis of heterozygous ADNP knockout mice showed an enhanced susceptibility to neuroinflammation. The AP P/PS1 transgenic mice for Alzheimer's disease showed an differential expression of ADNP mRNA vs VIP. Remarkably, NAP as a protective effect in the collagen-induced arthritis model of rheumatoid arthritis. Therefore ADNP/NAP may be both a neuroprotector and an direct immune down-regulator of inflammation.

PAPEL DE LA GLICERALDEHIDO 3 FOSFATO DESHIDROGENASA (LMO 2459) EN LA VIRULENCIA, SUPERVIVENCIA E INMUNIDAD DE LISTERIA MONOCYTOGENES. Fernández Prieto L, Madrazo Toca F, Cerro Vadillo E del, Gómez López MT, Leyva Cobián F, Álvarez Domínguez C, Carrasco Marín E. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla e Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV).

Listeria monocytogenes (LM) es un patógeno humano, gram positivo, intracelular facultativo. El principal mecanismo de patogenicidad de LM consiste en evitar la maduración del fagolisosoma inhibiendo a la GTPasa Rab5a y secretando listeriolisina O y fosfolipasa C, lo que le permite escapar al citosol donde se replica.

Para identificar la molécula que se une a Rab5a y su mecanismo de acción, purificamos las proteínas de un extracto de LM mediante una columna de afinidad, y obtuvimos una proteína de 40 kDa, la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GADPH). Analizando su estructura encontramos que tiene 2 dominios: un dominio N terminal con actividad de ADP ribosilación y un dominio C terminal con actividad glicolítica. El mecanismo de acción de esta proteína en la inhibición de la maduración fagosomal, reside en el dominio N-terminal, y es debido a la actividad de ADP-ribosilación sobre Rab5a de tal manera que retiene a Rab5a en los fagosomas y la inactiva bloqueando el intercambio GDP/GTP impidiendo la fusión endosomafagosoma.

También hemos comprobado que la GADPH es una proteína tanto estructural como secretada por la LM viva en el medio fagosomal y en el citosol.

La GADPH cumple dos características muy importantes para su utilización en el desarrollo de vacunas, se trata de una proteína tanto

estructural como secretada, y su bloqueo o ausencia es incompatible con la vida del patógeno.

Hemos realizado dos inmunizaciones consecutivas (espaciadas por 8 días) con células dendríticas incubadas con el péptido N-terminal (22 aminoácidos) y después hemos infectado ratones CBA (LD50 5x10³) con dosis letales de LM (5x10⁵ bacterias).

Los resultados preliminares muestran que la inmunización con este péptido protege de la sepsis producida con dosis letales y los ratones son capaces de controlar el progreso de la infección. Dada la alta homología, mas de un 85%, de este péptido con proteínas similares de otros patógenos como *Micobacterium* spp, *Streptococcus* spp, etc, nuestros resultados pudieran tener una aplicación más extensa en el diseño de vacunas multiméricas en las cuales se incluye una de las enfermedades reemergentes de mayor repercusión, como la tuberculosis.

EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA NKG2D EN LINFOCITOS T CD4+ DE INDIVIDUOS INFECTADOS POR VIH CON EXPANSIÓN DE LA SUBPOBLACIÓN CD4+CD8DIM. Alonso-Arias R, Tricas L, Sampere A, Asensi V, López-Larrea C. Unidad de Histocompatibilidad y Trasplantes, Hospital Universitario Central de Asturias.

En sangre periférica de individuos sanos y en determinadas patologías incluidas infecciones virales por CMV, VE-B y VHC se han encontrado expansiones de células T CD4+ con baja expresión de la molécula CD8 (CD4+CD8dim). Para comprobar si la infección por VIH induce la expansión de estas células dobles positivas, se comparó su frecuencia en un grupo de 300 individuos VIH+ en distintos estadios de la infección con un grupo control de 50 individuos sanos. La proporción de células CD4+CD8dim fue superior en los individuos infectados por VIH que en el grupo control, encontrándose diferencias estadísticamente significativas entre los individuos VIH+ con menos de 200 células T CD4+ /microL y los individuos sanos (p<0,005). El análisis por citometría de flujo de los linfocitos T CD4+ y CD4+CD8dim mostró expresión disminuida de las moléculas coestimuladoras CD27 y CD28 en los individuos con población expandida de células dobles positivas (p<0,005). Una proporción elevada de las células CD28- expresó la molécula NKG2D, representando el 17,8% (5,7-37%) de las células T CD4+ y el 57,7% (38-85,7%) de las CD4+CD8dim. Se encontró una respuesta incrementada frente a la proteína viral gag (péptidos solapados de 15 aa) en la población CD4+NKG2D+ vs CD4+NKG2D-.

En conclusión, la expansión de las células T CD4+CD8dim está asociada con la progresión de la infección por VIH y con la aparición de una población de linfocitos T CD4+ con fenotipo CD28-NKG2D+ específicos frente al virus.

UN NUEVO MECANISMO FAGOSOMAL NO OXIDATIVO EJERCIDO POR LA CATEPSINA D CONTOLA EL CRECIMIENTO INTRACELULAR DE LISTERIA MONOCYTOGENES. Madrazo-Toca F, Gomez-Lopez MT, Cerro-Vadillo E del, Fernandez-Prieto L, Leyva-Cobián F, Carrasco-Marín E, Alvarez-Dominguez C. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marques de Valdecilla e Instituto de Formación e Investigación Marqués de Valdecilla (IFIMAV). Santander.39008. Cantabria.

La destrucción de *Listeria monocytogenes*, bacteria patogénica intracelular facultativa, se produce en el interior de los fagosomas y depende tanto de los mecanismos oxidativos como de mecanismos no oxi-

dativos, integrados en la respuesta inmune innata frente a este patógeno. Sin embargo, sólo las células fagocíticas poseen ambos mecanismos de defensa. En este estudio, describimos un nuevo mecanismo listericida no oxidativo, basado en la acción de la catepsina-D, una aspartil-proteasa activa a pH ácido, que se localiza exclusivamente en orgánulos del compartimiento endocítico-lisosomal. Detallamos además, su acción molecular sobre el principal factor de virulencia de este patógeno con acción fagosomal: la listeriolisina O (LLO). La LLO pertenece a una familia de proteínas denominadas CDCs ó citolisinas dependientes de colesterol; las cuales poseen un undecapéptido altamente conservado (ECTGLAWEWWR) en su extremo carboxilo donde se localiza su actividad citolítica. Dentro del fagosoma, LLO es secretada y se inserta en la membrana fagosomal como monómero a través del dominio 4 en el extremo carboxilo. La oligomerización de distintos monómeros da lugar a la formación de poros, lo que facilita la lisis del fagosoma y que el patógeno escape al citosol para replicarse. El análisis que aquí presentamos indica que la acción fagosomal de la catepsina-D provoca un corte en un fragmento de 3-4 kDa del dominio 4 de la LLO, tanto *in vivo* como *in vitro* utilizando LLO recombinante. La eliminación de dicho fragmento indica: (i) que contiene la capacidad citolítica de la toxina medida por la lisis de eritrocitos de carnero ó de células intactas; (ii) es crítico para el anclaje de la LLO en la membrana fagosomal y su ausencia impide la oligomerización de monómeros y formación del poro; (iii) el sitio de corte se localiza en dos residuos de triptófano contiguos del undecapéptido altamente conservado de las CDCs; (iv) esta acción sobre el undecapéptido de la LLO se extiende a otras CDCs, como la pneumolisina O de *Streptococcus pyogenes* (PLY) y (v) aquellos fagosomas listericidas, como los obtenidos tras tratamiento de macrófagos con interferon-gamma, presentan altos niveles de catepsina-D activa y una LLO cortada en dicho undecapeptido, lo que impide la formación del poro y que la bacteria escape al citosol, restringiendo su viabilidad. Sin embargo, aquellos fagosomas provenientes de ratones deficientes en catepsina-D, presentan una LLO intacta, permitiendo al patógeno formar poros y escapar al citosol. En conclusión, sugerimos que la catepsina-D es clave para la inmunidad innata frente a *Listeria monocytogenes*. La importancia de dicho mecanismo que podría afectar a distintas infecciones bacterias cuyos principales factores de virulencia pertenecen a la familia de las CDCs, sería especialmente relevante en deficiencias humanas en catepsina-D y situaciones de acción enzimática deficiente.

PAPEL DE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA EN LA SUSCEPTIBILIDAD Y SEVERIDAD DE LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD. *García-Laorden M¹, García-Saavedra A¹, Rodríguez de Castro F², Solé-Violán J³, González-Quevedo N¹, Aspa J⁴, Briones M⁵, Rajas O⁴, Blanquer J⁵, Rodríguez-Gallego C¹.* ¹Immunología, ²Neumología, ³UMI, Hospital de G.C. Dr. Negrín, Las Palmas Gran Canaria. ⁴Neumología, Hospital de la Princesa, Madrid. ⁵UMI, Hospital, Clínico y Universitario de Valencia.

La lectina de unión a manosa (MBL) es una lectina sérica que se une a múltiples carbohidratos presentes en diversos microorganismos, activando la vía de Complemento dependiente de lectinas. Su deficiencia y bajos niveles, debidos a la presencia de 3 mutaciones exónicas y a variantes en la región promotora, se han asociado con mayor susceptibilidad a infección, si bien esta asociación es objeto de controversia.

En el presente estudio se analizaron las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos exónicos y de promotor del gen

MBL2 en 848 pacientes adultos con neumonía comunitaria y 1610 controles sanos, procedentes de tres comunidades españolas. Se analizaron las 3 poblaciones, por separado y conjuntamente, incluyendo el agente etiológico. El análisis genético se realizó mediante técnicas de PCR. Además se analizaron los niveles séricos de MBL y la actividad MBL-dependiente del Complemento, mediante ELISA, en población control.

No se encontraron diferencias significativas en el análisis genético al comparar casos y controles. Sin embargo, la presencia de genotipos bajo o nulo productores (XA/O+OO) se asoció a una mayor frecuencia de ingreso en UMI ($p=0,0085$, $OR=1,82$ [1,15-2,84]), y con la predisposición a padecer las formas más severas de la enfermedad: shock séptico ($p=0,016$, $OR=1,89$ [1,10-3,15]) y fracaso multiorgánico ($p=0,031$, $OR=1,89$ [1,01-3,33]). Además, la presencia de genotipos bajo o nulo productores se asoció a la necesidad de ventilación mecánica ($p=0,045$, $OR=1,69$ [1-2,86]) y a una mayor mortalidad relacionada ($p=0,0089$, $OR=2,47$ [1,19-4,85]). Estos resultados se confirman, o se aprecian las mismas tendencias, cuando las tres poblaciones son analizadas por separado, lo cual refuerza nuestros resultados.

Nuestro estudio indica que la deficiencia de MBL no predispone a una mayor susceptibilidad a neumonía comunitaria, ni siquiera al analizar el microorganismo causante, en particular neumococo (N=194). Sin embargo, esta deficiencia predispone a una mayor gravedad y a un peor pronóstico y desenlace de la enfermedad.

Este estudio ha sido subvencionado por las becas FIS 02/1620 y 04/1190.

REGULACIÓN MEDIANTE CITOQUINAS Y PROGESTERONA DE LA EXPRESIÓN DE HLA-G POR LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS. *Blanco O, Tirado I, Muñoz-Fernández R, Mata C de la, Leno E, Abadía-Molina AC, Peña J, García Olivares E.* Departamento de Bioquímica y Biología Molecular 3 e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

Las células deciduales estromales (DSC) son células características de la decidua y representan el principal componente celular de este tejido. Las DSC desarrollan actividades inmunitarias que podrían estar relacionadas con los mecanismos de tolerancia materno-fetal.

El HLA-G, es un antígeno monomórfico, con una distribución muy restringida fundamentalmente limitada al trofoblasto. Aunque no está totalmente probado, existen evidencias que sugieren que este antígeno se une a los receptores inhibidores de las NK deciduales para inhibir la actividad citotóxica de estas células frente a trofoblasto.

En estudios previos, nuestro grupo demostró que las DSC expresan débil pero consistentemente HLA-G. En el presente trabajo demostramos mediante citometría de flujo y western-blot, que la IL-10, una citoquina asociada a embarazo normal e IFN α incrementan la expresión de esta molécula por las DSC, mientras que la IL-2, asociada a aborto espontáneo, no tuvo ningún efecto en la expresión de HLA-G.

La progesterona diferencia (decidualiza) las células DSC. En contacto con la progesterona, las DSC sufren una inhibición de sus actividades inmunitarias, lo que probablemente favorece el desarrollo del embarazo. Esta hormona también produjo un incremento de HLA-G por las DSC.

La apoptosis de la DSC es un fenómeno fisiológico y progresivo del embarazo y existen evidencias de que las NK deciduales están implicadas en este fenómeno. La expresión de HLA-G por las DSC podría ser un mecanismo por el que estas células controlarían a las NK.

IMPLICACIÓN DE ICOS (CD278) EN LA HOMEOSTASIS DE CÉLULAS T REGULADORAS CD4+CD25+. Pini E¹, Ojeda G¹, Fernández B¹, Rojo JM¹, Portolés P¹. ¹Centro Nacional de Microbiología (Instituto de Salud Carlos III; Majadahonda, Madrid). ²Centro de Investigaciones Biológicas (CSIC; Madrid).

ICOS (CD278) es una molécula coestimuladora de la familia de CD28 que se expresa característicamente en linfocitos T activados. ICOS es esencial para el desarrollo eficiente de respuestas inmunes normales y patológicas, expresándose en linfocitos T activados y líneas Th2, y favoreciendo la diferenciación hacia fenotipo Th2. Sin embargo, el coestimulo a través de ICOS también es capaz de incrementar las respuestas de perfil Th1. Evidencias recientes muestran que ICOS se expresa en células T reguladoras (Treg) naturales y adaptativas. La obtención y estudio de ratones ICOS^{-/-} está poniendo de manifiesto la implicación de esta molécula en el desarrollo de patologías autoinmunes; así, se ha descrito que los ratones ICOS-deficientes son más sensibles a la inducción de encefalomielitis alérgica experimental (EAE), pero son más resistentes a la aparición de artritis inducida por colágeno II que los animales normales.

Usando ratones deficientes en ICOS, hemos examinado el papel de esta molécula en el desarrollo de la población T reguladora natural CD4+CD25+. Nuestros datos obtenidos en ensayos de células Treg *in vitro* muestran que las células CD4+CD25+ de ratones ICOS^{-/-} son funcionales, suprimiendo la proliferación y la producción de IL2 por parte de células efectoras CD4+CD25- procedentes de ratones normales o ICOS-deficientes. Esto sugiere que ICOS no se requiere para la función T reguladora *in vitro*.

Sin embargo, el número de células Treg CD4+CD25+Foxp3+ está significativamente disminuido en el bazo y en los nódulos linfáticos de ratones ICOS^{-/-}. La reducción no se debe a diferencias en niveles de expresión de estos marcadores, ni a una producción deficiente de células CD4+CD25+ en el timo. Además, las células CD4+ de ratones ICOS-deficientes pueden recibir eficientemente coestimulos a través de CD28 y producir IL2, dos importantes factores en la generación de células CD4+CD25+ en el timo. Estamos analizando posibles diferencias en la sensibilidad a apoptosis espontánea y supervivencia en células Treg CD4+CD25+ en la periferia de ratones ICOS^{-/-}, que pueda contribuir al descenso de estas células en órganos linfoides secundarios y a una mayor sensibilidad a ciertas enfermedades autoinmunes, como EAE, en estos animales.

ESTADIO DE DIFERENCIACIÓN, ACTIVACIÓN Y APOPTOSIS DE LOS LINFOCITOS T EN UNA COHORTE DE PACIENTES NO PROGRESORES A LARGO PLAZO CON EVOLUCIÓN DE CD4 DIVERGENTE. López M, Soriano V, Lozano S, Cascajero A, Ballesteros C, Rodés B, González-Lahoz J, Benito JM. Hospital Carlos III. Madrid.

Introducción. Diferentes factores como la activación y apoptosis de las células T se han asociado con la disminución del nivel de linfocitos T CD4+ y con la progresión de la infección por VIH. Sin embargo, una pequeña proporción de sujetos VIH+ es capaz de mantener niveles altos de linfocitos T CD4+ y frenar la progresión de la infección. Hemos analizado los niveles de activación y apoptosis en varias subpoblaciones de linfocitos T CD4+ y CD8+ en una cohorte de pacientes no progresores a largo plazo (LTNP), algunos de los cuales mostraron una progresión lenta de la infección.

Métodos. 61 sujetos VIH+ fueron incluidos en el estudio. 29 pertenecen a una cohorte bien caracterizada de LTNPs, y fueron estratificadas en dos grupos según la evolución de CD4: a) No progresores (NP) con CD4 estables durante 10 años de seguimiento; b) progresores lentos (PL) que mostraron una disminución significativa de CD4 (media: 64 cél/microlitro/año) durante el mismo periodo. Los 32 individuos restantes son progresores típicos (PT), sin tratamiento antirretroviral.

El estadio de diferenciación de las células T CD4+ y CD8+ fue medido en base a la expresión de CD45RA y CD27 mediante citometría de flujo de 4 colores. El nivel de activación de diferentes subpoblaciones de los linfocitos T CD4+ y CD8+ fue analizado utilizando un ensayo cuantitativo de expresión de CD38. El nivel de apoptosis de las subpoblaciones naive y memoria de los linfocitos T CD4+ y CD8+ fue analizado mediante tinción con Anexina-V. Las diferencias entre grupos fueron evaluadas utilizando el test de la T de Student y ANOVA.

Resultados. Los LTNPs tuvieron niveles significativamente más bajos de los linfocitos T CD4+ memoria efector que los PT (13%+2 y 26%+5, respectivamente; p= 0,02) y de los linfocitos T CD8+ memoria efector (18%+2 y 27%+3; p= 0,036). Los LTNPs tuvieron niveles medios de activación más bajos que los PT en las células T CD4+ memoria efectoras, CD8+ memoria central y CD8+ memoria efectoras expresado como moléculas de CD38/cél (2442+383 vs 3804+542; p= 0,021; 3989+371 vs 3291+353; p= 0,0001; y 3804+567 vs 2441+268; p= 0,039). El nivel medio de apoptosis de la población total de linfocitos T CD4+ y de la subpoblación de linfocitos T CD4+ memoria fue más bajo en LTNPs que en PT (8%+1 vs 13%+1; p= 0,006; y 14%+2 vs 20%+2; p= 0,03; respectivamente).

Los pacientes NP presentaron valores similares de carga viral plasmática que SP. No se observaron diferencias significativas en el estadio de diferenciación, niveles de activación y apoptosis de los linfocitos T CD4+ y CD8+ entre los dos grupos de pacientes NP y SP.

Conclusiones. Bajos niveles de activación y apoptosis están asociados con no-progresión de la infección por VIH. Sin embargo, estos parámetros no discriminan entre pacientes con progresión lenta y verdadera no-progresión, sugiriendo que otros factores del huésped o factores virales podrían estar implicados en la disminución progresiva de las células T CD4+ observada en los progresores lentos.

SESIÓN 5: INMUNODEFICIENCIAS

Moderadores: Eduardo Fernández-Cruz Pérez (Madrid),
María José Recio Hoyas (Madrid)

INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMUN Y TRASPLANTE DE PULMON: RESULTADO EXITOSO TRAS 2 AÑOS DE SEGUIMIENTO. Carbone J¹, Sarmiento E¹, Ussetti P², Laporta R², Carreño MC³, Rodríguez-Molina JJ¹, Fernández-Cruz E¹. ¹Servicio de Inmunología. Hospital Gregorio Marañón. ²Servicios de Neumología y ³Medicina Interna. Hospital Puerta de Hierro. Madrid.

Introducción-objetivo. Existe muy poca experiencia sobre el resultado de un trasplante pulmonar (TP) en pacientes con enfermedad pulmonar terminal, una de las primeras causas de mortalidad, en pacientes con inmunodeficiencia variable común (IDVC). La coexistencia de una enfermedad sistémica inmunológica puede constituir una contraindicación y dilema a la hora de decidir la indicación del trasplante.

Presentamos el caso de un paciente con IDVC en el cual se realizó con éxito un TP, única opción terapéutica de larga duración para este paciente.

Caso clínico. Varón de 39 años sometido a TP bilateral el 18.12.04 (H. P. de Hierro). Antecedentes. Infección respiratoria recurrente. Toxoplasmosis (1981). Tuberculosis pulmonar (1988). Acude a la Consulta de Inmunología (H. G. Maraño) en 1988 donde se diagnostica IDVC (criterios ESID) e inicia tratamiento sustitutivo con GGIV. Ya tiene bronquiectasias en este momento. Aunque el paciente mejora clínicamente los primeros años tras inicio de GGIV, desarrolla insuficiencia respiratoria progresiva secundaria a bronquiectasias a lo largo de los años. Asocia leucopenia, linfopenia T CD4 cuantitativa y funcional, y trombocitopenia sin afectación medular. Hepato-esplenomegalia con hipertensión portal. Psoriasis severa. No evidencia de síndrome linfoproliferativo, enfermedad granulomatosa ni de proceso autoinmune sistémico. Hipercatabolismo de IgG. Inmunocompetencia pre-TP: Se mantuvieron niveles de IgG >1000 mg/dl desde que se decidió el TP (Flebogamma 40,000 mg c/2s). Ac anti-toxoides tetánico 4,53 mg/dl, anti-PCP 11 mg/dl, CD3 78% (390/mm³), CD4 45% (225/mm³), CD19 12% (60/mm³). Inmunosupresión post-TP: Ciclosporina 225 mg/12h (con reducción de dosis y posteriormente cambio a tacrolimus), azatioprina (suspendida posteriormente por leucopenia), prednisona 30 mg/día (con reducción de dosis hasta 10/5 mg días alternos). No recibió terapia de inducción con anticuerpos monoclonales. Profilaxis anti-infecciosa: anfotericina B, valganciclovir, pentamidina. GGIV post-TP inmediato: se planteó como objetivo mantener niveles de IgG entre 1.500 y 2.500 mg/dl (ajuste progresivo de dosis de GGIV entre 20,000 mg 2v/s y 20,000 mg 1v/sem). Media de IgG post-TP: 1920 mg/dl (primer año), 1651 mg/dl (segundo año). Estudio 1-mes post-TP: Espirometría: FVC 4410 (95,7%); FEV1 4050 (106,1%), FEV1/FVC: 91%. Gammagrafía de perfusión pulmonar: dentro de la normalidad. Rx Tórax sin infiltrados. Complicación de rechazo: 1 año post-TP rechazo A1 tratado con bolos de metil prednisolona. Complicaciones infecciosas post-TP: infección por CMV (cuantificación de CMV y antigenemias positivas) siendo tratado con ganciclovir y GGIV-específica para CMV (Cytotect); no desarrolló enfermedad CMV. Anemia y neutropenia tratados con Epogen y Neupogen. Se observa mejoría significativa de la psoriasis en el post-TP. No desarrollo de autoinmunidad ni de síndrome linfoproliferativo en el periodo post-TP. Calidad de vida: 2 años después del TP, el paciente hace vida y actividad laboral normalmente.

Conclusión. El TP resultó exitoso para el tratamiento de la enfermedad pulmonar terminal de un paciente con IDVC.

EXPERIENCIA DE LA UNIDAD FUNCIONAL DE INMUNODEFICIENCIAS EN EL HOSPITAL PUERTA DEL MAR DE CADIZ. *Sampalo A, Rodríguez C, Nieto A, Mora-López F, Rodríguez-Gutiérrez JF, Delgado L, Brieva JA. Hospital Puerta del Mar.*

Hace trece años, nos planteamos la creación de una «Unidad Funcional de Inmunodeficiencias». Nuestro objetivo fue asumir, no sólo el enfoque diagnóstico inicial de las mismas y su confirmación en el laboratorio, sino además implicarnos, razonablemente, en el manejo clínico-terapéutico de los enfermos con un firme compromiso de colaboración con otras especialidades. Con no pocos esfuerzos, fueron haciéndose realidad una consulta y un enfermero a tiempo parcial, el recurso de hospital de Día para tratamiento sustitutivo, y el ingreso en camas con responsabilidad compartida.

Hasta la fecha se han atendido unas 3000 consultas, correspondientes a 1238 pacientes. Se han diagnosticado 273 casos de Inmunodeficiencia: 206 humorales (117 Def. de IgA, 21 IDVC, 16 hipogammaglobulinemias transitorias, 16 Def. de subclases, 14 defectos de producción de Acs, 1 def. de BTK, 1 Síndrome de Good y 1 Síndrome linfoproliferativo ligado a X; 26 Deficiencias de Complemento (22 Def. C1-inh y 4 def. de C2), 12 Inmunodeficiencias celulares y/o combinadas: (1 ADA, 1 def. de clase II, 4 Di George, 3 CMC, 1 WAS, 1 Trombopenia ligada a X), 21 casos de linfopenia T CD4 idiopática y 8 Síndromes hiperIgE. Se ha descartado la sospecha diagnóstica de IDP en 352 pacientes. Los casos restantes corresponden a alergia (268), inmunoterapia (106), autoinmunidad (55) y celiaquías (180). Como anécdota, se han diagnosticado en la Unidad: 3 casos de Münchaussen, 2 de histiocitosis, 2 de Kawasaki, dos Síndromes hemofagocíticos y un linfoma MALT que debutó como angioedema.

Paralelamente al despliegue clínico, ha sido fundamental el desarrollo del laboratorio de diagnóstico molecular, que nos ha permitido confirmar sospechas diagnósticas, intervenir precozmente en otros miembros afectados, hacer diagnósticos prenatales y ser más resolutivos y razonablemente autosuficientes.

Se calcula que alrededor del 50% de las IDP permanecen aún sin diagnosticar. En el caso de las IDCS esto supone un serio problema de mortalidad infantil evitable. Pensamos que el inmunólogo, que es el especialista que posee mayores conocimientos básicos sobre IDP, puede y debe implicarse en su diagnóstico. Cualquier fórmula que garantice un diagnóstico a tiempo de las inmunodeficiencias es válida. Nuestra propuesta de acortar distancias entre el laboratorio y la cama del paciente, aunque ardua, termina resultando eficaz. Iniciativas similares, podrían contribuir a reforzar el papel hospitalario del inmunólogo y a amortiguar el problema de la fuga de residentes médicos en la especialidad.

Nuestro agradecimiento a los compañeros de LaPaz, Sondureta y Vald Hebron por sus inestimables enseñanzas y colaboración.

ESTUDIO DE RT-PCR CUANTITATIVA REVELA BAJA EXPRESIÓN DEL GEN DE C1 INHIBIDOR EN PACIENTES CON ANGIOEDEMA HEREDITARIO. *Mena de la Cruz R, López-Lera A, Garrido S, Fontán G, López-Trascasa M. Unidad de Inmunología. Hospital Universitario La Paz, Madrid.*

C1 inhibidor es una proteína perteneciente a la familia de las serpinas (inhibidores de las serín-proteasas). Regula la activación de la vía clásica del sistema del complemento, de la kalikreina, la plasmina, la fibrinólisis, y los factores XIa y XIIa de la coagulación.

Defectos en la transcripción o la traducción debidos a alteraciones en el gen de C1 Inhibidor (q11.2-q13) producen la enfermedad autonómica dominante denominada Angioedema Hereditario (HAE). Los pacientes con esta patología sufren edemas recurrentes en tejidos subcutáneos, dolores abdominales, tumefacciones en vías respiratorias altas, eritema generalizado y presentan niveles de C1 Inhibidor cuantitativa (HAE Tipo I) o funcionalmente (HAE Tipo II) inferiores al 50%.

En este estudio se realizó un análisis, mediante RT-PCR cuantitativa a tiempo real, de la expresión del C1 inhibidor en una serie de 26 pacientes de la población española y los valores obtenidos se compararon con 13 muestras control. El grupo de pacientes presentó una media significativamente inferior a la de los controles. En los pacien-

tes con mutaciones que introducen un codón stop prematuro, así como en aquellos con mutaciones que producen un cambio de aminoácido, se observaron reducciones muy marcadas (del 96% y 85% respectivamente) respecto al grupo control. En el caso de las mutaciones que alteran el proceso de splicing, la reducción fue del 81%. Al analizar por separado los pacientes con mutaciones que afectan al splicing del exón 3, la reducción en los niveles de mRNA fue significativamente mayor (97%) que en el resto de alteraciones del splicing (62%).

Estos resultados sugieren una posible transinhibición de la transcripción del alelo sano por parte del alelo mutado, así como un papel de los transcritos alternativos sin exón 3 en la regulación de la expresión de C1 inhibidor.

PENETRANCIA INCOMPLETA DEL DEFECTO DE LA SERINA-PROTEASA-2 ASOCIADA A LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MASP-2). *García-Laorden MI¹, García-Saavedra A¹, Rodríguez de Castro F², Solé-Violán J³, González-Quevedo N¹, Domínguez-Acosta AR¹, Rúa-Figueroa I⁴, Rodríguez-Gallego C¹.* ¹Inmunología. ²Neumología. ³UMI. ⁴Reumatología, Hospital de G.C. Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria, Canarias.

La vía de las lectinas (VL) del sistema del complemento se activa mediante la unión de la lectina de unión a manosa (MBL) o ficolinas a carbohidratos específicos en las superficies microbianas, activándose las serina-proteasas asociadas a la MBL (MASPs). MASP-2 actúa sobre C4 y C2, generando la convertasa de C3. En 2003 se describe un paciente con desórdenes inflamatorios y autoinmunes, e infecciones severas por *S. pneumoniae*, homocigoto para la mutación D105G del gen MASP2. Esta mutación impide la unión de la MASP-2 a la MBL y las ficolinas, no permitiendo la activación de la VL.

Hemos analizado la mutación D105G, mediante PCR-RFLP, en 868 controles sanos, 967 adultos con neumonía comunitaria, 43 niños con infecciones respiratorias recurrentes, 130 pacientes con LES y 598 pacientes con VIH. Los genotipos se confirmaron mediante secuenciación directa. En todos los individuos se conocía el genotipo MBL2. También se analizaron la actividad de la VL y la concentración sérica de MASP-2 en controles sanos.

La frecuencia alélica de D105G en controles fue 0,024 (homocigosis esperada 0,00058). Se identificaron 2 homocigotos D105G, ambos del grupo control. El primero (mujer, 37 años), del personal hospitalario, presentaba además un genotipo MBL2 bajo-productor. El segundo (mujer, 39 años), un donante de sangre, ambos con niveles séricos muy disminuidos de MASP-2 y nula o muy baja actividad de la VL. En examen de salud y amplia analítica bioquímica e inmunológica no se detectó enfermedad o alteración alguna.

La deficiencia de MASP-2 se considera actualmente una inmunodeficiencia primaria, asociada a infecciones piógenas y LES. Además del paciente inicial, se ha descrito la homocigosidad D105G en un niño de un grupo de pacientes con infecciones respiratorias de repetición, y en una niña de un grupo con fibrosis quística, ambos grupos analizados para la asociación con mutaciones en MASP2. Sin embargo, el hecho de que los dos individuos adultos deficientes de MASP-2 que presentamos no muestren infecciones relevantes, ni desórdenes autoinmunes o inflamatorios detectables, indica una baja penetrancia clínica del defecto de MASP-2. Estos resultados muestran la necesidad de estudios adicionales para cla-

rificar la relevancia clínica de esta relativamente frecuente alteración.

DIAGNÓSTICO DEL PRIMER PACIENTE CON AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X (ALX) QUE PRESENTA UNA MUTACIÓN MISSENSE EN EL DOMINIO QUINASA (R641H) Y EL PRIMER POLIMORFISMO DESCRITO EN EL SH3 (A230V) DE Btk. *Pérez de Diego R^{1,2}, Bravo J, Allende LM³, Rivera J, Ferreira A¹, Fontán G¹, García Rodríguez MC¹.* ¹Unidad de Inmunología, Hospital Universitario «La Paz», Madrid. ²Grupo de transducción de señales, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO), Madrid. ³Servicio de Inmunología, Hospital Universitario «12 de Octubre», Madrid

La agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX) se produce por mutaciones en el gen que codifica para la proteína Btk (tirosina quinasa de Bruton).

En la Unidad de Inmunología del Hospital Universitario La Paz se han diagnosticado hasta la fecha un total de 69 pacientes con ALX pertenecientes a 52 familias no relacionadas, encontrando 48 mutaciones diferentes.

En este trabajo, presentamos el caso de un paciente de dos años de edad diagnosticado de una ALX clásica, en el cual se ha detectado una mutación en el dominio quinasa de Btk (R641H), y lo que parecía ser una mutación en el dominio SH3 de dicha proteína (A230V). Si bien en un principio tras analizar a más de 100 controles sanos nos indicaba que A230V era una mutación de Btk ya que ninguno de ellos presentaba dicho cambio, resultó ser un polimorfismo de esta familia al encontrar a un varón sano que lo presenta. Es la primera vez que se describe este polimorfismo en el dominio SH3 (A230V). La madre es portadora de la mutación y el polimorfismo, mientras que la abuela materna, la hermana de la madre y uno de sus hijos tan solo presentan el polimorfismo A230V. El paciente presenta un fenotipo clásico de ALX y el estudio de la proteína por citometría de flujo revela la presencia de Btk.

La mutación del dominio quinasa ya se ha descrito, viendo que en este caso el cambio de aminoácido afecta a la estabilidad estructural local, ya que la R641 se encarga de formar una pareja iónica con E567 contribuyendo a la interacción entre dos hélices del dominio.

El análisis estructural revela que el polimorfismo A230V provoca un cambio de aminoácido situado en uno de los lazos que unen dos láminas b, componentes del barril b que conforma el dominio SH3. En esta zona se produce la interacción con diferentes proteínas, tales como Syk, Vav o c-Cbl entre otras; y este tipo de cambio de aminoácido sería factible que generase un impedimento estérico que afecte a dichas interacciones, ya que en otro punto de la proteína el cambio de alanina por valina si es causante de una mutación que genera ALX; pero parece que tal cambio no afecta a la correcta función de Btk. Las únicas mutaciones del dominio SH3 de Btk que se han visto son las que generan una parada prematura en el marco de lectura provocando la ausencia de Btk.

El estudio completo del gen de BTK que se realiza como norma en la Unidad nos ha permitido encontrar a un paciente que presenta un polimorfismo en SH3. Se muestra así la importancia del análisis completo del gen y del estudio de todas las posibles portadoras en las familias. El hecho de que no existan mutaciones missense en el dominio SH3, plantea hasta que punto es importante el papel del dominio SH3 en la activación de Btk necesario para el desarrollo de los linfocitos B.

AMPLIA VARIABILIDAD CLÍNICA E INMUNOLÓGICA EN UNA FAMILIA CON CINCO PACIENTES AFECTOS DE AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL X. Sologuren I¹, García-Rodríguez MC², Fontán G², Pérez de Diego R², Santiago E¹, Alvarez-Santana MC¹, Cárdenas MA³, Rodríguez-Gallego C¹. ¹Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria. ²Servicio de Inmunología. Clínica Infantil, Hospital La Paz, Madrid. ³Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

XLA, causada por mutaciones en el gen BTK, es una enfermedad con penetrancia completa que se manifiesta desde la infancia. Los pacientes presentan valores muy disminuidos o ausentes de linfocitos B periféricos y de inmunoglobulinas séricas de todos los isotipos. Existe una considerable heterogeneidad clínica, y se postula la existencia de genes modificadores de la susceptibilidad a la infección. Presentamos una familia, portadora de la nueva mutación S575R, con 5 miembros diagnosticados de adultos de XLA. El caso índice (P1) se diagnosticó a la edad de 42 años, con una historia de infecciones respiratorias desde la infancia, niveles bajos de IgG (401 mg/dl), normales de IgG2, IgG3, IgG4 and IgE, e indetectables de IgA e IgM. Con posterioridad se diagnosticaron 4 sobrinos de P1. P2 (36 años al diagnóstico) había sido diagnosticado de IDCV a los 33 años, con una historia de infecciones sinopulmonares desde la infancia. Los otros tres pacientes (22-38 años al diagnóstico) presentaron una penetrancia baja (P3 y P4) o ausente (P5) y una gran heterogeneidad en niveles de inmunoglobulinas séricas, porcentaje de linfocitos B (0,04%, P1 - 1,2%, P4) título de isohemaglutininas y respuesta a vacunación. Es de destacar que P5 presenta valores normales de IgG, IgA e IgE, con un déficit selectivo de IgM. El análisis de expresión de Btk en P2 y P3 mostró ausencia de expresión. El análisis genético de genes implicados en la susceptibilidad a la infección (MBL, MASP2, C2, TLR2, TLR4, FCGRIIA, FCGRIIA y FCGRIIB) no mostró correlación genotipo-fenotipo. Es de destacar que P5 (27 años), no presenta manifestaciones clínicas en ausencia de tratamiento o profilaxis antibiótica, aún presentando deficiencia completa de MBL (YB/YB) y siendo heterocigoto para la mutación D105G de MASP2, lo que sugiere que MBL no es un gen modificador de XLA.

Se presenta la mayor heterogeneidad clínica e inmunológica familiar observada hasta la fecha en XLA, con el único paciente conocido sin manifestaciones clínicas. Nuestros resultados muestran el alto nivel de sospecha necesario para detectar casos atípicos de XLA e indican que el porcentaje de linfocitos B es el parámetro más importante de búsqueda, aún en individuos con niveles normales de IgG, IgA e IgE.

DIAGNÓSTICO EN LA EDAD ADULTA DE UN SÍNDROME DE HIPER-IGE FAMILIAR. Gil Herrera J¹, Rodríguez Dorrego R², Alvarez del Riego O¹, Sánchez Ramón S¹, Navarro J¹, Rodríguez Mahou M¹, Fernández-Cruz E¹. ¹Servicios de Inmunología y de ²Medicina Interna del Hospital General Universitario «Gregorio Marañón», Madrid.

Introducción. El síndrome de hiper-IgE (HIES) es un inmunodeficiencia primaria con afectación multisistémica y expresión de anomalías inmunológicas, esqueléticas y del tejido conjuntivo. Su transmisión es autosómica dominante con expresión variable; se han descrito también una forma de herencia autosómica recesiva y presentaciones de modo esporádico.

Pacientes y métodos. Familia de tres hermanos sin antecedentes de consanguinidad ni muertes en la infancia, madre fallecida por

disección de un aneurisma aórtico. El primer paciente identificado es un varón que padeció infecciones severas respiratorias (neumonías) y digestivas, abscesos y foliculitis cutáneas desde la infancia, y retención de la primera dentición. A los 49 años ingresó en nuestro hospital con fiebre, trombopenia, adenopatías mediastínicas y lesiones cutáneas; meses más tarde reingresa con tuberculosis hepatoesplénica. En el último año aparece bronconeumonía obliterante. El segundo hermano varón presenta forunculosis desde la infancia, trombopenia, hepatopatía con hipertensión portal y un tumor epidermoide de lengua en la edad adulta. Ambos pacientes presentan características faciales distintivas del HIES (frente prominente, dismorfias oculares, ensanchamiento nasal y prognatismo). La hermana, de 54 de edad, tiene un hijo varón diagnosticado de linfoma de Burkitt a los 28 años.

En el estudio inmunológico destacan el aumento de las cifras de IgE (324, 996 y 10111 KU/L) e IgA (489, 541 y 1110 mg/dL) en los tres miembros de la familia, IgG aumentada (1730 y 2210) en los dos varones, y cifras normales de IgM en todos ellos, sin paraproteínas circulantes. Recuentos leucocitarios con trombopenia en los dos varones, no hay eosinofilia en ninguno de los tres hermanos. Los recuentos linfocitarios son normales, funcionalmente se encuentra hiperergia tuberculínica y disminución de la respuesta linfoproliferativa *in vitro* a anti-CD3. Los recuentos de granulocitos son normales, sin defectos en la función fagocítica ni en el metabolismo oxidativo de los fagocitos. Todos los autoanticuerpos circulantes estudiados han sido negativos.

Conclusiones y discusión. Se ha identificado una familia HIES con espectro de presentación clínica variable. El diagnóstico se ha establecido en edad adulta, con una forma de presentación típica que ha pasado desapercibida durante años. La reciente descripción de asociación de aneurismas vasculares en otros dos pacientes con HIES, no relacionados entre sí, podría sugerir que el síndrome se expresaba en la generación anterior, y tener implicaciones preventivas para los miembros vivos de la familia afectada.

DIAGNÓSTICO PRENATAL RÁPIDO DE ATAXIA-TELANGIECTASIA POR ANALISIS MOLECULAR DIRECTO. Mancebo E¹, Bernardo I¹, Castro MJ¹, Fernandez-Martinez FJ¹, Barreiro E², De-Pablos P¹, Marin MJ¹, Cortezon S¹, Paz-Artal E¹, Allende LM¹. ¹Servicio de Inmunología, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid. ²Servicio de Genética, Hospital Universitario 12 de Octubre, Madrid.

Objetivos. Mutaciones en el gen ATM (Ataxia-Telangiectasia Mutated) causan la enfermedad autosómica recesiva Ataxia-Telangiectasia (A-T). En este estudio realizamos un diagnóstico prenatal de Ataxia-Telangiectasia partiendo de una muestra de amniocitos de una mujer embarazada. La pareja solicitante del diagnóstico tenía una hija que sufría A-T, debido a una delección en homocigosis en el gen ATM.

Métodos. La región codificante completa del gen ATM se secuenció en la paciente con A-T y sus padres, localizando el defecto genético, en un corto periodo de tiempo, siguiendo un protocolo optimizado. Para el diagnóstico prenatal se diseñaron unos primers específicos y se realizó una PCR para detectar la delección. Además, se descartó contaminación con DNA materno mediante el estudio HLA.

Resultados. En esta familia de origen gitano, nosotros llevamos a cabo un diagnóstico rápido de A-T. Esto nos permitió identificar el defecto genético y realizar el diagnóstico prenatal. Además, hemos realizado un estudio poblacional en gitanos españoles no relacionados y en controles no relacionados que muestra que la delección descrita podría ser un punto caliente en la población gitana.

Conclusión. El gran tamaño de la región codificante y la estructura genómica del gen ATM, junto con la ausencia de puntos calientes de mutación hacen que el screening de este gen sea complicado. La capacidad de identificar mutaciones en ATM nos aporta una herramienta que puede ser aplicada en diagnóstico confirmativo, consejo genético, predicción de portadores y diagnóstico prenatal.

DIFFERENTIAL BIOLOGICAL ROLE OF CD3 CHAINS REVEALED BY HUMAN IMMUNODEFICIENCIES. Recio MJ¹, Moreno-Pelayo MA², Kiliç SS³, Guardo AC¹, Sanal O⁴, Allende LM⁵, Pérez-Flores V¹, Mencía A², Modamio-Høybjør S², Seoane E⁶, Regueiro JR¹. ¹Inmunología, Facultad de Medicina, Univ. Complutense, Madrid. ²Unidad de Genética Molecular, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. ³Pediatric Immunology, Uludağ Univ. Medical Faculty, Göriükle-Bursa, Turkey. ⁴Immunology Division, Hacettepe Univ. Children's Hospital, Ankara, Turkey. ⁵Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. ⁶Inmunobiología Molecular, Hospital Gregorio Marañón, Madrid.

The biological role *in vivo* of the homologous CD3 γ and δ invariant chains within the human TCR/CD3 complex is a matter of debate, as murine models do not recapitulate human immunodeficiencies. We have characterized, in a Turkish family, two new patients with complete CD3 γ deficiency and lethal severe combined immunodeficiency (SCID) symptoms, and compared them with three CD3 γ -deficient individuals belonging to two families from Turkey and Spain. All tested patients shared similar immunological features such as a partial TCR/CD3 expression defect, mild $\alpha\beta$, and $\gamma\delta$ T lymphocytopenia, poor *in vitro* proliferative responses to antigens and mitogens at diagnosis, and very low TCR rearrangement excision circles and CD45RA+ $\alpha\beta$ T cells. However, intra- and interfamilial clinical variability was observed in patients carrying the same CD3G mutations. Two reached the second or third decade in healthy conditions, whereas the other three showed lethal SCID features with enteropathy early in life. In contrast, all reported human complete CD3 δ (or CD3 ϵ) deficiencies are infants with life-threatening SCID and very severe $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T lymphocytopenia. Thus, the peripheral T lymphocyte pool was comparatively well preserved in human CD3 γ deficiencies despite poor thymus output or clinical outcome. We propose a CD3 δ >>CD3 γ hierarchy for the relative impact of their absence on signalling for T cell production in humans.

INMUNODEFICIENCIA COMBINADA SEVERA POR DEFICIENCIA EN LA CADENA GAMMA COMÚN QUE DEBUTA EN LACTANTE CON SÍNDROME GRIPAL. Mancebo E¹, Allende LM¹, Bernardo I¹, Romo EM¹, Castro MJ¹, Guzmán M¹, Varela P¹, Paz-Artal E¹, Villa JR², Clemente J³, Ruiz-Contreras J³. ¹Servicio de Inmunología. Hospital 12 de Octubre. ²Servicio de Pediatría. Hospital Niño Jesús. ³Unidad de Inmunodeficiencias. Pediatría. Hospital 12 de Octubre. Madrid.

La inmunodeficiencia combinada severa ligada al X (IDCS-X) es causada por mutaciones en el gen de la cadena gamma común (IL2RG), que codifica para la subunidad gamma del receptor de las citoquinas IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-15 e IL-21.

Caso Clínico. Lactante de 6 meses de edad, asintomático hasta el 3º mes de vida, cuando fue diagnosticado de infección del tracto urinario, con motivo de un proceso febril. Recibió tratamiento profiláctico antibiótico hasta el 5º mes, comenzando entonces con decaimiento, tos y cianosis. Tres semanas después reingresa por persistencia de los sín-

tomos y es diagnosticado finalmente de neumonía intersticial por gripe A. Ambos padres habían tenido síndrome gripal una y dos semanas antes, respectivamente, del comienzo de los síntomas del niño. No existen antecedentes familiares de inmunodeficiencia ni consanguinidad.

El estudio inmunológico reveló una marcada linfopenia T y NK, con valores normales de linfocitos B y agammaglobulinemia, compatible con inmunodeficiencia combinada severa. Al ser la deficiencia en la cadena gamma común la forma más frecuente y tratarse de un varón realizamos el estudio genético del gen IL2RG, encontrando una mutación de splicing en el exon 7 (938(+1) gtgag \rightarrow atgag), previamente publicada en la literatura. Con 7 meses se le realizó un trasplante de médula ósea procedente de la madre, donante haploidéntico, obteniéndose buen prendimiento. El paciente ha acudido a seguimientos tras el trasplante mostrando una clara recuperación clínica e inmunológica. En conclusión, presentamos la caracterización molecular e inmunológica de un paciente con IDCS-X. Enfatizando en el debut característico del caso clínico y en la recuperación clínica e inmunológica tras el trasplante.

IDENTIFICACIÓN DE LA VARIANTE ALÉLICA DEL GEN DE LA PERFORINA [PRF1, N252S] EN HETEROCIGOSIS EN UN PACIENTE CON SOSPECHA CLÍNICA DE LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCÍTICA. Santamaría B, Gil J, Fernández-Cruz E, Urrea R, Hernández A, Rodríguez-Sáinz C. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Servicio de Inmunología.

Objetivo. Evaluación y diagnóstico molecular de un paciente pediátrico con sospecha clínica de linfocitosis hemofagocítica determinando la secuencia nucleotídica codificante del gen Prf1.

Paciente y métodos. Paciente varón de dos meses de edad con criterios clínicos sugestivos de linfocitosis hemofagocítica. El DNA obtenido de la sangre periférica del paciente y de sus dos progenitores (no consanguíneos) fue amplificado para los exones 2 y 3 del gen Prf1. Los fragmentos amplificados fueron purificados y secuenciados, comparando las secuencias obtenidas con la secuencias consenso disponible en la base de datos OMIM (número de acceso NT 008583) mediante el programa BLAST. (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>).

Resultados. En el paciente, el exón 3 del gen de la perforina presenta una mutación puntual (755A-G), que causa un cambio de Asn a Ser en la posición 252 (N252S). La variante alélica N252S se identificó en heterocigosis, heredada de su madre clínicamente sana.

Discusión. Nuestros resultados en un paciente con sospecha clínica de linfocitosis hemofagocítica, documentan el tercer caso descrito en la literatura con la presencia de la variante alélica N252S. Los tres casos están en heterocigosis y en asociación con situaciones patológicas relacionadas con la actividad citotóxica del sistema inmune: el primero se describió en un paciente con linfocitosis hemofagocítica familiar (posiblemente en combinación con otra mutación o mutaciones no identificada-s)⁽¹⁾; el segundo caso con esta variante alélica se encontró en un paciente con síndrome linfoproliferativo autoinmune y con un linfoma B difuso de células grandes, rico en histiocitos (en combinación con otra mutación en heterocigosis en el gen Fas⁽²⁾). Nuestro caso sugiere que el alelo [PRF1, N252S] posiblemente tiene valor patogénico en conjunción con otra-s mutación-es cuya identificación está en curso.

Bibliografía

1. Sepp et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. Science 1999;286:1957-59.

2. Clementi et al. Ingerited perforin and Fas mutations in a patient with autoimmune lymphoproliferative syndrome and lymphoma. *New Engl J Med* 2004;351:1419-24.

DIAGNÓSTICO PRENATAL DE UNA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA: HIPOPLASIA CARTÍLAGO-PELO. *Calleja-Antolín S, Allende L, Clemente J, Barreiro E, Muñoz-Robles J, González L, de Pablos P, Paz-Artal E, Morales P. Servicio de Inmunología, Hospital Doce 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 que se transmite de forma autonómica recesiva. CHH se caracteriza, principalmente, por estatura corta, hipoplasia del pelo, defectos en la inmunidad celular y predisposición a varias neoplasias malignas

Objetivo. En este trabajo se presenta un caso de diagnóstico prenatal en el embrión de una mujer portadora de una inserción de 15 pb en la posición -11 en el gen RMRP, el padre del embrión es portador de la substitución +4C>T en el mismo gen. Ambos individuos son los progenitores de una niña enferma de CHH fallecida tras una infección respiratoria severa a los 29 meses de edad. Debido al carácter severo de la CHH se aconseja el diagnóstico prenatal en el embrión de la gestante a pesar de no presentar anomalías ecográficas ni analíticas durante el embarazo.

Metodología. Se procede a realizar amniocentesis a la semana 15 de la gestación, y cultivo de amniocitos durante 15 días. Tras la extracción de DNA de los amniocitos cultivados se realiza PCR del gen RMRP y posteriormente se secuencian.

Resultados. El embrión en gestación resultó ser portador de la inserción de 15 pb en la posición -11 del gen RMRP, mutación de origen materno. No portaba, sin embargo, la mutación +4C>T de origen paterno, por lo que se determinó que el sujeto estudiado no sería afecto de CHH. El embarazo se desarrolló con normalidad llegando a término.

LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE IL-7 NO EVOLUCIONAN PARALELAMENTE AL NIVEL DE LINFOCITOS T CD4+ EN PACIENTES EN ESTADIOS TEMPRANOS DE LA INFECCIÓN POR VIH. *Benito JM, López M, Lozano S, González-Lahoz J, Soriano V. Hospital Carlos III.*

Introducción. IL-7 es una citoquina involucrada en la homeostasis de células T, con un importante papel en la proliferación y supervivencia de dichas células. Aumenta en condiciones de linfopenia, tales como la infección por VIH. En estudios transversales, se ha observado una correlación inversa entre los niveles de células CD4+ y los niveles plasmáticos de IL-7, lo que sugiere que dicha citoquina aumenta paulatinamente a medida que desciende el nivel de linfocitos T CD4+. Para poner a prueba esta hipótesis, en el presente estudio hemos analizado de forma longitudinal la evolución de dicha molécula en pacientes con infección VIH no sometidos a tratamiento antiretroviral.

Pacientes y métodos. Se midieron los niveles de IL-7 plasmática empleando una técnica de enzimoimmunoanálisis de alta sensibilidad, en un grupo de 71 pacientes con infección crónica por VIH no sometidos a tratamiento antiretroviral y en 20 controles seronegativos pareados por edad. En un subgrupo de 14 pacientes se realizaron mediciones seriadas de IL-7 durante un periodo de seguimiento de al menos

2 años en ausencia de tratamiento. En el estudio transversal se realizaron correlaciones entre IL-7, CD4 y carga viral VIH (CV), empleando un test de Pearson. En el estudio longitudinal, se calcularon las pendientes de cada uno de los tres parámetros analizados (IL-7, CD4 y CV) para cada uno de los pacientes durante el periodo de seguimiento, empleando para ello un análisis de regresión lineal. La asociación entre dichas pendientes se evaluó por un test de Spearman.

Resultados. Los niveles de IL-7 plasmática estaban significativamente incrementados en los pacientes VIH con respecto a los controles sanos ($3,5 \pm 3,6$ versus $0,6 \pm 0,4$ pg/ml; $p < 0,001$). En el grupo de pacientes, IL-7 se correlacionó inversamente con CD4 tras ajustar por niveles de CV ($r = -0,3$, $p = 0,02$).

En el análisis longitudinal, la media de seguimiento fue de 39 ± 15 meses y la media de determinaciones de IL-7 por paciente fue de 4. Durante dicho periodo de seguimiento, la media de CD4+ disminuyó significativamente desde 900 ± 452 hasta 596 ± 275 cél/microlitro ($p = 0,04$), mientras que tanto los niveles de CV como de IL-7 permanecieron estables (desde $4,5 \pm 0,5$ hasta $3,9 \pm 1,2$ log copias/ml para CV; y desde $2,5 \pm 2,8$ hasta $2,6 \pm 2,2$ pg/ml para IL-7). La pendiente de CD4 fue negativa en todos los pacientes y estadísticamente significativa en la mitad de ellos (la media de pendiente para todo el grupo fue de -10 ± 10 céls/microlitro/mes), mientras que la pendiente de IL-7 fue muy cercana a cero en la mayoría de los pacientes (la media de pendiente fue $0,06 \pm 0,16$ pg/ml/mes). No se observó asociación significativa entre la pendiente de CD4 y la de IL-7 durante el periodo de seguimiento.

Conclusiones. En pacientes con infección crónica por VIH y niveles elevados de células CD4, los niveles de IL-7 no se incrementan en paralelo a la disminución de la cifra de células CD4 que ocurre durante la progresión de la infección. Estos resultados sugieren que debe existir un umbral de células CD4 necesario para poner en marcha el mecanismo homeostático que conduce al incremento en la producción de IL-7.

LAS CÉLULAS T CD4+ CD45RO+ SON LA PRINCIPAL DIANA DE LAS SINAPSIS VIROLÓGICAS FORMADAS POR LA ENVUELTA DEL VIH-1. *Puigdomènech I, Izquierdo N, Martínez-Picado J, Juan M, Clotet B, Blanco J. Fundació IrsiCaixa Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona.*

Introducción. Las sinapsis virológicas se definen como contactos estables entre células infectadas por el VIH y células diana (linfocitos T CD4), y representan el principal mecanismo de transmisión del VIH. Se ha descrito que estas interacciones celulares están mediadas por la unión de la proteína viral gp120 a su receptor CD4 expresado en la célula diana y que se establecen preferentemente en células T CD4 CD45RO+. Las razones de esta selectividad se presentan a continuación.

Métodos. Las células T CD4 CD45RO+ y CD45RA+ se purificaron de sangre de donantes sanos mediante selección negativa. Ambos tipos celulares (CD45RO+ y CD45RA+) se cocultivaron conjuntamente con células MOLT CCR5 crónicamente infectadas con aislados de VIH X4 y R5 (NL4-3, BaL). Los contactos establecidos entre célula infectada y célula diana así como la transmisión viral y muerte celular se analizaron por citometría de flujo a las 2 o 24 horas de cocultivo. La expresión de CD4, CXCR4 (CD184), CCR5 (CD195), LFA-1(CD11a), ICAM-1(CD54), ICAM-2(CD102) y ICAM-3(CD50) en los diferentes tipos celulares se analizó por citometría de flujo.

Resultados. En cocultivo con células MOLT infectadas, las células T CD4 CD45RO+ captan mayor número de virus ($26 \pm 6\%$ en CD45RO+ y $10 \pm 1\%$ en CD45RA+ para virus NL4-3) y mueren más rápido ($41 \pm$

11% en CD45RO+ y 21+/-6% en CD45RA+ para virus NL4-3). Para determinar la razones de la mayor sensibilidad de las células CD45RO+, se ha desarrollado un método para cuantificar los contactos celulares entre células CD45RO+/CD45RA+ y células MOLT mediante el uso de marcadores intracelulares diferentes (CMRA para las CD45RO+ y CMFDA para las CD45RA+). Por citometría de flujo se ha observado un mayor porcentaje de uniones entre células MOLT infectadas y células T CD4 CD45RO+ que con células T CD4 CD45RA+ (17+/-5% en CD45RO+ y 9+/-3% en CD45RA+ para virus NL4-3 y 11+/-5% en CD45RO+ y 7+/-3% en CD45RA+ para virus BaL) y a la vez una disminución de células CD45RO+ libres a las 24 horas de cocultivo (del 50% para virus NL4-3 y del 80% para virus BaL). Consistente con estos resultados, las células CD45RO+ presentan mayor expresión de las moléculas de adhesión LFA-1, ICAM-1, ICAM-2 y ICAM-3 que las células CD45RA+. La presencia del anticuerpo anti CD4 neutralizante Leu3a inhibe completamente el contacto, la transferencia viral y la muerte celular.

Conclusiones. Las sinapsis virológicas afectan preferentemente a las células T CD4 CD45RO+ haciéndolas más susceptibles a la transferencia viral y a la muerte celular. Nuestros datos sugieren que esta diferencia está asociada a una mayor eficiencia en el establecimiento de contactos celulares por parte de las células CD45RO.

SESIÓN 6: AUTOINMUNIDAD-2

Moderadores: Julia Sequí Navarro (Madrid),
Luisa María Villar Guimerans (Madrid)

LA SOBRE-EXPRESIÓN DE BCL-2 EN LINFOCITOS B DE RATONES DEFICIENTES EN P21 (CIP1/WAF1) INDUCE UN LES ACELERADO EN RATONES C57BL/6. *Santiuste I, Fernández-Rey M¹, Iglesias M¹, Buelta L², Balomenos D³, Merino J¹, Merino R^{1,4}.* ¹Departamento de Biología Molecular y ²Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Universidad de Cantabria, Santander. ³Centro Nacional de Biotecnología y ⁴Centro de Investigaciones Biológicas, CSIC.

Es ampliamente conocido que las enfermedades autoinmunes son el resultado de la participación conjunta de diferentes alteraciones ambientales y/o genéticas que de forma individual son insuficientes para promover la enfermedad. Como y cuales de estos factores interactúan entre si para desencadenar autoinmunidad es en gran medida desconocido. En el presente estudio, se ha analizado la posible interacción entre anomalías en la regulación del ciclo celular y de la apoptosis linfocitaria en el control de la tolerancia linfocitaria y el desarrollo de autoinmunidad en ratones normales. Para ello, ratones C57BL/6 deficientes en p21 (CIP1/WAF1) (B6-p21-/-), que de forma espontánea desarrollan un cuadro autoinmune ligero, se cruzaron con ratones B6 que sobre-expresan la molécula anti-apoptótica Bcl-2 humana en linfocitos B (B6-hBcl-2 Tg). Posteriormente, se analizó el desarrollo de SLE en los diferentes ratones F1 resultantes (B6-p21+/+Bcl-2 Tg-, B6-p21+/+Bcl-2 Tg+, B6-p21-/-

Bcl-2 Tg- y B6-p21-/-Bcl-2 Tg+), mediante el estudio de la producción de autoanticuerpos circulantes, el desarrollo de glomerulonefritis y la supervivencia de los animales. Nuestros resultados muestran que los ratones doble mutantes B6-p21-/-Bcl-2 Tg+, en comparación con los simple mutantes o los animales normales, presentan títulos elevados de autoanticuerpos circulantes anti-DNA a los 8 meses de edad y desarrollan una glomerulonefritis severa a los 10 meses de edad, lo que

acelera su mortalidad. En conclusión, nuestro estudio muestra en la homeostasis y la tolerancia linfocitaria son relevantes las interacciones moleculares entre los reguladores del ciclo celular y de la apoptosis.

ALTERACIONES EN LA COMPARTIMENTALIZACIÓN DE LOS LINFOCITOS B EN ENFERMEDADES AUTOINMUNES SISTÉMICAS HUMANAS. *Rodríguez-Bayona B, González I, León P, Pérez-Venegas JJ, Rodríguez C, Brieve JA.* Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz.

El lupus eritematoso sistémico (LES) y la artritis reumatoide (AR) son considerados como prototipos de enfermedad autoinmune sistémica. A pesar de tratarse de dos modelos de autoinmunidad aparentemente distintos, el hecho de que terapias destinadas a la depleción específica de linfocitos B sean eficaces en el tratamiento de ambas patologías, sugiere un papel importante de las células B en la patogénesis no sólo del LES, sino también de la AR. Las subpoblaciones B de sangre periférica (SP) en individuos sanos se distribuyen entre células B naïve (CD27- IgD+), células B de memoria (CD27+) y un escaso número de plasmablastos. A su vez, la población CD27+ se reparte entre células CD27+ IgD- (post-switch) y células CD27+ IgD+ (no-switch). El objetivo de este estudio fue el análisis de la distribución de las subpoblaciones B en SP de pacientes diagnosticados de LES o AR *vs* individuos sanos. Para ello, se purificó la fracción mononuclear de sangre periférica (SP) y se analizó mediante citometría de flujo.

Resultados. En pacientes con LES los niveles de CP fueron significativamente superiores a los encontrados tanto en individuos sanos como en pacientes con AR. Se encontraron diferencias fenotípicas entre plasmablastos de pacientes con LES en función de parámetros clínicos. Así, la expresión de CXCR4 aparecía aumentada en LES activo (SLEDAI>10).

La población de memoria CD27+ tendía a estar disminuida en ambas enfermedades frente a individuos sanos. La discriminación entre poblaciones CD19+ CD27+ IgD+ y CD19+ CD27+ IgD-, permitió detectar una drástica disminución de la población CD27+ IgD+ en LES y AR (8,1 ± 0,9 y 8,8 ± 1,7 respectivamente *vs* individuos sanos 16,5 ± 1,7; media ± s.e.m; p<0,01), mientras que la población CD27+ IgD- se mantenía en valores similares en los tres grupos estudiados. Estas diferencias resultaron más marcadas cuando los pacientes con LES se clasificaron en activos/inactivos, siendo más acusadas en los pacientes con enfermedad activa. No se encontraron diferencias significativas en la población naïve (CD27- IgD+) entre los tres grupos. Sin embargo, se detectó una población minoritaria definida como CD27- IgD-, que aparecía incrementada en LES y AR (6,9 ± 0,6 y 8,3 ± 1,7 respectivamente *vs* individuos sanos 3,6 ± 0,6; media ± s.e.m; p<0,01).

La exploración de estas poblaciones en el líquido sinovial de los pacientes con AR reveló importantes diferencias con respecto a la SP de AR. Destacaron un aumento de la población de memoria total, así como un descenso de la población naïve (CD27- IgD+). La población CD27- IgD- aparecía claramente incrementada con respecto a la de SP.

Conclusiones. El aumento de plasmablastos en SP es una característica diferencial del LES, mientras que la disminución de células B de memoria a expensas de la subpoblación CD27+ IgD+ es un hallazgo común a ambas patologías. Además, aparece una población CD27- IgD- que está discretamente aumentada en LES y AR, siendo muy abundante dentro de la articulación reumatoidea. Estos resultados revelan una profunda alteración de la compartimentalización linfocitaria B en estas enfermedades.

FRECUENCIA Y FENOTIPO DE LINFOCITOS CD8+ CMV PP65 ESPECÍFICOS EN ARTRITIS REUMATOIDE. Pita ML, Gayoso I, de la Rosa O, Peralbo E, Solana R. Universidad de Córdoba.

La infección con el citomegalovirus (CMV) en humanos puede dirigir expansiones oligoclonales de linfocitos T CD8+ con limitada especificidad antigénica, especialmente durante el envejecimiento. Esta etapa se asocia con un incremento en las infecciones y una disminución de la inmunocompetencia, fenómeno llamado inmunosenescencia. Por otra parte se ha sugerido que la infección por CMV también está relacionada con la estimulación antigénica crónica desarrollada en artritis reumatoide (AR).

El objetivo del presente trabajo fue comparar la frecuencia y el fenotipo de células T CD8+ CMV específicas de individuos con AR comparado con individuos sanos de diferentes edades.

Por medio de Citometría de flujo multiparamétrica, se estudio el porcentaje de linfocitos T CD8+ periféricos, específicos para el pentámero HLA-2 cargado con el péptido NLVPMVATM-pp65 de CMV. En individuos jóvenes (menores de 40 a.), de mediana edad (41-65 a.), pacientes con AR (43-68 a.) y ancianos (más de 65 a.). También se determinó la expresión de CD27, CD28, CCR7, CD45RA, C1.7 y CD85j, en estas células.

Se encontró un aumento estadísticamente significativo de linfocitos CD8+ CMV pp65 específicos en individuos con AR y ancianos comparado con sujetos jóvenes y de mediana edad. Tanto en pacientes con AR como en ancianos el fenotipo más frecuente de la población T CD8 específica de CMV fue: CD27- CD28-, CD45RA- CCR7- y C1.7+ CD85j+. Esto apoya la hipótesis de que la infección con el CMV contribuye a las alteraciones de los linfocitos T CD8+ observadas en AR y que son comparables a los observados en el proceso de inmunosenescencia observado en ancianos, como son la acumulación de células T CD28null y el incremento en la expresión de receptores asociados a NK.

ALTERACIONES INMUNOFENOTÍPICAS EN SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON SÍNDROME ANTIFOSFOLÍPIDO OBSTÉTRICO. Carbone J, Lanio N, Sarmiento E, Gallego A, Micheloud D, Fernández-Cruz E. Servicio de Inmunología. Hospital Gregorio Marañón. Madrid.

Introducción. Distintos estudios en modelos animales y en pacientes han sugerido recientemente que el síndrome de anticuerpos antifosfolípidos (SAAF) no sólo es una patología pro-trombótica sino que también asocia un componente inflamatorio. También recientemente se han descrito células T CD4+ autoreactivas frente al cofactor beta-2-glicoproteína I, las cuales promueven la producción de anticuerpos antifosfolípidos (AAF). Se dice que estas células están activadas *in vivo* en pacientes con SAAF pero no en individuos sanos. Aunque se habla entonces de una implicación de la inmunidad celular en el SAAF, muy pocos estudios han evaluado las alteraciones inmunofenotípicas de los linfocitos de estos pacientes.

Objetivo. Presentar datos preliminares de un estudio transversal diseñado para definir las alteraciones de subpoblaciones linfocitarias T, B y NK que se observan en el SAAF obstétrico.

Métodos. Pacientes: 8 mujeres con SAAF obstétrico (diagnosticadas según criterios de clasificación de Sapporo) y 8 mujeres con aborto recurrente, de edad similar, que no tienen AAF. Las subpoblaciones linfocitarias T, B y NK se estudiaron en fresco, en sangre periférica, mediante citometría de flujo de tres colores (sangre total), incluyen-

do distintas combinaciones de anticuerpos monoclonales anti: CD3, CD4, CD8, CD25, CD45RA, CCR7, CD38, HLA-DR, CD19, CD27, IgD, CD5, CD40, CD16 y CD56.

Resultados. En relación con los controles, las mujeres con SAAF tenían: aumento de la expresión de marcadores de activación sobre células T CD4+ (CD4+CD38+DR+= 4 *versus* 2%, CD4+DR+= 6 *vs* 4%); expansión de células B-naive (CD19+CD27-IgD+= 73 *vs* 58%), expansión de células B patológicas (CD19+CD5+CD40+= 29 *vs* 9%); niveles más bajos de células B de memoria (CD19+CD27+= 21 *vs* 32%). Las pacientes con SAAF mostraron también niveles más bajos de células NK (CD3-CD56+CD16+= 6,8 *vs* 12%) y una tendencia a un mayor porcentaje de linfocitos atípicos CD3-CD56-CD16+ (6 *vs* 4%). No hemos encontrado diferencias en el porcentaje de células reguladoras T CD4+ y CD8+ (CD4+CD25high, CD8+CD28-).

Conclusiones. Las pacientes con SAAF tienen distintas alteraciones inmunofenotípicas en linfocitos de sangre periférica, algunas de ellas potencialmente implicadas en la patogenia del síndrome, lo que aporta más evidencia al concepto de que este síndrome se extiende más allá de la producción de autoanticuerpos. Especulamos si un aumento de células B que no expresan CD40 pudiese estar relacionado con la autoreactividad celular observada en este síndrome. El aumento de marcadores de activación sobre células T CD4+ se podría enmarcar en el aumento de activación por células T autoreactivas. Se está ampliando la muestra de este estudio y se ha iniciado un seguimiento clínico de las pacientes para evaluar el posible impacto de estas alteraciones en el curso evolutivo del SAAF.

EXPRESIÓN ALTERADA DE LA SUBUNIDAD GP130 DEL RECEPTOR DE IL-6 EN LINFOCITOS B DE PACIENTES CON LUPUS. SOBRE-EXPRESIÓN EN PACIENTES CON ENFERMEDAD ACTIVA. Urra JM¹, Torre M de la². ¹Inmunología, Hospital general de Ciudad Real. ²Servicio de Nefrología Hospital San Agustín, Avilés.

La valoración de enfermedad renal activa en el paciente diagnosticado de nefropatía lúpica, en ciertas situaciones, entraña mucha dificultad. Una apreciación errónea puede implicar bien la administración de un tratamiento inmunosupresor innecesario y no exento de efectos secundarios, o bien el deterioro de la función renal ante la falta del mismo. Aparte de la experiencia clínica y los habituales parámetros usados en esta entidad, no existe un marcador que oriente acerca de esta cuestión.

La glicoproteína gp130 es una subunidad del receptor de IL6 con un dominio transmembrana y función de transducción de señal. Esta subunidad es compartida además por todos los receptores de la superfamilia de IL6 (oncostatin M, IL11, LIF, CNF y cardiotrophin 1), estando implicada en la transducción de señal de todos estos receptores.

Dada la importante relación de IL6 con la producción de anticuerpos, el objetivo del presente estudio es evaluar por citometría de flujo la expresión de la molécula gp130 en linfocitos TCD4 y linfocitos B de pacientes diagnosticados de Lupus Eritematoso Sistémico (LES) con nefropatía lúpica.

Se estudiaron 46 pacientes con LES según criterios de la ARA y biopsia renal. La actividad de la enfermedad se valoró según SLEDAI, exploración física y analítica. Los pacientes se dividieron en 4 Grupos claramente establecidos; LES estable/inactivo (n= 30): pacientes en remisión, estables, sin sedimento activo, con proteinuria inferior a 1 gr/24 h y Crp inferior a 1,5 mg/dl. Grupo LES Activo (n= 11): aumento de un 50% de la proteinuria respecto a la basal, elevación no expli-

cada mayor de un 30% de la Crp y sedimento activo. Grupo reciente diagnóstico (n= 5): estudio realizado en el momento del diagnóstico. Grupo control (n= 21): sujetos sanos.

La expresión de gp130, tanto en linfocitos B como TCD4, fue mas elevada en pacientes LES que en controles sanos (8,4% vs 0,4% P<0,001 y 2,8% vs 0,4% p< 0,001 respectivamente). A su vez en linfocitos B los pacientes con lupus activo tuvieron expresión mas alta de gp130 (brote lúpico 15,1% P<0,001, reciente diagnóstico 26,6% P<0,001) que los pacientes con lupus no activo (2,8%). Los pacientes sin actividad lúpica mantenían niveles de expresión de gp130 mayores que los controles sanos (2,8 vs 0,37 ; P< 0,002. En 7 pacientes en los que se pudo realizar seguimiento, se observó una importante reducción en la expresión de gp130 cuando la actividad de la enfermedad cesó tras reajustar o implantar el tratamiento inmunosupresor (de 20,8% a 3,8%). Hubo correlación entre la actividad de la enfermedad calculada según el índice SLEDAI y la expresión de gp130 en linfocitos B (rs = 0,5880, P= 0,0002). Los análisis de curvas Roc determinaron un cut-off óptimo de 6,7% con una sensibilidad de 0,93 y una especificidad de 0,75 para discriminar nefropatía lúpica activa.

En conclusión en el LES existe una clara alteración en la expresión de gp130 en linfocitos B de sangre periférica. Este aumento de expresión de gp130 persiste incluso en pacientes asintomáticos y en remisión prolongada. Aumenta en los pacientes con actividad, disminuyendo tras tratamiento efectivo, sin embargo no desciende a los valores de controles sanos. Existe una buena correlación entre SLEDAI y expresión de gp130 en linfocitos B. Teniendo en cuenta las limitaciones propias del presente estudio concluimos que la valoración de gp130 en linfocitos B, mediante citometría de flujo en pacientes con LES, es un método sencillo y rápido que puede ser de ayuda en el diagnóstico, seguimiento y tratamiento de los pacientes diagnosticados de nefropatía lúpica.

EXPRESIÓN AUMENTADA DE LA PROTEÍNA DE CHOQUE TÉRMICO DE 90 KDA (HSP90) Y DE LAS PROTEÍNAS QUE UNEN CALCIO S100A8 (CALGRANULINA A) Y S100A9 (CALGRANULINA B), EN CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA (PBMCS) DE PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO (LES). Pavón EJ¹, Callejas JL², Ortego N², Zubiaur M¹, Sanchó J¹. ¹Departamento de Biología Celular e Inmunología, Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra», CSIC, Armilla. ²Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital San Cecilio, Granada.

En este estudio se aislaron PBMCS procedentes de pacientes con LES y controles sanos. Las proteínas de membrana y citosólicas se separaron de los núcleos intactos y de material insoluble al detergente NP-40 por técnicas estándar.

Las proteínas solubles en NP-40 se separaron mediante geles de dos dimensiones y se identificaron por espectrometría de masas (MALDI-TOF). Los patrones de expresión diferencial entre pacientes y controles se analizaron utilizando el software informático PD-Quest (BioRad).

De éste análisis se identificaron más de 100 proteínas tanto en pacientes como en controles, de las cuales el 32% de las mismas estaban relacionadas con fenómenos de transducción de señales o comunicación celular. Otro porcentaje importante tenían que ver con el crecimiento o el mantenimiento celular (24%), el metabolismo celular (21%), con procesos energéticos (11%), o con respuestas inmunológicas (3%).

También se observó que existía un aumento en la expresión de algunas proteínas en pacientes con LES respecto al grupo control.

Se consideran de especial interés la Hsp90, y las proteínas S100A8 y S100A9 por su papel en situaciones de estrés y en procesos inflamatorios, respectivamente. Estas proteínas podrían tener un papel relevante en subgrupos de pacientes con actividad clínica y manifestaciones patológicas específicas.

ANTICUERPOS ANTI-APARATO MITÓTICO (NUMA): VALOR DIAGNÓSTICO Y ASOCIACIONES CLÍNICAS. Mozo L, Gómez J, Gutiérrez C. Hospital Universitario Central de Asturias.

Los Ac anti-aparato mitótico (NuMA) son detectados muy infrecuentemente en el cribado por IFI de muestras patológicas. El autoAg es una proteína de la matriz nuclear de 235kD implicada en la formación del huso mitótico. Los Ac anti-NuMA se han descrito en un amplio rango de condiciones clínicas, principalmente en el S. de Sjögren, pero, debido a su baja prevalencia, su valor diagnóstico y las características clínicas de los pacientes positivos para este autoAc no han sido establecidos todavía. El objetivo del presente trabajo ha sido analizar las condiciones clínicas de los individuos con Ac anti-NuMA detectados en nuestro laboratorio. Todos los sueros que presentaban por IFI tinción en el aparato mitótico fueron analizados posteriormente por IB con el fin de detectar la reactividad anti-NuMA, confirmándose ésta en 36 pacientes. El diagnóstico de 34 de ellos fue obtenido mediante revisión de sus historias clínicas. Esta serie de pacientes anti-NuMA positivos es la mayor analizada hasta la fecha. La frecuencia de estos autoAc observada entre las muestras patológicas en nuestro laboratorio fue aproximadamente 1 por mil. En este grupo de pacientes anti-NuMA positivos la proporción de mujeres:hombres fue de 8 a 1 y, además, el 50% eran mayores de 60 años en el momento de la detección del autoAc. 19 pacientes fueron diagnosticados con diversas conectivopatías (55,8%) siendo el S. de Sjögren o el S. seco las más frecuentes (7/19, 36,8%). Cinco pacientes presentaban distintas enfermedades autoinmunes organoespecíficas mientras que los 10 restantes tenían diagnósticos relacionados con otras condiciones clínicas. Conclusión: los Ac anti-NuMA se presentan más frecuentemente en mujeres mayores de 60 años. Estos autoAc no son específicos ya que se detectan en un amplio espectro de condiciones patológicas. A pesar de ello, muchos de los pacientes positivos para Ac anti-NuMA presentan conectivopatías siendo las más frecuentes el S. de Sjögren o el S. seco.

ESPECIFICIDAD DE LOS ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDOS CÍCLICOS CITRULINADOS DE TERCERA GENERACIÓN EN PRESENCIA DE ARTRITIS PSORIÁSICA. Caro-Oleas JL¹, Fernández-Suárez A², Porrino C³, Reneses S⁴, Wichmann I¹, Núñez-Roldán A¹. ¹Servicios de Inmunología y ⁴Reumatología, Hospitales Universitarios Virgen del Rocío, Sevilla; ²Área de Biotecnología (Análisis Clínicos), Hospital Alto Guadalquivir, Andujar; ³Área Integrada de Biotecnología (Análisis Clínicos), Hospital de Poniente, El Ejido.

Introducción. Los anticuerpos anti-péptidos cíclicos citrulinados (Ac. anti-CCP) son un importante marcador diagnóstico de la artritis reumatoide (AR) utilizados en el cribaje de las poliartritis indiferenciadas. La mayoría de trabajos publicados muestran una alta especificidad (cercana al 100%) de los Ac. anti-CCP en el diagnóstico diferencial de la AR en fases iniciales de la enfermedad. No obstante, y

a pesar de la elevada especificidad encontrada, también se ha descrito la existencia de falsos positivos en presencia de otras patologías reumáticas, como la artritis reumatoide juvenil, la artritis psoriásica, el lupus eritematoso sistémico y la artritis inflamatoria. El objetivo del presente trabajo es establecer la utilidad diagnóstica de un nuevo ELISA de tercera generación y cuantificar el número de falsos positivos de Ac. anti-CCP encontrados en pacientes con diagnóstico de artritis psoriásica, tras el seguimiento de una población con poliartritis de inicio.

Material y métodos. Se recogieron 234 muestras de suero a todos los pacientes procedentes de Atención Primaria, Servicios de Urgencias y Consultas Externas de Reumatología que fueron derivados por primera vez a la Unidad de Poliartritis de Inicio del Hospital Universitario Virgen del Rocío de Sevilla. Todos ellos fueron incluidos (edad ≥ 16 años; tiempo evolución ≥ 4 semanas ≤ 1 año; 2 o más articulaciones inflamadas) en un registro informatizado prospectivo desde enero de 2002 hasta la actualidad. Tras seguimiento de un año, desde la primera consulta, se establecieron los diagnósticos según los criterios de la ACR. De esta población, 38 pacientes fueron diagnosticados de artritis psoriásica. Además, se incluyó un grupo de 48 controles sanos, de edad media y una distribución de sexos similar al grupo de pacientes con poliartritis de inicio. En todos ellos se determinaron los Ac. anti-CCP utilizando el método QUANTA LiteTMCCP3 IgG ELISA (INOVA Diagnostic Inc., San Diego U.S.A.).

Resultados. Después de un año de seguimiento, la AR fue confirmada en 124 de 234 pacientes con poliartritis de inicio. El resto de pacientes (n=110) fueron diagnosticados con diferentes enfermedades reumáticas, siendo la más común la artropatía psoriásica (38 pacientes). No obstante, 48 pacientes con poliartritis indiferenciada permanecían todavía sin poder ser diagnosticados según los criterios de la ACR. La sensibilidad y especificidad obtenidas mediante la curva ROC con esta nueva tercera generación de Ac. anti-CCP fue de 51,5% y de 96,2% respectivamente (punto de corte óptimo, 14,7 U/mL). Dentro del grupo de otras enfermedades reumáticas han aparecido 5 resultados positivos para Ac. Anti-CCP, 4 en el grupo de poliartritis indiferenciadas (3 seropositivas para el FR y 1 seronegativa para FR) y uno en el grupo de pacientes con artritis psoriásica.

Conclusiones. La tercera generación de Ac. anti-CCP no mejora la especificidad y sensibilidad de su predecesora de segunda generación. Al igual que lo descrito en la literatura, que muestra una pequeña proporción de falsos positivos en pacientes con artropatía psoriásica, se encuentra un resultado positivo de Ac. Anti-CCP con el ELISA de tercera generación; no podemos afirmar lo mismo en los otros 4 pacientes con poliartritis indiferenciada ya que en el futuro pueden desarrollar AR.

ANTICUERPOS FRENTE A PEPTIDO/PROTEINAS CITRULINADAS EN PACIENTES CON ARTROPATIA CRÓNICA. UTILIDAD DIAGNOSTICA. *Oliver-Miñarro D, López-Longo FJ, Sánchez-Ramón S, Teijeiro R, De la Torre I, González-Díaz de Rábago E, Carreño L, Fernández-Cruz E, Rodríguez-Mahou M. Departamento de Inmunología y Reumatología, Hospital General Universitario «Gregorio Marañón», Madrid.*

Los anticuerpos frente a péptidos citrulinados ha sido el objeto de numerosos estudios en relación con el diagnóstico de la artritis reumatoide (AR), así como de otras artropatías crónicas. El objetivo de nuestro estudio es comprobar la utilidad diagnóstica de cada uno de los

anticuerpos frente a péptidos y proteínas citrulinadas (filagrina y vimentina), en nuestra población de pacientes.

Métodos. Se estudiaron 414 pacientes procedentes de la consulta de Reumatología del Hospital G.U. Gregorio Marañón; 103 diagnosticados de AR, 54 de Artritis Psoriásica, 43 de Artritis Reumatoide Juvenil, 56 de Lupus eritematoso sistémico (LES), 58 de Polimialgia reumática, 42 de Reumatismo Palindrómico y 58 de Enfermedad indiferenciada del tejido conectivo (UCTD). Se determinó por técnica de ELISA Anticuerpos Anti-Péptido cíclico Citrulinado (anti-PCC), Anti-vimentina Citrulinada (anti-VC) y anti-filagrina Citrulinada (AFA). Se comparó sensibilidad (se), especificidad (sp) por curvas ROC, el likelihood ratio (LR) y la Probabilidad post-test (ptP).

Resultados. La presencia de los tres anticuerpos estaba significativamente asociada con AR ($p < 0,000$). Solamente en el caso de LES y Ac. anti-CV se encontró asociación estadística ($p < 0,000$). El estudio del ratio de probabilidad (LR) demostró que solamente los ac. Anti-CCP a títulos elevados tienen una especificidad del 100% para el diagnóstico de AR.

Conclusiones. Según los datos obtenidos la determinación de anti-CCP es el marcador más útil para el diagnóstico de AR. Niveles altos de ac. Anti-CCP ofrece una certeza diagnóstica del 100%. Un resultado positivo de anticuerpos anti-CCP incrementa 33 veces la probabilidad pre-test (o prevalencia) de tener un diagnóstico de AR.

UTILIDAD CLÍNICA DEL MARCADOR R052 AISLADO. *Jurado Roger A¹, Menor Almagro R², Romero Valdés D², Salaberri Maestrojuan J³, Solís Díaz R², Páez Camino M², Pérez Venegas J³. ¹Servicio de Reumatología, Hospital de Jerez FRA. ²Servicio de Laboratorio, Hospital Infanta Margarita de Cabra. ³Servicio de Reumatología, Hospital puerta del Mar de Cádiz.*

Objetivos. Determinar la validez de la positividad aislada para anti-RO52 y sus asociaciones clínicas.

- Se analizaron todas las muestras de suero referidas de forma consecutiva al Laboratorio de Inmunología en un periodo de dos años, para la determinación de Anticuerpos Antinucleares.
- En un primer paso se seleccionaron aquellas positivas a título $\geq 1/160$ mediante IFI sobre Hep-2.
- En un segundo paso se realizó un inmunoensayo en línea multiparamétrico (INNOLIA ANA UPDATE K-1090) para la detección de anticuerpos frente a SmB, SmD, RNP-70, RNP-A, RNP-C, Ro52, Ro60, La, Centrómero, Scl-70, Jo-1, Ribosomal P e Histonas.
- Se seleccionaron las muestras positivas para una o más de las especificidades antigénicas Ro52, Ro60 y La.
- En estos casos positivos se estudió retrospectivamente la asociación con el patrón de IFI, las asociaciones clínicas y analíticas y el diagnóstico (test de Fisher):
 - El patrón de IFI se clasificó como: patrón homogéneo, moteado fino, moteado grueso, citoplásmico.
 - Se tuvieron en cuenta los siguientes signos y síntomas clínicos: derrame pericárdico, pleuritis y derrame pleural, neumatía intersticial, aftas, glomerulonefritis, afectación del SNC, afectación del SNP, rash y fotosensibilidad, lesiones de lupus discoide, lupus cutáneo subagudo, vasculitis cutánea, sequedad oral, sequedad ocular, lesiones de artritis reumatoide, raynaud, alopecia, anemia, leucopenia, linfopenia, plaquetopenia, hipocomplementemia, hipergammaglobulinemia, factor reumatoide positivo, hipotiroidismo.

- Los diagnósticos recogidos fueron: LES, Lupus discoide, Sjögren 1º, Sjögren 2º, Esclerosis sistémica, Artritis reumatoide, CREST, Polimiositis-Dermatomiositis, EMTC, Conectivopatía indiferenciada, otros diagnósticos.

Resultados. En los pacientes en los que se analizaron varias muestras durante ese periodo, el patrón de IFI y las reactividades antigénicas permanecieron constantes en la mayoría de los casos.

117 muestras pertenecientes a 69 pacientes fueron positivas para Ro52, y/o Ro60 y/o La. De éstas, 52 muestras (pertenecientes a 25 pacientes) fueron positivas para Ro52 aislado, sin la concurrencia de Ro60 ni La.

Cuando se aplicó el test de Fisher para analizar las variables estudiadas en el grupo de pacientes con anti-Ro52 positivo aislado con respecto al total, se encontraron las siguientes asociaciones significativas:

- Patrón de IFI: citoplásmico ($p=0,0000$) moteado fino ($p=0,006$)
- Clínica: neumopatía intersticial ($p=0,008$)
- Fotosensibilidad ($p=0,012$)
- Leucopenia ($p=0,02$)
- FR positivo ($p=0,003$)
- Diagnóstico: LES (0,02)

Con respecto al resto de especificidades antigénicas estudiadas con el Inmunoensayo en línea, llama la atención la asociación con anti-Jo1 ($p=0,044$).

Conclusiones. En nuestra serie, la presencia de anti-Ro52 aislado se asoció significativamente con:

- Los patrones citoplásmico y moteado fino.
- Fotosensibilidad y neumopatía intersticial.
- Leucopenia y FR positivo.

Los casos anti-Ro52 positivos sin anti-Ro60 ni anti-La constituyen un porcentaje muy alto (44% de las muestras y 36% de los pacientes) de los casos positivos para alguna de estas especificidades antigénicas, que se pierden con los test que no incluyen esta especificidad.

En el 96% de los casos con anti-Ro52 aislado subyacía una conectivopatía, y en el 4% restante otra enfermedad autoinmune.

La asociación de anti-Ro52 con Jo-1 confirma otros estudios anteriores con los mismos hallazgos.

EFFECTO DE POLIMORFISMOS FUNCIONALES EN IL-10 Y TNFALFA SOBRE LOS NIVELES SÉRICOS DE CITOCINAS EN PACIENTES DE LES TRATADOS CON ANTIPALÚDICOS. López P¹, Prado C¹, Paz B de¹, Gómez J², Gutiérrez C^{1,2}, Suárez A¹. ¹Área de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. ²Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias.

Aunque su mecanismo de acción no es totalmente conocido, los antipalúdicos han sido ampliamente utilizados como agentes anti-reumáticos en el tratamiento de varias enfermedades autoinmunes. Recientemente se ha descrito que estos fármacos disminuyen los niveles séricos de TNFalfa y otras citocinas en pacientes de LES, lo que explicaría, al menos en parte, su efecto antiinflamatorio. Sin embargo, en un estudio previo hemos visto que tanto la respuesta clínica a los antipalúdicos como su grado de inhibición del TNFalfa están influidos por polimorfismos funcionales presentes en el TNFalfa y la IL-10, siendo los portadores del genotipo alto TNFalfa/bajo IL-10 los mejores respondedores a esta terapia. Elevados niveles de estas dos citocinas, mutuamente reguladas y con efectos opuestos sobre la inflamación, se supone que ejercen un efecto perjudicial sobre el LES. Por otra

parte, la aparición de autoanticuerpos como consecuencia de tratamientos prolongados con IFNalfa, así como la presencia en pacientes de LES de una elevada expresión de esta citocina y de sus inductores endógenos circulantes, han sugerido un papel clave de esta citocina inmunoestimuladora en la etiopatogénesis del LES. En este trabajo nos propusimos valorar el efecto de los antipalúdicos sobre los niveles de estas citocinas en pacientes de LES con distinto genotipo como posible origen de las diferencias observadas en la respuesta al tratamiento. Para ello, se determinaron los polimorfismos genéticos presentes en el promotor del TNFalfa(-308G/A) y la IL-10(-1082G/A) en 172 pacientes de LES, mediante amplificación por PCR e hibridación con sondas específicas de alelo. Los niveles séricos de IFNalfa, IL-10 y TNFalfa se cuantificaron mediante ELISA y se correlacionaron entre sí y con las manifestaciones clínicas y el tratamiento. Encontramos unos niveles de IFNalfa significativamente más elevados en pacientes que en controles (18,64 vs 9,96 $p<0,0001$), que, curiosamente, se correlacionaban positivamente con los niveles séricos de TNFalfa tanto en pacientes ($r=0,225$, $p=0,004$) como en controles ($r=0,281$, $p=0,003$). No se observaron diferencias significativas entre tratamientos, sin embargo, en el grupo de pacientes que seguían una terapia con antipalúdicos ($n=104$), los portadores del genotipo bajo TNFalfa/alto IL-10 presentaron unos niveles de IFNalfa significativamente mayores que los de otros genotipos (57,64 vs 15,15, $p=0,010$), mientras que los pacientes con genotipo buen respondedor a antipalúdicos (alto TNFalfa/bajo IL-10) no presentaron niveles elevados de esta citocina (16,19 vs 19,65). Los niveles séricos de IL-10 en el mismo grupo de pacientes tratados con antipalúdicos mostraron resultados similares, siendo más elevados en los pacientes con genotipo bajo TNFalfa/alto IL-10 que en el resto (3,04 vs 0,50, $p=0,035$), lo que sugiere que estos agentes serían capaces de incrementar los niveles de IFNalfa e IL-10 en pacientes de LES con el genotipo sugerente de una mayor producción de IL-10 (bajo TNFalfa/alto IL-10) pero no los modificarían en los pacientes portadores del genotipo buen respondedor. De hecho, IFNalfa e IL-10 se encontraron correlacionadas en este grupo de pacientes ($n=36$, $r=0,558$, $p=0,0004$). En resumen, estos resultados indican que el tratamiento con antipalúdicos incrementa los niveles séricos de IFNalfa e IL-10 en pacientes de LES portadores del genotipo bajo TNFalfa/alto IL-10, lo que sugiere que esta puede ser una de las razones del menor grado de respuesta al tratamiento observado en estos pacientes.

EFFECTO DE LOS ANTIPALÚDICOS SOBRE LAS CÉLULAS CD4+CD25HIGH (TREG) EN PACIENTES DE LES. INFLUENCIA DE POLIMORFISMOS FUNCIONALES EN IL-10 Y TNFALFA. Prado C, López P, Gómez J, Paz B de, Gutiérrez C, Suárez A. Dpto. Biología Funcional. Área de Inmunología. Universidad de Oviedo. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Central de Asturias.

Recientemente se ha demostrado que el tratamiento con antipalúdicos, ampliamente utilizado en algunas enfermedades autoinmunes, disminuye los niveles séricos de TNFalfa en pacientes de LES. Además, la respuesta clínica al tratamiento parece estar influida por polimorfismos funcionales presentes en los promotores de TNFalfa (-308G/A) e IL-10 (-1082G/A), siendo el genotipo combinado alto TNFalfa/bajo IL-10 el mejor respondedor a esta terapia. Por otra parte, las células Treg naturales (CD4+CD25high) parecen ejercer un papel clave en la tolerancia periférica y en el control de las enfermedades autoinmunes, por lo que nos propusimos estudiar el efecto del tra-

tamiento con antipalúdicos sobre esta población celular en pacientes de LES. Para ello cuantificamos la población de linfocitos Treg y los niveles de TNFalfa sérico en 93 pacientes de LES que genotipamos para TNFalfa e IL-10, analizando los resultados en relación al tratamiento. En algunos pacientes se estudió la funcionalidad de las células CD4+CD25high analizando su capacidad de inhibición de la proliferación de linfocitos CD4+CD25- antólogos. El estudio de las células Treg en función del tratamiento mostró que los pacientes tratados con corticoides presentaban unos niveles superiores a los no tratados tanto en el porcentaje de células CD4+CD25high (8,12 vs 6,10, $p=0,013$) como en los valores relativos de RNAm de Foxp3 (1,14 vs 0,34, $p=0,049$). No se encontraron diferencias significativas en el grupo de pacientes tratados con antipalúdicos, sin embargo, al segmentar los pacientes en función de su genotipo, se observó que aquellos que estaban con tratamiento antipalúdico y eran portadores del genotipo buen respondedor (alto TNFalfa/bajo IL-10) presentaban un mayor porcentaje de células CD4+CD25high que los que tenían el genotipo opuesto y estaban con la misma terapia (8,17 vs 6,15, $p=0,038$). Además, resultados preliminares de los estudios funcionales ($n=6$) sugieren que el tratamiento con antipalúdicos da lugar a una actividad supresora mayor en las células CD4+CD25high de los pacientes con genotipo alto TNFalfa/bajo IL-10 que en los portadores de otros genotipos (63% vs 36%). Por otra parte, se encontró una correlación negativa entre los niveles de TNFalfa séricos y el porcentaje de células CD4+CD25high ($r=-0,247$, $p=0,017$), lo que podría indicar una implicación de la acción inhibidora de los antipalúdicos sobre el TNFalfa en el aumento de la actividad de las Treg. En resumen, estos resultados sugieren que la buena respuesta a los antipalúdicos observada en pacientes de genotipo alto TNFalfa/bajo IL-10 podría estar en parte mediada por el aumento en el tamaño y la actividad de la población de células Treg.

MORBILIDAD Y TRATAMIENTO EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO DE ASTURIAS. Gómez J, Mozo L, Suárez A, López P, Prado C, Gutiérrez C. Hospital Central de Asturias.

La morbimortalidad en el lupus eritematoso sistémico (LES) ha cambiado en parte como consecuencia de los tratamientos introducidos en las últimas décadas. En el presente trabajo examinamos la morbilidad asociada al tratamiento en 363 pacientes diagnosticados de LES, virtualmente la totalidad de pacientes con LES en Asturias. Se construyó una base de datos a partir de la revisión de las historias clínicas hospitalarias correspondientes a las solicitudes de anticuerpos antinucleares realizadas durante un período de diez años. Además de los criterios del colegio americano de reumatología (ACR), otros síntomas o complicaciones fueron registrados y posteriormente analizados por regresión logística en relación al tipo de tratamiento recibido por el paciente: anti-inflamatorios no esteroideos (AINES), anti-palúdicos, esteroides, inmunosupresores y otros (inmunoglobulinas, danazol, etc). Se ajustó para el sexo, la edad al diagnóstico, y principales parámetros clínicos. La osteoporosis se asoció significativamente ($p<0,02$) al uso de corticoides, mientras que las frecuencias de hipertensión arterial, obesidad e infecciones, especialmente respiratorias, fueron significativamente más altas ($p<0,03$, $p<0,04$, $p<0,001$ respectivamente) en los pacientes bajo tratamiento con inmunosupresores. Además también encontramos una fuerte asociación entre hipertensión arterial y nefropatía ($p<0,001$) y una mayor frecuencia de necrosis aséptica ($p<0,04$) en pacientes con tratamiento

continuado con AINES. No se encontraron diferencias significativas entre los distintos tratamientos cuando estudiamos la presencia de hiperlipemia, hemorragia digestiva, enfermedad vascular o alteraciones oculares. Concluimos que se comprueba la existencia de complicaciones atribuibles al tratamiento en nuestra serie, lo cual tiene importancia a la hora de diseñar o adaptar los esquemas terapéuticos utilizados.

SESIÓN 7: ALERGIA. OTROS

Moderadores: Ignacio Moneo Goiri (Madrid),
Gonzalo Rubio Pedraza (Murcia)

POLEN DE *SENECIO JACOBEA*: UNA NUEVA FUENTE ALERGÉNICA. Mollá R, Luengo O, López E, Cardona V, Sastre B, Lahoz C, Cadahia A, Pozo V del. Fundación Jiménez Díaz.

Introducción. *Senecio jacobea* es una maleza que pertenece a la familia *Asteraceae* (que también recibe el nombre de *Compositae* o *Compuestas*). En nuestro medio, el género de compuestas que de forma más frecuente es responsable de sensibilización alérgica, es la *Artemisia*, cuya prevalencia de sensibilización en España es de alrededor del 20%, y en Europa es del 3-10%.

Dentro de la familia *Asteraceae*, *Senecio* pertenece a las plantas que presentan flores de tipo tubulifloras y su polinización es entomófila. El nombre del género *Senecio* proviene del latín «senex» (anciano), que alude al color blanco de sus vilanos. En España se citan 22 especies del género *Senecio*, siendo las más comunes: *S. vulgaris* y *S. jacobea*.

Objetivo. con este estudio tratamos de determinar si el polen de *Senecio* es responsable de parte de las sensibilizaciones en pacientes con rinoconjuntivitis y/o asma alérgico en nuestro medio, así como su caracterización inmunológica, determinando sus alérgenos mayores y las proteínas responsables de la reactividad cruzada con otros pólenes.

Material y métodos. Un total de 473 pacientes que acudieron a la consulta aquejados de rinoconjuntivitis y/o asma fueron sometidos a las pruebas cutáneas en prick con la batería rutinaria de aeroalérgenos de nuestra zona y con el extracto del polen de *Senecio jacobea*.

De los pacientes que dieron positivo a la prueba cutánea en prick frente a *S. jacobea*, obtuvimos el suero para los estudios posteriores.

La caracterización de los alérgenos del extracto del polen de *Senecio* fue llevada a cabo en geles de poliacrilamida, inmunodetección y estudios de inhibición.

Resultados. El 12% del total de pacientes estudiados fueron positivos mediante pruebas cutáneas en prick al polen de *Senecio*.

Los estudios de inmunodetección revelan la existencia de tres alérgenos mayores, con pesos moleculares de 60, 42 y 30 KDa.

Los inmunoblottings y ELISA de inhibición nos muestran la existencia de reactividad cruzada entre *S. jacobea* y otras especies del mismo género (*S. vulgaris*, *S. vernalis*) y también con el polen de *Artemisia vulgaris*.

Conclusión. Este estudio confirma que *Senecio jacobea* es un aeroalérgeno con una prevalencia de sensibilización similar a la de *Artemisia* en nuestra área. Además, presenta reactividad cruzada con *Artemisia vulgaris*.

CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS DEL EXTRACTO DEL POLEN DE *SALSOLA KALI* Y CLONAJE MOLECULAR DE SAL K 2.

K 2. *Civantos E, Llanes E, López E, Mollá R, Sastre B, Palomino P, Cárdbaba B, Lahoz C, Pozo V del.* Departamento Inmunología. Fundación Jiménez Díaz-Capio, Madrid.

Introducción. *Salsola kali* es una maleza que pertenece a la familia *Chenopodiaceae*, produce gran cantidad de polen y se la considera la más alergénica de la familia. Se encuentra ampliamente distribuida a lo largo de la costa de Europa, Norte de África, Estados Unidos y Australia. En España aparece en la cuenca del Ebro y en la zona de Alicante, Murcia y Almería.

El objetivo de este trabajo es la caracterización molecular de algunas proteínas del polen de *Salsola kali*, entre ellas su antígeno mayoritario (42 kDa), y el clonaje de una de sus proteínas alergénicas por reactivación cruzada con *Chenopodium album*.

Material y métodos. La caracterización molecular de las proteínas del polen de *S. kali* se llevó a cabo mediante SDS-PAGE, electroforesis bidimensional, estudios de desglicosilación y de proteínas liposolubles y espectrometría de masas. La caracterización inmunológica se realizó por medio de inmunodetecciones con sueros de 76 pacientes, densitometrados e inmunodetección de las proteínas separadas por electroforesis bidimensional con un pool de sueros y un antisuero de ratón frente a la proteína de 42 kDa de *S. kali*. Una proteína de *S. kali* se clonó y expresó. Dado que existía un bloqueo de la región N-terminal de la proteína de 42 kDa de *S. kali*, se obtuvieron los cebadores utilizando el extremo N-terminal de una proteína del mismo peso molecular de *Chenopodium album*, que presenta una identidad inmunológica total con *S. kali*. Se hizo una inmunodetección con los sueros de los pacientes para analizar la reactividad de la proteína recombinante.

Resultados. 39 proteínas distintas se separan por SDS-PAGE de las cuales un total de 18 son reconocidas por alguno de los sueros. El extracto presenta tanto proteínas glicosiladas como liposolubles que son reconocidas por la IgE de un pool de sueros de pacientes sensibilizados. Mediante la electroforesis bidimensional se obtuvieron proteínas de distinto punto isoeléctrico y el mismo peso molecular, algunas de las cuales son isoformas. Por inmunodetección se comprobó que distintas proteínas eran reconocidas por la IgE del suero de los pacientes y al menos 14 spots (que corresponden a 8 proteínas distintas), fueron reconocidos por el antisuero de ratón frente a la proteína de 42 kDa. Como resultado del clonaje y expresión se obtuvo una proteína de 36 kDa, susceptible de ser glicosilada, alergénica y homóloga a una de las proteínas obtenidas en la banda de 42 kDa y que ha sido inscrita en GenBank con el nombre de Sal k 2 y número de acceso AF449490.

Conclusiones. El extracto de *S. kali* presenta al menos 18 proteínas que son alergénicas. La banda de 42 kDa donde se encuentra el alérgeno mayoritario, está formada por al menos 8 proteínas distintas, de las cuales se ha clonado una de ellas con actividad de proteína quinasa.

APLICACIÓN DE LA CITOMETRÍA DE MULTIFLUORESCENCIA PARA EL ANÁLISIS DE CÉLULAS T ALERGENO ESPECÍFICAS Y CÉLULAS T REGULADORAS. *Martínez-Sánchez MV, Salgado-Cecilia G, López-Álvarez MR, Muro M, Campillo-Marquina JA, Álvarez-López MR, Pagán-Alemán J, Minguela A.* Hospital Universitario Virgen Arrixaca de Murcia.

En la última década se han desarrollado diversas metodologías para caracterizar las células T específicas implicadas en las respuestas

de la inmunidad adaptativa. La utilización de CFSE (*carboxi-fluoresceinsuccinimidylyl ester*) y la estimulación *in vitro* con alérgenos específicos, han permitido el estudio tanto de las células T efectoras en las reacciones de hipersensibilidad, como de las células T que regulan (Treg) dichos procesos.

En la presente comunicación queremos presentar datos preliminares de la aplicación de la citometría de multifluorescencia para detectar y caracterizar fenotípica y funcionalmente, tanto células alérgeno específicas como Treg en controles sanos y en pacientes alérgicos a *Artemisia vulgaris*. Para ello, se ha desarrollado un método de estimulación *in vitro* con alérgeno y se han determinado las células específicas que proliferan frente al alérgeno (CFSE-low). En las células alérgeno específicas se ha estudiado la expresión de marcadores de maduración/activación (CD27 y CD70), moléculas de adhesión que regulan el tráfico de células T (CD29, CD49d y CD62L), y de receptores que controlan la migración de células Th1 y Th2 (CXCR3, CCR4, CCR5, CCR3 y CRTh2). Por otro lado se ha analizado su capacidad efectora a través de la producción de citoquinas Th1 (IL-2, IFN- γ y TNF- α) y Th2 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13). En los mismos pacientes y controles, se han estudiado marcadores asociados a células T reguladoras (CD25, CD103, CD127, CTLA-4 y FoxP3) y se han puesto a punto métodos para su aislamiento, expansión y diferenciación. Para estos estudios se ha utilizado un citómetro LSR-II (Becton Dickinson) con 3 láseres (405 nm, 488 nm y 655 nm) con capacidad para detectar 11 fluorescencias. En el poster se discutirá la configuración óptica, combinación de marcadores y de fluorescencias más adecuadas para realizar este tipo de estudios.

ANÁLISIS DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS IMPLICADOS EN LA SENSIBILIZACIÓN A OLEA EUROPAEA: IL-13, CADENA ALPHA DE IL-4R, IL-5 Y RECEPTOR B2-ADRENÉRGICO. *Llanes E, Civantos E, Cercas R, López E, Sastre B, Mollá R, Palomino P, Pozo V, Lahoz C, Cárdbaba B.* Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

Antecedentes. Diversos estudios previos han puesto de manifiesto cómo la sensibilización específica a los distintos alérgenos del polen del olivo podría estar relacionada con diferentes manifestaciones clínicas, así como que una sensibilización específica puede estar regulada por diferentes polimorfismos genéticos.

Objetivo. Analizar la posible implicación de siete polimorfismos genéticos de IL-13 (C-1112T y +2044G/A (R130Q)), IL-4RA (I50V y Q551R), IL-5 (-746C/T) y B2AR (R16G y Q27E) en la sensibilización específica de los alérgicos al polen del olivo.

Métodos. Tipificamos 7 polimorfismos de los genes de IL-13, IL-4RA, IL-5 y B2AR en una población de 146 alérgicos al polen del olivo, con rinitis y/o asma estacional, y de 50 individuos control. Estos polimorfismos fueron analizados mediante PCR-RFLP y RT-PCR.

Resultados. Los dos polimorfismos de IL-13, el genotipo TT de IL-13 C-1112T (OR = 0,35; 95% CI, 0,16-0,76; P = 0,006) y el genotipo heterocigoto RQ de IL-13 R130Q (OR = 3,12; 95% CI, 1,29-7,79; P = 0,009), están asociados de manera estadísticamente significativa con el riesgo de desarrollar alergia al polen del olivo. IL-5 -746T está asociado con un menor riesgo de desarrollar asma (OR = 0,34; 95% CI, 0,1-1,15; P = 0,045). También obtuvimos evidencias de interacción entre los SNPs de IL-4RA V50/Q551 (P = 0,007) y IL4RA V50/R551 (P = 0,003). IL-4RA V50Q551 está incrementado en asmáticos mientras por el contrario IL-4RA V50R551 está disminuido en pacientes asmáticos.

Conclusiones. Los polimorfismos de IL-13 estudiados están implicados en el desarrollo de la alergia al polen del olivo en nuestra población. El polimorfismo IL-13 C-1112T está asociado con un descenso del riesgo de desarrollar alergia al polen del olivo, mientras que por el contrario el polimorfismo IL-13 R130Q está asociado con un incremento del riesgo. El homocigoto IL-5 -746TT está asociado con un descenso de la prevalencia de asma. Finalmente, encontramos que la interacción entre los 2 polimorfismos del gen de IL-4RA (I50V/Q551R) está implicada en el desarrollo de asma.

EFICACIA DE INHIBIDORES DE STAT6 EN MODELOS DE ASMA.

Cortes JR, Perez-G M, Fernandez C, Zamorano J. Unidad Investigación, Hospital San Pedro de Alcantara, Cáceres.

El asma es una enfermedad inflamatoria que representa un grave problema sociosanitario. El origen de esta enfermedad parece estar debido a una respuesta inmunológica anómala frente a antígenos aparentemente inocuos. Los avances en el campo de la inmunología han permitido determinar numerosos mediadores implicados en la progresión de la enfermedad. La importancia de estos mediadores viene determinada por el hecho de que están siendo activamente investigados como potenciales dianas terapéuticas. En este sentido, numerosas evidencias indican que las Interleuquina-4 (IL-4) e IL-13 tienen un papel central en el desarrollo de la enfermedad a través de la activación del factor de transcripción STAT6. En un estudio previo, nuestro grupo demostró que dosis antiinflamatorias de salicilatos inhibían la activación de este factor de transcripción. El objetivo del presente estudio fue desarrollar nuevos inhibidores de STAT6 mediante modificaciones químicas secuenciales de salicilato s. Mediante esta aproximación se obtuvieron, entre otras moléculas, compuestos con estructura plana y rígida de mayor tamaño que el salicilato y con un patrón definido de grupos hidroxilo las cuales fueron capaces de inhibir la activación de STAT6 con gran eficacia. Entre los compuestos obtenidos destacaban los denominados JRC688 y JRC706 que inhibían STAT6 con una IC50 de 20 µM. De ellos, JRC706 no tenía efecto sobre la viabilidad celular por lo que fue seleccionado para su estudio en modelos murinos de asma. Los resultados encontrados indican que la administración de JRC706 puede prevenir la respuesta inflamatoria asociada con asma. Así, la presencia de células inflamatorias infiltradas en pulmón y lavados broncoalveolares, la producción de mucus e hiperplasia de globet cells, así como los niveles de IgE estaban muy disminuidos en ratones tratados con JRC706 con respecto a los animales asmáticos controles sin tratar. Estos hallazgos indican que JRC706 es un buen compuesto para investigar en asma.

ESTUDIO DE LA IMPLICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS SUPRESORAS DE LA SEÑALIZACIÓN DE CITOCINAS (SOCS) EN LA MODULACIÓN EJERCIDA POR LA GALECTINA-3 EN EL ASMA CRÓNICA. López E, Sastre B, Mollá R, Cárđaba B, Cívantos E, Llanes E, Lahoz C, Pozo V del. Fundación Jiménez Díaz.

Introducción. El asma alérgica es una enfermedad de las vías respiratorias, que se caracteriza por inflamación, hiperrespuesta bronquial y obstrucción variable al flujo aéreo que cursa con episodios recurrentes de sibilancias, tos y disnea.

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, hemos demostrado tanto *in vitro* como *in vivo* la implicación de la Galectina-

3 en la regulación de la reacción alérgica/inflamatoria, mediante la inhibición del gen de la IL-5.

Los supresores de la señalización de citocinas (SOCS) representan una familia de proteínas descubierta recientemente, que están implicadas en la regulación negativa de la señalización de citocinas, asociada a la ruta JAK-STAT. De los ocho miembros que hay descritos de la familia de estas proteínas, SOCS-1, SOCS-3 y SOCS-5, están implicadas en de alguna manera en la diferenciación Th1-Th2.

SOCS-3 y SOCS-5 son principalmente expresadas en Th2 y Th1 respectivamente, su expresión inhibe recíprocamente los procesos de diferenciación hacia Th1 o Th2.

Objetivo. El objetivo principal de este estudio es evaluar la implicación de las proteínas supresoras de la señalización de citocinas (SOCS) en el mecanismo de actuación de la Galectina-3 en la modulación del asma.

Metodología. El estudio se realizó en ratones a los que se les induce asma crónica (Th2) y que serán sometidos a un tratamiento de terapia génica con el gen de la galectina-3. Así, ratones macho de la cepa A/J se clasifican en diferentes grupos de estudio: 1. Sin sensibilizar. 2. Sensibilizados con OVA y sin plásmido. 3. Sensibilizados con OVA y el plásmido vacío. 4. Sensibilizados con OVA y además se les administra el plásmido que contiene el gen de la Galectina-3. El grupo 1 recibe solución salina estéril intranasalmente. A los grupos murinos 2, 3 y 4 se les instila con OVA (1 mg/ml) intranasalmente 3 veces por semana durante las 12 semanas del protocolo. Además los grupos 3 y 4 reciben 50 µg de plásmido vía intranasal cada 15 días, durante los tres meses de estudio.

Se analizan por PCR cuantitativa a tiempo real, los niveles de expresión génica de SOCS-1, 3 y 5 en el pulmón de los ratones de los diferentes grupos de estudio. Para evaluar el efecto a nivel de la traducción proteica, se realizó una inmunodetección así como un análisis inmunohistoquímico en dicho tejido pulmonar.

Resultados y conclusiones. Los resultados a nivel de transcripción génica, indican que no existen diferencias estadísticamente significativas, entre los diferentes grupos de animales en cuanto a la expresión de los genes de SOCS-1 y SOCS-5. Sin embargo al analizar la expresión del gen de SOCS-3, se encuentran niveles estadísticamente más bajos en los grupos pEGFP-Gal-3 y SS, que tienen valores parecidos entre sí, en contraste con los grupos OVA y pEGFP, en los que están más elevados.

Los resultados en la traducción proteica se correlacionan con los obtenidos en el proceso de transcripción, es decir la expresión de SOCS-3 es menor en el grupo de ratones tratado con dicho plásmido (grupo pEGFP-Gal-3) frente a los ratones asmáticos no tratados.

Por lo tanto se puede decir que la Galectina-3 administrada exógenamente en forma de gen, dentro de un vector plasmídico, modula directa o indirectamente los niveles de expresión de la proteína SOCS-3.

ESTADO ACTUAL DEL PROCESO DE SOPORTE DE LABORATORIO EN EL HOSPITAL INFANTA MARGARITA DE CABRA TRAS ANÁLISIS PREVIO DE SITUACIÓN. Jurado Roger A¹, López Braos J¹, Martínez Noguera R². ¹Servicio de Laboratorio. ²Servicio de Medicina Preventiva. Hospital Infanta Margarita de Cabra. Córdoba.

Introducción. El área al que presta asistencia sanitaria el HIM comprende 22 pueblos con isocronas de hasta 45 minutos y una población de 171.300 habitantes. La gran cantidad de profesionales y actividades

implicadas en el Proceso de Laboratorio, exige una actuación coordinada entre diferentes profesionales y niveles de atención.

El desarrollo del modelo de gestión por procesos en Andalucía pretende el reanálisis de los flujos de trabajo en la asistencia sanitaria, abordando ésta de un modo integral. Se pretende utilizar el «Proceso de Soporte de Laboratorio» publicado por la Consejería de Salud de la Junta de Andalucía, como guión para ordenar las tareas a realizar, desde que se solicita una prueba, hasta la recepción del informe de resultados.

Objetivos. El objetivo de este trabajo es:

- El análisis de situación previo a la implantación del Proceso en nuestro área.
- Áreas de mejora detectadas y Propuestas de mejora.
- Estado actual del Proceso.

Materiales y métodos. Se organizaron sesiones de trabajo en las que participaron 6 profesionales de Atención Especializada y 4 de Primaria, de diferentes categorías (técnicos de Laboratorio, enfermeros, facultativos, etc). En las reuniones se siguió la metodología de implantación acordada en la Comisión Mixta Interniveles. El estudio de situación se dividió en tres fases: preanalítica, analítica y postanalítica.

Resultados. El mayor número de áreas de mejora detectadas se ha producido en la fase preanalítica (9 mejoras), destacando entre otras, la escasa información sobre la toma de muestra y los múltiples tubos de extracción diferentes. En la fase analítica (2 mejoras) destaca el problema que supone el aumento exponencial del número de muestras procesadas. En las postanalíticas (6 mejoras), la pérdida de informes o la recepción en lugares inapropiados.

Conclusiones. Las reuniones realizadas fueron de enorme valor para intercambiar la experiencia y opinión de entre profesionales de diferentes niveles asistenciales y categorías, que han servido para elaborar el Anexo II (refleja las áreas de mejora detectadas y las posibles soluciones), así como la Arquitectura IV del Proceso (qué hacer paso a paso, quién los hace y cómo).

Como cabía esperar en base a los porcentajes de error atribuibles a fallos en cada una de estas fases según los datos de la literatura, las principales áreas de mejora se han detectado en la fase preanalítica, lo que nos ha ayudado a planificar las modificaciones oportunas.

Estado actual: las nueve mejoras propuestas para la Fase Preanalítica se han implantado o se implantarán en el primer trimestre de 2007. No se ha trabajado en ninguna de las dos de la Fase Analítica. Se ha implantado una y se está trabajando en otra de la Fase Postanalítica.

MODULACIÓN POR ESFINGOSINA-1 FOSFATO DE LA SEÑALIZACIÓN POR LOS RECEPTORES TIPO TOLL: IMPLICACIONES PARA LA RESPUESTA INMUNE. Dueñas A¹, Aceves M¹, Gómez C¹, Orduña A², Sánchez Crespo M¹, García Rodríguez C¹. ¹IBGM (Centro mixto CSIC-Univ. Valladolid). ²Hospital Clínico Universitario, Valladolid.

Introducción. En los últimos años se han acumulado numerosos datos experimentales que implican a los receptores tipo Toll (TLR) en la regulación de la respuesta inmune innata y en la respuesta adquirida. La unión de ligandos a TLRs promueve una cascada de señalización intracelular que activa factores de transcripción como NF- κ B, que a su vez regulan la expresión de genes de mediadores inflamatorios. Por otra parte, es creciente el interés de lípidos como esfingosina 1-fos-

fato (1-P), mediador presente en las lipoproteínas humanas en altas concentraciones, por su papel en la regulación de la respuesta inmune.

Objetivo. Estudiar la posible modulación de la activación vía receptor TLR2 por diferentes mediadores fosfolipídicos.

Resultados y conclusiones. El estudio se realizó inicialmente en células 293 transfectadas con el receptor TLR2 y el gen reportador NF- κ B-5xLuc, activadas con ligandos de TLR2 y tratadas con diferentes fosfolípidos. Los resultados indicaban que, a diferencia de otros fosfolípidos como ácido lisofosfatídico y lisofosfatidilcolina, esfingosina 1-P atenúa la activación vía TLR2. Para estudiar la relevancia fisiológica de estos hallazgos se realizaron experimentos en monocitos y macrófagos derivados de sangre periférica humana, en los que se observó que esfingosina 1-P atenuó la expresión de genes de quemoquinas proinflamatorias y la activación de NF- κ B inducidas vía TLR2. En ensayos de inmunodetección con anticuerpos fosfo-específicos se observó que esfingosina 1-P atenuó la fosforilación de ERK, pero no de JNK, inducida por activación de la vía TLR2, y que este efecto es revertido parcialmente por la inhibición farmacológica de PI3K con wortmanina y por la inhibición de la expresión de los receptores S1P1 y S1P2 con oligonucleótidos de RNA. Estos resultados demuestran la existencia en macrófagos humanos de un mecanismo de «cross-talk» entre esfingolípidos y TLR, en el que la unión a receptores de esfingosina 1-P específicos y la activación de PI3K ejercen un efecto modulador de la activación de TLR2 sin afectar la activación de JNK, lo que puede tener importantes consecuencias en la regulación de la respuesta inmunoinflamatoria.

GENERACIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE ANTICUERPOS RECOMBINANTES FRENTE A CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES HUMANAS DERIVADAS DE MÉDULA ÓSEA. Sánchez-Martín D¹, Sanz L¹, Vicario JL², Álvarez-Vallina L¹. ¹Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. ²Unidad de Histocompatibilidad, Centro de Transfusión de la Comunidad Madrid.

Las células madre mesenquimales (MSC, del inglés *Mesenchymal Stem Cells*) son células multipotentes que contribuyen a la regeneración de los tejidos mesenquimáticos. Diferentes procedimientos permiten el aislamiento de MSC, así como su diferenciación controlada *in vitro* hacia una amplia variedad de tipos celulares funcionales como, osteoblastos, condroblastos, adipocitos y mioblastos esqueléticos.

Las MSC constituyen un modelo útil con múltiples aplicaciones clínicas, tanto en terapia regenerativa como en terapia génica. Sin embargo, para aprovechar todo su potencial terapéutico es necesario disponer de nuevos marcadores que permitan una mejor caracterización, tanto a nivel fenotípico como funcional.

La tecnología de exposición de anticuerpos en la superficie de fagos filamentosos (*Phage Display*) se ha convertido en el sistema de referencia para la generación *in vitro* de anticuerpos monoclonales. Con este objetivo, diseñamos una estrategia de selección, mediante rondas sucesivas de *panning* de la genoteca Griffin.1 frente a MSC humanas derivadas de médula ósea, procedente de donantes sanos distintos. La genoteca Griffin.1 es una genoteca semisintética humana con formato scFv (fragmento variable de cadena única) y una diversidad clonal estimada de 108. Las MSC presentaban un fenotipo homogéneo caracterizado por la expresión de los marcadores CD13⁺, CD73⁺, CD90⁺ y moléculas MHC de clase I, y la ausencia de antígenos de superficie típicos de las células madre hematopoyéticas como CD34, CD45 o CD14.

Después de cada ronda se determinó la cantidad de partículas virales, por titulación y técnicas de ELISA, así como el porcentaje de clones portadores de fragmentos de anticuerpo que reconocían moléculas expresadas en la superficie de las MSC humanas, con un sistema de ELISA con MSC enteras. El porcentaje de clones positivos, capaces de reconocer la superficie de las MSC pasó de un 7% tras la primera ronda, a un 44% tras la segunda ronda y a un 60% después de la tercera ronda de selección. La caracterización de los clones positivos se realizó mediante secuenciación. El análisis funcional se realizará mediante citometría, inmunoprecipitación y huella peptídica (MALDI) del ligando.

CONSUMO PROLONGADO DE YOGURT FRESCO EN POBLACIÓN ESPAÑOLA SANA: CONSECUENCIAS SOBRE EL SISTEMA INMUNE SISTÉMICO. *Gutiérrez-San José E¹, Casquete M¹, Nocito M², Arranz-Sanz E¹, Garrote JA¹, Blanco-Quirós A¹, Redondo del Río MP¹, Castro MJ¹, Mateo B de¹, Alonso-Franch M¹, Mayo-Iscar A³, Lenoir I⁴, Cobo JM⁵, Mateos JA⁵, Corell A¹.* ¹Department of Pediatrics, Immunology and Nutrition, University of Valladolid, Valladolid. ²Department of Microbiology and Immunology, University Hospital, Valladolid. ³Department of Statistics, University of Valladolid, Valladolid. ⁴R&D Department, Danone Vitapole, Palaiseau Cedex, France. ⁵Health Marketing, Danone S.A., Barcelona.

Antecedentes. El yogurt es una leche coagulada obtenida por la fermentación ácido-láctica en presencia de las bacterias *L. bulgaricus* y *S. thermophilus*. Los efectos saludables del yogurt son conocidos desde la antigüedad, siendo E. Metchnikoff quien postuló su efecto sobre la longevidad en los consumidores búlgaros. Pero ha sido en las últimas décadas cuando se ha comenzado a estudiar los efectos del consumo del yogurt sobre el sistema inmune. Los datos son, hasta ahora, muy controvertidos, debido fundamentalmente a los diferentes diseños utilizados, diferentes cepas bacterianas, diferentes parámetros inmunológicos estudiados, diferentes dosis de yogurt ingeridas. A pesar de toda esta controversia, el consumo de yogurt se considera beneficioso en patologías con base inmune tales como el cáncer, enfermedades gastrointestinales, infecciones y asma.

Objetivo: estudiar los efectos inmuno-moduladores del consumo prolongado de yogurt fresco en población sana española

Diseño y métodos. Se ha realizado un estudio doble-ciego, aleatorio y estratificado en 122 individuos sanos. Todos ellos han consumido 3 unidades diarias de yogurt (375 g) durante 8 semanas. Se han utilizado 3 tipos de yogurt: fresco, pasteurizado y pasteurizado total. A todos ellos se les han analizado diferentes parámetros inmunológicos sistémicos a día 0, 14, 35 y 56.

Resultados y discusión:

- El consumo prolongado de yogurt (sea cual sea su contenido en bacterias vivas) tiene efectos moduladores sobre la inmunidad sistémica, particularmente en mecanismos de la inmunidad innata: aumenta la capacidad fagocítica y bactericida de los granulocitos; potencia la expresión de moléculas adaptadoras como CD16; reduce la expresión de CD14 (receptor de lipopolisacáridos) en monocitos y granulocitos; e induce una mayor síntesis de citocinas proinflamatorias (IL-1 e IL-6) y quimiocinas involucradas en extravasación leucocitaria (IL-8).
- Pero además, el consumo prolongado de yogurt fresco (y no el pasteurizado) modula herramientas fundamentales de la inmunidad adquirida: incrementa los niveles séricos de IgM (anticuerpo de

respuestas primarias), aumenta la proporción de linfocitos T periféricos (fundamentalmente de la subpoblación cooperadora «virgen») así como el desarrollo de perfiles de activación Th1 (aumentando la síntesis de IFN-gamma) frente a los Th2 (disminuyendo la síntesis de IL-5).

Conclusiones. El consumo prolongado de yogurt fresco modula parámetros inmunológicos sistémicos tanto de la inmunidad innata como de la inmunidad adquirida. Parece necesaria la presencia de bacterias vivas en el yogurt para que se module la inmunidad adquirida, requerimiento no necesario para la modulación en la inmunidad innata.

EL ESTRÉS ACADÉMICO MODULA ALGUNAS HERRAMIENTAS RELEVANTES DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA Y ADQUIRIDA. *Gutiérrez San José E, López Fernández MN, Nocito M, Redondo del Río MP, Castro MJ, Mayo-Iscar A, Alonso Franch M, Corell A.* ¹Department of Pediatrics, Immunology and Nutrition, University of Valladolid, Valladolid. ²Department of Microbiology and Immunology, University Hospital, Valladolid. ³Department of Statistics, University of Valladolid, Valladolid.

Objetivos del estudio. Determinar el grado de estrés / ansiedad de un grupo de estudiantes universitarios en 2 momentos de la vida académica: vuelta de un periodo vacacional y semanas de exámenes, eliminando otros factores que enmascaren (nutrición, fármacos, etc.).

Estudiar el sistema inmune del grupo seleccionado de estudiantes voluntarios en los 2 momentos previamente mencionados; con particular atención a los linfocitos T y determinar las alteraciones inmunológicas atribuibles al estrés.

Diseño y métodos. Se reclutaron 50 estudiantes universitarios fundamentalmente de la licenciatura de Medicina, pero en menor número de otras titulaciones. Todos ellos firmaron un consentimiento informado para su participación en el estudio. A todos ellos se les hizo una consulta médica inicial para descartar aquellos que tuviesen alguna enfermedad crónica de carácter inmune, o estuviesen recibiendo algún tratamiento farmacológico o nutricional que pudiese interferir en el estudio. También se les pasó un test de personalidad (16PF) para eliminar posibles alteraciones de índole psicológico o psiquiátrico y evaluar la ansiedad como rasgo de la personalidad. A los 50 que pasaron dicho filtro inicial, se les estudió en 2 momentos muy diferentes de la vida académica: uno basal o control (regreso de las vacaciones de semana santa) y 24 horas antes del examen para ellos más estresante. En ambos puntos se determinó el grado de estrés / ansiedad mediante los test psicológicos ISRA y EAE, el estado nutricional (mediante encuesta detallada de alimentación o cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) y un estudio inmunológico abarcando suficientes parámetros básicos tanto de la inmunidad humoral como de la inmunidad celular.

Resultados y discusión:

Con el test EAE aparecen diferencias significativas entre la intensidad y el estrés global percibido por el estudiante en el momento basal y en el periodo de exámenes. Con el test ISRA no se hayaron diferencias significativas en las puntuaciones totales, pero sí en algunos de los ítems.

En los parámetros inmunológicos se aprecia una disminución de linfocitos NK, alteraciones en la activación de linfocitos T (no sólo en la proporción vírgenes/memoria, sino en la capacidad de activación y proliferación medida por la expresión del antígeno CD69), así como

un incremento discreto pero significativo de linfocitos B, acompañado de alteraciones en IgG (con disminución de esta inmunoglobulina en los periodos de estrés) y disminución de los factores C3 y C4 del sistema de complemento.

ADAPTACIÓN DE UN ENZIMOINMUNOENSAYO PARA LA DETECCIÓN DE HLA-G SOLUBLE EN EL SOBRENADANTE DE EMBRIONES PREIMPLANTADOS. Marcos P, Martí S, Ten J, Galán F, Bernabeu R, Rubio G. *Inmunología, Dep. Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, Instituto Bernabeu, Alicante.*

HLA-G se expresa por las células trofoblásticas que invaden la decidua y contribuye a la aceptación del embrión modulando la respuesta alógena en útero. La detección de las formas secretadas (sHLA-G), generadas por splicing alternativo del mRNA, ha adquirido un atractivo reciente por sus posibles efectos sistémicos y utilidad diagnóstica en tumores y programas de reproducción asistida entre otros. Existe controversia reciente ya que no está claro si el sHLA-G liberado por el trofoblasto corresponde realmente a la forma de membrana (HLA-G1) proteolizada. Tampoco está claro si el embrión preimplantado expresa las isoformas solubles. Por otra parte, las cifras de sHLA-G descritas para embriones a 46-72 h después de la fertilización (3-80 ng/día por embrión) han sido cuestionadas ya que llegan incluso a superar el contenido total de proteínas esperables en la masa celular (45-50 ng).

Nuestro grupo ha puesto a punto un enzimoimmunoensayo para detectar sHLA-G en el rango de concentración esperable en cultivos de embriones de 46-72 h después de la fecundación. Al no existir un estándar aceptado para sHLA-G, el ensayo se ha calibrado utilizando el sobrenadante de la línea Jeg3 (coriocarcinoma) productora de todas las isoformas de HLA-G. Como mAb de captura para el ELISA se ha seleccionado el MEM-G/9 (específico para las isoformas HLA-G1 y -G5). Como mAb de detección, el W6/32 (que reconoce todas las formas heterodiméricas de HLA-I) ha dado un resultado satisfactorio. El empleo de este último en forma biotinilada resulta en un alto fondo que no mejora el límite inferior de detección. La inespecificidad, sin embargo, se ha disminuido alternando ciclos de incubación en un rango de temperaturas de 4° a 37° C. Aunque se ha ensayado ExtrAvidina-HRP (Sigma) para disminuir el fondo, en nuestras manos ha resultado más eficaz la estreptavidina tras un doble bloqueo y caseína 0,5% en todos los lavados.

De este modo, se ha podido detectar sHLA-G en el 50% de los sobrenadantes de 1-2c/w de Jeg3 tras 48 de cultivo, lo que podría asimilarse o ser inferior a la secreción de un embrión preimplante. La especificidad del ensayo se ha contrastado utilizando el sobrenadante de la línea C1R transfectada con HLA-G y sobrenadantes de líneas clase I+ HLA-G- Hep-G2 y C2BBel1.

CUANTIFICACIÓN DE LA SECRECIÓN EMBRIONARIA DE HLA-G IN VITRO COMO MARCADOR DE POTENCIAL DE IMPLANTACIÓN. Marcos P, Ten J, Galán F, Bernabeu R, Rubio G. *Inmunología, Dep. Medicina Clínica, Universidad Miguel Hernández, Instituto Bernabeu, Alicante.*

En los programas de reproducción asistida es habitual transferir más de un embrión al útero materno. Se pretende aumentar la tasa de implantación embrionaria pero aumenta el riesgo de embarazos múl-

tiples. Para disminuirlo se tiende a la transferencia de un único embrión, óptimo, seleccionado por criterios morfológicos. Para mejorar su baja eficacia se buscan indicadores bioquímicos. Se ha propuesto la secreción de HLA-G (sHLA-G) por el embrión en cultivo, sabiendo que esta molécula se expresa por el trofoblasto para zafarse del sistema inmunitario de la madre. Sin embargo, hay datos contradictorios sobre las isoformas de HLA-G expresadas por el embrión preimplantado y no se dispone de estándares aceptados para la cuantificación de sHLA-G.

En este trabajo, se correlaciona la presencia de sHLA-G en cultivos individuales de embriones con las tasas de embarazo. Los sobrenadantes se recogen a las 48 horas de la microinyección citoplasmática de espermatozoide (ICSI) y los embriones seleccionados por criterios morfológicos se transfieren a las 68 h post ICSI (al menos dos embriones por paciente). sHLA-G se determina mediante un ELISA amplificado, utilizando como par captura - detección los mAb MEM-G/9 y W6/32. Se preparó un calibrador interno con el sobrenadante del coriocarcinoma Jeg3 creciendo a saturación y se le asignó una concentración de 100 UsG/ml, a la que se refieren todos los datos.

Se muestran resultados de una serie preliminar de 114 sobrenadantes analizados. De las transferencias realizadas resultaron: 2 embarazos con dos sacos (una paciente recibió 2 embriones positivos (al menos 0,9 UsG/ml) y la otra recibió un único embrión sHLA-G+) y 5 embarazos con 1 saco (dos pacientes recibieron al menos 1 embrión sHLA-G+). Es decir, de las 7 mujeres gestantes, 4 recibieron al menos un embrión sHLA-G+. De las 11 pacientes no embarazadas, 8 recibieron embriones de menos de 0,7 UsG/ml y 3 un único embrión sHLA-G+. Es llamativo el que de 50 embriones no transferidos por anomalías morfológicas, 17 (34%) secretaron 0,7 sUG/ml o más. De hecho, valores extremos (hasta 5,5 sUG/ml) correspondieron a embriones bloqueados. Esto último apoyaría la idea propuesta de que al menos parte del sHLA-G detectable en estas etapas tan tempranas podría proceder del oocito más que de la secreción embrionaria.

SESIÓN 8: CÉLULAS NK CÉLULAS B

Moderadores: Ángel Corbí López (Madrid),
José Antonio Brieva Romero (Cádiz)

DESCENSO DEL NÚMERO Y LA RESPUESTA PROLIFERATIVA DE CÉLULAS NKT INVARIANTES V α 24+V β 11+ EN INDIVIDUOS ANCIANOS SANOS. Peralbo E¹, Gayoso I¹, Rosa O de la¹, Pita ML¹, Tarazona R², Solana R¹. ¹Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Sección Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. ²Departamento de Fisiología (área inmunología) Universidad de Extremadura. Cáceres.

Introducción. Las células T natural killer invariantes (NKTi) son una subpoblación de linfocitos T identificada en varias especies de mamíferos, cuyo TCR está constituido por una cadena α invariante (V α 24-J α 18 en humanos) asociada a un número limitado de cadenas β (V β 11 en humanos). Las células NKTi también se caracterizan por la expresión de receptores NK, fundamentalmente CD161. A pesar de la importancia de las células NKTi en la regulación de la respuesta

inmune, dada su capacidad para producir rápidamente interleuquinas tanto de tipo Th1 como Th2 tras su estimulación, existen muy pocos estudios en humanos sobre los efectos del envejecimiento en las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$.

Objetivos. Realizar un análisis comparativo entre el número y respuesta proliferativa *ex vivo* frente a la α -Galactosil-cerámida (α -GalCer) de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ de sangre periférica procedentes de individuos jóvenes y ancianos sanos.

Material y métodos. PBMCs de sangre periférica fueron extraídos de donantes jóvenes sanos (25-30 años) y donantes ancianos sanos (70-88 años). La cuantificación y análisis fenotípico de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ se realizó mediante citometría de flujo multiparamétrica. Para el estudio de la capacidad proliferativa de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ en respuesta a la α -GalCer, las PBMCs de los donantes fueron cultivadas *in vitro* con α -GalCer e IL-2. La respuesta proliferativa de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ se analizó mediante el cálculo del número acumulativo de doblamientos de la población (pair doublings, PD) NKTi tras 14 días de cultivo.

Resultados y discusión. Los estudios mostraron que tanto el porcentaje como el número absoluto de células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ de sangre periférica están disminuidos en individuos ancianos cuando comparamos con jóvenes. El análisis de la capacidad proliferativa frente a la α -GalCer mostró que tras 14 días de cultivo, las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ procedentes de tanto individuos jóvenes como de individuos ancianos sanos presentan una expansión significativa. Sin embargo, los PD acumulativos de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ de ancianos fueron significativamente más bajos que los obtenidos para las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ de jóvenes, indicando que las células NKTi de ancianos presentan una menor respuesta proliferativa frente a la α -GalCer. Estos resultados indican pues, un declive en el número y respuesta proliferativa de las células NKTi $V\alpha 24^+$ $V\beta 11^+$ de sangre periférica asociado al envejecimiento. Dado el importante papel inmunoregulador atribuido a las células NKTi, estas alteraciones en su número y función podrían contribuir al deterioro de la respuesta inmune en ancianos.

UN NUEVO MÉTODO PARA TIPIFICAR LOS GENES KIR MEDIANTE PCR-SSP QUE GENERA AMPLICONES CORTOS Y FACILITA EL ESTUDIO DE MUESTRAS DE DNA SUBÓPTIMAS. Vilches C, Castaño J, Gómez-Lozano N, Estefanía E. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro.

La detección de los genes KIR mediante PCR-SSP llevó en 1997 al descubrimiento de que los KIR codificados en los genomas de distintos humanos difieren en gran medida. Aquella técnica, actualizada para incluir genes y alelos descubiertos posteriormente, se sigue usando para analizar la diversidad de las poblaciones humanas y para estudiar la influencia de la variabilidad de los genes KIR sobre la salud. No obstante, varios de los métodos publicados para la genotipificación KIR presentan el inconveniente de estar basados en la amplificación de fragmentos grandes de DNA (1 ó 2 Kilobases). Esto puede ser problemático en muestras de baja calidad, que se encuentran a menudo en colecciones de DNA de gran valor científico; el resultado es la pérdida de datos o, aún peor, la producción de resultados poco fiables. Para resolver este problema, hemos rediseñado un método de PCR-SSP publicado en 2002 por nuestro grupo, de manera que genere amplicones de pequeño tamaño. Esta modificación minimiza los fallos de amplificación, reduce la necesidad de repetir estudios y per-

mite determinar el genotipo KIR con mayor fiabilidad incluso en muestras de menor calidad.

Financiación: ISCIII-Red G03/104 y MEC-BFU2005-04622

EL GEN KIR2DS3 ESTÁ DUPLICADO EN ALGUNOS HAPLOTIPOS KIR. Ordóñez D, Estefanía E, Gomez-Lozano N, Vilches C. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Puerta de Hierro.

Los KIR (Killer-cell Ig-like Receptors) son receptores de membrana de células NK y linfocitos T, algunos de los cuales reconocen moléculas de HLA de clase I. Sus genes se agrupan en el cromosoma 19 (19q13.4) y algunos de ellos codifican para receptores todavía no caracterizados. Uno de éstos es KIR2DS3, homólogo a los KIR activadores que reconocen HLA-C. Existen varias secuencias de KIR2DS3, que se distinguen por cambios sinónimos y por uno que afecta a un aminoácido de la región intracitoplásmica: Asp250 en 2DS3*001 y Asn250 en 2DS3*002. El gen para 2DS3*001 se localiza en la región centromérica del complejo KIR, entre 2DL5B*002 y 2DP1, mientras que 2DS3*002 parece encontrarse en una posición más telomérica, entre 2DL5A*005 y 2DS1. Por tanto, es posible que existan haplotipos con el gen en las dos posiciones. El objetivo de este estudio es encontrar estos haplotipos.

Para ello diseñamos un método para la detección del polimorfismo en la posición intracitoplásmica de 2DS3 en muestras de ADN genómico, y realizamos estudios de segregación familiar. En algunas familias en las que uno de los parentales portaba tanto 2DS3*001 como 2DS3*002 y el otro no tenía KIR2DS3, encontramos hijos que no heredaron ninguna variante y otros que heredaron ambas conjuntamente en un mismo haplotipo. Por tanto, en la población existen diversos haplotipos con respecto al gen 2DS3: algunos tienen dos copias del gen, 2DS3*001 en la región centromérica y 2DS3*002 en la telomérica; otros portan cada una de ellas por separado; y otros carecen de 2DS3.

Financiación: MEC - BFU 2005 - 04622.

INTERLEUKIN-15 LIVER GENE TRANSFER INCREASES THE NUMBER AND FUNCTION OF IKDC AND NK CELLS. Murillo O, Arina A, Dubrot J, Azpilicueta A, Gabari I, Perez Gracia JL, Alfaro C, Berasain C, Bendandi M, Ferrini S, Hervás-Stubbs S, Melero I. Centro de investigación Médica Aplicada (CIMA).

Interleukin-15 is a cytokine with great potential in immunotherapy. Its functions include homeostatic proliferation of CD8+ T cells, protection from apoptosis in activated lymphocytes, as well as inducing proliferation and survival of NK cells. An expression cassette encoding human IL-15 has been transferred by hydrodynamic injection into the liver of mice, in such a way that *in vivo* transduced hepatocytes secrete functional human IL-15. Such procedure results in transient expression of the cytokine that peaks in plasma 8h after injection and is detectable during the first 24-48 h. Doses can be repeated in the same mouse achieving similar levels of circulating cytokine. IL-15 hydrodynamic gene transfer results in an expansion of NK cells (DX5+, NK1.1+, CD3-, B220-) and the recently defined subpopulation IKDC (CD11cint, DX5+, NK1.1+, CD3-, B220+, GR1.1-). The attained expansion of these leukocytes in the liver is more dramatic, although it can also be readily detected in the spleen. Numeric increases are at least in part the result of proliferation from already differentiated cells and are followed by enhanced cytolytic

activity against YAC-1 cells, IFN γ production and the surface expression of TRAIL and CD137 (4-1BB). Both IKDC and NK cells have been implicated in innate immune responses against cancer cells. The novel link between IL-15 and IKDC further suggests potential for combinatorial immunotherapy strategies.

MOLECULAR CLONING OF DOCK10/ ZIZIMIN3, A NOVEL CDC42/RAC-INTERACTING PROTEIN SPECIFICALLY INDUCED BY IL4 IN B LYMPHOCYTES. Yelo E¹, Gimeno L¹, Bernardo MV¹, Majado MJ¹, Álvarez-López MR¹, Parrado A¹. ¹Immunology Service¹ and ²Hematology Service. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar. Murcia

IL4 protects CLL B cells from death by apoptosis. Gene expression analysis suggest that IL4 pathways are activated in CLL cells. We have identified DOCK10/Zizimin3 as an IL4-induced gene in CLL cells, and have obtained its full length sequence after cloning 1960 bp at its 5 terminus by RACE-PCR. The human DOCK10/ZIZ3 sequence coded for a protein with 2180 amino acids and a predicted Mr of 250K. DOCK10/ZIZ3 shared homology with the other two members of the Zizimin family, and is the largest among them: DOCK9/ZIZ1 (2069 amino acids) and DOCK11/ZIZ2 (2073 amino acids) are 52% and 50% identical, respectively, to DOCK10/ZIZ3, and 58% identical between them. DOCK10 was predominantly expressed in hematopoietic tissues, particularly in peripheral blood (PB), but also in lymph nodes, thymus and spleen. Among the PB subpopulations, DOCK10 was expressed in B and T lymphocytes and, at lower levels, in monocytes. DOCK10 was also expressed in several non-hematopoietic tissues, most significantly in brain and kidney. Its homologue DOCK9, compared to DOCK10, was predominantly expressed in placenta, and less significantly in hematopoietic tissues, particularly in B lymphocytes and monocytes. DOCK11, like DOCK10, was predominantly expressed in PB. Compared to DOCK10, DOCK11 was expressed more prominently in placenta, thyroid and PB monocytes, and less significantly in brain and lymph nodes. Therefore, each of the Zizimin family members had a specific tissue distribution. Among the three genes, only DOCK10 was induced by IL4 in CLL cells *in vitro*. Induction of DOCK10 by IL4 was a common event in CLL, since it was observed in 10 out of 10 cases. IL4 also induced DOCK10 expression in normal PB B lymphocytes, suggesting that DOCK10 induction by IL4 in CLL cells may be normal, rather than pathological. Western blot analysis using a polyclonal antibody raised against a peptide which mapped at the N terminus of DOCK10, detected a band of the expected size of 250K. Interestingly, IL4 did not induce DOCK10 expression in CD4 or CD8 T lymphocytes *in vitro*. Expression of DOCK10 was also studied in 4 B-ALL, 2 T-ALL, and 1 T-CLL. DOCK10 neither was expressed at significant levels nor induced by IL4 *in vitro* in these patients, except for a weak induction in a common B-ALL case, suggesting that expression of DOCK10, and its induction with IL4, may be restricted to certain stages of B cell differentiation, and/or certain B cell malignancies. DOCK10 was distributed both in cytosolic and nuclear extracts of CLL cells, and IL4 increased its expression in both compartments. K562 clones stably transfected with DOCK10 using the inducible tet-off expression system showed significantly higher levels of DOCK10 in cytoplasm than in nucleus. Immunofluorescence analysis of HA-tagged DOCK10 K562 clones showed preferential staining of the cytoplasm, and dotted structures were frequently observed. GST-pulldown assays showed that DOCK10 bound to nucleotide-free (nf) Cdc42, but not to GTP- or GDP-loaded Cdc42. In addition, DOCK10

bound to nf Rac1, albeit with less affinity than to Cdc42. DOCK10 did not bind to RhoA. These results suggest that, like DOCK9 and DOCK11, DOCK10 may act as a novel Cdc42 guanine-nucleotide exchange factor (GEF) and, in addition, as a Rac1 GEF.

CD38-MULTIPROTEIN COMPLEXES IN MEMBRANE RAFTS INVOLVED IN SIGNAL TRANSDUCTION IN NEOPLASTIC HUMAN B LYMPHOCYTES. Zumaquero E¹, Muñoz P¹, Cobo M¹, Pavón E¹, Lucena G¹, Martín A¹, González-Pacanoska D², Ruiz Pérez L-M¹, Malavasi F³, Sancho J¹, Zubiaur M¹. ¹Dep. Cellular Biology and Immunology. ²Dep. Biochemistry and Molecular Pharmacology, IPBL-N, CSIC, PTS, Armilla-Granada. ³Dep. Genetics, Biology and Biochemistry and CeRMS, Univ. of Torino Medic

Human CD38 is a signalling receptor and a broadly expressed type II transmembrane glycoprotein that belongs to the family of the ADP-ribosyl cyclases. In neoplastic human B lymphocytes: Namalwa, Daudi and Raji cell lines around the 50% of the total CD38 was preferentially associated with a subset of Brij-98-resistant rafts vesicles, which were stable at 37°C. The 45% of the surface CD38 pool was specifically recruited to membrane rafts. CD38-ecto-cyclase activity associated with Brij-98-resistant rafts microdomains was significantly higher than that in the soluble fractions. Disruption of membrane rafts with methyl- β -cyclodextrin, reduced CD38 partition and its associated cyclase activity. To better understand CD38 function we set forth to identify multiprotein complexes that preferentially associate with CD38 in the membrane rafts microdomains. In Namalwa cells CD38 was concentrated in a subset of lipid rafts that contains relatively high levels of the tyrosine kinase Lyn, the GTP-ase ai-2 subunit, and the CD19 B cell receptor. The association between CD38 and those signalling proteins was lipid raft dependent and it was perturbed in the presence of the non-ionic detergent octyl-D-glucopyranoside. CD38 ligation induced an increase of CD38 translocation to the membrane rafts and a transient activation of MAPK and AKT. Our results indicate that the location of CD38 in the membrane rafts of human B cells may favor both CD38 receptorial and ecto-enzymatic activities.

LA EXPRESION DE CXCR3 IDENTIFICA UNA NUEVA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS B MEMORIA RECIENTES ALTAMENTE MUTADOS. Ocaña E, González I, Jiménez G, Campos-Caro A, Brieva JA. Unidad de Investigación y Servicio de Inmunología. Hospital Puerta del Mar. Cádiz.

Introducción. La expresión de CXCR3 se vincula fundamentalmente a linfocitos T y otros leucocitos, que migran gracias a este receptor, a zonas de inflamación donde se producen sus ligandos. Una pequeña subpoblación de linfocitos B humanos de sangre expresan dicho receptor, si bien su papel es desconocido. Previamente nuestro grupo describió que esta población presentaba un fenotipo activado (CD80, CD86, TLR9), con un patrón característico de moléculas de adhesión y de marcadores de proliferación y muerte celular, y además contenía la mayoría de las células post-switched y todas las IgG+.

Objetivos. Analizar la expresión de genes implicados en el desarrollo de los linfocitos B, así como las mutaciones somáticas de los genes IgVH. Estudio funcional de la subpoblación de linfocitos B memoria CD27+ CXCR3+ en sangre periférica.

Métodos. Se estudió la expresión de diferentes genes implicados en el desarrollo de los linfocitos B mediante PCR a tiempo real. El análisis de las mutaciones somáticas de la región IGVH3 se llevó a cabo mediante secuenciación automática y el programa informático de análisis IgDSM. Para el análisis funcional, se estudiaron las diferentes poblaciones memoria tras la inmunización con toxoide tetánico (tet), y se analizó la respuesta a diferentes estímulos en cultivos.

Resultados. Se analizó la expresión de los genes Blimp-1, XBP-1, PAX5 y BCL6 en las tres subpoblaciones de linfocitos B; naive, memoria CD27+ CXCR3+ y memoria CD27+CXCR3-. Los resultados mostraron una elevada expresión de los genes Blimp-1 y XBP-1 en las dos poblaciones memoria, sin que existan diferencias significativas entre ellas, sin embargo la expresión de PAX5 y BCL6 fue similar a la de los linfocitos B naive. El estudio de las mutaciones somáticas reveló un mayor número de mutaciones (reemplazantes y silentes) tanto en FR como en CDR en la población memoria 27+CXCR3-, próxima a la observada en células plasmáticas (CP); sin embargo el cociente R/S era similar en ambas poblaciones memoria, y menor que el de las células plasmáticas. En cuanto al estudio funcional tras la inmunización con toxoide tetánico, se detecta un grupo de linfocitos B específicos IgG-tet de forma creciente a partir de la segunda semana, llegando al máximo al mes tras el booster, y bajando su de tección a niveles pre-boost a los 6 meses. Estos linfocitos B IgG-tet están restringidos a la subpoblación CD19+ CD27+ CXCR3+. Estas células expresan TLR-9 funcional y producen IgG-tet al ser cultivadas en presencia de ODN.

Conclusiones. Este trabajo describe una nueva población de linfocitos B memoria CD27+ CXCR3+, activados, con gran número de mutaciones somáticas y con una elevada expresión de los genes Blimp-1 y XBP-1, claramente implicados en la diferenciación hacia CP. Además esta población incluye los linfocitos B de memoria específicos inducidos recientemente *in vivo* tras la inmunización, que además tienen la capacidad de responder a ODN.

PAX5 CONTROLA LA DIFERENCIACIÓN DE LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS A TRAVÉS DE LA REPRESIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN BLIMP1. Mora-López F, Reales E, Brieva JA, Campos-Caro A. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Introducción. Los linfocitos B (LB) son las células responsables de la respuesta inmune humoral, función que cumplen a través de la secreción de anticuerpos (Ac). Una vez activado por el antígeno, el LB va a experimentar una transformación para convertirse en un tipo celular especializado en la síntesis y secreción de Ac: la célula plasmática (CP). La diferenciación final de las CP es dependiente de los factores de transcripción IRF-4, XBP-1 y BLIMP1. Éste último es considerado el «regulador maestro» del proceso.

Objetivos. El conocimiento de los factores implicados en la regulación de la expresión de BLIMP1 aportará información de interés acerca de la diferenciación de las CP. Para ello hemos identificado y analizado la región promotora del gen BLIMP1 humano (PRDM1).

Métodos y Resultados. El análisis de la región promotora mínima indica la posible presencia de un sitio de unión para PAX5 (BSAP) en la región 5'-UTR del gen. Los ensayos de retardo en gel demuestran que dicha secuencia participa en la formación de un complejo. Utilizando anticuerpos específicos comprobamos que dicho complejo está formado por PAX5. La mutación del sitio de unión para PAX5 impide la formación del complejo, y en ensayos con genes reporteros, pro-

voca un aumento de la transcripción a partir del promotor mínimo, lo que indica que PAX5 actúa como represor de la expresión de BLIMP1. Ensayos de cotransfección con un vector de expresión de PAX5 en células HEK-293 confirman este punto. Experimentos de inmunoprecipitación de cromatina confirman que PAX5 se une *in vivo* al promotor de BLIMP1.

Discusión. PAX5 es fundamental en el mantenimiento del fenotipo y funciones del LB. Su expresión es reprimida por BLIMP1 en la CP. En el presente trabajo demostramos que PAX5 actúa en la represión de la expresión de BLIMP1. Este resultado es compatible con trabajos publicados en los que se demuestra que la delección de PAX5 induce la diferenciación plasmática. Al reprimirse mutuamente PAX5 y BLIMP1 dan lugar a una circuito de retroalimentación negativa regulador que sería el punto de control principal del proceso diferenciativo.

ANÁLISIS COMPARATIVO DE LAS MUTACIONES SOMÁTICAS DE GENES IGVH PRESENTES EN CÉLULAS PLASMÁTICAS HUMANAS DE AMÍGDALA, SANGRE PERIFÉRICA Y MÉDULA ÓSEA. Jiménez-Gómez G, Gómez-Perales JL, Segundo C, Medina F, González-García I, Campos-Caro A, Brieva JA. Unidad de Investigación. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

Las células plasmáticas (CP) son el estadio final de diferenciación B, y como tal son las responsables de la producción de los anticuerpos o inmunoglobulinas (Ig), que han sido finalmente seleccionados para la defensa humoral contra antígenos (Ag). Para cumplir esta función las Ig de las CP han sufrido en fases previas de su desarrollo una serie de alteraciones en su secuencia de los genes IGVH debidas al proceso de hipermutación somática (HMS) y posterior selección por Ag, lo que conduce a la mejora de la afinidad de las Igs. Modelos animales revelan que las CP iniciales se generan en los órganos linfoides pocos días después de la entrada de Ag. Después de ésta primera fase, el número de CP desciende drásticamente en estas áreas inductivas y algunas se desplazan a través de la circulación (SP) hasta tejidos de depósito final, como la médula ósea (MO). Se ha establecido que este camino madurativo incluye el incremento de HMS y mejora de la afinidad. Recientemente, se ha podido establecer en humanos que las CP no son homogéneas, observándose cambios fenotípicos y funcionales que sugieren un gradiente madurativo similar que se inicia en las CP tempranas de los órganos linfoides inductivos (amígdala, (A)), progresa en la fase circulante en sangre periférica (SP) y es máximo en CP de MO. Sin embargo, no se sabe si este gradiente madurativo se acompaña de cambios en los genes IGVH de las CP. En este trabajo se han obtenido CP humanas de A, SP y MO altamente purificadas usando métodos inmuno-magnéticos y/o «sorting» de células CD38++. Se ha secuenciado el ADNc codificante de las regiones IGVH6 e IGVH3 (n= 574 y 749, respectivamente) presentes en CP secretoras de IgM, IgG, e IgA procedentes de los tres territorios mencionados y proveniente de varios sujetos. Los resultados muestran que existen diferencias notables entre los territorios de CP en cuanto a las mutaciones somáticas (nº, localización en CDR vs FR, Nº de mutaciones reemplazantes R, etc.) presentes en los genes mencionados, produciéndose un aumento de éstas en dirección A → SP → MO. Estos resultados eran similares para secuencias VH3 y VH6. Estos genes aparecen más mutados en los CDRs que en los FRs, de acuerdo con lo descrito. Además, la comparación entre las mutaciones presentes en los distintos isotipos revela gran cantidad de diferencias. El isotipo IgA presenta el mayor número de mutaciones en A, IgM, el menor, e IgG oscila entre las dos. En SP y MO, el iso-

tipo más mutado es IgG seguido de IgA e IgM. Estos datos establecen por primera vez en humanos que la cantidad y calidad de las HMS en los genes IgVH de las CP es un claro indicador de la madurez y posible funcionalidad *in vivo* de las Ig que codifican.

CÉLULAS PLASMÁTICAS HUMANAS CIRCULANTES INDUCIDAS TRAS LA INMUNIZACIÓN CON TOXOIDE TETÁNICO: LA SUPERVIVENCIA PROLONGADA ESTÁ VINCULADA A LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS DE ALTA AFINIDAD. *González-García I, Jiménez-Gómez G, Rodríguez-Bayona B, Campos-Caro A, Brieva JA. Unidad de Investigación, Hospital Puerta del Mar, Cádiz*

Las células plasmáticas (CP) son la fase final de diferenciación de los linfocitos B (LB) y están dedicadas a la producción masiva de anticuerpos. En este trabajo se demuestra en humanos la existencia de dos subpoblaciones de CP circulantes específicas inducidas después de la reinmunización con toxoide tetánico (tet). Ambas subpoblaciones difieren en su intensidad de tinción citoplasmática con tet-FITC mediante el análisis por citometría de flujo (CF), que las revela como dos poblaciones discretas y totalmente estables e independientes, denominándose tetalto y tetintermedio, respectivamente. Ambas subpoblaciones son realmente CP, como demuestra su perfil de marcadores de superficie (CD19+, CD20-, CD38alto, CD27alto, etc.) Y, además, se localizan en el mismo compartimento y contienen la misma cantidad de IgG-tet citoplasmática, y presentan cantidades similares del factor de transcripción Blimp-1, lo que indica que ambos tipos celulares han adquirido un nivel equivalente de madurez. El análisis de Scatchard realizado con tet-FITC por CF revela diferencias en la KD de alrededor de 10 veces entre las IgG-tet producidas por ambos tipos de CP, y la secuenciación de genes IgVH3 provenientes de ambos tipos celulares demuestra signos de mayor selección en las IgG-tet presentes en CP tetalto. Dadas las características similares exhibidas por ambas subpoblaciones en cuanto a cinética de generación, fenotipo y actividad proliferativa, es razonable pensar que ambas provienen de la diferenciación reciente de LB de memoria con IgG-tet de distinta afinidad, reclutados en los focos extrafolículos y activados durante el reencuentro con el Ag. A pesar de estas similitudes, CP tetalto y tetintermedio difieren en que las últimas presentan altos niveles de expresión de caspasa 3 activada y bajos niveles de supervivencia *in vitro*. Estos hallazgos demuestran que la supervivencia de las CP está restringida a la subpoblación que contiene IgG-tet con mayor afinidad por el antígeno.

SESIÓN 9: TRASPLANTES

Moderadores: Jaume Martorell Pons (Barcelona),
Luis Larrad Mur (Zaragoza)

INDUCCIÓN DE HIPORESPUESTA DONANTE ESPECÍFICA EN EL TRASPLANTE RENAL MEDIANTE UN PROTOCOLO IMMUNOSUPRESOR SIN ANTICALCINEURÍNICOS Y ESTEROIDES. *Mestre M¹, Bestard O², Bas J¹, Cruzado JM², Torras F¹, Serón D², Carreira M³, Grinyó JM². Hospital Universitario de Bellvitge. Barcelona.*

La inducción de un estado de hiporespuesta donante específica (DSh) es uno de los principales hitos en el trasplante (Tx) de órganos.

Con este objetivo hemos realizado un estudio piloto con 20 trasplantados renales basado en la administración de un curso corto de rATG, seguido de MMF y sirolimus. La alorespuesta Th1/Th2 donante específica (dR) fue monitorizada mediante la frecuencia de IFN-gamma e IL-10 por técnica de ELISPOT a los 0, 1, 6 y 12 meses post-Tx. El grado de apoptosis celular (CD3, CD4, CD8, annexina-V) se determinó por citometría de flujo en los días 5, 10 y 30 post-Tx. También se estudió la presencia de células Foxp3+ en biopsias de protocolo.

Después del tratamiento inductor, se objetivó una depleción transitoria de los linfocitos T asociada a un pico apoptótico al quinto día post-Tx, mayoritariamente entre la subpoblación linfocitaria CD8+HLA-DR+. Se detectó un test ELISPOT positivo IFN-gamma (dR+, >25spots/300.000 PBMC) en el pre-Tx en 6/14 de los casos (42%). Entre estos 6 pacientes, 5 desarrollaron rechazo agudo comprobado por biopsia (BPAR) (83,3%). En cambio, sólo 1/8 (12,5%) de los pacientes con un test ELISPOT negativo desarrollaron BPAR (P= 0,02). Además, el porcentaje de pacientes que mostraban una hiporespuesta donante específica (DSh) se incrementó progresivamente: 9/14 (64,2%) a los 6 meses del Tx. La función renal era mejor y la lesión histológica menor en los pacientes DSh. No se detectaron signos de activación de la alorespuesta inmune humoral: el depósito de C4d en las biopsias y los Ac. donante específicos (DSA) fueron negativos en todos los pacientes. Finalmente, la mayoría de los pacientes del estudio presentaban en la biopsia de protocolo de los 6 meses un importante porcentaje de células Foxp3+ entre los infiltrados linfocitarios en los injertos renales.

Así, la inducción de un estado de hiporespuesta donante específica es factible después del Tx renal. Estos pacientes tienen una excelente evolución clínica y un importante infiltrado de células T reguladoras en el injerto renal.

ANTICUERPOS ANTI-MICA PREDICEN EL RECHAZO AGUDO EN PACIENTES TRASPLANTADOS DE CORAZÓN. *Suárez-Álvarez B, López-Vázquez A, Fdez-Morera JL, Díaz-Molina B, Blanco-Gelaz MA, Martínez-Borra J, Muro M, Álvarez-López MR, López-Larrea C. Laboratorio de Histocompatibilidad y Trasplante. Hospital Universitario Central de Asturias.*

Se analizó la presencia de anticuerpos anti-MICA en 190 sueros pre- y post-trasplante obtenidos de 44 pacientes trasplantados de corazón. Para ello se diseñó una técnica de citotoxicidad dependiente de complemento (CDC) mediante el uso de líneas recombinantes y se comparó con el método de Luminex recientemente desarrollado. Adicionalmente, la expresión de MICA fue analizada mediante RT-PCR a tiempo real e inmunohistoquímica en biopsias endomiocárdicas obtenidas a diferentes tiempos durante el primer año post-trasplante. Se detectó presencia de anticuerpos anti-MICA en el 16% de los pacientes mediante Luminex y en el 25% por CDC, mientras que sólo dos pacientes presentaron anticuerpos anti-HLA. La prevalencia de anticuerpos anti-MICA fue significativamente más alta entre los pacientes con rechazo agudo severo que en aquellos sin rechazo (60,7% vs 14,3%, p= 0,0038 por CDC; 55,5% vs 5,7%, p= 0,0020 por Luminex). La presencia de anticuerpos anti-MICA post-trasplante fue anterior al desarrollo del rechazo, sugiriendo un papel importante de estos como marcador de predicción del rechazo. Los alloanticuerpos anti-MICA son específicos de donante (DSA) aunque la presencia de otros alelos ha también sido mostrada. Adicionalmente,

pudo detectarse un aumento de la expresión de MICA, tanto a nivel de mRNA como de proteína en aquellas biopsias con evidencias histológicas de rechazo agudo severo.

En conclusión, el análisis de la expresión de MICA en biopsias endomiocárdicas en pacientes trasplantados de corazón y su correlación con la presencia de anticuerpos anti-MICA en el periodo post-trasplante podrían ser nuevos marcadores de predicción del rechazo agudo.

INMUNOCOMPETENCIA DE PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO TRAS DOS DOSIS DE DACLIZUMAB Y TRIPLE INMUNOSUPRESION: IMPACTO EN EL DESARROLLO DE INFECCIONES. Carbone J¹, Sarmiento E¹, Lanió N¹, Kern F², Gallego A¹, Rodríguez-Molina J¹, Navarro J¹, Fernández-Yañez J³, Palomo J³, Ruiz M⁴, Rodríguez-Hernández C⁵, Fernández-Cruz E¹. Servicios de ¹Inmunología, ³Cardiología, ⁴Cirugía Cardíaca, ⁵Bioquímica, Hospital Gregorio Marañón. Madrid. ²Institut für Medizinische Immunologie, Charité, Berlin, Alemania.

Objetivo. 1. Evaluar alteraciones de la inmunidad celular y humoral pre y post-trasplante cardíaco (TC). 2. Relacionar los parámetros de inmunocompetencia con el desarrollo de infecciones post-TC.

Pacientes y controles. Cohorte de 60 pacientes sometidos a TC en el HGUGM entre Abril 2003 y Agosto 2006. Inducción incluye: 2 dosis de daclizumab (anticuerpo humanizado contra el receptor de la IL2, anti-CD25). Mantenimiento incluye: Micofenolato, prednisona y ciclosporina o tacrolimus según perfil de seguridad. Controles quirúrgicos (CQ, n=14): pacientes sometidos a cirugía cardíaca con circulación extracorpórea, sin inmunosupresión (estudio pre y post-cirugía: primera semana). Controles sanos (CS, n=8).

Métodos y resultados:

1. Producción *ex vivo* de interferón (IFN-gamma) por células CD8+ y CD4+ tras estímulo con péptidos antigénicos del CMV (n= 7) (cultivo de PBMC con péptidos antigénicos IE-1 y pp65, citometría de flujo de 4 colores, FACScalibur BD, MoAb BD): Media de porcentaje de células CD8+ productoras de IFN-gamma: Frente a IE-1: Pre-TC (0,59), post-TC (0,35, p= 0,2); frente a pp65: Pre-TC (1,26), post-TC (1,19, p= 0,9). Células CD8+ productoras de IFN-gamma frente a pp65 vs IE1 en post-TC: p= 0,04. Un paciente que desarrolla enfermedad CMV tiene porcentajes más bajos: 0,02 y 0,06% frente a IE1 y pp65, respectivamente. En CQ no hay cambio de porcentaje de células CD8+ productoras de IFN-gamma en el post-TC (IE1: 0,33 vs 0,29; pp65: 0,75 vs 1,04). La respuesta específica CD4+ frente a IE1 es menor o ausente en comparación con la respuesta específica CD8+.

2. Dinámica de Subpoblaciones Linfocitarias (Citometría de flujo de 4-colores: Pre-TC n=15, 7-15d n=8, 1m n=9, 3m n=7): Células CD4+CD25+: Pre-TC: porcentaje similar a CS. Depleción significativa post-TC hasta los tres meses (Pre-TC: 62%, 7-15d: 0,47%, 1m: 0,06%, 3m: 28%). En CQ no se producen cambios significativos (Pre-TC: 60%, post-TC: 61%). Células B: Pre-TC: Porcentajes mas bajos de células B (CD19+) y de células B memoria con cambio de isotipo (CD19+CD27+IgD-IgM-) vs CS: 5 vs 7%; 12 vs 18%, respectivamente. 7-15d: Expansión de células B CD19+ (11%). Células T: Pre-TC: Porcentajes mas bajos de células CD8+CD45RA+CCR7+ frente a CS: 25% vs 41%. Células CD4+ y CD8+ activadas (CD4+CD38+DR+, CD8+CD38+DR+): Pre-TC: Porcentajes mas altos frente a CS: 5 vs 2,7% y 25 vs 8,7% respectivamente. Expansión de células CD8+CD38+DR+ al mes post-TC (34%).

3. Impacto en el desarrollo de infecciones (n= 60). 23/60 pacientes desarrollaron infecciones. Pre-TC: IgG (Nefelometría): pacientes con niveles <1115 mg/dl (mediana): 4,58 veces más riesgo de tener infección (RR) (p= 0,01). C3 <124 mg/dl (mediana): RR= 4,49 (p= 0,02). 7d post-TC: IgG <676 mg/dl (mediana): RR= 4,03 (p= 0,02).

Conclusiones:

1. Se observa respuesta CD8+ específica frente a péptidos dominantes de CMV antes y después del TC.
2. La depleción absoluta de células CD4+CD25+ con dos dosis de daclizumab se mantiene al menos hasta el mes post-TC.
3. La medición de niveles de IgG, antes y después del TC, es útil para detectar pacientes en riesgo de desarrollar infecciones.

MONITORIZACIÓN DE SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS T REGULADORAS EN PACIENTES TRASPLANTADOS RENALES DURANTE EL PRIMER AÑO POSTTRASPLANTE. San Segundo D¹, Benito MJ¹, Fernández-Fresnedo G², Cacho E¹, Beares I¹, Ruiz JC², Arias M², López-Hoyos M¹. Servicios de ¹Inmunología y ²Nefrología. Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla».

Introducción. Durante los últimos años han recuperado un papel relevante las células T reguladoras en el control de las respuestas inmunitarias. De los distintos tipos de células T reguladoras, las subpoblaciones más estudiadas en la tolerancia frente a aloinjertos destacan: CD4+CD25hi, CD3+CD4-CD8-, CD8+CD28- y las células NKT (CD3+CD16+CD56+). Su cuantificación podría ser una herramienta útil para detectar aquellos receptores «más tolerantes» en los que se podría reducir la inmunosupresión.

Objetivo. Cuantificar las células T reguladoras sanguíneas durante el primer año post-trasplante renal y correlacionarlo con la evolución del injerto y del receptor.

Material y métodos. Se estudiaron 32 pacientes trasplantados renales en el momento del trasplante (T= 0), así como a los 6 meses (T= 6) y un año post-trasplante (T= 12). La pauta inmunosupresora consistía en ciclosporina, MMF y corticoides. Las principales subpoblaciones de células T reguladoras se caracterizaron mediante citometría de flujo, utilizando anticuerpos monoclonales dirigidos frente a los principales marcadores de cada una de las subpoblaciones. Además se valoró la capacidad supresora *in vitro* de las células CD4+CD25hi.

Resultados. Las células T CD4+CD25hi descendieron significativamente a T=6 (mediana: 1,97 cél/mL) frente a T=0 (7,96 cél/mL, p<0,01) y se recuperaron parcialmente a T=12 (4,47 cél/mL, p<0,05). El número de células NKT/mL a T=12 aumentó significativamente con respecto a T=0 y T=6 (p<0,05). Los linfocitos CD8+CD28- aumentaron significativamente (p<0,05) a los 6 meses y continuaron elevados a los 12 meses. Los receptores que recibían su segundo injerto tenían menos células CD4+CD25hi que los que recibían el primero, aunque la cinética de las células reguladoras era semejante durante el primer año entre los retrasplantados y los que recibían su primer injerto. Aquellos receptores que mostraban un filtrado glomerular >60mL/min al año del trasplante tenían mayor número de células CD4+CD25hi a T=0.

Conclusión. La inmunosupresión recibida durante los primeros 6 meses del trasplante afecta a las células CD4+CD25hi para, posteriormente, recuperarse su número en sangre. Por el contrario, la población reguladora CD8+CD28-, a la que se ha atribuido un papel esencial en trasplante hepático pero no renal, aumenta durante el primer año del trasplante independientemente de la inmunosupresión.

EXPANSIÓN DE CÉLULAS T CD8+CD28- ASOCIADA A BUENA ACEPTACIÓN DE INJERTO CARDIACO. Blanco-García RM, López-Álvarez MR, Marín-Moreno IM, Bernal-Ramos A, Salgado-Cecilia G, Campillo JA, Botella C, Muro M, García-Alonso AM, Pascual D, Álvarez-López MR, Minguela A. *Servicio de Inmunología y Cardiología del Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar, Murcia.*

Se ha descrito que es posible generar mediante estimulación *in vitro* células T CD8+ CD28- con capacidad para suprimir respuestas alógenas específicas. La inducción de dichas células *in vivo* podría estar mediada por células endoteliales que expresan las moléculas inhibitorias ILT-3 y ILT-4, moléculas cuya expresión se induce a su vez por IFN-alfa e IL-10.

En este estudio se ha analizado, mediante citometría de flujo, la población de linfocitos T CD3+ CD8+ CD28- en muestras de sangre periférica (SP), en un total de 42 receptores de trasplante cardiaco, obtenidas en el pre-trasplante y 1, 2, 3, y 4 semanas, y 2, 3, 4, 6, 9 y 12 meses post-trasplante. Se ha determinado tanto en cifras porcentuales como absolutas el recuento de dicha población, y se ha caracterizado su fenotipo, en particular se ha monitorizado la expresión de receptores KIR (del inglés, killing inhibitory receptors) tales como CD94, CD158a y CD158b, además de otras moléculas asociadas a células NK o NKT como son CD56/CD57. Los pacientes se clasificaron en: con-RA (n=19) y sin-RA (n=23) en función del índice de rechazo agudo que se calculó como un promedio del grado de rechazo de todas las biopsias (sumatorio del grado rechazo / nº biopsias con rechazo). Los pacientes con índice de RA > 1 fueron incluidos en el grupo con-RA.

Nuestros resultados demuestran un aumento significativo de linfocitos T CD8+CD28- en cifras porcentuales y absolutas en pacientes con buena aceptación de sus injertos (sin-RA), que comienza a partir del tercer mes post-trasplante y se mantiene hasta el final del periodo de monitorización (1año), llegando a duplicar los valores de dicha población al pre-trasplante. Por el contrario, en los pacientes con episodios de RA no se detecta una expansión de dicha población celular que se mantiene en cifras similares al pre-trasplante. La expansión de células T CD8+CD28- que tiene lugar en pacientes con buena aceptación de sus injertos, es mayoritariamente a costa de células que no expresan moléculas KIR (CD94, CD158a o CD158b negativas), pero expresan parcialmente CD56/CD57 (hasta un 50%).

Por tanto, nuestros datos ponen de manifiesto que en los pacientes con buena aceptación de sus injertos se produce una expansión de células T CD8+CD28-, que pueden ser la causa o el reflejo del establecimiento de un proceso de inducción de tolerancia que favorezca la aceptación del injerto. Además, la monitorización de dicha población podría ser de utilidad para ajustar de forma individualizada las dosis inmunosupresoras.

RELEVANCIA DE LA HETEROZIGOSIDAD HLA-C EN EL DONANTE EN LA INDUCCIÓN DE LINFOCITOS CD8+KIR2D POSITIVOS Y EN LA TOLERANCIA FRENTE AL INJERTO HEPÁTICO. López-Álvarez MR, Ruiz-Merino G, Botella C, Marín-Moreno I, Miras M, Sánchez-Bueno F, Muro M, Minguela A, García-Alonso AM, Moya-Quiles MR, Álvarez-López MR. *Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. El Palmar, Murcia.*

Las moléculas de HLA-C presentan dimorfismo en la posición 80 de la hélice alpha (Asn o Lys), el cual define dos familias de ligandos específicos para los receptores KIR2DL1/S1 y KIR2DL2/3/S2

(CD158a y CD158b). Las células NK y linfocitos T CD8+ expresan receptores KIR que interaccionan con HLA de clase I y transmiten señales activadoras o inhibitorias a estas células. Estudios recientes que incluyen los de nuestro grupo han mostrado que HLA-C puede tener un papel en el trasplante hepático.

El objetivo de este trabajo fue analizar el papel de la incompatibilidad HLA-C y su influencia en la recuperación de los repertorios de linfocitos T CD8+KIR2D+ en trasplante hepático.

El genotipo HLA-C se determinó por PCR en 300 parejas donante-receptor y el número de células T CD8+KIR2D+ se analizó por citometría de flujo en muestras de sangre periférica de 142 pacientes, obtenidas en los días 0 y 7, 15, 30, 90, 365 post-trasplante usando los anticuerpos EB6 (anti-CD158a) y GL183 (anti-CD158b) que respectivamente reconocen las moléculas KIR2DL1/S1 y KIR2DL2/3/S2 que incluyen receptores de inhibición y activación de células NK. Para el análisis, los trasplantes se clasificaron por una parte, en función de la presencia o ausencia de rechazo agudo en 2 grupos: AR y NAR y, por otra de acuerdo a los fenotipos HLA-C de donantes y receptores hepáticos.

El estudio reveló que la heterozigosis HLA-C del donante (Asn80/Lys80) claramente influencia la respuesta alógena frente al injerto hepático en el caso de que los receptores sean homocigotos y que esta respuesta es diferente en receptores de injerto Asn80/Asn80 (C1/C1) y Lys80/Lys80 (C2/C2). De hecho, en el primer caso, se inducía la expansión de células CD8+KIR2DL1/S1+ que fue significativamente mayor que las muestras basales a partir del día 30 post-trasplante (P= 0,017) y esto se correlacionaba con ausencia de rechazo agudo, mientras que un efecto similar no era observado en pacientes del segundo grupo, HLA-C2.

En conclusión el estudio de HLA-C y los repertorios de linfocitos que expresan KIR puede definir grupos de trasplantes con diferente sensibilidad al rechazo y servir para la adecuación terapéutica en terapias individualizadas.

El trabajo ha sido financiado por el proyecto FISS PI050944, la Red de grupos RED-GIT (G03/104).

INFLUENCIA DEL NÚMERO DE COPIAS DE LA REGIÓN CROMOSÓMICA QUE CONTIENE LOS GENES CCL4L-CCL3L EN EL RECHAZO AGUDO POST-TRASPLANTE DE PULMÓN. Colobran R, Casamitjana N, Roman A, Faner R, Pedrosa E, Gil J, Caro P, Pujol-Borrell R, Juan M, Palou E. LIRAD / Banc de Sang i Teixits (BST) / Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

El alotrasplante de pulmón es una opción terapéutica que tiene como mayor obstáculo el rechazo del injerto. Ciertas quimiocinas y sus receptores tienen un papel importante en la patogénesis del rechazo, participando en el reclutamiento de las células del sistema inmune en el pulmón trasplantado. En este trabajo se han estudiado polimorfismos de estas moléculas en 160 pacientes trasplantados de pulmón con un seguimiento post-trasplante suficiente para analizar su posible asociación a la aparición de rechazo agudo y/o crónico. Concretamente se analizaron polimorfismos con relevancia clínica de las moléculas CCL5/RANTES (-403 y -28), CCR5 (Δ32), CCL3/MIP-1α (+113 y +459), CCL4L/LAG-1 (+58 y +590), CCL2/MCP-1 (+2578) y CXCL8/IL-8 (+251) mediante PCR-RFLP o PCR a tiempo real. Debido a la creciente relevancia de las variaciones del número de copias (CNVs) como factores de susceptibilidad/resistencia en patología, se ha incluido en este estudio el polimorfismo del número de copias (CNP) de una región cromosómica que contiene los genes CCL4L y

CCL3L (el número de copias de CCL4L se ha definido también por PCR a tiempo real).

Solamente el CNP CCL4L-CCL3L ha presentado una influencia significativa en el rechazo post-trasplante de pulmón: el grupo de pacientes que no sufrieron rechazo agudo (n= 79) muestran una media de copias de CCL4L significativamente menor que el grupo de pacientes que presentaron rechazo agudo (n= 78) (1,66 vs 1,96 p= 0,024). De manera más evidente, el subgrupo de pacientes con dos o más episodios de rechazo agudo (n= 23) muestran un número aún mayor de copias de CCL4L (2,3 p= 0,002). En cambio, no se observaron diferencias en este polimorfismo entre los pacientes que sufrieron o no rechazo crónico.

Por lo tanto, es posible establecer una correlación entre el número de copias de la región cromosómica CCL4L-CCL3L y un mayor riesgo a padecer rechazo agudo post-trasplante pulmonar.

SESIÓN 10: INMUNOLOGÍA TUMORAL

Moderadores: Melchor Álvarez de Mon Soto (Madrid),
Augusto Silva González (Madrid)

IMPLICACIÓN DIRECTA DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DEL MHC DE CLASE I EN LA ONCOGENICIDAD TUMORAL IN VIVO EN UN SISTEMA TUMORAL XENOGENICO. Casares C¹, Linares I¹, Berruguilla E¹, Romero I¹, Salaya G¹, Paco L¹, Collado A², Algarra P³, Garrido F³, López-Nevot MA¹, García-Lora A¹. ¹Análisis Clínicos e inmunología, ²Unidad de Investigación, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ³Departamento Ciencias de las Salud. Universidad de Jaén.

La línea de melanoma humano Ando2 proviene de un paciente con melanoma maligno, presentando la pérdida de expresión de un haplotipo HLA, manteniendo la expresión en superficie del otro haplotipo HLA de clase I. Cuando estas células tumorales fueron inyectadas en ratones nude, el tumor obtenido después del crecimiento presentó una pérdida total de moléculas HLA de clase I (Ando2-Nude). La línea celular Ando2 fue transfectada con uno de los alelos que perdía, HLA-A2 (Ando2-T1E3).

Se ha comparado el crecimiento *in vivo* en ratones nude de estas tres líneas celulares que tienen diferente fenotipo HLA de clase I, y que todas derivan de la misma línea celular, es decir, son líneas parenterales. Para los estudios *in-vivo* se inyectaron 1x10⁶, 2x10⁶ y 5x10⁶ de células en ratones Nude, en grupos de 5 ratones. El crecimiento del tumor en función del tiempo fue analizado midiendo el diámetro mayor del tumor. También se comparó su proliferación *in vitro*, cultivando las células en placas de 96 pocillos, midiendo la proliferación mediante Alamar-blue y obteniéndose curvas de crecimiento.

Los resultados de crecimiento en ratones Nude nos muestran que la línea Ando2-Nude es la que crece más rápido alcanzando un tamaño aproximado de 8 mm en 24 días post-inyección. La línea celular Ando2 crece igualmente al principio, pero después se ralentiza su crecimiento, alcanzando un tamaño aproximado de 8 mm a los 43 días post-inyección. La línea celular Ando2-T1E3 crece hasta un máximo de 1,3 mm a los 15 días, disminuyendo el tamaño del tumor a continuación, siendo finalmente rechazada. Estos resultados muestran una relación inversa entre expresión de moléculas del MHC de clase I y el crecimiento o la oncogenicidad *in vivo* de estas líneas celulares tumorales.

Los ensayos de proliferación *in vitro* muestran que las tres líneas crecen de forma muy similar en las primeras 24 horas, sin embargo a partir de este momento la línea Ando2-Nude tiene una tasa de proliferación mucho mayor que Ando2 y transfectante (Ando2-T1E3). Los resultados muestran que la expresión de moléculas

MHC de clase I presentan una relación inversa con la tasa de proliferación *in vitro*.

Los resultados obtenidos muestran una posible relación directa entre la pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I y la oncogenicidad directa *in vivo* de las células tumorales.

DELECIÓN DE 9 PB EN EL GEN CD3Z DE UN PACIENTE CON ANGIOSARCOMA CUTÁNEO, METÁSTASIS GÁSTRICA Y NIVELES BAJOS DE CD3. Aguinaga Barrilero A, Rodríguez Pérez N, Pérez Blas M, Gutiérrez A, Lasa I, López A, Martín Villa JM. Facultad de Medicina (UCM).

Introducción. La baja expresión de la cadena CD3Z en distintas situaciones de inflamación crónica ha sido repetidamente descrita. Se ha visto que los pacientes de distintos tipos de cáncer presentan este defecto en sus linfocitos T y, esto podría ser causa, al menos en parte, de la diseminación y progresión tumoral. La causa del defecto de CD3Z puede ser variable y en pacientes con cáncer todavía se desconoce.

Métodos. Se ha utilizado una muestra de sangre de un paciente con angiosarcoma cutáneo y metástasis gástrica para analizar, por una parte, la expresión de CD3 en linfocitos de sangre periférica por citometría de flujo. Por otra parte, se ha purificado el ARN total de las células mononucleares de sangre periférica del paciente y retrotranscrito a cDNA, el cual ha sido amplificado y secuenciado utilizando cebadores específicos del gen CD3Z. El porcentaje de expresión de CD3 obtenido por citometría de flujo ha resultado ser extremadamente bajo, en relación a un control sano (16 vs 74%). La secuenciación del cDNA ha revelado una delección de 9pb al inicio de la región 3'UTR del ARNm de CD3Z (descrita por primera vez y depositada en el GenBank con el número de acceso EF079882). Además, se ha realizado la cuantificación del ARNm de CD3Z de este paciente por PCR cuantitativa a tiempo real, utilizando como gen control el ARNr 18S. El paciente muestra una expresión del ARNm de CD3Z 11 veces menor que la del control usado como referencia.

Conclusión. Este caso parece indicar que un defecto en la cadena CD3Z hace a los linfocitos T incapaces de responder frente a un evento tumorigénico, y de controlar la aparición de metástasis.

HLA Y MARCADORES INMUNOGENÉTICOS EN PACIENTES CON LGLS-CD3+. Garrido P¹, Almeida J², Cantón J³, López Nevot MA³, Sandberg Y², Langerak AW⁴, Garrido F³, Orfao A², Ruiz-Cabello F³. ¹Servicio de Hematología Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ²Instituto de Biología Molecular y Celular del Cáncer, Centro de Investigación del Cáncer (CSIC-USAL), Salamanca. ³Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Granada. ⁴Department of Immunology, Erasmus MC, Rotterdam, Holanda.

La linfocitosis de LGL, normalmente son procesos clonales que derivan tanto de células del linaje T-CD3+ como de células con fenotipo NK. El fenotipo más común en LGL-sT está representado por expansiones de linfocitos T alfa/beta, CD3+, CD8+, CD57+. El curso clínico, frecuentemente indolente, se asocia sin embargo a enfermedades

des autoinmunes (artritis reumatoide, eritroblastopenia, etc.) Este dato, han permitido sugerir que un estímulo crónico del sistema inmune (autoinmune o viral) puede jugar un papel relevante en la patogénesis de estos SLPT crónicos. En este sentido, algunos estudios han apuntado tras análisis de las secuencias CDR3 una homología que apuntaría hacia origen antigénico común. Con independencia de esto, nosotros pensamos que un posible defecto en la inmunoregulación pueda ser también relevante, y por este motivo hemos querido analizar la contribución de factores inmunogenéticos a estos procesos a través del estudio de marcadores polimórficos asociados a enfermedades autoinmunes, y a persistencia de infecciones virales. En nuestro estudio se ha analizado el tipo de familia TCR-Vbeta expandida su relación con el genotipo HLA y los polimorfismos genéticos de, IFN- γ , CTLA-4, IL10, IL4, TNF α , IL4, FAS y FASL. La muestra consistió en 41 casos de LGL TCD3+, CD8+ y de 40 casos de LGL-CD4+/CD8+ y fue comparada con 170 muestras controles de DNA recogidas al azar, la mayoría procedentes de un banco de donantes de sangre.

Del estudio del tipo de familia TCR-Vbeta expandida y de la región CDR3 se encontró un grupo muy homogéneo en el grupo de pacientes LGLs CD3+, CD4+, CD8+, que compartió alelo HLA., la secuencia CDR3 y el segmento Vb elegido. Estos resultados no se observaron en el grupo de LGLs-CD8, CD57+ lo que puede estar relacionada con una mayor heterogeneidad patogénica, a su vez asociada a la mayor variedad clínico-biológica, en este grupo. Finalmente, no se encontraron diferencias significativas en las frecuencias alélicas de los marcadores polimórficos antes mencionados, lo que parece descartar su contribución a la patogenia de estos síndromes linfoproliferativos.

LA SELECCIÓN INMUNOMAGNÉTICA DE CÉLULAS TUMORALES CIRCULANTES COMO HERRAMIENTA ÚTIL EN LA PREDICCIÓN DE LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO EN PACIENTES CON CÁNCER DE MAMA. Serrano MJ, Campos M, Warleta E, Ruiz-Mora J, Delgado-Rodríguez M, Algarra I, Sánchez-Rovira P, Gaforio JJ. Área de Inmunología. Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.

Introducción. La presencia de metástasis es la primera causa de muerte en pacientes con cáncer de mama.

La metástasis es el último paso en una serie de eventos que implican el paso a través de la sangre y/o de la circulación linfática de células tumorales circulantes (CTCs) con propiedades metastáticas.

El estudio de estas células tiene, pues, importantes implicaciones para entender mejor no solo los eventos que conllevan las rutas metastáticas, sino, también es de utilidad para el pronóstico de la enfermedad, la monitorización del tratamiento y la predicción temprana de la respuesta a tratamientos quimioterápicos. En un estudio anterior, nuestro grupo ya demostró que la detección de CTCs antes de iniciar cualquier tratamiento con quimioterapia, tenía valor pronóstico sobre la evolución de la enfermedad (Gaforio et. al 2003, Int. J. Cancer).

Presentamos aquí, los resultados obtenidos tras analizar la presencia de CTCs durante el tratamiento quimioterápico en pacientes con cáncer de mama. Estudiamos la capacidad potencial que las células tumorales circulantes tienen para predecir la respuesta al tratamiento en estos pacientes, utilizando la selección positiva inmunomagnética como método óptimo de aislamiento de dichas células.

Material y métodos. 59 pacientes fueron incorporados en este estudio entre abril del 2000 y diciembre del 2002. Siendo la media de segui-

miento de 50 meses. Todos los pacientes recibían tratamiento quimioterápico y se les realizaba extracciones sanguíneas antes, durante y después del tratamiento. Este trabajo se centra en los resultados obtenidos tras la administración de la quimioterapia. Tras el consentimiento informado, se extraían 10 ml de sangre periférica en tubos heparinizados. El aislamiento de las CTCs se realizaba utilizando una técnica de selección positiva inmunomagnética basada en la tecnología MACS (Miltenyi Biotec). Las células son seleccionadas mediante el uso de un anticuerpo específico pancitoqueratina conjugado con partículas ferromagnéticas. Una vez seleccionadas, las CTCs son detectadas por tinción inmunocitoquímica con un sustrato de fosfatasa alcalina que las tiñe de color rojo.

Resultados. Las CTCs fueron detectadas en 32 pacientes (54,23%) con un número medio de células de 3,7 CTCs/10 ml (rango de 1-105). Su número se correlacionó con la Supervivencia Global y la Progresión Libre de Enfermedad. En el análisis de regresión Cox univariante el número de CTC se correlacionaba significativamente con la Supervivencia Global ($p = 0,020$) y con la Progresión Libre de Enfermedad ($p = 0,008$). En el análisis multivariable la correlación con la Supervivencia Global estaba al borde de la significación estadística ($p = 0,071$), al igual que la Progresión Libre de Enfermedad ($p = 0,052$).

Conclusiones. Nuestros resultados sugieren, que la persistencia de células tumorales circulantes tras el tratamiento quimioterápico podría predecir tempranamente la evolución clínica del paciente, pudiendo ser una nueva herramienta para la monitorización del tratamiento en pacientes con cáncer de mama. Además, los resultados corroboran que la utilización de la técnica de selección positiva inmunomagnética es metodológicamente útil para detección en sangre de células tumorales circulantes.

CONTRIBUCIÓN DE LOS MECANISMOS DE «SHEDDING» Y «SPLICING» ALTERNATIVO DE ARNm A LA GENERACIÓN DEL RECEPTOR SOLUBLE DE IL-6 EN MIELOMA MULTIPLE. Benítez-Rondán A¹, García-Salas M¹, Horiuchi S², Yamamoto N², Medina F¹. ¹Unidad de Investigación. Hospital Puerta del Mar. Cádiz. ²Department of Microbiology. Tokyo Medical and Dental University. Tokyo (Japan).

Antecedentes. El mieloma múltiple (MM) es un tumor incurable de células plasmáticas que depende para su supervivencia de la interacción de la interleuquina 6 (IL-6) con su receptor, principalmente con la forma soluble de éste (sIL-6R). Considerando un hipotético papel de sIL-6R como diana antitumoral en el MM, sería adecuado profundizar en los mecanismos por los que se genera.

Objetivos. (1) Cuantificar la contribución a nivel de proteína en el MM de los dos mecanismos previamente descritos en la producción de sIL-6R, *shedding* (por proteólisis de la forma de IL-6R asociada a membrana) y *splicing* alternativo del ARNm. (2) Determinar el papel de la metaloproteasa ADAM-17 (TACE, CD156b) en estos fenómenos de *shedding*.

Metodología. (1) Se testó en células de MM (tanto en líneas como en muestras *ex vivo* de pacientes) la expresión en superficie de IL-6R y de ADAM-17 mediante citometría de flujo. (2) Se cultivaron células de MM en presencia de diversos estímulos y se cuantificó en los sobrenadantes el sIL-6R total y el generado por *splicing* alternativo, mediante una técnica de ELISA.

Resultados. (1) La presencia de IL-6R es detectable en la superficie de las líneas celulares de MM pero prácticamente negativa en las muestras *ex vivo*. (2) Tanto en líneas celulares como en muestras *ex vivo*

la producción de sIL-6R se debe principalmente a fenómenos de *shedding* siendo la aportación del *splicing* alternativo sólo del orden de un 10%, incluso en presencia de estímulos como IL-10 y/o Oncostatina M que favorecen dicho mecanismo en otros sistemas celulares. (3) Las líneas y las muestras *ex vivo* de MM expresan en su membrana celular ADAM17.

Conclusiones. (1) La escasa expresión de IL-6R en la superficie de las células de MM obtenidas *ex vivo*, refuerza el papel relevante de la forma soluble (sIL-6R) en dicha patología. (2) El mecanismo de *shedding* es fundamental en la generación de sIL-6R en MM mientras que la contribución del *splicing* es mínima, situación que habría que considerar en posibles estrategias antitumorales con sIL-6R como diana. (3) La expresión de ADAM-17 en las células de MM, sugiere que como en otros sistemas celulares, esta metaloproteasa participa en los fenómenos de *shedding* de sIL-6R.

THE TREATMENT OF LUNG METASTASIS WITH INHALED IL-2 OF METASTATATIC RENAL CELL CARCINOMA PATIENTS INDUCES SYSTEMIC MODULATORY EFFECTS. Chara L, Diaz D, Chevarria J, Navas V, Carballido J, Prieto A, Monserrat J, Barcenilla H, Sanchez M, Acuña L, Villarreal M, Jimenez E, Olaverria M, Alvarez-Mon M. CNB-CSIC R&D Associated Unit, IMMPA, Department of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid. Clinical Oncology Research Unit, University Central Hospital of Asturias, Oviedo. Department of Urology, University Hospital «Puerta de Hierro», Madrid.

Background. IL-2 is a drug that is employed in the treatment of several tumors due to its capacity of restore or increase the regulatory and effector function of the immune system. These effects have been demonstrated with the administration of the drug by intravenous and subcutaneous ways. Recently, it has been observed that the inhaled IL-2 administration is effective in the treatment of lung and renal cell carcinoma metastasis. However, it is unknown if this therapeutic effect is accompanied of systemic and local modulatory effects.

Objectives. To compare spontaneous and mitogen-induced apoptosis in peripheral blood lymphocytes of renal carcinoma patients before and after treatment with inhaled IL-2.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells were purified from 7 patients with renal carcinoma before and after treatment with inhaled IL-2. The cells were characterized in a FACScalibur cytometer using fluorochrome-labeled monoclonal antibodies. The AI (or percentage of apoptotic cells, AI x 100) was calculated for T-cells expressing CD3, CD4, CD8, CD56, HLA-DR, CD25 and CD45RO/CD45RA antigens and NK-cells (CD3-CD56+ or CD3-CD16+). These AI were determined after 24 hours of culture under two conditions: without exogenous apoptosis inducers and in the presence of phytohemagglutinin. Comparisons between patients were carried out using the Wilcoxon test and were considered significant when $p < 0,05$.

Results. A significant decrease in spontaneous *ex vivo* apoptosis was found in peripheral blood lymphocytes from renal carcinoma patients after treatment with inhaled IL-2 with respect to pretreatment values. This decrease occurred in T-cells and also in CD45RO+ cells from both CD4+ and CD8+ subsets. A decrease of apoptosis was also observed in CD25+ expressing cells from CD3+, CD4+ and CD8+ subsets after treatment with inhaled IL-2. A decrease in AI was found in mitogen induced apoptosis of CD25+ cells from CD3+, CD4+ and CD8+ subsets.

Conclusions. The treatment with inhaled IL-2 has immunomodulatory effects that are observed at systemic level as a reduction of the apoptosis of cells from several memory and activated peripheral blood T-cell subsets.

DESARROLLO DE UN MODELO DE ANGIOGÉNESIS HUMANA IN VIVO PARA LA EVALUACIÓN DE AGENTES ANTIANGIOGÉNICOS. Cuesta AM, Álvarez-Vallina L, Sanz L. Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid.

La hipótesis de que el crecimiento tumoral podía detenerse inhibiendo la formación de nuevos vasos sanguíneos fue propuesta hace más de 30 años, y hoy en día el desarrollo de terapias anti-angiogénicas constituye un campo de gran actividad, existiendo ya un anticuerpo monoclonal inhibidor de angiogénesis aprobado para el tratamiento de ciertos tipos de cáncer. Sin embargo, no disponemos de un modelo *in vivo* de angiogénesis humana para el screening de agentes con potencial anti-angiogénico. La implantación en ratones inmunodeficientes de células tumorales humanas es una herramienta muy útil en otros contextos, pero el componente vascular de los tumores así formados procede exclusivamente del huésped y puede no ser un correlato fiel del endotelio humano. Por otro lado, los implantes de biopsias de piel humana no reflejan las características especiales de los vasos tumorales.

Como alternativa hemos explorado el trasplante en ratones inmunodeficientes de injertos primarios de tumores humanos, en concreto de cáncer de colon, intentando preservar al máximo la arquitectura original (vasos sanguíneos incluidos) durante el proceso. Cada animal recibió en el espacio subcutáneo varias piezas de pocos milímetros de diámetro, y se procedió a evaluar el prendimiento y el crecimiento tumoral durante un periodo máximo de un mes. Los animales se sacrificaron a los 10, 20 y 30 días post-implantación y los tumores fueron resecados y analizados mediante técnicas de inmunohistoquímica. En todos los casos en los que la pieza había prendido (aproximadamente, un 50%) se conservaba la histología original y la existencia de vasos sanguíneos funcionales podía constatarse por la presencia de hematíes en el interior de la luz. La naturaleza de estos vasos se analizó mediante tinción con anticuerpos frente a CD31 y CD34 tanto humano como murino. A día 10 post-implantación todo el componente vascular era de origen humano; a día 20 existía una cierta variabilidad individual, con un predominio de células endoteliales murinas en unos casos y de humanas en otros. A día 30, el componente vascular humano había sido sustituido en su práctica totalidad por endotelio murino.

En conclusión, este modelo de xenoinjerto de cáncer de colon puede ser de utilidad para el estudio de la respuesta del endotelio tumoral humano a agentes anti-angiogénicos al menos en los estadios iniciales de la implantación.

INHIBICIÓN DEL CRECIMIENTO TUMORAL MEDIANTE LA SECRECIÓN INTRATUMORAL DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS RECOMBINANTES. Compte M¹, Blanco B¹, Serrano F², Cuesta AM¹, Sanz L¹, Bernad A³, Holliger P⁴, Álvarez-Vallina L¹. ¹Unidad de Inmunología Molecular, Hosp. Univ. Puerta de Hierro, Madrid. ²Tissue Bioengineering Multidisciplinary Unit, Fundación Hosp. de Alorcón, Madrid. ³Dpto. de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología, Madrid. ⁴Medical Research Council Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, Reino Unido.

Los anticuerpos (Ac) biespecíficos (AcBis) contienen dos dominios de unión al antígeno con distinta especificidad antigénica. General-

mente los AcBis están diseñados para reconocer un antígeno en la superficie de las células tumorales y una molécula activadora en la superficie de las células efectoras del sistema inmune. Diferentes ensayos *in vitro* e *in vivo*, y distintos AcBis probados en ensayos clínicos han demostrado su potencial en protocolos de terapia antitumoral. Sin embargo, la administración sistémica de AcBis presenta limitaciones debido a su reducida capacidad de penetración tisular y a sus efectos secundarios.

Nuestro grupo ha desarrollado una nueva estrategia genética para conseguir la activación de las células T a través de la secreción local (*in situ*) de AcBis recombinantes con formato diabody, con especificidad frente a la cadena ϵ del complejo TCR/CD3 humano y frente a un antígeno carcinoembrionario (CEA) humano (α CEA/ α CD3). La aplicación terapéutica de este protocolo requiere desarrollar un sistema de transferencia génica para modificar *ex vivo* células primarias. Con este objetivo, hemos generado un vector lentiviral (pRRL-dAb-IRES-GFP), derivado del HIV-1, tricistrónico que contiene los genes del diabody biespecífico (dAb cadena 1 y dAb cadena 2) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP) unidos a través de secuencias IRES derivadas del virus de la encefalomiocarditis.

Comprobamos que líneas celulares humanas de origen hematopoyético, (mielomonocíticas y linfoides) infectadas con este vector secretaban diabody α CEA/ α CD3 funcional. Asimismo, linfocitos T humanos primarios infectados con el vector lentiviral expresaron de forma estable GFP (30%) y secretaban niveles apreciables de diabody α CEA/ α CD3 funcional. En ensayos *in vivo*, la inyección intratumoral de células T infectadas con el lentivirus pRRL-dAb-IRES-GFP retrasó significativamente el crecimiento tumoral con respecto al grupo control. En conclusión se plantea un nuevo sistema de inmunoterapia antitumoral, no descrita hasta el momento, que podría sentar las bases de una nueva modalidad terapéutica de amplia difusión en clínica humana.

REGULACION DE LA RESISTENCIA A LA APOPTOSIS MEDIADA POR TRAIL EN LINFOCITOS T PRIMARIOS: PAPEL DE LOS INHIBIDORES DE NF κ B. Morales J, Ruiz-Magaña MJ, Ruiz-Ruiz C. Departamento Bioquímica y Biolog Mol 3 e Inmunoología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada.

El ligando de muerte TRAIL se ha implicado en la acción antitumoral de diversos tipos de células del sistema inmunológico, como células dendríticas, células NK o linfocitos T. La resistencia de dichas células a la apoptosis mediada por TRAIL es esencial a fin de poder actuar como mediadoras de la respuesta antitumoral. En este trabajo se ha estudiado la resistencia a TRAIL de células T primarias humanas, tanto en reposo como activadas, en respuesta al tratamiento con diferentes agentes descritos como moduladores de la sensibilización a TRAIL en modelos tumorales: drogas genotóxicas, agentes despolimerizantes de microtúbulos, inhibidores de la vía de fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K), inhibidores del proteosoma, inhibidores de histona deacetilasa (HDACi) e inhibidores de NF- κ B. Si bien algunos de estos agentes son tóxicos para los linfocitos T, tan sólo los inhibidores de NF- κ B fueron capaces de sensibilizar a las células T activadas a la apoptosis mediada por TRAIL, posiblemente mediante la regulación de proteínas antiapoptóticas como TRAIL-R4, c-FLIPs y miembros de la familia IAP (proteínas inhibidoras de apoptosis). Estos resultados cuestionan la seguridad de algunas terapias combinadas con TRAIL.

SESIÓN 11: CÉLULAS T

Moderadores: Rafael Bragado Herrero (Madrid),
Jaime Sancho López (Madrid)

LA CADENA ALFA DEL RECEPTOR DE IL7 (IL7RA) ES UNA DIANA TRANSCRIPCIONAL DIRECTA DE LA SEÑALIZACIÓN POR NOTCH1 EN CÉLULAS T. González-García S, Martín-Gayo E, Ballestar E, Esteller M, Toribio ML. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas.

La señalización por Notch1 es esencial para el desarrollo de las células T a partir de progenitores hematopoyéticos multipotenciales. Notch1 induce el programa de diferenciación linfóide T y promueve la expansión de los precursores de los linfocitos T. La identificación de los genes diana de Notch1 durante este proceso de diferenciación es indispensable para comprender el mecanismo por el cual Notch1 favorece la generación de células T en contra de otros linajes hematopoyéticos. En este trabajo hemos identificado la cadena alfa el receptor de interleuquina 7 como una diana transcripcional directa de la señalización por Notch1 en células T. La expresión de una forma constitutivamente activa de Notch1 en células T induce la actividad del promotor de IL7Ra, lo que se traduce en un aumento de los niveles de proteína en membrana. Hemos identificado un sitio de unión consenso de CSL conservado en humano y ratón, a través del cual Notch1 se une al promotor de IL7Ra. La mutación de este sitio o la ausencia de CSL impiden la activación del promotor de IL7Ra por Notch1. Es más, durante el desarrollo de los linfocitos T humanos, la inhibición de la señal de Notch mediante inhibidores de gamma secretasas o tras la expresión de un dominante negativo de MAML1, reduce drásticamente los niveles de expresión en membrana de IL7Ra, inhibiendo la proliferación de los progenitores T, mientras que su diferenciación no se ve afectada hasta el estadio DN3, donde se ha descrito que la señalización por Notch1 es esencial para la expresión del preTCR y la diferenciación final de las células preTCR. Estos datos indican que la expresión del receptor de IL-7 es parte del programa madurativo inducido por Notch1, indispensable para el proceso de expansión de los progenitores de los linfocitos T que precede a su diferenciación final en células T maduras.

ESTRUCTURA, EXPRESIÓN Y MODULACIÓN DEL TCR EN LINFOCITOS T HUMANOS CARENTES DE CD3 γ RECONSTITUIDOS CON QUIMERAS DE CD3 γ δ . Perez-Flores V¹, Guardo AC¹, Martín-Fernández JM¹, Nielsen BL², Geisler C², Allende L³, Sanal O⁴, Recio MJ¹, Regueiro JR¹. ¹Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. ²Inst. of Medical Microbiology and Immunology, Univ. of Copenhagen, Denmark. ³Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. ⁴Pediatrics, Hacettepe University Children's Hospital, Ankara, Turkey

Las cadenas CD3 del receptor antígeno-específico de las células T (TCR) juegan un papel central en la regulación de la expresión del TCR en la superficie celular. La inmunodeficiencia de CD3 γ (γ -) en humanos resulta en una disminución en la expresión del TCR en membrana e incapacidad para modular éste en respuesta a PMA. La internalización del TCR en respuesta a PMA depende del dominio intracelular (IC) de CD3 γ . Sin embargo, aún no se conoce la causa molecular de la reducción de la expresión del TCR en los linfocitos γ -. Hemos desarrollado vectores retrovirales bicistrónicos que portan distintas com-

binaciones de los segmentos intracelular (IC), transmembranal (TM) y extracelular (EC) de las cadenas CD3 γ y CD3 δ ($\gamma\gamma\gamma$, $\gamma\gamma\delta$, $\gamma\delta\delta$, $\delta\gamma\gamma$ y $\gamma\gamma$). Al vector vacío lo denominamos ---. Estas construcciones fueron inicialmente introducidas en una línea celular T γ - denominada JGN (de Jurkat Gamma Negativa), que no expresa TCR en su superficie. Los resultados obtenidos confirman que la expresión del TCR en JGN depende del dominio EC de CD3 γ , ya que $\gamma\gamma\gamma$, $\gamma\gamma\delta$, $\gamma\delta\delta$ y $\gamma\gamma$ -, pero no $\delta\gamma\gamma$ o ---, permiten la re-expresión del complejo TCR en membrana. Por el contrario, la respuesta a PMA dependió claramente del dominio IC de CD3 γ , puesto que la expresión de $\gamma\gamma\gamma$, pero no $\gamma\gamma\delta$, $\gamma\delta\delta$ o $\gamma\gamma$ -, resulta en modulación normal del complejo. Posteriormente, estas construcciones fueron empleadas para transducir linfocitos T de sangre (PBLs) deficientes naturales de la cadena CD3 γ así como líneas inmortalizadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS) de estos mismos pacientes. En estos modelos la expresión del TCR en superficie, no está abolida sino reducida. Las quimeras confirman que la respuesta a PMA mapea con el dominio IC de CD3 γ . Sin embargo, en lo que se refiere a expresión, el complejo mutante obtenido aumentó sus niveles de expresión cuando se reemplazó la cadena ausente por las quimeras $\gamma\gamma\gamma$, $\gamma\gamma\delta$, $\gamma\delta\delta$ y sorprendentemente $\delta\gamma\gamma$ tanto en PBLs CD3 γ - como en HVS CD3 γ -; por el contrario cuando se introdujo la quimera $\gamma\gamma$ - no se obtuvo aumento en la expresión (equiparable a la de ---). Por tanto no podemos atribuir la responsabilidad del aumento de expresión del complejo a ningún dominio en concreto de la cadena CD3 γ , en contraste con lo ocurrido en JGN. Por otra parte, algunos anticuerpos como BMA031 detectaron mejor el TCR restaurado con $\gamma\gamma\gamma$ que con $\delta\gamma\gamma$, mientras que MEM-57 (CD3 δ -específico) se comportó al contrario. Esto indica que el dominio extracelular de CD3 δ , a pesar de su homología con CD3 γ , no mimetiza completamente su función estructural y conformacional dentro del complejo TCR/CD3. Aunque la homología entre las proteínas, más que la estructura de los distintos dominios, podría explicar estos resultados, concluimos que CD3 γ regula la expresión del TCR en superficie, ejerciendo su acción quizá durante las fases de ensamblaje y/o transporte a la membrana celular.

CLUES TO THE STRUCTURE OF THE HUMAN $\alpha\beta$ AND $\gamma\delta$ TCR COMPLEX REVEALED BY HOMOZYGOUS AND HETEROZYGOUS CD3 DEFICIENCIES. Guardo AC¹, Perez-Flores V¹, Takada H², Allende LM³, Kiliç SS⁴, Sanal O⁵, Recio MJ¹, Regueiro JR¹. ¹Immunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid. ²School of Medical Sciences, Kyushu University, Fukuoka, Japan. ³Immunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. ⁴Pediatric Immunology, Uludağ Univ. Medical Faculty, Görükle-Bursa, Turkey. ⁵Immunology Division, Hacettepe Univ. Children's Hospital, Ankara, Turkey.

The $\alpha\beta$ T cell receptor (TCR) complex is composed of an antigen-binding $\alpha\beta$ dimer and a signal-transducing module containing two different CD3 heterodimers (CD3 $\gamma\epsilon$ and CD3 $\delta\epsilon$) and a single ζ homodimer ($\alpha\beta$ - $\epsilon\gamma\epsilon\delta\zeta\zeta$ stoichiometry). The murine $\gamma\delta$ TCR, in contrast, has been reported to lack the CD3 $\delta\epsilon$ dimer based on genetic as well as biochemical evidence ($\gamma\delta$ - $\epsilon\gamma\epsilon\delta\zeta\zeta$ stoichiometry). Indeed, mice lacking CD3 γ have no mature T lymphocytes, whereas mice lacking CD3 δ show normal numbers of $\gamma\delta$ T cells but impaired $\alpha\beta$ T cell development. We have now addressed this discrepancy in humans by comparing T cell development and, when T cells were present, both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR/CD3 expression in patients lacking the CD3 γ (γ ^{-/-}, n=5) or CD3 δ (δ ^{-/-}, n=8) subunits due to homozygous null mutations in CD3G or D, and in their healthy heterozygous relatives (γ ^{+/-} or δ ^{+/-}, n=8 and 2, respectively).

First, abundant numbers of $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ T cells with high levels of surface TCR can be detected in γ ^{-/-}, but not δ ^{-/-} humans. These results are not compatible with the murine $\gamma\delta$ - $\epsilon\gamma\epsilon\delta\zeta\zeta$ stoichiometry but, rather, with a $\gamma\delta$ - $\epsilon\gamma\epsilon\delta\zeta\zeta$ stoichiometry, as shown for the $\alpha\beta$ TCR in both species. Indeed, the human TCR δ chain (as shown for the homologous TCR β) can associate with either CD3 $\gamma\epsilon$ or CD3 $\delta\epsilon$.

Second, detailed cytometric analyses consistently showed decreased CD3 expression in both $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ CD3 γ ^{+/-} or CD3 δ ^{+/-} T lymphocytes, which we believe is caused by reduced availability of the affected CD3 chains. However, CD3 expression was significantly lower in γ ^{+/-} $\gamma\delta$ T cells (an average 55% as compared to normal controls) than in γ ^{+/-} $\alpha\beta$ T cells (85%), whereas δ ^{+/-} T cells showed similar reductions in both lineages (78 and 88%, respectively). This lineage-associated effect of CD3G null allele heterozygosity was unexpectedly reversed in γ ^{-/-} T lymphocytes, as $\gamma\delta$ T cells expressed relatively more CD3 (30% of controls) than $\alpha\beta$ T cells (20% of controls).

Collectively, the results indicate that, in contrast to mice, the human $\alpha\beta$ and $\gamma\delta$ TCR/CD3 ensembles share a similar stoichiometry. However, they must have differential structural interactions or constraints, as revealed by their discordant behaviour when confronted with limiting amounts of the homologous CD3 δ or CD3 γ chains.

CONTRIBUCIÓN DE CD3 γ A LA SEÑALIZACIÓN VÍA TCR/CD3. Reiné J¹, Regueiro JR¹, Martínez-Busto E¹, Rossi NE¹, Domínguez O², Recio MJ¹. ¹Immunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense, Madrid. ²CNIO. Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.

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, así como las baterías de genes inducidos en cada caso. La señalización vía TCR/CD3 en ausencia de CD3 γ 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.

En este trabajo nos propusimos como objetivo fundamental estudiar los eventos tempranos (fosforilación de los intermediarios de señalización) y tardíos (inducción de genes mediante microarrays de DNA) de señalización vía TCR/CD3 en ausencia de CD3 γ para acotar la contribución y conexiones de dicha cadena en linfocitos T humanos. Por otro lado, ya que la alteración de los intermediarios de señalización podría afectar la reorganización del citoesqueleto, analizamos la polimerización de la actina mediante tinción con Faloidina-TRITC. Estos estudios se han llevado a cabo en líneas de células T transformadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS) derivadas de los tres únicos casos de deficiencia de CD3 γ (γ ^{-/-}) descritos en el mundo. Nuestros resultados indican que linfocitos T de individuos deficientes (γ ^{-/-}) estimulados a distintos intervalos de tiempo con los anticuerpos anti-CD3 (UCHT1, OKT3, Leu4) presentan un retraso en la cinética de activación de ERK, lo que sugiere que CD3 γ debe ofrecer un soporte funcional en la ruta de señalización de las MAP Kinasas. Así mismo, los resultados de inducción de genes sugieren un perfil de expresión distinto en linfocitos γ ^{+/+} vs γ ^{-/-}. Por último, los resultados preliminares de inmunofluorescencia y citometría muestran que los linfocitos T no ven afectada la reorganización del citoesqueleto en ausencia de la cadena CD3 γ .

EL DOMINIO TM DE TCR β JUEGA UN PAPEL EN EL DESARROLLO DE LAS CÉLULAS T DE MEMORIA CD8 $^{+}$. *Teixeiro E^{1,2}, Daniels M², Schrum A², Bragado R¹, Palmer E².* ¹Fundación Jiménez Díaz-UTE (Madrid). ²Hospital Universitario de Basilea (Suiza).

Al comienzo de la respuesta primaria, la interacción TCR/péptido-MHC promueve en los linfocitos naïve el desarrollo de un programa de proliferación y diferenciación que finaliza con la supervivencia de un escaso número de linfocitos de memoria. Estas células son responsables de la inmunidad de larga duración y responden más rápida y eficientemente que las células T naïve. Es ampliamente aceptado que la efectividad de la respuesta de los linfocitos T CD8 $^{+}$ de memoria depende de la calidad de la estimulación original de su TCR. Sin embargo, los mecanismos involucrados no están suficientemente aclarados.

El dominio transmembrana de la cadena β del TCR (β TM) incluye algunos residuos que han permanecido conservados a lo largo de la evolución y que, en algunos casos, han sido implicados en la transferencia de señales al interior celular desde los dominios extracelulares del TCR. En el background Rag2 $^{-/-}$, hemos generado ratones transgénicos para el receptor OT-1 (específico de un péptido de OVA en el contexto de H2-Kb) que incluyen una mutación puntual (β TM mut) en uno de los residuos conservados antes mencionados.

Las células naïve CD8 $^{+}$ estos ratones mutantes muestran una supervivencia periférica normal y los parámetros de respuesta primaria a la estimulación antigénica *in vivo* son semejantes a los de las células de ratones transgénicos para el receptor salvaje. Sin embargo, el número de células de memoria generadas en los ratones mutantes es inferior al observado en los ratones salvajes y su funcionalidad en una respuesta secundaria está severamente comprometida. Así, hemos observado que, tras reestimulación antigénica, las células de memoria CD8 $^{+}$ de los ratones mutantes exhiben una pobre respuesta proliferativa, son deficientes en secreción de citoquinas y en capacidad citotóxica y muestran una diferenciación retardada.

Además de disponer de un sistema experimental para el estudio de los mecanismos involucrados en la generación de linfocitos T CD8 $^{+}$ de memoria, proponemos un papel para el dominio transmembrana de la cadena β del TCR en la transmisión de señales requeridas para el desarrollo y función de dichas células.

ESTUDIO DE LA DISTRIBUCIÓN DE CD38 EN SINAPSIS INMUNOLÓGICA. PAPEL FUNCIONAL EN LINFOCITOS T. *Muñoz P¹, Mittelbrunn M², Pérez M², de la Fuente H², Zubiaur M¹, Sánchez-Madrid F², Sancho J¹.* ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra» (CSIC) Granada. ²Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Madrid.

CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II altamente expresada en células T activadas. Aunque se conocen funciones como señalización intracelular, adhesión, proliferación, apoptosis, producción de citoquinas y fosforilación de proteínas, aún no está claro el papel que puede desarrollar CD38 en la formación de la sinapsis inmunológica (SI).

La SI es una superficie especializada de contacto que se forma entre la célula T y la célula presentadora (APC). En ésta área podemos distinguir 2 regiones. Una zona central que contiene el TCR, moléculas coestimuladoras y moléculas de señalización y una zona periférica que está enriquecida en moléculas de adhesión.

La señalización a través de CD38 en células T es funcionalmente dependiente del complejo TCR/CD3 y es iniciado en un tipo de rafts de membrana que contienen además Lck y la cadena ζ del TCR. Dado que

las moléculas Lck y CD3- ζ son reclutadas en la sinapsis inmunológica nuestro trabajo se centró en investigar la distribución de CD38 en la SI.

Para nuestros estudios usamos el modelo Jurkat-Raji en presencia o no del superantígeno SEE y observamos que el patrón de distribución de CD38 en sinapsis madura era diferente al de CD3- ζ . Mientras que CD3- ζ se redistribuye hacia la zona central de la SI formando un pequeño clúster, CD38 lo hace en toda la zona de contacto célula T: célula B.

Puesto que tanto las células Jurkat como las Raji expresan CD38 en superficie transfectamos una u otra célula con la construcción CD38-GFP para determinar de qué tipo celular provenía el CD38 que aparecía en la sinapsis inmunológica. Una cantidad de CD38-GFP se localiza en endosomas de reciclaje y en el aparato de Golgi y otra en la membrana celular, acumulándose en la zona de contacto T:B de una forma antígeno-dependiente. La célula T es la que más contribuye a que CD38 aparezca en la SI.

En el caso de células deficientes en Lck (JCAM 1.6), el reclutamiento de CD38 a la SI estaba muy disminuido, aunque no completamente.

También usamos el modelo CH7C17:HOM2 en presencia o no del péptido antigénico HA₃₀₇₋₃₁₉. Este modelo es muy útil ya que las células HOM2 son CD38 negativas y podemos estudiar el papel funcional del CD38 que proviene de la célula T (CH7C17) en la sinapsis inmunológica. Para ello bloqueamos CD38 mediante el anticuerpo IB6 y observamos que aunque los niveles de fosforilación de Erk no cambiaban, por el contrario, disminuían los niveles de fosforilación de LAT y PKC- θ . Esto sugiere un papel funcional de CD38 en señalizaciones tempranas. Por otro lado, bloqueando CD38 con IB6 se observa una disminución de la producción de IL-2 e IFN- γ (alteraciones en la respuesta Th1).

La localización de CD38 en la sinapsis inmunológica y la contribución de las células T y B a este fenómeno sugieren que CD38 puede jugar un papel importante durante la presentación antigénica.

ESTUDIO DEL PAPEL DE ENOS EN LA REGULACIÓN DE LA ACTIVACIÓN DE LOS LINFOCITOS T. *Ibiza S, Victor VM, Boscá I, Ortega A, O'Connor E, Urzainqui A, Sánchez-Madrid F, Esplugues JV, Serrador JM.* Laboratorio de Biología Vascular e Inflamación. Fundación Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC). Madrid.

En el transcurso de la respuesta inmune, el óxido nítrico (NO) desempeña un papel central en las acciones citotóxicas mediadas por macrófagos y células NK⁽¹⁾. Además, se ha descrito que, durante la presentación del antígeno por parte de los macrófagos a las células T, el NO desempeña una actividad inmunomoduladora regulando la expresión de citocinas y la proliferación celular⁽²⁾. Por otra parte, trabajos llevados a cabo con anterioridad han descrito que, las células T estimuladas por macrófagos o quimiocinas liberan NO⁽²⁻⁴⁾. Queda por dilucidar el mecanismo por el que este NO participa en la regulación de la respuesta inmune adaptativa. El papel desempeñado por el NO en las células T, así como la expresión y la localización subcelular de óxido nítrico sintetasas continúan siendo controvertidos. En este trabajo hemos demostrado que las células T producen NO en respuesta a la unión con el antígeno presentado por las células presentadoras de antígeno (APC). Este NO procedía de la óxido nítrico sintetasa endotelial (eNOS), requiriendo de la liberación de Ca²⁺ intracelular y la actividad de PI3K⁽⁵⁾. Mediante una construcción GFP de eNOS y sondas fluorescentes específicas para detectar NO, hemos encontrado que en conjugados antígeno-específicos entre linfocitos T y APC, eNOS co-translocaba con el aparato de Golgi y el centro organizador de microtúbulos (MTOC) hacia los contactos intercelulares, dando lugar a la producción de NO en las proximidades de la sinapsis inmune. Además,

encotramos que la actividad de eNOS en la sinapsis inmune dificulta la organización de CD3 en el área central de la zona de contacto con la APC e incrementaba la fosforilación de «*extracellular signal-regulated kinases*» (ERK) a través de un mecanismo GMPc independiente. Por tanto, nuestros datos demuestran que en la respuesta a antígenos presentados por APC, los linfocitos T producen NO procedente de eNOS y que este NO regula la señalización del TCR en la sinapsis inmune.

Bibliografía

1. Bogdan, C. (2001). *Nat. Immunol.* 2, 907-916.
2. Roland, C. R., et al (1994). *J. Immunol* 153, 5453-64.
3. Sciorati, C. (1997). *J. Biol. Chem.* 272, 23211-23215.
4. Diefenbach, A., et al. (1998). *Immunity* 8, 77-87.
5. Fulton, D., et al. (1999). *Nature* 399, 597-601.

LA PROTEÍNA MOTORA MIOSINA IIA ESTÁ IMPLICADA EN LA ENDOCITOSIS DE CXCR4 INDUCIDA POR LIGANDO. Rey M, Sánchez-Madrid F. *Serv. de Inmunología. Hosp. Univ. de la Princesa.*

La endocitosis de los receptores de quimioquinas regula la transducción de señales iniciada por las quimioquinas, pero los mecanismos moleculares que controlan este proceso no están totalmente definidos. En este trabajo hemos estudiado la implicación de la proteína motora MIIA (cadena pesada de la miosina no muscular tipo IIA) en la endocitosis de CXCR4 inducida por SDF-1 alpha en linfocitos T. La sobreexpresión del extremo C-terminal de MIIA inhibe la endocitosis de CXCR4 inducida por ligando, pero no la del receptor de transferina. Actuando sobre el MIIA endógeno, bien silenciando su expresión con siRNA o mediante el tratamiento con blebbistatina, también se inhibe la endocitosis de CXCR4. Asimismo, la inhibición de la endocitosis de CXCR4 actuando sobre el MIIA endógeno produce un aumento en la migración de los linfocitos T inducida por SDF-1 α , así como la inhibición de la capacidad antifusogénica de la envuelta del HIV por esta quimioquina. Estudios de coimmunoprecipitación y unión proteína-proteína demostraron asimismo que MIIA interacciona tanto con el extremo C-terminal de CXCR4 como con Beta-arrestina. SDF-1 alpha promueve además una rápida disociación de MIIA y beta-arrestina. Nuestros datos revelan un nuevo papel para MIIA en la endocitosis de CXCR4, que implica su asociación dinámica con Beta-arrestina, poniendo de manifiesto el papel de la MIIA endógena como reguladora de la internalización de CXCR4, y, por tanto, del declive de la señalización por SDF-1 alpha.

PAPEL DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA SYNTENIN-1 EN LA REGULACIÓN DE LA MIGRACIÓN Y LA ACTIVACIÓN DE LAS CÉLULAS T. Sala-Valdés M, Ibanez A, Rey M, Sánchez-Madrid F, Lozano F. *Servicio De Inmunología. Hospital Clínico de Barcelona. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario de la Princesa.*

Syntenin-1 es una proteína citosólica ubicua que posee dominios PDZ capaces de establecer interacciones moleculares entre proteínas de membrana, de citoesqueleto y señalizadoras. Aunque se ha implicado en diferentes procesos biológicos de células epiteliales y neuronales, se desconoce su posible papel funcional en linfocitos. Nuestros resultados indican que Syntenin-1 participa en la reorganización de la membrana y del citoesqueleto que tiene lugar durante la migración y la activación de las células T. Syntenin-1 se concentra en estructuras características de células T migrantes polarizadas como el frente de avance y el urópodo. La sobreexpresión de Syntenin-1 aumenta significativamente la capa-

dad migratoria de células T inducida por la quimioquina CXCL12/SDF-1 alpha, mientras que el silenciamiento de la expresión de Syntenin-1 reduce también de forma significativa. Por otro lado, Syntenin-1 colocaliza con CD3 and CXCR4 en la sinapsis inmunitaria y su sobreexpresión aumenta la expresión en membrana de CD69 y la producción de IL-2 subsiguiente a la formación de conjugados de células T-B dependientes de antígeno. De acuerdo con estos datos, Syntenin-1 se asocia al receptor CXCR4 de una forma inducible tanto por quimioquinas (CXCL12/SDF-1 alpha) como por superantígenos (SEE). Estos hallazgos revelan el nuevo papel regulador desempeñado por Syntenin-1 en aspectos relevantes de la fisiología de las células T como son la migración guiada por quimioquinas o la activación por el antígeno. Asimismo, ilustran la existencia de estrategias moleculares comunes de polarización celular en los sistemas epiteliales, neuronales y linfoides.

LOSS OF EXPRESSION OF LINEAGE ANTIGENS IN APOPTOTIC LYMPHOCYTES FROM MAMMALIAN SPECIES: A COMMON FEATURE IN THE THREE MOST STUDIED SPECIES. Chara L, Chevarria J, Diaz D, Monserrat J, Prieto A, Ubeda M, Muñoz L, Lario M, Nieto M, Sanchez M, Barcenilla H, Acuña L, Villarroya M, Alvarez-Mon M. *CNB-CSIC R&D Associated Unit, IMMMPA, Department of Medicine, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid.*

Background. Recently, it has been demonstrated that the loss of Lineage Antigens (LAG) expression is a common feature of apoptotic human lymphocytes, but this phenomenon had not been studied in murine lymphocytes.

Objectives. To determine if the loss of LAG expression is a common feature of rat and mice apoptotic lymphocytes, and to study the kinetic patterns of their LAG expression along the apoptotic process.

Methods. Highly purified spleen lymphocyte populations were obtained by positive fluorescence-activated cell sorting (FACSaria) from Wistar rats and C57BL/6 mice. The cells were cultured for 24 hours under four conditions: without exogenous apoptosis inducers and in the presence of phytohemagglutinin (PHA), staurosporin (ST) or polystyrene beads coated with CD3 and CD28 antibodies (T-cell expander). We used a four color flow cytometry analysis that uses surface antibodies, Annexin V-FITC binding and 7-Aminoactinomycin D to enumerate viable (V), necrotic, and early (EA), intermediate (IA) and late (LA) apoptotic cells. Differences were evaluated by the Wilcoxon test and were considered significant when $p < 0,05$.

Results. We observed loss of expression of all antigens studied in the apoptotic cells from both species rat and mouse. A progressive decrease of the Mean Fluorescence Intensity (MFI) in the different studied LAGs along the apoptosis process was observed in all lymphocyte populations in spontaneous and induced apoptosis. The kinetic of LAG loss was faster for the CD28 and CD19 antigens in the early apoptosis stages, and was progressive along the different apoptosis stages for the CD4, CD8 and CD3 antigens. In the case of CD5, the LAG expression was maintained in the early apoptosis stages and decreased in the intermediate and late apoptosis stages. The percentage of MFI LAG loss in late apoptotic cells with respect to viable lymphocytes was more than 90% for the CD28 LAG, between 50% and 90% for the CD5, CD8 and CD19 LAGs, and between 20% and 50% for the CD3 and CD4 LAGs.

Conclusions. Under all the conditions assayed, the loss of LAG expression is a common feature of rat and mice apoptotic lymphocytes. The loss of antigen by apoptotic lymphocytes it has been demonstrated in the three different species: human, mouse and rat. This suggests that

the loss of antigens by apoptotic lymphocytes is a common feature of mammalian species. The specific kinetic patterns of LAg loss observed for different surface proteins suggest that this process might be actively regulated by apoptotic cells.

ALTERACIONES FENOTÍPICAS DEL COMPARTIMENTO T DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE ASOCIADAS AL TRATAMIENTO CON FÁRMACOS MODIFICADORES DE LA ENFERMEDAD. Villarroel M¹, Sánchez MA¹, Sánchez-Atrio A², Zaldivar G¹, León MP, García JDD³, Pérez-Gómez A², Cuende E², Lopez A², Albarran F², Prieto A¹, Mallo AB¹, Reyes E¹, Álvarez-Mon M^{1,2}. ¹Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología. Unidad I+D Asociada CNB-CSIC. Dpto. Medicina. UAH. ²Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología. HUPA. ³Servicio de Medicina Interna. HUPA. Alcalá de Henares.

Introducción. La implicación del compartimento T en la inducción, mantenimiento y progresión de la Artritis Reumatoide AR ha sido previamente establecida. Las diferentes estrategias terapéuticas en pacientes con AR son: a) antiinflamatorios no esteroideos (AINEs), b) glucocorticoides (GC), c) fármacos modificadores de la enfermedad - FAME- sintéticos (FAME S), d) FAME biológicos (FAME B) o terapia combinada entre estos grupos. Así estas diferentes estrategias terapéuticas conllevan con diferentes implicaciones en la respuesta inmunológica, entre las cuales pueden estar implicadas las células T.

Objetivo. Comparar el compartimento T de sangre periférica en pacientes con AR, considerando el tratamiento empleado, respecto a pacientes con osteoartritis (OA) como control de enfermedad y controles sanos (CS).

Métodos. Pacientes diagnosticados con AR (N= 33), pacientes con OA (N= 24) y CS (N= 28). Los pacientes con AR fueron estratificados según el tratamiento en 5 grupos: pacientes sin tratamiento (n= 3); pacientes tratados con FAME S - AINEs- (n= 9); pacientes con terapia combinada con FAME S - GC- (n= 9); pacientes terapia con FAME B y GC (n= 2) y pacientes con FAME B-S (n= 10). Mediante citometría de flujo de 4 colores y uso de anticuerpos monoclonales (CD19, CD3, CD8) se estudio el número absoluto de células T en sangre periférica.

Resultados. Encontramos un incremento significativo en el número absoluto de linfocitos y LT en pacientes con AR tratados con FAME S-B respecto a: 1) pacientes sin tratamiento, pacientes con AR tratados con 2) FAME S-GC, 3) FAME S-AINEs, 4) pacientes con OA y 5) CS, a su vez en los 4 últimos grupos de pacientes, estas mismas poblaciones se hallan disminuidas respecto a los pacientes sin tratamiento, así como también de la subpoblación de LT CD8Hi (Tabla 1). La subpoblación de LT CD8Low se halla disminuida en los pacientes sin tratamiento y pacientes con AR tratados con FAME S-AINEs respecto a los tratados con FAME S-B, pacientes con OA y CS.

Tabla 1. Número absoluto de células por μ L

Tratamiento	Linfocitos	LT	LT CD8Hi	LT CD8Low
AR sin tratamiento	814	527	50	20
AR FAME S-AINEs	1172	1333	24	169
AR FAME S-GC	1497	1019	31	160
AR FAME B-GC	2177	1383	232	59
AR FAME B-S	2660	1884	263	160
OA	1681	1340	40	205
CS	2154	1297	259	52

Conclusión. Las terapias con FAME B-S están relacionadas con el incremento en el número absoluto en sangre periférica de linfocitos, Linfocitos T y dentro de esta última de la subpoblación CD8, este aumento podría estar relacionado con la redistribución poblacional hacia sitios de inflamación o muerte celular programada. Este efecto de regulación de la respuesta inflamatoria esta asociada a la intensidad del tratamiento.

DESARROLLO DE UNA PLATAFORMA PARA LA SELECCIÓN DE REPERTORIOS DE ANTICUERPOS EXPRESADOS EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS INMUNES. Alonso-Camino V, Sánchez-Martín D, Sanz L, Álvarez-Vallina L. Unidad de Inmunología Molecular, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid.

La tecnología de exposición de péptidos y proteínas en la superficie de fagos filamentosos se ha convertido en el sistema de referencia para la generación *in vitro* de anticuerpos (Ac) monoclonales. Se trata básicamente de construir y luego explotar grandes repertorios de genes de regiones variables (V) de inmunoglobulinas humanas, aprovechando la simplicidad y capacidad de manipulación del genoma. Sin embargo, la utilización como soporte de partículas virales (bacteriófagos) presenta limitaciones importantes para la selección de repertorios en determinados contextos. La utilización de células humanas como plataforma para la selección de Acs representaría un método más fisiológico para la selección *in vivo* de repertorios de Acs.

Para validar esta estrategia generamos un vector lentiviral que contiene el gen de un receptor inmune quimérico (RQ) y el gen de la proteína verde fluorescente (GFP). Los RQs son proteínas de fusión formadas por un dominio de reconocimiento unido a las porciones transmembrana e intracelular de una proteína con capacidad de transducir la señal.

La porción extracelular del RQ empleado en este trabajo comprende el fragmento variable de cadena única (scFv) del AcMo MFE23, que reconoce el antígeno carcinoembrionario (CEA) humano. La introducción de una etiqueta peptídica (*tag*) en el extremo amino terminal del scFv, inmediatamente después de la secuencia señal, permite detectar la expresión del RQ en la superficie celular. La capacidad de señalización intracelular la aporta, la cadena ζ ; del complejo TCR/CD3 de la célula T.

Con este virus se infectaron células T humanas y se obtuvo una población estable que se activaba de forma específica tras la interacción del RQ expresado en su superficie con CEA expresado en la membrana de la célula diana. Esta activación se tradujo en la expresión de CD25 y CD69 y en la secreción de IL-2. Tras comprobar que el RQ es funcional y que tras la interacción del mismo con su ligando se produce la activación celular se procedió a la purificación mediante citometría *sorting* de las células activadas específicamente a través del RQ de entre una población de competidores y a su posterior expansión *in vitro*.

Nuestros resultados demuestran que es posible activar y recuperar células T humanas tras la interacción a través de un RQ expresado en su membrana.

La sustitución del dominio de reconocimiento MFE23 por un repertorio de anticuerpos, daría lugar a una nueva plataforma de selección de base celular para la identificación de anticuerpos terapéuticamente útiles.