

# Inmunología

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

© Copyright 2004

ERGON CREACIÓN S.A.

Reservados todos los derechos.

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

ERGON CREACIÓN S.A.

Arboleda 1,

28220 Majadahonda (Madrid)

Publicación autorizada por el

Ministerio de Sanidad como

SopORTE Válido: Ref. Nº 288

ISSN: 0213-9626

Depósito legal: M-53681-2002



Arboleda 1,

28220 Majadahonda (Madrid)

Tel: 91 636 29 30

Fax: 91 636 29 31

e-mail: ergon@ergon.es

## TARIFAS DE SUSCRIPCIONES

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

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

## COMITÉ DIRECTOR

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

## COMITÉ EDITORIAL

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

## SECRETARÍA EDITORIAL

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

## SECRETARÍA DE REDACCIÓN

Maria Rosa Sarrias i Fornés

# Inmunología

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



## SUMARIO

Vol. 23, Supl. 1, Mayo 2004

### COMUNICACIONES ORALES Y POSTERS

#### C-0003. Transducción de señales en células T

71  
Moderadores: *Augusto Silva González*  
*José Ramón Regueiro González-Barrios*

#### C-0004. Estructura y función de las moléculas MHC-I y MHC-II

77  
Moderadores: *Antonio Arnáiz Villena*  
*Luis Larrad Mur*

#### C-0007. Células presentadoras de antígeno: macrófagos y células dendríticas

82  
Moderadores: *Eugenio Carrasco Marín*  
*Dolores Jaraquemada Pérez*

#### D-0003. Heterogeneidad de los linfocitos B

85  
Moderadores: *José Antonio Brieva Romero*  
*Ramón Merino Pérez*

#### D-0006. Células NK y células T citotóxicas

88  
Moderadores: *José Peña Martínez*  
*Manuel Santamaría Ossorio*

#### F-0009-F-0010. Respuesta inmunitaria contra patógenos

92  
Moderadores: *Carmen Álvarez Domínguez*  
*Manuel Fresno Escudero*

#### F-0011. Inmunodeficiencias

97  
Moderadores: *Nuria Matamoros Florí*  
*Margarita López Trascasa*

#### F-0012. HIV y SIDA

105  
Moderadores: *Emilio Cuadrado del Barrio*  
*Eduardo Fernández-Cruz Pérez*

#### F-0013. Hipersensibilidad inmediata, asma y respuesta alérgica

113  
Moderadores: *Ignacio Moneo Goiri*  
*Carlos Lahoz Navarro*

F-0015. Genética de la autoinmunidad . . . . . 116  
Moderadores: *Ana Suárez Díaz*  
*Javier Martín Ibáñez*

F-0016. Patogenia de la autoinmunidad . . . . . 123  
Moderadores: *Jesús Merino Pérez*  
*Ricardo Pujol Borrell*

F-00161. Diagnóstico serológico en autoinmunidad . . . . . 129  
Moderadores: *Marcos López Hoyos*  
*José Luis Rodríguez Sánchez*

F-0019. Inmunología del trasplante . . . . . 137  
Moderadores: *Jaume Martorell Pons*  
*Ana María García Alonso*

F-00201. Inmunidad antitumoral I: carcinomas de estirpe epitelial . . . . . 146  
Moderadores: *José Luis Subiza Garrido-Lestache*  
*Manuel Martín Villa*

F-00202. Inmunidad antitumoral II: melanoma y neoplasias hematopoyéticas . . . . . 152  
Moderadores: *Ernesto Roldán Santiago José*  
*Antonio Brieva Romero*

F-0022. Inmunoterapia antitumoral . . . . . 156  
Moderadores: *Augusto Silva González*  
*Ignacio Melero Bermejo*

F-0023. Estrategias inmunoterapéuticas, vacunas . . . . . 160  
Moderadores: *África González Fernández*  
*Eduardo Martínez Naves*

F-0024. Aspectos genéticos y funcionales en patologías diversas . . . . . 166  
Moderadores: *Cándido Juárez Rubio*  
*Juan Ignacio Arostegui Gorospe*

Índice de Autores . . . . . 171

# Información para los autores

*Immunología aceptará para su publicación trabajos redactados en español o en inglés, aunque se considerará preferible y prioritario el uso del idioma inglés, que aborden cualquier aspecto clínico, experimental o metodológico dentro de la Inmunología. Dichos trabajos habrán de ser inéditos, estar comprendidos en algunas de las secciones en que se estructura la revista y cumplir los requisitos de uniformidad para los manuscritos enviados a revistas biomédicas ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).*

**Editoriales:** Recogerá estados de opinión sobre aspectos relacionados con la Inmunología, preferentemente en conexión con algunos de los trabajos publicados en el mismo número de la revista. Si bien estos trabajos serán encargados por la Dirección de la revista, cualquier persona interesada en colaborar en esta sección deberá dirigirse previamente cualquier miembro del Comité Director.

**Originales:** Comprenderá trabajos inéditos de investigación clínica o experimental en Inmunología que puedan considerarse de *utilidad* e interés para nuestra comunidad científica.

**Revisiones:** Acogerá contribuciones en las que se realice una completa puesta al día de algún tema de interés dentro de la Inmunología. Se dará preferencia a aquellos trabajos que aborden de forma crítica las implicaciones fisiopatológicas del tema analizado y cuya bibliografía contenga citas lo más recientes y relevantes posibles. Esta sección también acogerá ensayos de carácter teórico, bien fundamentados, que propongan nuevas ideas o hipótesis de trabajo.

**Panorama:** Recogerá contribuciones de interés que no puedan ser incluidas en alguna de las secciones anteriormente citadas tales como reuniones o conferencias sobre temas relacionados con la Inmunología, temas de actualidad científico-social y sanitario, etc.

**Cartas al Director:** Recogerá breves comentarios o críticas con relación a trabajos publicados recientemente en nuestra o en otras revistas, así como temas de interés científico, educativo, sanitario y social.

## PRESENTACIÓN DE LOS TRABAJOS

1. Los trabajos deberán ser remitidos preferentemente por vía electrónica, bien directamente a la Secretaría Editorial ([lozano@medicina.ub.es](mailto:lozano@medicina.ub.es)), o bien a cualquier miembro del Comité Director (véanse direcciones adjuntas al final de este texto). Deberán estar mecanografiados a doble espacio, en hojas tamaño DIN A4, numeradas en el ángulo superior derecho, preferiblemente en formato Microsoft Word (texto) o Power Point (figuras). Asimismo, deberán ir acompañados de una carta de presentación en la que se solicite su examen para su posible publicación en alguna de las secciones de Inmunología y se especifique, en su caso, el nombre del miembro del Comité Editorial que promovió su envío. Aunque no existe una limitación de espacio predeterminada para ninguna de las secciones, es aconsejable que la exposición de todas las contribuciones se ajuste a un estilo sintético y breve (conciso). En cualquier caso, la extensión deberá estar en función exclusiva de la densidad de los datos y resultados presentados. A título orientativo, se considera deseable no superar las 5000 palabras (sin incluir resumen, bibliografía y pies de tablas y figuras) en los artículos originales y revisiones y las 2000 palabras en las demás secciones.
2. En la **primera página** figurarán exclusivamente y, por este orden, los siguientes datos: título del trabajo, nombre y apellidos de los autores, centro donde se realizó aquél y dirección completa (con Teléfono, Fax y E-mail) del autor encargado de la correspondencia.
3. En la **segunda página** figurarán, por este orden: título del trabajo, resumen del mismo y palabras clave en inglés (title, summary and key words). En la tercera página figurarán los mismos items pero en español; esta página no será obligatoria en el caso de manuscritos redactados en inglés procedentes de países no

hispanohablantes. El resumen incluirá la intencionalidad del trabajo, resultados obtenidos más destacados y principales conclusiones, expuestos de tal forma que pueda ser comprendido sin necesidad de recurrir a la lectura completa del artículo. Será obligatorio tanto en Revisiones como Originales y su extensión máxima no excederá de 250 palabras. Al pie del resumen se indicarán de 3 a 10 palabras clave extraídas del Medical Subject Headings (MeSH) de Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html>).

4. **Estructura del texto.** Variará según la sección a que se destine:
  - a) **Originales.** Normalmente constarán de los siguientes apartados:
    - 1) **Introducción:** deberá ser breve y contendrá la intencionalidad y los fundamentos del trabajo, redactado de tal forma que el lector pueda comprender el texto que le sigue;
    - 2) **Material y método:** se expondrá el material utilizado en el trabajo, humano o de experimentación, sus características, criterios de selección y técnicas empleadas, facilitando los datos necesarios, bibliográficos o directos, para que la experiencia relatada pueda ser repetida por el lector; se hará constar el cumplimiento de las normas de buena práctica clínica y de experimentación animal;
    - 3) **Resultados:** referirá los datos obtenidos en la realización del trabajo, sin más comentarios que los estrictamente necesarios para el encadenamiento lógico de su exposición;
    - 4) **Discusión:** los autores expondrán sus opiniones sobre la base de aquellos resultados, posible interpretación de los mismos, aplicación práctica, comparación con los resultados obtenidos por otros autores en publicaciones similares, sugerencias para futuros trabajos sobre el tema, etcétera. Los *Originales* también podrán adoptar la forma de **Comunicaciones Breves** en que los apartados arriba indicados (Introducción, Materiales y método, Resultados y Discusión) podrán presentarse de forma integrada, debiendo añadirse un apartado final de Conclusiones.
  - b) **Otros trabajos** (Editoriales, Revisiones, Panorama, Cartas al Editor): Se estructurarán a criterio del autor o según modelos convencionales en revistas científicas.
5. **Agradecimientos.** Incluirá la mención de becas y ayudas a la investigación que han permitido la realización del trabajo, así como agradecimientos a personas e instituciones que los autores estimen pertinentes.
6. **La bibliografía** será referida, en hojas aparte, según el orden de aparición en el texto. La numeración será correlativa y, dentro del texto, se indicará entre paréntesis. No es recomendable la utilización de referencias bibliográficas de actas de reuniones y de libros de texto. No incluirá citas de artículos sometidos a examen, las cuales deberán ser referidas en el texto, entre paréntesis, como observaciones no publicadas. Se utilizará el estilo reseñado a continuación basado en los «Requisitos de uniformidad» (estilo Vancouver).
  - **Artículos de revistas:** Apellidos e iniciales de todos los autores cuando son seis o menos y de los seis primeros seguido de la expresión et al cuando son siete o más, título del trabajo, nombre de la revista, año de publicación, volumen y páginas inicial y final. Los nombres de las revistas deben abreviarse según el estilo utilizado en el Index Medicus (List of Journals Indexed incluido en el número de Enero de Index Medicus y en la web de la biblioteca de la NLM <http://www.nlm.nih.gov>).  
*Ejemplos:*
    1. Delgado P, Fernandez E, Dave V, Kappes D, Alarcon B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and thymocyte positive selection. *Nature* 2000; 406: 426-430.
    2. Marrack P, Kappler J. The antigen specific MHC-restricted receptor on T cells. *Inmunología* 1986; 5: 3-12.

# Información para los autores

- **Capítulo de un libro:**
  3. Carrera AC, Martínez-A C. Lymphoid kinase detection and activation. En: Lefkovits I, editor. *Immunology Methods Manual*. San Diego: Academic Press; 1997. Vol.2, p. 1163–1181.
  4. Denis K, Kennett RH, Kinman N, Molinario C, Sherman L. Defining the B-cell repertoire with hybridomas derived from monoclonal fragment cultures. En: Kennett RH, McKearn TJ, Bechtol KB, editors. *Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analyses*. 2ª edición. New York: Plenum Press; 1981. p. 49–59.
- 7. **La iconografía** de los trabajos será de dos tipos: **tablas y figuras**. Ambas se enviarán en hojas aparte y numeradas correlativamente, con cifras romanas (tablas) o arábigas (figuras), según su orden de aparición en el texto. Las tablas irán encabezadas por un enunciado o título en la parte superior y con las notas aclaratorias al pie. Las figuras deberán ser de excelente calidad y en blanco y negro. Podrán ser gráficos o fotografías y deberá cuidarse su confección de forma que pueda comprenderse su significado sin necesidad de recurrir al texto. Las dimensiones serán tales que su anchura sea de 7 cm (una columna) o 15 cm (doble columna) y que su altura sea la menor posible. La publicación de ilustraciones en color será posible previo acuerdo económico con la editorial. Las figuras llevarán pegadas una etiqueta autoadhesiva en el reverso indicando la numeración, la parte superior con una flecha y nombre del autor. No debe escribirse directamente en el dorso de las figuras. Los pies de las figuras se mecanografiarán a doble espacio en hoja aparte y deberán incluir un título breve y una explicación concisa que permita su comprensión sin necesidad de recurrir al texto.

8. **Abreviaturas.** La primera vez que se utilicen en el texto deberán ir entre paréntesis y precedidas del término/s al/los que sustituya.

## REVISIÓN Y PUBLICACIÓN

La actuaciones y decisiones tomadas durante el proceso de revisión y publicación están de acuerdo con las recomendaciones sobre política editorial aprobadas por el Consejo de editores científicos ([www.CouncilScienceEditors.org/sevices\\_DraftApproved.shtml](http://www.CouncilScienceEditors.org/sevices_DraftApproved.shtml)). Cada trabajo será analizado por al menos dos revisores, generalmente del Comité Editorial. Sus comentarios, junto con la recomendación del miembro del Comité de Directores que recibió el artículo, serán enviados al Director Ejecutivo. Este podrá rechazar los trabajos no favorecidos por la evaluación, o bien indicar al autor aquellas modificaciones que se juzguen necesarias para su aceptación. Los criterios de aceptación serán el rigor, la novedad y/o la utilidad de la aportación. En caso de aceptación del trabajo, los autores recibirán para su corrección las pruebas de imprenta, que deberán ser devueltas dentro de las 72 horas siguientes a su recepción. El primer autor recibirá una copia en formato pdf de su trabajo una vez publicado (excepto las Cartas al Director).

El *Comité Director* y la *empresa editora de Inmunología*, así como la *Sociedad Española de Inmunología* no se responsabilizan de los conceptos, opiniones o afirmaciones sostenidas por los autores en sus trabajos. Todos los artículos serán propiedad de *Inmunología* no pudiendo reproducirse, ni siquiera en parte, sin previo consentimiento de la misma. Una vez publicado el trabajo, el autor cede en exclusiva a *Inmunología* los derechos de reproducción, distribución, comunicación de carácter público y traducción del trabajo.

**COMITÉ DIRECTOR.** Los trabajos deberán enviarse al editor más próximo al tema del trabajo.

### BALBINO ALARCÓN

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Universidad Autónoma, Cantoblanco  
28049 Madrid–ESPAÑA  
Tel +34 91 3978458; Fax +34 91 3974799  
balarcon@cbm.uam.es

### ARTURO FERREIRA

Departamento de Inmunología  
Instituto de Ciencias Médicas de la  
Universidad de Chile  
Santiago de Chile–CHILE  
Tel +56 2 678 6724; Fax +56 2 735 3346  
aferreir@machi.med.uchile.cl

### MANUEL FRESNO ESCUDERO

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
Universidad Autónoma, Cantoblanco  
28049 Madrid.  
Tel.: 34-913978413; Fax: 34-913974799  
E-mail: mfresno@cbm.uam.es

### MIGUEL LOPEZ-BOTET

Departament de Ciències Experimentals  
i de la Salut  
Dr Aiguader 82  
08003 Barcelona–ESPAÑA  
Tel +34 93 5422847; Fax +34 93 5422802  
miguel.lopez-botet@cexs.upf.es

### JOSÉ ANTONIO LÓPEZ DE CASTRO

Centro de Biología Molecular Severo Ochoa  
Universidad Autónoma, Cantoblanco  
28049 Madrid–ESPAÑA  
Tel +34 91 3978050; Fax +34 91 3978087  
aldecastro@cbm.uam.es

### FRANCISCO LOZANO, *Director Ejecutivo*

Servei d'Immunologia. Hospital Clínic  
Villarroel, 170  
08036 Barcelona–ESPAÑA  
Tel +34 93 4544920; Fax: +34 93 4518038  
lozano@medicina.ub.es

### IGNACIO MELERO

División de Terapia Génica  
Departamento de Medicina Interna  
Facultad de Medicina. Universidad de Navarra  
Irunlarrea, 1  
31008 Pamplona–ESPAÑA  
Tel +34 94 8425668; Fax +34 94 8425649  
imelero@unav.es

### ALBERTO NIETO CADENAZZI

Cátedra de Inmunología. Facultad de Química  
Avda. Alfredo Navarro 3051 2º  
Casilla de Correos 1157  
Montevideo–URUGUAY  
Tel +598 2 9241884; Fax +598 2 9246079  
anieto@bilbo.edu.uy

### RICARDO PUJOL-BORRELL

Unidad de Inmunología, Departamento de  
Biología Celular, Fisiología e Inmunología,  
Hospital Universitario Germans Trias i Pujol  
Ctra. Canyet, s/n  
08916 Badalona, Barcelona  
Tel: (+34) 93-4978892; Fax: (+34) 93-4978843  
Ricardo.Pujol@uab.es

### JOSÉ MARÍA ROJO

Centro de Investigaciones Biológicas  
Consejo Superior de Investigaciones Científicas  
Velázquez, 144  
28006 Madrid–ESPAÑA  
Tel +34 91 5611800 (Ext. 4217);  
Fax +34 91 5627518  
jmrojo@cib.csic.es

### FRANCISCO SÁNCHEZ

Servicio de Inmunología  
Hospital de La Princesa  
Diego de León, 62  
28006 Madrid–ESPAÑA  
Tel +34 91 5202370; Fax +34 91 5202374  
fsmadrid/princesa@hup.es

# Information for authors

---

*Immunología* is devoted to publish articles in Spanish or English, the latter being considered preferable and of higher priority, describing clinical, experimental or methodological data within any field of Immunology. The articles should be completely new and encompassed in any of the Journal' sections (Editorial, Originals, Reviews, Panorama and Letters to the Editor). Articles should fulfil the uniform requirements of manuscripts submitted to biomedical journals ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)).

**Editorials.** Should cover states of opinion on the field of Immunology, preferably related to the topics covered by the same issue of the Journal. Editorials are written only by invitation of the Committee of Directors. Interested authors should contact with any member of the Committee of Directors.

**Originals.** Should cover completely new works on clinical or experimental investigations encompassed in the field of Immunology and which are considered of benefit and interest to the scientific community.

**Reviews.** Should cover original contributions updating topics of broad scientific interest within the field of Immunology. Works critically reviewing the physiopathological implications of the topic subjected to analysis and containing the most recent and relevant citations are highly desired. This section will also cover well-reasoned theoretical essays, which propose new ideas and working hypothesis.

**Panorama.** Should cover contributions of interest which do not fit in other Journal' sections such as scientific meetings and conferences, scientific-social topics of current importance, etc.

**Letters to the Editor.** Should cover brief comments and criticisms on recently published articles, as well as on topics of current scientific, educational, health care and social interest.

## SUBMISSION AND ORGANISATION OF MANUSCRIPTS

1. Manuscripts should be submitted preferably by electronic mail, directly to the Editorial Office ([lozano@medicina.ub.es](mailto:lozano@medicina.ub.es)) or to any member of the Committee of Directors (see enclosed addresses below). Manuscripts should be typewritten, double-spaced, with wide margins on A4 paper, and numbered at the top right side. Microsoft Word (text) and Microsoft Power Point (figures) files are preferred. Each contribution must be accompanied by an introductory cover letter requesting consideration for publication in the appropriate the Journal' section, and specifying, if applicable, the name of the member of the Editorial Committee which promoted its submission. There are no length restrictions to any of the Journal' sections, but it is advisable to use a concise style. The length of the manuscript will be always a function of the density of the results presented. As a guidance, it is desirable not to exceed 5000 words for originals and reviews (excluding summary, references and figure and table legends), and 2000 words for the others sections.
2. The first page should include the title, author's names, institution(s) in which the study was done, and the complete address (including telephone, fax and e-mail) of the corresponding author.
3. All articles, except Letters to the Editor, must include a second page in English with the full title, a summary of less than 250 words and 3-10 MeSH keywords ([www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html](http://www.nlm.nih.gov/mesh/meshhome.html)). A third page including the same items in Spanish will not be mandatory for manuscripts written in English coming from non-Spanish speaking countries. The summary should state the rationale, objectives, and main findings and conclusions in a comprehensible manner.
4. The structure of the text will vary depending on the Journal' section:
  - a) **Originals.** They should be arranged in the following sections: 1) *Introduction*, should contain the background and reasons for doing the work in a synthetic manner; 2) *Materials and Methods*, should provide the reader with all the necessary information to reproduce the reported results, and, if applicable, it must specify the fulfilment of the good clinical and animal research practice procedures; 3) *Results*, should present the data in a concise manner, with no other comments than those strictly required for their complete understanding; 4) *Discussion*, should include the significance of the work, its limitations and advantages, reference to others' work, and further work that should be done.  
*Originals* presented in the form of **Brief Communications** will be also accepted. These reports should contain a summary and all the above mentioned sections should be unified. A final paragraph of Conclusions should be included.
  - b) **Other works** (Editorials, Reviews, Panorama, Letters to the Editor) should be arranged according to author' criteria or to standard conventions followed by scientific journals.
5. **Acknowledgements.** Should cite individuals, institutions, grants, etc. that, under author' criteria, have helped and/or contributed to the study.
6. **References**, published or in press (including those of tables and figures legends), should be numerically identified in the text within parentheses and grouped at the end of text in numerical order of appearance. Manuscripts submitted or in preparation, and unpublished observations, should be included in the text in parentheses. References should include the name of all authors when less than 6 (or only the first six, followed by et al., when more than 6), title, journal (abbreviated according to Index Medicus, <http://www.nlm.nih.gov>), year, volume, first and last pages. *Examples:*

# Information for authors

---

1. Delgado P, Fernandez E, Dave V, Kappes D, Alarcon B. CD3delta couples T-cell receptor signalling to ERK activation and T-lymphocyte positive selection. *Nature* 2000; 406: 426-430.
2. Marrack P, Kappler J. The antigen specific MHC-restricted receptor on T cells. *Inmunología* 1986; 5: 3-12.
3. Carrera AC, Martínez-A C. Lymphoid kinase detection and activation. In: Lefkowitz I, editor. *Immunology Methods Manual*. San Diego: Academic Press; 1997. Vol.2, p. 1163-1181.
4. Denis K, Kennett RH, Kinman N, Molinaro C, Sherman L. Defining the B-cell repertoire with hybridomas derived from monoclonal fragment cultures. In: Kennett RH, McKearn TJ, Bechtol KB, editors. *Monoclonal antibodies. Hybridomas: a new dimension in biological analyses*. 2<sup>a</sup> edition. New York: Plenum Press; 1981. p. 49-59.
7. **Illustrations. Tables and Figures** should be submitted one per page, separately at the end of the text. Tables with a descriptive title and footnotes should be identified with Arabic numerals in order of appearance in the text. Figures of excellent quality will be of 7 cm (one column) or 15 cm (full page) in width so that the height is minimised, and should be identified with Arabic numerals in the back. Figure legends should be numbered and grouped in a single separate page. Only black and white Figures will be accepted, unless otherwise agreed with the Editor.
8. **Abbreviations.** Should be defined at their first use in the text, within parenthesis.

## REVISION AND PUBLICATION

The review and publication process is in agreement with the editorial policy statements approved by council of science editors (CSE) ([www.CouncilScienceEditors.org/services\\_DraftApproved.shtml](http://www.CouncilScienceEditors.org/services_DraftApproved.shtml)). At least two referees, normally members of the Editorial Board, will review each manuscript. Their comments, together with the recommendation of the member of the Committee of Directors who received the article, will be sent to the Executive Director, who may reject unsuitable work or propose modifications before final acceptance. Acceptance of papers is based on rigour, originality and/or usefulness of the observation. Galley proofs of accepted manuscripts should be returned within 72 hours. The first author will receive a copy in pdf format of each accepted article.

The contents and opinions included in the articles are responsibility of authors, and do not represent the opinions of the magazine or the Society, unless otherwise specified. In submitting an article, the author vouches that it has not been published and is not being and will not be submitted to other journals if published, and accepts that, in the event, the copyright of the article will belong to *Inmunología*.

## C-0003. Transducción de señales en células T

**Moderadores:** Augusto Silva González (Madrid), José Ramón Regueiro González-Barrios (Madrid)

**C-0003-01-O. ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN GÉNICA DIFERENCIAL MEDIANTE CDNA MICROARRAYS EN TIMOCITOS EXTRAIDOS DE RATONES E2F1<sup>-/-</sup>, E2F2<sup>-/-</sup>, E2F12<sup>-/-</sup> FRENTE A E2F1,2<sup>+/+</sup>. I. García-Arana, I. Bernales, A. Zubiaga. Facultad de Ciencias. Campus de Leioa. UPV/EHU.**

Los factores de transcripción de la familia E2F están implicados en el control de los procesos de proliferación, diferenciación y apoptosis. Estudios previos en nuestro laboratorio han demostrado que E2F1 y E2F2 juegan un papel esencial en la regulación de la tolerancia inmunológica. Sin embargo, los mecanismos moleculares implicados en la regulación de la proliferación y de la apoptosis tímica mediada por los factores E2F son, todavía, desconocidos. Con el fin de definir dichos mecanismos, hemos analizado, en primer lugar, la respuesta de los timocitos E2F1<sup>-/-</sup> y E2F2<sup>-/-</sup> frente al tratamiento con anti-CD3; en segundo lugar, hemos llevado a cabo un análisis genómico global, analizando los perfiles de expresión génica de timocitos mutantes para E2F1 ó para E2F2 en condiciones de quiescencia o sometidos a tratamiento con anti-CD3. Hemos encontrado que los timocitos knockout para el gen E2F2 presentan una tasa proliferativa superior en 5 veces a la tasa de los timocitos silvestres. Por otro lado, la tasa proliferativa de los timocitos mutantes para el gen E2F1 es ligeramente inferior a la de los controles. Sin embargo, la tasa de apoptosis inducida por el tratamiento con anti-CD3 es inferior en las células E2F1<sup>-/-</sup> que en las silvestres. Estos resultados sugieren que E2F2 regula negativamente la proliferación de los timocitos, mientras que E2F1 está implicado en la inducción de apoptosis en respuesta a estímulos generados vía receptor T. Para poder identificar las dianas génicas transcripcionales de E2F1 y E2F2 en el timo, se ha realizado un análisis genómico funcional de los timocitos knockout para E2F1 y E2F2 mediante microarrays de DNA. Se ha identificado un grupo elevado de genes reguladores del ciclo celular y de la apoptosis cuyos niveles de expresión se encuentran alterados de una manera específica en los timocitos mutantes para E2F1 ó para E2F2. El análisis detallado de estos genes nos está permitiendo definir el papel de los factores E2F en el desarrollo y maduración linfocitaria.

**C-0003-02-O. EL ANÁLISIS DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LINFOCITOS T E2F1<sup>-/-</sup> Y E2F2<sup>-/-</sup> REVELA FUNCIONES ÚNICAS Y COMPARTIDAS DE ESTOS FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN LA REGULACIÓN DE LA PROLIFERACIÓN LINFOCITARIA. A. Infante<sup>1</sup>, U. Laregoiti<sup>1</sup>, J. Galán<sup>2</sup>, R. Diaz-Uriarte<sup>2</sup>, M. Malumbres<sup>2</sup>, A. Zubiaga<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, Universidad del País Vasco. <sup>2</sup>Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.**

Los factores de transcripción E2F (E2F1-E2F7) regulan la expresión de un gran número de genes que son esenciales para la proliferación, apoptosis y diferenciación celular. Sin embargo, se desco-

cen las funciones específicas de cada miembro de la familia E2F, o su grado de redundancia funcional. E2F2 juega un papel crítico en la tolerancia inmunológica, de tal forma que los linfocitos T *knockout* para E2F2 muestran una proliferación incrementada tras la estimulación a través del complejo TCR, así como una acumulación de células auto-reactivas de memoria, lo que conduce al desarrollo de un síndrome autoinmune en los ratones *knockout* para E2F2.

Para definir el mecanismo por el que E2F2 juega un papel negativo como regulador de la proliferación linfocitaria, es indispensable identificar las dianas específicas de E2F2 que son cruciales para esta proliferación. Con este fin, se analizó el patrón de expresión génica de linfocitos T E2F1<sup>-/-</sup>, E2F2<sup>-/-</sup> y E2F1/2<sup>-/-</sup> mediante microarrays de cDNA.

Nuestros resultados muestran que la pérdida de E2F2 en linfocitos T purificados de nódulos linfáticos, resulta en una expresión incrementada de un número significativo de genes relacionados con el ciclo celular. Por otra parte, la expresión de estos genes no se vio alterada en los linfocitos knockout para E2F1. Estos resultados implican que durante G0, E2F2, pero no E2F1, funciona principalmente impidiendo la entrada inapropiada de los linfocitos T en el ciclo celular, mediante la represión de la expresión de genes de control de ciclo. Además, demostramos por inmunoprecipitación de cromatina (ChIP), que E2F2 se mantiene unido en G0 a los promotores de muchos genes cuya expresión se encuentra alterada en los knockout para E2F2, consistente con el papel de este factor como represor de la transcripción

**C-0003-03-C. ACTIVIDAD DE STAT6 SOBRE EL ELEMENTO P1 DEL PROMOTOR DE IL-4 DURANTE LA DIFERENCIACIÓN TH1/TH2. B. Dorado, F.M. Martín-Saavedra, S. Ballester. Unidad de Regulación Génica, CNM, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid.**

Los linfocitos T cooperadores (Th) se clasifican en dos subtipos según el perfil de interleuquinas que producen: Th1, productor de IFN- $\gamma$ , IL-2 y linfotóxina; y Th2, productor de IL-4, IL-5, e IL-10 entre otras. El tipo de respuesta dada por el hospedador es determinante en la evolución de ciertos procesos infecciosos y disfunciones inmunes. La expresión de IL-4 está regulada a nivel transcripcional, siendo uno de los elementos fundamentales en la actividad de su promotor el sitio P1, el cual contiene la secuencia de reconocimiento del factor NFAT solapante con la secuencia del factor Stat6. Hemos descrito previamente que durante etapas tardías del proceso de activación por TCR en células Th2 diferenciadas, Stat6 ejerce un efecto negativo sobre la expresión del gen de IL-4 a través del elemento P1 de su promotor, lo cual podría constituir un mecanismo de autorregulación. Nuestro objetivo es determinar si dicho mecanismo tiene lugar durante la diferenciación de los linfocitos T hacia cada uno de los dos subtipos Th. Para ello, estamos analizando durante los procesos de diferenciación *in vitro* hacia Th1 (mediado por IL-12) o Th2 (mediado por IL-4) los siguientes procesos: a) la actividad transcripcional dirigida por el elemento P1 mediante transfección transitoria, b) la capacidad de unión, mediante EMSA, al sitio P1 de las

proteínas NFAT y Stat6 y c) los distintos estados de fosforilación de Stat6, mediante western blot. Los resultados obtenidos indican que, la actividad transcripcional de Stat6 a través del sitio P1, en células en proceso de diferenciación hacia Th2 es distinta a la descrita para células Th2 ya diferenciadas. Sin embargo, en células que están diferenciándose hacia Th1, este factor de transcripción mantiene un papel inhibidor sobre la actividad de P1. Hasta el momento no hemos encontrado que estas diferencias de actividad de Stat6 sobre P1 se deban a una distinta localización celular, capacidad de unión a DNA o fosforilación.

**C-0003-04-O. EL RECEPTOR DE LA CÉLULA T (TCR  $\alpha/\beta$ ) PROPORCIONA SEÑALES DIFERENTES PARA LA PROLIFERACIÓN Y APOPTOSIS. E. Teixeira<sup>1,3</sup>, B. Hausmann<sup>1</sup>, M. Thome<sup>2</sup>, R. Bragado<sup>3</sup>, Ed Palmer<sup>1</sup>.**  
<sup>1</sup>Laboratory of Transplantation Immunology. University Hospital. Basel. Switzerland. <sup>2</sup>Department of Biochemistry. University of Lausanne. Switzerland. <sup>3</sup>Departamento de Immunología. Fundación Jiménez Díaz. Madrid.

**Introducción.** La expresión del receptor clonotípico TCR  $\alpha/\beta$  es determinante para la diferenciación y maduración de células en el entorno tímico. El mismo receptor soporta dos tipos de selección (positiva y negativa), cuyo objetivo es configurar un repertorio de células T restringido por el MHC propio y que sea auto-tolerante. Asimismo, la diversidad de respuestas de la célula T madura y su eficiencia están íntimamente relacionadas con la señal recibida a través del mismo TCR. Cómo la misma estructura es capaz de discriminar y/o integrar las señales que recibe tras la unión de ligando para diferenciar destinos tan dispares como la proliferación y la apoptosis – supervivencia *vs* muerte- ó qué intermediarios ó cascadas bioquímicas son limitantes para la señalización diferencial soportada por el TCR, son aspectos no resueltos. En el doble contexto de complejidad estructural y funcional del TCR se suscitan, además, otros interrogantes no suficientemente aclarados. Así, ¿Existen en el receptor clonotípico dominios conservados responsables de modular la respuesta de la célula T?; Si existen, ¿cuales son?, ¿qué fenómenos modulan?, ¿cómo lo realizan?.

**Objetivos.** Evaluar el papel de la región transmembrana (TM) de TCR $\beta$  en selección tímica y en activación periférica.

**Métodos.** Se generaron ratones transgénicos H-2<sup>b</sup>-Rag<sup>-/-</sup> que expresaban un único receptor quimérico, en el que la región TM de TCR $\beta$  se substituyó por la homóloga de TCR $\gamma$  y se procedió a un estudio comparativo con ratones similares con TCR salvaje (WT)

**Resultados.** El análisis de subpoblaciones de las células que expresan el receptor aloespecífico sugiere que la selección tímica opera normamente en los ratones mutantes. De acuerdo con ello, escasos linfocitos TCR+ CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> se encontraron en la periferia de ratones derivados del cruce con animales que expresan el ligando de selección negativa (I-A<sup>bm12</sup>).

En periferia, mientras que el porcentaje de células de nódulos linfoides (NL) que expresan el receptor transgénico y CD4 es comparable, los ratones mutantes tienen 2 veces más de linfocitos CD4<sup>+</sup>8<sup>-</sup> que los WT. La comparación de las respuestas proliferativas muestra que las células T mutantes proliferan más vigorosamente que las WT aunque la cinética de inducción de CD69 es semejante. Sin embargo, aunque la velocidad de división celular es similar, durante la respuesta proliferativa se produce una mayor acumulación de células mutantes que de WT. Ello, de acuerdo con la menor fracción de dichas células mutantes que sufren apoptosis, probablemente como consecuencia de una menor inducción de Fas-L. Estudios adicionales, rela-

cionados con la activación de NF- $\kappa$ B inducida a través del TCR, sugieren que dicha activación está disminuida en las células mutantes como consecuencia de la incapacidad de su receptor para reclutar Carma-1.

**Conclusiones.** Las diferencias observadas indican que el TCR proporciona señales diferentes hacia la división *vs* muerte celular e implican a la región transmembrana en esta señalización diferencial.

**C-0003-05-O. IN MURINE T CELLS CD38 SURFACE EXPRESSION AND LIPID RAFT PARTITIONING REQUIRES TCR-MEDIATED SIGNALING AND CO-STIMULATION DRIVEN BY NON-T CELLS. P. Muñoz<sup>1</sup>, C. Sandoval<sup>2</sup>, M. C. Navarro<sup>1</sup>, E.J. Pavón<sup>1</sup>, L. Santos-Argumedo<sup>2</sup>, M. Zubiaur<sup>1</sup>, J. Sancho<sup>1</sup>.**  
<sup>1</sup>Departamento de Biología Celular e Inmunología. Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra». CSIC. Granada, Spain. <sup>2</sup>Departamento de Biomedicina Molecular. CINVESTAV-IPN. México D.F., México.

**Objective.** To determine whether mouse CD38 was located within lipid rafts in resting or activated T cells

**Methods.** Untouched T cells were isolated from splenocytes from Balb/c mice by negative selection of non-T cells with an anti-CD45R mAb bound to Petri dishes (panning), or with a cocktail of biotin-conjugated mAbs against CD11b, CD45R, DX5, and Ter-119 followed by incubation with anti-biotin magnetic beads (Miltenyi Biotec) and separation on MACS columns. Cells were analyzed by FACS before and after each experiment using mAbs specific for subset markers as CD3, Thy1, and CD45R, or specific for activation markers as CD38, and CD69. Splenocytes or purified T cells were activated with either an anti-CD3 mAb, or ConA in the presence or not of IL-2 for 24, or 48 hours. Lipid raft and nonraft fractions from these cells were isolated by ultracentrifugation. Proteins in lipid raft and non-raft fractions were analyzed by Western blotting, and probed for ZAP-70, Lck, Fyn, CD38, LAT, CD3-z, and CD3-e.

**Results.** Percentages of CD3+ T cells expressing CD38 were significantly increased upon stimulation of splenocytes with anti-CD3 mAb, or ConA in the presence of IL-2, whereas no such increase was observed when highly purified T cells were used. Likewise, TCR-, or mitogen-induced increased targeting of CD38 to lipid rafts was more efficient in the presence of non-T cells, which is indicative that both processes are dependent on co-stimulation driven by other cells and/or co-receptors.

**Conclusion.** In mouse T cells CD38 expression and CD38 recruitment into lipid rafts seems to be dependent on both TCR-mediated signaling, and on the presence of non-T cells that may provide co-stimulatory factors or co-receptors.

**C-0003-06-C. MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE ALOGÉNICA A TRAVÉS DE LA SEÑALIZACIÓN O BLOQUEO DE LA MOLÉCULA COESTIMULADORA PD-1. R. Domínguez Perles, G. Peñuelas Rivas, ML. del Río González, P. Ramírez Romero, P. Parrilla, J.I. Rodríguez Barbosa. Unidad de Investigación en Trasplantes, Cirugía Experimental, HU Arrixaca, El Palmar, Murcia.**

**Introducción.** Programmed Death I (PD-1), es una glicoproteína de 55 kDa, perteneciente a la superfamilia de las inmunoglobulinas (similar a CTLA-4 y BTLA), que se asocia con la activación de



los linfocitos T, B y las células mieloides. La cola citoplasmática de PD-1 contiene un residuo ITIM y un residuo ITSM. Los ratones deficientes en PD-1, al igual que los deficientes en CTLA-4 y BTLA, desarrollan procesos autoinmunes, lo que indica la importancia de este receptor en la regulación de la tolerancia periférica.

**Objetivo.** El estudio de la modulación de la respuesta proliferativa mediada por anti-CD3 mediante la señalización con anticuerpos monoclonales (AcMn) a través del receptor PD-1.

**Métodos.** Se clonó la molécula PD-1 murina en el vector pcDNA3.1/V5-His-TOPO. Los transfectantes estables, clonados por dilución límite con niveles elevados de expresión fueron identificados mediante inmunodot con el anticuerpo anti-V5 y se seleccionó el clon mPD-1-A6. Los hibridomas secretores de AcMn anti-PD-1 se testaron en citometría frente a la línea transfectada, timocitos y esplenocitos activados *in vitro*. Asimismo, se confirmó la banda de peso molecular esperada para PD-1 mediante inmunoblotting. Estos AcMn se testaron en ensayos *in vitro* de proliferación inducida por anti-CD3.

**Resultados.** El screening de la fusión nos permitió caracterizar dos hibridomas secretores de AcMn frente a PD-1 murino, el clon mPD-1-1H10 y el clon mPD-1-4F10. Ambos AcMn reconocían una banda de 55 kDa en inmunoblotting al enfrentarlos a un lisado NP40 de la línea transfectada, y esplenocitos o timocitos activados *in vitro* con anti-CD3. En citometría, los AcMn reconocían PD-1 en linfocitos T activados, pero no en linfocitos T naive. La señalización a través de PD-1 con el AcMn anti-mPD-1-1H10 potenciaba la proliferación mediada por anti-CD3, mientras que la señalización con el AcMn anti mPD-1-4F10 no produjo inhibición de la proliferación en esplenocitos, pero se observó una inhibición en la respuesta proliferativa de timocitos a concentraciones bajas de anti-CD3.

**Conclusiones:** La señalización a través de PD-1 no sólo transmite señales inhibitorias al linfocito T, sino que es capaz de potenciar la respuesta proliferativa inducida por anti-CD3, indicando que su cola intracitoplásmica podría transmitir tanto señales positivas como negativas.

**C-0003-07-O. REGULACION PROTEOLITICA DE STAT6 POR CALPAINA.** J. Zamorano, M.D. Rivas, F. Setien, M. Perez-Gonzalez. Unidad de Investigación, H. San Pedro de Alcantara. Cáceres.

El factor de transcripción STAT6 tiene un papel muy importante en la respuesta celular a la IL-4. Su activación está estrechamente regulada por las quinasas JAK mientras que su inhibición por fosfatasa específicas. Diversos estudios han demostrado que los miembros de la familia STAT pueden ser también regulados proteolíticamente, por lo que en este estudio investigamos la naturaleza de las proteasas implicadas en la regulación de STAT6. Así, encontramos que STAT6 puede ser procesado en extractos celulares por proteasas dependientes de calcio. Esta degradación es específicamente inhibida por inhibidores de calpaína. El hecho que STAT6 purificado también es proteolíticamente degradado por calpaína recombinante sugiere que esta proteasa puede tener un importante papel en la regulación de STAT6. Sin embargo, la regulación proteolítica de STAT6 resultó ser compleja *in vivo*. En este caso, la estimulación celular con ionóforos, que promueven la activación de calpaínas, no afecta los niveles celulares de STAT6. Sin embargo, los ionóforos de calcio inhiben la fosforilación de STAT6 inducida por la IL-4 y este efecto se correlaciona con la pérdida de proteína. Tanto la pérdida de fosforilación como de proteína fueron bloqueados por inhibidores de calpaína. Los datos obtenidos indican que una calpaí-

na citoplasmática puede ser responsable de la pérdida de STAT6. Las calpaínas son proteasas que participan en la regulación de proteínas intracelulares; en este estudio hemos encontrado que pueden regular negativamente la activación de STAT6 por la IL-4.

*Este trabajo está financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria. FIS 01/0157, FIS 99/3082 y la Junta de Extremadura 2PR01C015. M. Perez-Gonzalez es becario de la Fundación Fernando Valhondo Calaff.*

**C-0003-08-C. CARACTERIZACIÓN FUNCIONAL DE S4D-SRCRB.** S. Roselló<sup>1</sup>, M.R. Sarrías<sup>1</sup>, O. Padilla<sup>1</sup>, M. Carrascal<sup>3</sup>, J.M. Sierra<sup>2</sup>, J. Abián<sup>3</sup>, J. Vives<sup>1</sup>, J. Vila<sup>2</sup>, F. Lozano<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servei Immunologia, Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. <sup>2</sup>Servei Microbiologia, Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. <sup>3</sup>Unidad de Espectrometría de Masas Estructural y Biológica, IIBB-IDIBAPS-CSIC, Barcelona

La familia Scavenger Receptor Cysteine-Rich (SRCR-SF) está formada por proteínas de membrana y/o secretadas con dominios extracelulares ricos en cisteína tipo Scavenger. Recientemente nuestro grupo ha clonado un nuevo miembro denominado S4D-SRCRB, compuesto por 4 dominios SRCR del grupo B separados por dominios ricos en Pro, Ser y Thr. Hemos producido formas recombinantes (parciales y completas) de S4D-SRCRB, algunas de las cuales han sido fusionadas a un tag de hemaglutinina, utilizando el sistema de expresión episomal pCepPU en células eucariotas de mamífero HEK EBNA-293. El análisis de la expresión por SDS-PAGE y Western blot detectó una banda de aproximadamente 80 kDa en contra de los 56 kDa de peso molecular estimado, confirmando por espectrometría de masas que la proteína expresada es rS4D-SRCRB, por lo que es modificada postraduccionalmente. Por cromatografía de afinidad se ha purificado proteína rS4D-SRCRB, que ha sido utilizada para la inmunización de animales para la obtención de anticuerpos policlonales. S4D-SRCRB tiene una alta homología estructural con la proteína DMBT-1/gp340 (humana), la cual está involucrada en la polarización de epitelios y en la inmunidad innata de las superficies mucosas. DMBT-1 posee un motivo de unión a bacterias Gram + y Gram - (RXR) situado en la región N-terminal de los dominios SRCR que recuerda al identificado para otro miembro de la SRCR-SF denominado MARCO (QXR). Dado que S4D-SRCRB contiene el motivo RXR en los dominios SRCRB-1 y SRCRB-3 y el motivo QXR en el dominio SRCRB-2, hemos comprobado mediante ensayos de unión directa que rS4D-SRCRB se une a una batería de cepas bacterianas. Estos resultados preliminares (junto con la expresión de S4D-SRCRB en epitelios de los sistemas respiratorio, digestivo y genitourinario) permiten formular la hipótesis de que la proteína S4D-SRCRB participa en la defensa inmune innata del huésped.

**C-0003-09-O. ESTUDIO DE LA INTERACCIÓN DEL RECEPTOR LIMFOCITARIO CD6 CON SYNTENIN, UN MIEMBRO DE LA SUPERFAMILIA DE PROTEINAS CON DOMINIOS PDZ.** A. Ibañez, I. Gimferrer, M. Farnós, J. Vives, C. Serra, F. Lozano. Servei Immunologia, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona (UB).

CD6 es una glicoproteína de membrana tipo I perteneciente a la superfamilia de receptores SRCR (Scavenger Receptor Cystein

Rich). Se expresa en linfocitos T maduros, timocitos y una subpoblación de linfocitos B(B1a). La precisa función de CD6 en la activación y diferenciación linfocitaria todavía no se conoce, aunque hay evidencias que indican que CD6 actuaría como una molécula accesoria capaz de transmitir señales en células T maduras. La secuencia aminoácídica de su cola citoplasmática revela diversos sitios consenso de fosforilación, así como sitios de unión a moléculas con dominios SH2 y SH3. Hasta la fecha no se han descrito moléculas asociadas a la zona citoplasmática de CD6 que podrían estar implicadas en la transducción de señales intracelulares.

El objetivo de nuestro estudio fue la identificación de proteínas intracelulares con capacidad de unión a la cola citoplasmática de CD6 mediante la técnica del doble híbrido. En este trabajo se describe la interacción de la zona C-terminal de CD6 con la proteína adaptadora syntenin. Mediante estudios de mapeo se ha demostrado que los últimos cuatro aminoácidos C-terminales de CD6 así como la integridad de los dos dominios PDZ de syntenin, son necesarios para dicha interacción.

Estudios *in vivo* de cotransfección en células COS-7 y ensayos de capping han corroborado dicha interacción. Análisis de conjugados celulares demostraron que syntenin colocaliza con CD3 en la zona central de la sinapsis inmunológica.

Syntenin pertenece a la superfamilia de proteínas con dominios PDZ, participa en la interacción de receptores de membrana con el citoesqueleto y con otras proteínas señalizadoras. Así podría estar implicada en procesos de reorganización de proteínas tanto de la superficie celular como del citosol.

Nuestro trabajo describe la primera interacción de la cola citoplasmática de CD6 con una proteína intracelular aportando datos de gran relevancia para el conocimiento de la función de CD6 y de su vía de señalización.

**C-0003-10-O. IMPORTANCIA DE LAS INTERACCIONES MEDIADAS POR CD6 EN LA ACTIVACIÓN Y PROLIFERACIÓN DE CÉLULAS T. I. Gimferrer<sup>1</sup>, M. Calvo<sup>2</sup>, M. Mittelbrunn<sup>3</sup>, M. Farnós<sup>1</sup>, M.R. Sarrias<sup>1</sup>, C. Enrich<sup>4</sup>, J. Vives<sup>1</sup>, F. Sánchez-Madrid<sup>3</sup>, F. Lozano<sup>1</sup>.** <sup>1</sup> Servei Immunologia, Hospital Clínic-Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS), Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona (UB). <sup>2</sup> IDIBAPS, Serveis Científico-Tècnics, Facultat de Medicina, Universitat de Barcelona. <sup>3</sup> Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid. <sup>4</sup> Departament de Biologia Cel·lular, Facultat de Medicina, IDIBAPS, UB.

CD6 es un receptor de la superficie celular perteneciente a la superfamilia de los SRCR (Scavenger Receptor Cistein Rich) y expresado en timocitos, linfocitos T maduros y linfocitos B1a. La función última de CD6 no ha sido aún descrita, pero hay numerosas evidencias que apoyan una implicación de CD6 en la activación y diferenciación de las células T. En este trabajo, a través de experimentos de co-inmunoprecipitación, co-capping y FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) demostramos que una fracción de las moléculas de CD6 están físicamente asociadas con el complejo TCR/CD3 en la superficie de las células T.

El posterior análisis de imágenes de conjugados celulares demostró que tanto CD6 como su ligando ALCAM, (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) co-localizan con el complejo TCR/CD3

en el centro de la sinapsis inmunológica (IS). Estos resultados plantean la hipótesis de una posible implicación de CD6 en la modulación de las señales mediadas por el complejo TCR/CD3 y en la maduración de la IS.

Para confirmar esta hipótesis realizamos ensayos de proliferación de células T inducida por CD3 y ensayos de maduración de conjugados T-APC antígeno específicos ambos en presencia de la proteína quimérica soluble hCD6Fc. Dicha proteína, formada por la zona extracelular de CD6 unida a la zona Fc de las Ig, inhibió de forma dosis dependiente la proliferación de las células T y redujo de forma significativa el número de conjugados celulares maduros. Por tanto en conjunto nuestros datos demuestran que CD6, a través de sus interacciones moleculares tanto intra- como inter- celulares, tiene un importante papel durante la activación y proliferación de las células T.

**C-0003-11-O. RECLUTAMIENTO DEL RECEPTOR DE TRANSFERRINA A LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA COMO RESPUESTA A LA ACTIVACIÓN DEL RECEPTOR DE LAS CÉLULAS T. A. Batista, J. Millán, M. Mittelbrunn, F. Sánchez-Madrid, M.A. Alonso.** Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa». Universidad Autónoma de Madrid.

**Introducción.** Cuando un antígeno presentado por una célula presentadora (APC) activa al receptor de las células T (TCR), se induce la formación de una plataforma de receptores y de moléculas intracelulares de señalización. Esta acumulación de moléculas, denominada sinapsis inmunológica o complejo supramolecular de activación (SMAC), viene acompañada por una reorganización del citoesqueleto de actina y una redistribución de los lípidos y proteínas de superficie. Las balsas lipídicas o rafts juegan un papel importante en este proceso de activación del linfocito T, ya que muchas moléculas se incluyen en dichos microdominios tras la unión del TCR al antígeno.

**Objetivos.** Estudiar la dinámica del receptor de transferrina (TfR) presente en la superficie celular y en el compartimento endosomal del linfocito T y analizar su comportamiento tras la activación y durante la formación de la sinapsis inmunológica.

**Métodos.** La activación de los linfocitos T se llevó a cabo por adición de anticuerpos (Acs) anti-CD3 solubles o acoplados a bolas magnéticas, o por conjugación con APCs. Se llevaron a cabo experimentos con líneas celulares así como con linfocitos de sangre periférica (PBLs). Para detectar el TfR utilizamos las técnicas de citometría de flujo, inmunofluorescencia confocal y aislamiento de rafts por centrifugación de equilibrio y análisis de los mismos por Western Blot.

**Resultados.** Se determinó el reclutamiento del TfR a los rafts tras la activación tanto en líneas celulares como en PBLs. También se demostró la redistribución del TfR de superficie a la zona de contacto tanto en conjugados como en células activadas por bolas recubiertas de Acs anti-CD3. En los conjugados, el TfR de superficie se localizó en la región periférica del SMAC (p-SMAC), mientras que el pool endosomal se redistribuyó en una zona cercana y enfrentada a la sinapsis. En presencia de Acs específicos anti-TfR el número total de conjugados APCs-T y el porcentaje de conjugados con Lck y CD3 translocados a la zona de contacto se vieron reducidos. Todos estos datos sugieren que TfR tiene un papel en la formación de la sinapsis inmunológica.

**C-0003-12-C. A238L, UN PRODUCTO VIRAL QUE INHIBE NFAT Y NFkB, MODULA LA ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE COX-2 EN LINFOCITOS T.** A. G. Granja, M.L. Nogal, C. Hurtado, V. Vila, M.L. Salas, Á.L. Carrascosa, M. Fresno, Y. Revilla. *Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa». CSIC. Madrid.*

**Introducción.** Uno de los mecanismos del virus de la peste porcina africana (VPPA) para evadir la respuesta inmune es codificar un homólogo de Ikb (A238L), que bloquea la activación de NFAT y NFkB. El gen de ciclooxigenasa 2 (Cox-2) humana contiene un promotor complejo, con sitios de unión para varios factores transcripcionales, destacando una E-box, un sitio CRE, y sitios de unión funcionales para NFAT y NFkB.

**Objetivos.** Investigar el mecanismo molecular de la inhibición de A238L sobre los distintos elementos de regulación transcripcional del promotor de Cox-2.

**Métodos.** Se generó una línea celular Jurkat que expresa A238L en la que transfectamos diferentes construcciones del promotor humano de Cox-2 para analizar sus elementos de respuesta. Se realizaron RT-PCR y Western blot para evaluar los niveles de ARNm y proteína de Cox-2, y ensayos de cambio de movilidad electroforética (EMSA) para analizar los sitios de unión específicos del promotor de Cox-2. Se utilizaron plásmidos de expresión de Gal4-NFAT para estudiar la capacidad transactivacional de NFAT. Se obtuvo un mutante del virus por delección específica de A238L, para analizar su efecto durante la infección en células Vero.

**Resultados.** La actividad del promotor de Cox-2 es inhibida en células Jurkat que expresan A238L, siendo el sitio NFAT distal el principal implicado en la activación del promotor y el elemento modulado por A238L. Los niveles de ARNm y proteína Cox-2 son más bajos en células Jurkat que expresan A238L. Además, A238L inhibe la capacidad transactivadora de NFAT tanto en células Jurkat estimuladas como durante la infección en células Vero.

**Conclusiones.** A238L inhibe la expresión de Cox-2 a través del sitio de reconocimiento NFAT distal de su promotor, mediante la inhibición de la capacidad transactivacional de NFAT, representando un nuevo mecanismo de evasión viral de la respuesta inmune.

**C-003-13-O. REGULACIÓN DE LA CAPACIDAD TRANSCRIPCIONAL DE c-Rel/NF-κB.** C. Sánchez-Valdepeñas, M. Fresno. *Centro de Biología Molecular Severo Ochoa. UAM. Cantoblanco. Madrid.*

La familia de factores de transcripción NF-κB juegan un papel importante en la respuesta inmune. La regulación de los miembros transcripcionalmente activos de esta familia (c-Rel, p65 y Rel B) se realiza a dos niveles: 1) media la liberación de estos factores inicialmente unidos a unas proteínas inhibitoras (Ikb) 2) media la activación de la capacidad transactivadora de estas proteínas por fosforilación de su dominio de transactivación (TAD). Cada vez existen más evidencias de que ambos niveles de regulación son imprescindibles para la transcripción de genes dependientes de estos factores.

**Objetivo.** Estudiar la activación del TAD de c-Rel a partir de diferentes rutas de transducción de señales.

**Métodos.** Transfecciones transitorias de células Jurkat y Fibroblastos Embrionarios de ratón (MEFs) de cepas BL6 y ratones aly/aly (carecen de la actividad quinasa de NIK, NF-κB Inducing kinase), en las que se sobrexpresan los TADs de c-Rel y p65 en un sistema de Gal4

junto con diversas quinasas activas o dominantes negativos. Inmunoprecipitación y «pull down» para estudiar interacciones y ensayos de fosforilación *in vitro*.

**Resultados y conclusiones.** Hemos identificado 3 quinasas, proteína quinasa C zeta (PKCζ), Cot/Tpl2 quinasa y NIK como potenciadoras de la capacidad de transactivación de c-Rel y p65. Los resultados de cotransfección en células Jurkat sugieren que Cot, NIK y PKCζ podrían localizarse en la misma ruta de transducción de señales la cual finaliza en la fosforilación del TAD de c-Rel por NIK. Estos datos sugieren que la actividad de Cot se encuentra por encima de NIK y PKCζ. En el caso del TAD de p65, NIK estaría actuando en una ruta independiente a Cot y PKCζ, estando esta por debajo de Cot. Los resultados de transfección en MEFs confirman que Cot y NIK actúan en la misma ruta de activación de c-Rel y de forma independiente sobre p65. Hemos identificado la región 771-947 de NIK como responsable de la interacción con el TAD de c-Rel.

**C-0003-14-C. PAPEL DE H-RAS Y N-RAS EN EL DESARROLLO TÍMICO DE RATONES TRANSGÉNICOS PARA EL TCR.** M. Pulgar<sup>1</sup>, B. Alarcón<sup>1</sup>, E. Santos<sup>2</sup>, E. Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, Madrid. <sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer, Salamanca.

**Introducción.** H-Ras, N-Ras y K-Ras son miembros de una superfamilia de proteínas que unen nucleótidos de guanina y poseen actividad GTPasa. Las proteínas Ras presentan una alta homología, y están implicadas en diversas rutas de señalización intracelular. La inactivación funcional de las proteínas Ras por competición con una forma mutante con actividad dominante-negativa afecta la generación en el timo de células T maduras, lo que sugiere un papel de Ras en los procesos de desarrollo intratímico de las células T.

**Objetivos.** Determinar si H-Ras o N-Ras tienen funciones específicas y/o redundantes en el desarrollo y selección intratímica de las células T.

**Métodos.** Estudio del desarrollo tímico en ratones deficientes en H-Ras o N-Ras y transgénicos para un TCR determinado que permitirá el seguimiento de la selección positiva de timocitos CD4+ (TCR AND), timocitos CD8+ (TCR OT-I y hembras TCR HY), o la selección negativa de timocitos (machos TCR HY).

**Resultados.** La selección positiva o negativa de timocitos no es afectada por la deficiencia específica en H-Ras o N-Ras, lo que se correlaciona con la ausencia de alteraciones en eventos de señalización intracelular iniciadas por el TCR en timocitos carentes de H-Ras o N-Ras.

**Conclusiones.** Nuestros resultados demuestran que H-Ras o N-Ras no son requeridos de forma específica para el desarrollo y selección de timocitos, y sugieren una redundancia funcional de las proteínas Ras durante la ontogenia de las células T, o bien que estas dos isoformas no tienen ningún papel en desarrollo tímico.

**C-0003-15-O. LA INTERNALIZACIÓN Y DEGRADACIÓN CONSTITUTIVA DEL COMPLEJO PRE-TCR HUMANO: PAPEL DE LA PROTEÍNA ADAPTADORA CMS.** M.N. Navarro, G. Nusspaumer, M. L. Toribio. *Centro de Biología Molecular «Severo Ochoa», Madrid.*

La diferenciación intratímica de los linfocitos T es un proceso altamente regulado. Los puntos principales de regulación coinciden con la expresión de los complejos pre-TCR y TCR.

El complejo pre-TCR se expresa a niveles muy bajos en la superficie celular y de manera transitoria en el desarrollo. Además de carecer de ligando conocido, casi todos los datos generados hasta ahora apoyan una señalización constitutiva independiente de ligando, por lo que la regulación de la expresión en la superficie celular sería también responsable de la regulación de la señalización.

Datos previos de nuestro grupo han demostrado que el complejo pre-TCR, a diferencia de los complejos TCR $\alpha\beta$  convencionales, se degrada constitutivamente tras la internalización en ausencia de estímulo, y esta capacidad diferencial reside en el tallo intracitoplásmico de la cadena pT $\alpha$ .

Nuestro objetivo principal es la disección de los mecanismos implicados en el proceso de degradación constitutiva del complejo pre-TCR, y el papel de la cadena pT $\alpha$  en este proceso.

Mediante técnicas de Pull-Down, hemos identificado la interacción de la cadena pT $\alpha$  con la proteína adaptadora CMS (CD2AP), y la participación de un dominio rico en prolinas de la molécula pT $\alpha$ .

La obtención y transfección de dominantes negativos de CMS en células que expresan el pre-TCR nos han permitido analizar la función de esta proteína en el proceso de internalización y degradación del pre-TCR. Mediante análisis por citometría de flujo, microscopía confocal y Western-Blot, hemos visto que la alteración de la función de CMS interfiere con la ruta intracelular de transporte de los complejos internalizados y bloquea su degradación lisosomal.

Gracias a estos datos, podemos concluir que la degradación del complejo pre-TCR es un proceso dirigido y regulado directamente por la cadena pT $\alpha$  a través de su dominio intracelular.

**C-0003-16-O. DIFERENCIAS BIOQUÍMICAS EN EL COMPLEJO TCR $\alpha\beta$ -CD3 DE LA SUPERFICIE DE LOS LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> Y CD8<sup>+</sup> HUMANOS MADUROS.** N.E. Rossi<sup>1</sup>, D.A. Zapata<sup>1</sup>, W.W.A. Schamel<sup>2</sup>, P.S. Torres<sup>1</sup>, B. Alarcón<sup>2</sup>, M.N. Navarro<sup>2</sup>, M.L. Toribio<sup>2</sup>, J.R. Regueiro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>CBMSO, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Universidad Autónoma, Cantoblanco, Madrid.

Hemos demostrado que existen diferencias bioquímicas y conformacionales en el TCR $\alpha\beta$  entre los linfocitos T maduros CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> deficientes de CD3 $\gamma$  ( $\gamma^+$ ). Ahora hemos confirmado estos hallazgos en la membrana y extendido las observaciones a linfocitos T maduros normales ( $\gamma^+$ ). Las cadenas del TCR-CD3 de membrana de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> $\gamma^+$  (salvo CD3 $\gamma$ ) estaban presentes y tenían un tamaño similar a las de los controles CD4<sup>+</sup> $\gamma^+$  por inmunoprecipitación. Su complejo TCR-CD3 nativo también era similar al de los controles CD4<sup>+</sup> $\gamma^+$ , excepto por su estequiometría ( $\alpha\beta(\delta\epsilon)_2\zeta_2$  en lugar de  $\alpha\beta\gamma\delta\epsilon\zeta_2$ ). En contraste, en las células CD8<sup>+</sup>  $\gamma^-$ , las cadenas TCR $\alpha$ , TCR $\beta$  y CD3 $\delta$  no presentaban un tamaño normal, y el TCR $\alpha$  apenas se detectaba por inmunofluorescencia confocal. El gel nativo demostró que estas células expresaban un TCR-CD3 heterogéneo en la membrana. El barrido epítópico del TCR-CD3 en linfocitos T primarios normales con una amplia batería de mAb demostró que, a diferencia del resto, RW2-8C8 teñía mejor los linfocitos T CD8<sup>+</sup> que los CD4<sup>+</sup>, y esa diferencia era dependiente de glicosilación, pero independiente de la diferenciación y activación de la célula T. La tinción de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> con RW2-8C8 era más dependiente de la integridad de las balsas lipídicas que en los CD4<sup>+</sup>. Además, se observaron diferencias en la glicosilación del TCR entre ambos linajes por inmunoprecipitación. Los resultados apoyan

la existencia de diferencias específicas de linaje en la conformación o topología del TCR-CD3 entre las células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup> que pueden ser relevantes para las interacciones en cis durante el reconocimiento antigénico y la transducción de señales.

**C-0003-17-C. USE OF DRAQ5 REVEALS THAT T LYMPHOCYTES WITH HIGHEST PROLIFERATION ACTIVITY AFTER POLICLONAL ACTIVATION EXPRESS BOTH CD45 ISOFORMS WITH HIGH INTENSITY (CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup>).** D. Díaz<sup>1</sup>, A. Prieto<sup>1</sup>, H. Barcenilla<sup>1</sup>, M.A. Sánchez<sup>2</sup>, P. Prieto<sup>1</sup>, J. Montserrat<sup>1</sup>, A. Orfao<sup>2</sup>, A. de la Hera<sup>1</sup>, M. Álvarez Mon-Soto<sup>1,3</sup>. <sup>1</sup>Department of Medicine, CSIC R&D Associated Unit University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Flow Cytometry Unit, Cancer Research Centre and Department of Medicine, University of Salamanca, Salamanca, Spain. <sup>3</sup>Immune System Diseases and Oncology Service, University Hospital «Príncipe de Asturias», Alcalá de Henares, Madrid, Spain.

**Background.** The deep red fluorescing agent DRAQ5 is a synthetic anthraquinone with a high affinity for DNA and a high capacity to rapidly enter living cells. DRAQ5 fluorescence was found to reflect cellular DNA content used to evidence cell cycle distribution profile.

**Material and Methods.** The association between the modulation of the surface expression of CD45 isoforms on mitogen stimulated peripheral blood mononuclear cells and DRAQ5 cell cycle distribution was studied by flow cytometry. T lymphocytes were polyclonally stimulated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies coated microbeads and the cell cycle of phenotypic subsets was studied at 3, 6 and 11 days of culture. Proliferation index (PI) of the different subsets studied was calculated dividing the number of dividing cells (S and G2/M phases) between the number of no dividing cells (G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub> phases).

**Results.** CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells presented the higher PI of all the subsets studied in all the days assayed (14.00, 15.49 and 9.55 at 3, 6 and 11 days, respectively). CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>lo</sup> and CD45RA<sup>lo</sup>CD45RO<sup>hi</sup> cells presented similar PI all days of culture studied and both presented the maximum PI at 6 days of culture (3.28 and 2.86, respectively). CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>-</sup> and CD45RA<sup>-</sup>CD45RO<sup>+</sup> cells showed very low PI values in all days of culture studied (always below 0.20).

**Conclusions.** The association between the modulation of the surface expression of CD45 isoforms and cell cycle stage of mitogen stimulated T cells is evident. Hence, we can associate the proliferating stage of a T lymphocyte with its phenotype. CD45RA<sup>+</sup>CD45RO<sup>+</sup> phenotype is characteristic of the T cells with highest proliferative activity.

**C-0003-18-C. 3 PATRONES DE EXPRESIÓN DE QUIMIOQUINAS QUE DETERMINAN LA CAPACIDAD DE MIGRACIÓN DE LINFOCITOS T CD4<sup>+</sup> Y ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DE CD31.** R. Ruiz-Hernandez<sup>1</sup>, B. Clotet<sup>1</sup>, M. Bofill<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Fundació Irsicaixa, Laboratorio Retrovirologia, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona. <sup>2</sup>ICREA, Institut de Recerca.

**Introducción.** CD31(PECAM-1) es una glicoproteína de superficie y que actuaría como molécula de adhesión en la migración de leucocitos y ha sido usada para establecer una heterogeneidad dentro

de linfocitos Naive. Según la bibliografía, la pérdida *in vitro* de CD31 se relacionaría con la maduración de CD4+. Dentro de CD4+, la subpoblación CD45RA+ CD31+ se ha definido como más reciente emigrante tímica que su homóloga CD31- en base al estudio de sus TRECs (círculos de escisión del reordenamiento del receptor de linfocitos T).

**Objetivos.** Realizar un análisis de la expresión de diversos receptores de quimioquinas, así como de el receptor de IL-7, y del marcador CD31 en la población de linfocitos T CD4+ Naive y memoria, en PBMCs.

**Métodos.** Por citometría de flujo usando anticuerpos conjugados a fluoróforos se midió la expresión de los receptores de quimioquinas y el receptor de IL-7 dentro de la población linfocitaria CD4+ tanto en CD45RA+/- como en CD31+/-.

La determinación de TRECs se realizó por PCR cuantitativa Real-Time.

La separación de subpoblaciones CD4+CD45RA+ tanto CD31+ como CD31- se realizó por *sorter*.

**Conclusiones:** Los resultados demuestran la existencia de varios patrones de expresión de receptores. Un primer patrón vendría dado por receptores asociados a la migración a órganos linfoides, dado por CXCR4 y CCR7, expresado preferentemente en poblaciones Naive. De igual manera, el receptor de IL-7, que indicaría que todas estas subpoblaciones serían capaces de proliferar en respuesta a esta interleucina. Un segundo patrón vendría dado por receptores de quimioquinas CXCR3, CXCR5, CCR4, CCR5, CCR6, que se expresarían preferencialmente en linfocitos memoria, implicado en la migración de estas linfocitos a sitios de inflamación. Por último también se encontraría una expresión de receptores CCR3 y CCR9 en la población CD4+CD45RA-CD31+, implicando a esta una función de migración al intestino y puntos de inflamación alérgica en pulmón y piel.

## C-0004. Estructura y función de las moléculas MHC-I y MHC-II

*Moderadores:* Antonio Arnáiz Villena (Madrid), Luis Larrad Mur (Zaragoza)

**C-0004-01-C. SECUENCIA CODIFICANTE COMPLETA DE LOS ALELOS HLA-B\*0707, B\*1524, B\*4405, B\*4802, DRB1\*0409 Y DRB1\*0411.** R. de Pablo, S. Sepúlveda, R. Solís, E. Estefanía, N. Gómez-Lozano, C. Vilches. Servicio de Inmunología, H.U. Puerta de Hierro. Madrid.

**Introducción.** La identificación de nuevos alelos HLA suele llevar a la secuenciación de los exones que codifican para los dominios de unión al péptido. En pocas ocasiones se determina la secuencia codificante completa de estos genes, de modo que más de la mitad de la molécula sigue siendo desconocida. Se sabe que esta zona no secuenciada de modo rutinario presenta un cierto grado de polimorfismo y que algunos de estos polimorfismos causan inactivación del gen o dificultan la interacción de la molécula con el correceptor CD8. La falta de información sobre la secuencia completa lleva a ambigüedades en la tipificación y en la asignación de nombre a los nuevos alelos. En este trabajo presentamos la identificación en la población española y la determinación de la secuencia codificante completa de los siguientes alelos HLA: B\*0707, B\*1524, B\*4405, B\*4802, DRB1\*0409 y DRB1\*0411.

**Resultados.** Las secuencias de nucleótidos de la región codificante completa de los alelos HLA-B y DRB1 que presentamos aquí no presentan diferencias en cada caso con la secuencia del alelo con la máxima identidad en el exon 2 (y 3 en el caso de HLA-B), lo que apoya la hipótesis de que el alelo estudiado deriva de aquél por mutación puntual.

La comparación de los fenotipos de los donantes estudiados aquí con los de trabajos previos, sugieren que dichos donantes presentan las siguientes asociaciones:

- A\*01, B\*0707, Cw\*07, DRB1\*11, DQB1\*03
- A\*31, B\*4802, Cw\*04, DRB1\*0411, DQB1\*03
- B\*1524, Cw\*03, DRB1\*11.
- B\*4405, Cw\*02

En otro caso pudimos demostrar, mediante segregación familiar, la asociación inusual A\*03, B\*4405, Cw\*04, DRB1\*0403.

**C-0004-02-O. EL CAMBIO DE UN AMINOÁCIDO EN LA POSICIÓN 97 DETERMINA LA FALTA DE EXPRESIÓN DEL ALELO HLA-B\*2704.** M. A. Blanco-Gelaz<sup>1</sup>, J. Martínez-Borra<sup>1</sup>, B. Suárez-Alvarez<sup>1</sup>, S. González<sup>2</sup>, A. López-Vázquez<sup>1</sup>, C. López-Larrea<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup>Departamento de Biología Funcional y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

Otras características no relacionadas con el papel natural de HLA-B27 como molécula presentadora de antígenos, pueden ser importantes en la patogenia de la espondilitis anquilopoyética (EA). El objetivo de este trabajo fue determinar el impacto del cambio Asn97Asp en el plegamiento y la expresión de B\*2704 transfectado en la línea 721.221.

Examinamos por citometría de flujo la expresión superficial de B\*2704 y del B\*2704 Asn97Asp. La mutación en la posición 97 suprime la expresión tanto de las formas no conformacionales (HC-10) como de las conformacionales (ME-1). No se encontró expresión de la forma conformacional en B\*2704 Asn97Asp según se observó en los experimentos de inmunoprecipitación con el anticuerpo ME-1. Adicionalmente, se determinó el impacto de la mutación Asn97Asp en la maduración de B\*2704 en la célula 221. Las muestras fueron tratadas con endo-H y analizadas por Western-blot usando el anticuerpo HC-10 para determinar la salida del retículo endoplasmático (RE). Esto reveló que la forma «salvaje» de B\*2704 es exportada del RE al aparato de Golgi. En contraste, el mutante N97D no es exportado a Golgi lo que sugiere que es retenido y se acumula en forma de moléculas con plegamiento anormal. Para determinar si la mutación de Asn97Asp tenía un efecto en la interacción con los chaperones, analizamos la asociación del mutante con TAP, CNX y CLR. La forma HC-10 del mutante N97D sigue siendo capaz de interactuar con TAP aunque de forma débil, asociándose sin embargo a CRT y a CLX de forma similar al tipo salvaje.

Alternativamente a la teoría artritogénica, que propone que

la enfermedad es consecuencia de la función de HLA-B27 como molécula presentadora de antígenos, se ha sugerido que la EA puede ser consecuencia del plegamiento aberrante de las moléculas HLA-B27 y su acumulación en el RE. Esto puede dar lugar a una respuesta a proteínas con plegamiento anómalo o «Unfolded proteins response» (UPR).

El trabajo futuro debe apuntar a clarificar la conexión funcional entre la vía UPR en respuesta al plegamiento anormal de B27 y el estrés en el ER. Este mutante sería útil como modelo de misfolding de HLA-B27.

**C-0004-03-C. APROXIMACIÓN A LA TIPIFICACIÓN DE BAJA-MEDIA RESOLUCIÓN DEL LOCUS HLA-B MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL CON SONDAS DE HIBRIDACIÓN. R. Faner, N. Casamitjana, R. Colobran, A. Ribera, E. Palou, R. Pujol, M. Juan. LIRAD (Laboratori d'Immunobiologia Aplicada a la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques), SSR-CTBT, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, UAB. Ctra del Canyet s/n 08916. Badalona. Barcelona.**

Tras comprobar que la PCR en tiempo real con sondas de hibridación FRET es capaz de resolver mediante tres reacciones el polimorfismo de la familia alélica HLA B27, se ha propuesto como objetivo de este estudio extender dicha metodología hacia la tipificación de baja-media resolución del locus HLA B.

Se ha diseñado una aproximación basada en unas 12-20 ampliificaciones (simultáneas), cada una específica de varios grupos de alelos de HLA B. La discriminación de los grupos amplificados se consigue mediante la aplicación de una sonda FRET específica para cada reacción. El análisis de las temperaturas de fusión de la sonda aplicada en cada caso, permite discriminar los grupos de alelos amplificados en cada reacción. En la máxima situación de discriminación mediante una sola sonda se obtienen 6 perfiles diferentes. Al mismo tiempo en cada reacción se coamplifica la  $\beta$ -globina obteniendo de este modo un control de presencia de DNA en cada tubo.

El sistema se ha optimizado en muestras procedentes de la colección de DNAs de nuestro laboratorio de tipificación y en algunos casos a partir de muestras obtenidas de líneas celulares EVB transformadas. Se ha realizado un estudio sobre las indeterminaciones que genera el sistema en muestras heterocigotas y homocigotas, siendo su grado ambigüedad similar al generado mediante otras técnicas de tipificación. Mediante las citadas ampliificaciones que conforman la aproximación, se definen un total de 80-90 temperaturas de fusión teóricas posibles. De estas, un mínimo de 55 han sido definidas experimentalmente y las restantes no han sido comprobadas (debido a la no disponibilidad de muestra por la baja frecuencia de dichos alelos en la población). En estos momentos se está validando el sistema mediante el análisis de 200 muestras tipificadas previamente para el locus HLA -B por métodos de PCR-SSP o PCR-SSO.

Se puede concluir que dicha aproximación permite realizar una discriminación aceptable del pluriplialismo de los alelos de locus HLA B en un tiempo muy corto, con un número de reacciones necesarias reducido y sin el requerimiento de pasos post-PCR.

*Este proyecto ha sido financiado por la Marató de TV3, expediente 00/4830. Nuestro grupo forma parte del Centro de HUGTiP en la red española de «Estrategias para optimizar los resultados en donación y trasplante».*

**C-0004-04-O. ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES HAPLOTIPOS MHC EN PACIENTES DE DEFICIENCIA DE IgA: MAPEO FINO CON MICROSATÉLITES. L. Gual García<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>1</sup>, M. Fernández-Arquero<sup>1</sup>, M.C. García-Rodríguez<sup>2</sup>, A. Ferreira<sup>2</sup>, G. Fontán<sup>2</sup>, E. Urcelay<sup>1</sup>, E.G. de la Concha<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, H.C. San Carlos, Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, H. U. La Paz, Madrid.**

**Introducción.** Recientemente se ha descrito la existencia de al menos dos genes de susceptibilidad distintos en el MHC, presentes en diferentes haplotipos. Nuestros resultados apuntan que un gen de susceptibilidad estaría localizado en el MHC de clase II en los haplotipos DR1 y DR7 positivos, mientras que en los haplotipos DR3 positivos el gen estaría localizado en el MHC de clase III.

**Objetivos.** Localizar con precisión los genes de susceptibilidad presentes en los haplotipos DR1+ y DR7+, teniendo en cuenta la diversidad estructural que poseen estos haplotipos.

**Métodos.** Se han estudiado 400 haplotipos procedentes de 100 familias de pacientes de D IgA. En estos haplotipos se ha llevado a cabo un análisis detallado usando 20 marcadores distribuidos a lo largo del MHC, poniendo especial interés en seleccionar marcadores localizados en la región del MHC de clase II (para así poder acotar la región mínima que comparten, por una parte todos los haplotipos de susceptibilidad DR1+, y por otra parte, todos los haplotipos DR7+). Además, se disponen de los datos procedentes del análisis de estos mismos marcadores en otras poblaciones procedentes del Norte de Europa, lo que permite hacer una comparación de la estructura de ambos haplotipos en estas dos zonas geográficas.

**Resultados.** La comparación de la estructura de los haplotipos DR1+ en la población española con la de los haplotipos DR1+ presentes en las poblaciones Norte-Europeas (Británica y Sueca) no muestra diferencias en los haplotipos DRB1\*0101+ y DRB1\*0102+ entre las dos poblaciones, pero, a diferencia de lo que pasa en el Norte de Europa, en España el haplotipo DRB1\*0101+ no da susceptibilidad a la D IgA. Por otra parte, los distintos haplotipos DR7+ comparten sólo la región comprendida entre los microsatélites de clase II DQCARI y D6S2665.

**Conclusiones.** Nuestros datos sugieren que la mutación etiológica presente en la zona DQB1/ DRB1 en los haplotipos DRB1\*0101+ y DRB1\*0102+ en el Norte de Europa se ha perdido en los haplotipos DRB1\*0101+ de España, pero se mantiene en los haplotipos DRB1\*0102+. Por otro lado, la localización más probable para el gen de susceptibilidad en los haplotipos DR7+ es DQA1 o DRB1 (los dos únicos genes presentes en la región acotada).

**C-0004-05-O. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DE LOS GENES HLA-DP. J. Jiménez<sup>1</sup>, Q. Seguí<sup>1</sup>, M. Krawczyk<sup>2</sup>, A. González-Novo<sup>1</sup>, A. Jiménez<sup>1</sup>, W. Reith<sup>2</sup>, M. Sánchez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto Microbiología y Genética Instituto de Microbiología Bioquímica. Universidad de Salamanca/CSIC. <sup>2</sup>Department of Pathology and Immunology. University of Geneva Medical School.**

Los genes MHC de clase II se encuentran sometidos a una estricta regulación, que se produce mayoritariamente a nivel transcripcional, y de forma coordinada entre los distintos tipos y genes relacionados (DO y Ii). Durante los últimos años una intensa inves-

tigación en el campo ha permitido identificar los factores transcripcionales requeridos para la expresión de estos genes (CIITA, RFX, CREB y NFY), así como las secuencias con las que éstos interaccionan en las regiones promotoras de los mismos (cajas Y, X, X2, S).

Además de la regulación coordinada de los diferentes isotipos de clase II, existen numerosas líneas celulares que muestran expresión específica e independiente de estos genes. Un ejemplo de esta regulación «descoordinada» es la colección de líneas mutantes LCLs generadas en nuestro laboratorio, que expresan HLA-DR y -DQ, pero no -DP. Las líneas celulares 45.EM2 y 45.EM18 carecen de HLA-DP en su superficie debido a la ausencia de expresión del gen HLA-DPB1 y HLA-DPA1 respectivamente.

Confirmamos el defecto transcripcional de estas líneas celulares mediante el análisis de los transcritos nacientes del gen afectado en cada línea, así como por ensayos de actividad luciferasa utilizando una batería de plásmidos con distintas regiones de las secuencias promotoras de los genes HLA-DPA y DPB. Por otra parte, analizamos los factores transcripcionales descritos como imprescindibles para la expresión de los genes de clase II, encontrando niveles de transcritos y proteína normales, así como ausencia de mutaciones en la secuencia de dichos factores en comparación con la línea parental 45.1.

**C-0004-06-O. EXPRESIÓN DE HLA-G POR LAS CÉLULAS DECIDUALES ESTROMALES HUMANAS.** O. Blanco, M. Kimatrai, R. Muñoz Fernández, I. Tirado, J. Peña, J.M. García Pacheco, E. García Olivares. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de GRANADA. Laboratorio de Inmunología, Hospital do Meixoeiro, Vigo. Servicio de Inmunología, H.U. Reina Sofía. Córdoba.

**Introducción.** La decidua es el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Durante el embarazo normal se desarrollan a nivel de la decidua, mecanismos de tolerancia inmunológica de la madre hacia el feto; mientras que en el aborto espontáneo, se activan mecanismos de reacción inmunológica que lesionan el trofoblasto. Las células deciduales estromales (DSC, decidual stromal cells) son las más abundantes de la decidua, y aunque son de tipo estromal, presentan funciones inmunitarias que podrían estar implicadas en la interrelación materno-fetal.

**Objetivos.** En el presente trabajo se ha estudiado la expresión de HLA-G (antígenos expresados por el trofoblasto que podrían inhibir la actividad citotóxica de las células NK deciduales frente al trofoblasto) por las DSC.

**Métodos.** La expresión de HLA-G por las DSC se ha estudiado en células DSC purificadas y mantenidas en cultivo, mediante RT-PCR, anticuerpos monoclonales, citometría de flujo y Western Blot

**Resultados.** En las DSC se detectó HLA-G, mRNA y proteínas. La expresión de esta molécula se incrementó mediante IL-10, mientras que el IFN $\gamma$  la inhibió.

**Conclusiones.** La expresión de HLA-G por las DSC podría ser de importancia en la tolerancia materno-fetal, actuando de ligando de los receptores de las células NK e inhibiendo la actividad citotóxica de estas células frente al trofoblasto. La IL-10, que se ha visto esta asociada al embarazo normal, incrementando la expresión de HLA-G, favorecería la actividad bloqueante de las DSC, mientras que el IFN $\gamma$ , que se asocia al aborto, inhibiendo la expresión de HLA-G en las DSC, liberaría a las NK, que podrían atacar, entonces, al trofoblasto.

**C-0004-07-O. TRANSFECCIÓN DEL GEN HLA-A2 EN UNA LÍNEA DE MELANOMA CON PÉRDIDA DE HAPLOTIPO.** L. Paco<sup>1</sup>, M. Martínez-Llamas<sup>1</sup>, E. Jiménez-Medina<sup>1</sup>, J. Palacios, A. García-Lora<sup>1</sup>, M.A. López-Nevo<sup>1</sup>, P. Coulié<sup>2</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio Análisis Clínicos, Hospital Univ. Virgen de las Nieves, Granada, Spain. <sup>2</sup>Unite Genetique, Louvain University, Brussels.

En tumores sólidos y en líneas celulares tumorales se han detectado diferentes fenotipos alterados HLA. La reexpresión de genes HLA en estas células tumorales puede dar lugar al rescate de antígenos tumorales inmunodominantes que pueden ser presentados de nuevo a los linfocitos T. El objetivo de este estudio es la reexpresión del gen HLA-A2, mediante transfección génica, en la línea de melanoma ANDO 2, que presenta una pérdida total de haplotipo incluyendo al gen HLA-A2.

Se emplearon dos construcciones diferentes: pcDNA3.1-A2, con el promotor CMV viral; y pEF-6-A2, con el promotor humano EF-1. La línea fue transfectada de manera estable mediante liposomas.

Tras la selección con el antibiótico correspondiente se midió la expresión del gen A2 por citometría de flujo. Se obtuvo una elevada expresión en superficie del HLA-A2 para la transfectante bajo el control del promotor del CMV. Ensayos posteriores mostraron que la expresión en superficie de la molécula HLA-A2 se perdía de forma progresiva en el tiempo, hasta llegar a la pérdida total. Tras RT-PCR y posterior secuenciación comprobamos que el gen A2 se transcribía, y que dicho transcrito no presentaba ninguna mutación que pudiese explicar la pérdida de expresión. Además, se perdió también la expresión en superficie de las demás moléculas HLA de clase I endógenas. El estudio de la transcripción, mediante RT-PCR, de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico mostró la existencia de una baja expresión de LMP2 y LMP7, que explicarían la falta de expresión en superficie de moléculas HLA de clase I.

Este trabajo muestra las dificultades que presenta la reexpresión de moléculas HLA mediante Transfección génica, ya que nuevas alteraciones en los mecanismos de expresión de moléculas HLA pueden interferir en el proceso. De todos modos, estos transfectantes pueden ser de utilidad para descifrar la regulación de la expresión de moléculas HLA y su relación con el proceso de diferenciación de las células.

**C-0004-08-C. DIFERENTES VÍAS ALTERNATIVAS PARA LA FORMACIÓN DE LOS ALELOS HLA-B\*570101 Y HLA-B\*5801 (GRUPO B-17) BASADOS EN SECUENCIAS INTRÓNICAS.** J. Moscoso<sup>1</sup>, J. Martínez-Laso<sup>1</sup>, J. Zamora<sup>1</sup>, E. Lowy<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, M. Pérez Blas<sup>1</sup>, G. Vargas Alarcón<sup>2</sup>, J.I. Serrano Vela<sup>1</sup>, E. Gómez Casado<sup>1</sup>, A. Arnaiz Villena<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto. de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Hospital 12 Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Dpto. de Fisiología, Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez, Tlalpan. Dpto. de Biología Molecular, Escuela de Medicina, Universidad Panamericana, Mexico DF.

**Introducción.** El locus HLA-B es el más polimórfico de los genes de clase I del complejo principal de histocompatibilidad. Esto puede ser debido a la existencia tanto de una frecuencia de recombinación particularmente alta como a mutaciones puntuales en los exones 2 y 3.

**Objetivos.** Comprobar en un grupo específico de alelos HLA los posibles modos de generación de nuevos alelos.

**Métodos.** Hemos secuenciado automáticamente (directa e indirectamente) 14 alelos del locus HLA-B (exones 1, 2 y 3 e intrones 1 y

2) y hemos utilizado 13 alelos del mismo locus previamente descritos para realizar el estudio comparativo.

**Resultados.** Se han estudiado las posibles vías de evolución de los alelos HLA-B\*570101 y HLA-B\*5801 (que pertenecen al grupo serológico HLA-B17). La hipótesis aceptada es que los alelos se han originado por eventos de conversión génica, ya que se han analizado también las secuencias intrónicas.

**Conclusiones.** La evolución por mutación puntual de cualquier alelo HLA solamente debe ser aceptada sólo si los intrones flanqueantes son secuenciados.

**C-0004-09-C. FRECUENCIAS DE ALELOS HLA EN AMERINDIOS AYMARA DE LA ZONA DEL LAGO TITICACA (BOLIVIA).** J.I. Serrano Vela<sup>1</sup>, J. Martínez Laso<sup>1</sup>, N. Siles<sup>2</sup>, J. Moscoso<sup>1</sup>, J. Zamora<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, M. Pérez-Blas<sup>1</sup>, M.J. Castro<sup>1</sup>, A. Arnaiz Villena<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Hospital 12 Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Hospital Militar, División de Laboratorio, La Paz, Bolivia.

**Introducción.** La población Aymara, vinculada a la cultura de Tiahuanaco, es probablemente una de las más antiguas asentadas en las orillas del lago Titicaca (Bolivia/ Perú). La lengua Aymara en parte ha dado lugar a la lengua Quechua, pero los Aymaras aparentemente nunca se movieron de su asentamiento inicial.

**Objetivos.** Estudio poblacional con fines epidemiológicos (asociación HLA-enfermedad), elaboración de listas de espera para trasplante (ya sea en España, por la gran inmigración existente hoy, o en la región autóctona) y estudio antropológico sobre el origen de emparentamiento de la población. Los alelos HLA Amerindios son muy diferentes a los encontrados en el resto de poblaciones mundiales.

**Métodos.** Hemos estudiado las secuencias de ADN de los alelos HLA-A, -B, -DRB1 y -DQB1, mediante el método de secuenciación indirecta, en 85 individuos Aymara no relacionados cuyas dos generaciones anteriores vivían en la zona del lago Titicaca - La Paz. Se compararon con 7005 individuos del resto del mundo con las metodologías estándar.

**Resultados.** El alelo HLA-DRB1\*0901 (de origen asiático y atabasco) es relativamente frecuente en Aymaras. Además, esta población comparte haplotipos con la población Quechua y con poblaciones asiáticas; sin embargo, analizando los genes HLA mediante dendrogramas Neighbour-Joining y análisis de correspondencia se han observado diferencias entre Aymaras y Quechuas.

**Conclusiones.** Parece que tuvo lugar una mezcla entre poblaciones procedentes de Asia y las antiguas poblaciones indígenas Amerindias de los Andes, mientras que dicha mezcla asiática no debió ocurrir con poblaciones Mesoamericanas.

**C-0004-10-O. EL ORIGEN DE LOS QUECHUAS BOLIVIANOS: EMPARENTAMIENTO CON OTRAS POBLACIONES AMERINDIAS Y ASIÁTICAS.** J. Zamora<sup>1</sup>, J. Martínez Laso<sup>1</sup>, N. Siles<sup>2</sup>, J. Moscoso<sup>1</sup>, J.I. Serrano Vela<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, M. Pérez Blas<sup>1</sup>, M.J. Castro<sup>1</sup>, A. Arnaiz Villena<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto. de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Hosp. 12 Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Hospital Militar, División de Laboratorio, La Paz, Bolivia.

**Introducción.** Los Incas constituyeron un pueblo que hablaba Quechua y que se asentó en principio cerca de Cuzco (Perú), proce-

des de la región del lago Titicaca. Su imperio se extendía desde Ecuador hasta Chile cuando los conquistadores españoles tomaron su reino en 1532 d.C. En la actualidad podemos encontrar Quechuas en Colombia, Ecuador, Bolivia, Perú y Argentina; sin embargo, la lengua Quechua fue impuesta por los incas y los españoles a muchas comunidades de habla no Quechua.

**Objetivos.** Estudio poblacional con fines epidemiológicos (asociación HLA-enfermedad), elaboración de listas de espera para trasplante (ya sea en España, por la gran inmigración existente hoy, o en la región autóctona) y estudio antropológico sobre el origen de emparentamiento de la población. Los alelos HLA Amerindios son muy diferentes a los encontrados en el resto de poblaciones mundiales.

**Métodos.** Hemos tomado muestras de sangre de donantes Quechuas bolivianos de La Paz (región del lago Titicaca), de donde se consideran autóctonos. Los ancestros de los donantes habitaban en la zona al menos en las tres generaciones precedentes. Se han estudiado las secuencias de ADN de los alelos HLA-A, -B, -DRB1 y -DQB1 mediante secuenciación indirecta.

**Resultados.** Las frecuencias de alelos HLA y su distribución de este grupo se han comparado con 7005 individuos de 68 poblaciones diferentes de todo el mundo. Se han calculado las distancias genéticas entre poblaciones, y se han realizado dendrogramas y análisis de correspondencia para establecer relaciones entre poblaciones.

**Conclusiones.** Las principales conclusiones son: 1) Algunos haplotipos extendidos HLA-A-B-DRB1-DQB1 encontrados en Quechuas son compartidos por poblaciones asiáticas y no aparecen en otros Amerindios (Mesoamericanos). 2) La población de habla Aymara de la misma región (Lago Titicaca, La Paz) muestra una distancia genética cercana con los Quechuas, pero la distribución de frecuencias de alelos HLA es diferente, a la vista de los dendrogramas y análisis de correspondencia. Además, el alelo HLA-DRB1\*0901, común en poblaciones asiáticas y Atabascos (del norte de Canadá y Alaska), aparece en los Quechuas con una frecuencia alta. Esto sugiere la existencia de contacto genético entre poblaciones asiáticas y los antiguos Quechuas (Incas) que no se ha encontrado en grupos Amerindios mesoamericanos.

**C-0004-11-O. ORIGEN DE LOS AMERINDIOS JAIDUKAMA (COLOMBIA) SEGÚN LOS GENES HLA.** A. Villena<sup>1</sup>, F. Montoya<sup>2</sup>, J. Moscoso<sup>1</sup>, J. Zamora<sup>1</sup>, J.I. Serrano Vela<sup>1</sup>, C. Bedoya<sup>2</sup>, C. Silvera<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, M. Pérez Blas<sup>1</sup>, J. Martínez Laso<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense. Hospital 12 Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Sección de Inmunología, Corporación de Investigaciones Biológicas (CIB), Medellín, Colombia.

**Introducción.** Se ha definido una población aislada de indígenas Colombianos, los Jaidukama, que viven en una zona selvática del noroeste de Colombia, relativamente cerca de la selva Darien panameña. Hablan un lenguaje de tipo Caribe y su origen es incierto.

**Objetivos.** Estudio poblacional con fines epidemiológicos (asociación HLA-enfermedad), elaboración de listas de espera para trasplante (ya sea en España, por la gran inmigración existente hoy, o en la región autóctona) y estudio antropológico sobre el origen de emparentamiento de la población. Los alelos HLA Amerindios son muy diferentes a los encontrados en el resto de poblaciones mundiales.



**Métodos.** Se tomaron muestras de los padres de 13 familias de los 27 que habitan el área Jaidukama, accediendo en helicóptero desde Medellín. Se realizó el fenotipo de alelos de clase I y clase II. Se calcularon los haplotipos extendidos y se compararon los resultados con otras poblaciones amerindias y del resto del mundo (n=7005) mediante dendrogramas Neighbour-Joining y análisis de correspondencia.

**Resultados.** Los resultados muestran un relativamente pequeño polimorfismo HLA con típicos alelos amerindios. Las poblaciones más cercanas son los Xavantes (Brasil), Cayapa (Ecuador) y Aymara (Bolivia-Perú), mostrando que poseen tanto características genéticas HLA andinas como de la Amazonia o el Caribe.

**Conclusión.** Se discute las características del poblamiento de América en base a los resultados obtenidos y el origen de los Jaidukama.

**C-0004-12-O. HAPLOTIPOS HLA Y MUTACIONES HFE EN HEMOCROMATOSIS HEREDITARIA Y PORFIRIA CUTANEA TARDA ESPORÁDICA EN ESPAÑOLES.** J. Moscoso<sup>3</sup>, M. González Hevilla<sup>1</sup>, R.E. de Salamanca<sup>2</sup>, P. Morales<sup>1</sup>, J. Martínez Laso<sup>1,3</sup>, A. Fontanellas<sup>2</sup>, M.J. Castro<sup>1</sup>, R. Rojo<sup>1</sup>, J. Zamora<sup>3</sup>, J.I. Serrano Vela<sup>3</sup>, J.M. Martín Villa<sup>3</sup>, M. Pérez Blas<sup>3</sup>, A. Arnaiz Villena<sup>1,3</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Medicina Interna, Hospital 12 de Octubre, Universidad Complutense, Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

**Introducción.** Se ha postulado que la mutación C282Y del gen HFE (ligada al haplotipo HLA-A3-B7) no es la única responsable de la Hemocromatosis Hereditaria; los alelos HLA de clase I podrían estar también implicados en la patogénesis de la enfermedad. Además, la mutación H63D, ligada a HLA-A29-B44, podría ser otro factor relacionado con el desarrollo de la Hemocromatosis, particularmente en la cuenca mediterránea y en el resto del mundo. Por otro lado, la *Porfiria Cutanea Tarda* esporádica parece estar asociada también a ambas mutaciones. En este trabajo se han estudiado esas dos mutaciones del gen HFE y los genes HLA para comprobar estas hipótesis.

**Objetivos.** Comprobar si existe en la población española algún factor HLA adicional de susceptibilidad a Hemocromatosis y *Porfiria Cutanea Tarda*, además del gen HFE, como parece suceder en la población portuguesa.

**Métodos.** Se ha realizado el tipaje HLA y se han buscado las mutaciones C282Y y H63D en 98 pacientes españoles con Hemocromatosis Hereditaria y en 63 con *Porfiria Cutanea Tarda*. La fracción etiológica ( $\delta$ ) ha sido empleada para determinar el grado absoluto de ligamiento genético con ambas enfermedades.

**Resultados.** El haplotipo HLA-A29-B44, frecuente en España, no aparece asociado de forma significativa con la mutación H63D en pacientes con Hemocromatosis Hereditaria (aunque es más frecuente en pacientes que en controles). Los pacientes con *Porfiria Cutanea Tarda* esporádica tampoco presentan una asociación significativa con la mutación H63D, aunque ésta es también más frecuente en pacientes que en controles; sin embargo, la combinación H63D/C282Y sí parece conferir un riesgo significativamente superior de padecer *Porfiria Cutanea Tarda*.

**Conclusión.** El riesgo adicional para padecer Hemocromatosis Hereditaria que, según se postula, confieren los antígenos HLA de clase I parece ser secundario al desequilibrio de ligamiento del gen

HFE con ciertos alelos de clase I o con otros adyacentes. La *Porfiria Cutanea Tarda* tampoco parece estar ligada a HLA.

**C-0004-13-C. VARIABILIDAD DEL SISTEMA PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD E HISTORIA EVOLUTIVA DE LOS CANARIOS AFRICANOS.** E. Lowy<sup>1</sup>, J. Zamora<sup>1</sup>, J. Moscoso<sup>1</sup>, V. Ruíz del Valle<sup>1</sup>, J.I. Serrano Vela<sup>1</sup>, J. Martínez Laso<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, M. Pérez Blas<sup>1</sup>, R. van den Elzen<sup>2</sup>, A. Arnaiz Villena<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Hospital 12 Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Alexander Koenig Research Institute and Zoological Museum, Bonn, Alemania.

**Introducción.** Hemos descrito que unas especies de canarios africanos tuvieron un origen en el extremo sur y que más tarde se extendieron hacia el norte y hacia Europa (verdecillo), y otros tuvieron un origen centroafricano que luego se extendieron de este a oeste. La especie de canario más antigua apareció hace 10 millones de años.

**Objetivos.** Comprobar el polimorfismo de las proteínas de trasplante de clase I, por primera vez, en un conjunto de especies de vertebrados que constituyen un género.

**Métodos.** Se estudiaron las especies de canarios representativas de todos los grupos para los alelos de histocompatibilidad de clase I por medio de secuenciación de ADN.

**Resultados.** De las diferentes 18 secuencias codificantes obtenidas todas tienen una estructura tridimensional similar a las de las secuencias HLA y el tamaño de los intrones es más parecido al de los mamíferos que a los de pequeño tamaño encontrados en el pollo. El polimorfismo es limitado y se ha observado también evolución transespecífica, pues existe un alelo común a dos especies de canarios distintas, *Serinus flaviventris* y *Serinus sulphuratus*.

**Conclusión.** Los resultados se discuten sobre la base de contraponer sistema de histocompatibilidad «naturales» (guepardo, aves) con «artificiales» (ratón, pollo, hombre).

**C-0004-14-C. CARACTERIZACIÓN DEL EQUIVALENTE A HLA -F EN CHIMPANCÉ, GORILA Y ORANGUTÁN.** M.J. Castro, E. Mancebo, E. Romo, E. Rueda, S. Luen-go, P. Morales. Inmunología. Hospital 12 de Octubre, Madrid.

**Introducción.** MHC-F es un gen MHC, junto con MHC-G y -E, perteneciente al grupo de genes de clase I no clásicos. Se caracteriza por su limitado polimorfismo y porque su función es desconocida.

Recientes estudios sugieren una función interrelacionada de HLA-E, -F y -G en el reconocimiento inmune en la barrera feto-maternal.

**Objetivos.** En este trabajo nos proponemos estudiar la evolución del locus MHC-F a lo largo de la línea de primates antropoides, identificando el ortólogo de este gen en chimpancé, gorila y orangután.

**Materiales y métodos.** Se usaron líneas celulares de primates procedentes de 4 chimpancés, 2 gorilas y 2 orangutanes a las que se extrajo RNA, se sintetizó cDNA y se secuenció el gen MHC-F según métodos estándar. A partir de las secuencias obtenidas se construyeron árboles filogenéticos.

**Resultados.** Se obtuvieron 2 alelos nuevos de MHC-F en chimpancé común, 1 en chimpancé pigmeo, 1 en gorila y otro en orangután.

El análisis de estas secuencias de cDNA de MHC-F nos permite corroborar que pierden el exón 7 por splicing al igual que en humanos y otras especies de primates.

Además, las secuencias obtenidas no presentan una inserción de 6 nucleótidos en el exón 2 al igual que en humanos y a diferencia del mono rhesus y el tamarino.

**Discusión.** El análisis de las proteínas resultantes, extrapoladas a partir de las secuencias de cDNA, cuando se comparan con las

demás proteínas de MHC-F de primates secuenciadas hasta la fecha, muestran que MHC-F es una molécula con estructura de clase I y que los residuos aminoácidos clave en la zona de unión a antígeno están altamente conservados. Esto sugiere una función común y conservada a lo largo de la evolución de los primates.

Por último, la inserción de 6 nucleótidos (2 aminoácidos) en el exón 2 de MHC-F nos sirven para acometer una revisión en el diagrama de la evolución de los primates.

## C-0007. Células presentadoras de antígeno: macrófagos y células dendríticas

*Moderadores:* Eugenio Carrasco Marín (Santander), Dolores Jaraquemada Pérez (Bellaterra)

**C-0007-01-O. LAS TETRASPANINAS, CD9, CD81 Y CD151 ESTÁN IMPLICADAS EN LA ADHESIÓN Y MOTILIDAD DE LOS MELANOCITOS HUMANOS.** M.Á. García López, A. García Díez, P. Fernández Peñas. *Servicio de Dermatología, Hospital Universitario de la Princesa, Madrid*

**Introducción.** Las tetraspaninas: familia de proteínas con cuatro dominios transmembrana, se expresan en una gran variedad de tipos celulares, implicadas en distintas funciones: adhesión celular, movilidad, invasión tumoral, señalización intracelular. Estas moléculas, de especial interés en linfocitos, tienen capacidad para interactuar con proteínas de adhesión como integrinas. Nuestro grupo ha estudiado la expresión y función de las tetraspaninas en queratinocitos donde se vio su clara implicación en la movilidad celular. En este trabajo analizamos el papel de estas moléculas en otras células de la piel, los melanocitos, implicadas en enfermedades autoinmunes como el vitíligo.

**Objetivos.** Estudiar la expresión de CD9, CD81 y CD151 en melanocitos y su implicación en adhesión y migración.

**Métodos.** Melanocitos obtenidos a partir de piel procedente de cirugías. Anticuerpos: anti-integrinas  $\beta 1$  (TS2/16 activador y VJ1/14 inhibidor),  $\alpha 2$ ,  $\alpha 3$  CD151, CD63, CD9, y CD81. Citometría de Flujo e Inmunofluorescencias: tinción con anticuerpos anti-tetraspaninas. Adhesión: recuento de células adheridas a matriz y bloqueo de la adhesión con anticuerpos. Motilidad: medida de migración de melanocitos a través de transwell teniendo como único estímulo migratorio la fibronectina.

**Resultados.** Positividad para  $\beta 1$ : 80%; CD9:85%; CD81:41%; CD151:20%. Colocalización de las tetraspaninas en la superficie de la membrana celular y en las uniones intercelulares con integrina  $\beta 1$ . Anticuerpos anti-tetraspaninas son capaces de inhibir la adhesión a matriz, lo que repercute directamente en la motilidad de las células.

**Conclusiones y discusión:** 1) Los melanocitos humanos normales expresan CD9, CD81 y CD151 principalmente en las uniones intercelulares, donde colocalizan con la integrina  $\beta 1$ . 2) Anticuerpos anti-tetraspanina modulan la adhesión y la motilidad de los melanocitos. 3) Estas moléculas podrían ser el punto de unión con el resto de células de la piel, queratinocitos y/o células de Langerhans.

**C-0007-02-O. ANÁLISIS DEL EFECTO DE LA RADIACIÓN UV EN LA MADURACIÓN, ADHESIÓN Y LA MIGRACIÓN DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS.** M. Mittelbrunn<sup>1</sup>, R. Tejedor<sup>1</sup>, Á. Ursa<sup>1</sup>, J.L. Alonso-Lebrero<sup>2</sup>, J. Pablo Pivel<sup>2</sup>, S. González<sup>2</sup>, F. Sánchez-Madrid<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Ind Farmaceutica Cantabria, Dpto de I+D, C/Arequipa 1, Madrid

La exposición de la piel humana a la luz ultravioleta (UV) induce una supresión local y sistémica del sistema inmune. Se piensa que el mecanismo implicado en esta depresión inmune está mediado por las células de Langerhans, células dendríticas epidérmicas que desempeñan un papel crucial en la presentación inmune. Después de la exposición a la luz UV, las células de Langerhans/Dendríticas migran desde la piel hasta los ganglios linfáticos. Sin embargo, se piensa que estas células sometidas a luz UV tienen alterada su capacidad de presentar antígenos a los linfocitos T.

Con el fin de entender cómo se produce la movilización de células de Langerhans/ Dendríticas después de la radiación solar se ha profundizado en los cambios fenotípicos y funcionales, en relación con su capacidad de migración, adhesión y captación antigénica, que sufren las células Dendríticas tras irradiación con el simulador solar. Para ello, células Dendríticas inmaduras humanas derivadas *in vitro* a partir de monocitos fueron sometidas a radiación UV utilizando el simulador solar. La luz UV induce la maduración parcial de las células dendríticas, que se refleja en una disminución de las moléculas implicadas en la captación antigénica (DC-SIGN), así como una disminución de su capacidad para realizar endocitosis y un aumento en los niveles de expresión de moléculas implicadas en la presentación antigénica (MHC-II y CD86). Sin embargo, la luz UV no induce la expresión de otro marcador típico de maduración, CD83. La luz UV cambia las propiedades de adhesión y migración de las células dendríticas.

Las células dendríticas que han sido sometidas a luz UV, disminuyen la expresión de moléculas de adhesión (integrinas) y aumentan la expresión de determinados receptores de quimioquinas (CXCR4 y en menor grado CCR7) lo que determina que las células migren mayoritariamente hacia la quimioquina SDF-1 y en menor proporción hacia SLC.

**C-0007-03-O. DINÁMICA DE LAS MOLÉCULAS DE ADHESIÓN INVOLUCRADAS EN LA SINAPSIS INMUNOLÓGICA ENTRE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS Y LOS LINFOCITOS T.** H. de la Fuente<sup>1</sup>, M. Mittelbrunn<sup>1</sup>, L. Sánchez<sup>2</sup>, M. Vicente-Manzanares<sup>1</sup>, A. Lamana<sup>1</sup>, R. Pardi<sup>1</sup>, C. Cabañas<sup>2</sup>, F. Sánchez-Madrid<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid. <sup>2</sup>Instituto de Farmacología y Toxicología CSIC-UCM, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid

La interacción entre células dendríticas (DCs) y los linfocitos T es el primer paso para iniciar la respuesta inmune primaria. Aunque el papel de los receptores de los linfocitos T implicados en el establecimiento de la Sinapsis Inmunológica (SI) ha sido ampliamente estudiado, poco se sabe de la participación de los receptores de las DCs en la formación de estos conjugados. El principal objetivo de nuestro trabajo fue caracterizar la dinámica de los receptores de adhesión (ICAM-1, ICAM-3, LFA-1 y CD44) y de reconocimiento antigénico (MHC-II) de las DCs durante el establecimiento de la SI. Estudios de videomicroscopía confocal con DCs transfectadas con construcciones GFP revelaron que ICAM-3 e ICAM-1 se concentran inicialmente en el uropodo de las DCs y se translocan a la zona de contacto durante el reconocimiento celular. ICAM-3 es la primera molécula de adhesión que aparece en la zona de contacto. En los siguientes minutos LFA-1, ICAM-1 y MHC-II se reclutaron a la SI de forma similar. Después de 20min estos receptores se concentraron establemente en la zona de contacto permitiendo la estabilización de la SI. Por el contrario otras moléculas como CD44 no participan en la formación de este contacto celular. Uno de los eventos esenciales para el reconocimiento específico de péptidos son los contactos exploratorios iniciales entre los linfocitos T y la DC. Estudios previos de nuestro laboratorio han determinado el papel relevante de ICAM-3 durante estos primeros contactos con la DC. En este estudio se analizaron las consecuencias funcionales de la interacción de ICAM3 y/o ICAM-1 del linfocito T con la DC. Para ello, se generaron conjugados de DC con microesferas de látex recubiertas con las proteínas recombinantes ICAM3, ICAM1 o ICAM1+ICAM3. Estos estudios revelaron que ICAM-3 es capaz de reclutar moléculas MHC-II observándose un efecto sinérgico con ICAM-1. Estudios adicionales utilizando inhibidores específicos de los principales receptores de estas moléculas, revelaron que este fenómeno es dependiente de la integrina LFA-1.

**C-0007-04-O. PAPEL DEL TNF AUTOCRINO Y DE NFκB EN EL CONTROL DE LA EXPRESIÓN DE COX-2 INDUCIDA POR IFNγ EN MACRÓFAGOS.** V. Vila del Sol, M. Fresno. Centro de Biología Molecular Severo Ochoa CSIC-UAM. Universidad Autónoma de Madrid.

**Introducción.** Algunos estímulos proinflamatorios como IFNγ o TNF inducen la activación de macrófagos y la producción de mediadores inflamatorios como las prostaglandinas (PGs). La enzima limitante en la síntesis inducible de PGs es la ciclooxigenasa 2 (COX-2).

**Objetivos.** Analizar el mecanismo molecular por el cual el IFNγ induce la expresión de COX-2.

**Métodos.** Se utilizaron células de tipo macrófago de ratón RAW 264.7, así como macrófagos peritoneales procedentes de ratones «wild type» o TNF<sup>-/-</sup>, y se trataron con diferentes estímulos: IFNγ, TNF o LPS. Se analizó la expresión de COX-2, y la producción de PGs y TNF. Por otro lado, se realizaron transfecciones transitorias con dis-

tintas construcciones del promotor de COX-2, y se estudió la activación de NFκB mediante ensayos de retardo en gel (EMSA).

**Resultados.** El IFNγ indujo la expresión de COX-2, así como la producción de PGs, y esta inducción tuvo lugar a nivel transcripcional. La delección de los elementos de respuesta a IFNγ (ISRE I e ISRE II), inhibió parcialmente la inducción por IFNγ, mientras que la delección de la región -950/-150 abolió dicha inducción. En esta región se ha descrito un elemento NFκB, cuya mutación disminuyó la actividad promotora de COX-2 en respuesta a IFNγ. Además, la sobre-expresión de la proteína inhibidora de NFκB, IκBα, redujo fuertemente esta inducción. En adición, la expresión de COX-2 y la producción de PGE<sub>2</sub> en respuesta a IFNγ, no se detectó en macrófagos peritoneales de ratones TNF<sup>-/-</sup>. Por otro lado, la neutralización del TNF producido en respuesta a IFNγ, produjo la inhibición de la expresión de COX-2, así como su actividad promotora. Se observó una activación tardía de NFκB (8h) después del tratamiento con IFNγ, que correlacionó con un efecto autocrino del TNF.

**Conclusiones.** Estos resultados sugieren un modelo en el cual el TNF producido en respuesta a IFNγ, actuaría de forma autocrina activando el factor NFκB, que se requeriría para la completa expresión de COX-2.

**C-0007-05-O. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE APOBEC3G EN CÉLULAS DENDRÍTICAS MADURAS E INMADURAS Y AUSENCIA DE POLIMORFISMOS EN EL EXON 3 DE APOBEC3G.** H. Oliva<sup>1</sup>, R. Pacheco<sup>2</sup>, N. Climent<sup>1</sup>, F. García<sup>3</sup>, J.M. Miró<sup>3</sup>, R. Franco<sup>2</sup>, N. Navaratnam<sup>4</sup>, J.M. Gatell<sup>3</sup>, T. Gallart<sup>1</sup>. Servicios de Inmunología<sup>1</sup> e Infecciones<sup>3</sup> del Hospital Clínic de Barcelona-Grupo de Investigación del SIDA-IDIBAPS. Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona. Facultad de Químicas<sup>2</sup>, Universidad de Barcelona. RNA Editing Group<sup>4</sup>. MRC, Hammersmith Hospital Campus, London.

**Introducción.** APOBEC3G es un miembro de la familia de enzimas editoras de RNA que protege al huésped frente al VIH, lo que es contrarrestado por la proteína vírica Vif («Virion infectivity factor») que se une a APOBEC3G y promueve su degradación en el roteosoma. Esos datos sugieren la hipótesis de que variaciones interindividuales en la expresión de APOBEC3G y/o su mayor/menor grado de función, determinada por mecanismos epigenéticos o por polimorfismos genéticos, pueden hallarse entre las células e individuos con mayor o menor susceptibilidad-resistencia a la infección.

**Objetivos y métodos.** Evaluar la expresión de APOBEC3G en distintas líneas celulares, en células T primarias, y muy especialmente en células dendríticas (CD) derivadas de monocitos (CD-DM), inmaduras (CDi) y maduras (CDm). Desarrollar un sistema RT-PCR para cuantificar expresión génica de APOBEC3G. Producir un anticuerpo monoclonal murino (mAb) anti-APOBEC3G para evaluar su expresión proteica. Evaluar la presencia de polimorfismos en el exón 3 de APOBEC3G donde radica el sitio de unión con Vif.

**Resultados.** Se ha logrado determinar la expresión de la APOBEC3G, en monocitos, células T en reposo y células, así como en CDi y en CDm. Se determinó una mayor expresión de APOBEC3G en CDm respecto a CDi. Se logró obtener un anticuerpo monoclonal contra APOBEC3G, de isotipo IgG. La secuenciación del tercer exón de APOBEC3G, en 70 individuos sanos, demuestra un polimorfismo silente en la posición 588 (T/C).

**Conclusiones.** Hay una mayor expresión de la APOBEC3G en CDm, respecto de CDi, lo que es consistente con datos previos

sobre la mayor vulnerabilidad de las CDi para ser infectadas que las CDm. El mAb reconoce un epitopo no conformacional. No se han hallado mutaciones relevantes en el tercer exón de APOBEC3G.

**C-0007-06-O. EFECTO DE LA IL-10 SOBRE LA EXPRESIÓN DE TRAIL INDUCIDA POR IFNs EN MONOCITOS. R.**

*Alonso Arias<sup>1</sup>, C. Gutiérrez Martín<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Área de Inmunología, Dpto. de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>Serv. de Inmunología, Hospital Central de Asturias.*

TRAIL es una molécula con importantes funciones antitumorales y anti-inflamatorias cuya expresión se induce fundamentalmente por los IFNs tipo I y tipo II. La IL-10 es una citocina altamente pleiotrópica con actividad inhibitoria de respuestas inflamatorias y potenciadora de respuestas citotóxicas en monocitos, lo que nos llevó a postular que la expresión de TRAIL en estas células podría estar sometida a regulación por IL-10. Para comprobarlo se aislaron monocitos de sangre periférica mediante gradiente de densidad y selección negativa con micropartículas magnéticas y se estudió el efecto de la IL-10 sobre la expresión de TRAIL inducida por IFNs tipo I y tipo II por citometría de flujo. Además se realizó cuantificación, mediante RT-PCR a tiempo-real, de los niveles de expresión del RNAm. La IL-10 incrementó la expresión de TRAIL inducida por distintas concentraciones de IFN- $\alpha$  ( $2 \times 10^2$ ,  $5 \times 10^2$ , y  $10^3$  U/ml), el nivel de expresión al cabo de 18 horas de estimulación pasó del 33% de media en respuesta a 200 U/ml de IFN- $\alpha$  al 53,8% cuando se añadieron al cultivo 10 ng/ml de IL-10 ( $n=17$ ,  $p<0,001$ ). El mismo resultado se encontró al estudiar el efecto de la IL-10 en los monocitos tratados con IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$ , y el bloqueo con anticuerpos anti-IL-10 demostró la especificidad de esta citocina revirtiendo la modulación positiva observada. Para analizar si el incremento de expresión proteica de TRAIL era consecuencia del incremento en los niveles de RNAm se realizó cuantificación del RNAm de TRAIL en respuesta a IFN- $\alpha$  y a IL-10 y se encontró que en aquellas células estimuladas con IFN- $\alpha$  los niveles de RNAm fueron 4 veces superiores a los encontrados en las células sin estimular, mientras que los niveles se incrementaron hasta 14 veces en respuesta a la combinación de IFN- $\alpha$  e IL-10. Estos resultados nos indican un efecto modulador positivo, no descrito hasta el momento, por parte de la IL-10 sobre la expresión de TRAIL inducida por IFNs. El incremento en la expresión de TRAIL podría suponer uno de los mecanismos antiinflamatorios de la IL-10, así como explicar parte del efecto beneficioso postulado para la IL-10 en la respuesta antitumoral junto con la inhibición del proceso angiogénico en el microambiente tumoral y la activación de la capacidad citotóxica de las células NK.

**C007-07-O. PRODUCCIÓN DE UNA PROTEÍNA DE FUSIÓN MR1-FLAG SOLUBLE EN CÉLULAS DE RATÓN Y HUMANAS. B.**

*Gonzalbo López, F. Setién Baranda, Y. Campos Martín, M. Gómez del Moral, J. Suela Rubio, E. Martínez Naves. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina U.C.M., Madrid.*

**Introducción.** MR1 es una molécula de la familia MHC de clase Id codificada en el cromosoma 1q25.3. Las moléculas MR1 restringen el desarrollo y la respuesta de los linfocitos MAIT (Mucosal Associated Invariant T cells), cuya función parece estar relacionada con la flora comensal intestinal y la producción de IgA. Se desconoce la naturaleza de los antígenos presentados por MR1, así como la expresión tisular y celular de esta molécula. Actualmente no existen reactivos adecuados para abordar el estudio de la biología celular y molecular de MR1.

**Objetivo.** Producir una proteína de fusión MR1-FLAG recombinante y soluble, que sería utilizada para estudiar el ligando presentado por MR1 así como la producción de anticuerpos monoclonales y policlonales.

**Resultados.** Se utilizó el sistema de expresión génica GS y el plásmido pSRaNeo. Los cDNA que codifican para MR1-FLAG y b2m fueron clonados en los plásmidos pEE 12.4 y pSRaNeo. Los plásmidos obtenidos fueron electroporados en células NS-0 de ratón y C1R humanas respectivamente, que fueron clonadas por dilución límite. La producción de MR1 en los clones seleccionados fue comprobada mediante Western Blot utilizando antisueros de conejo anti MR1 desarrollados en nuestro laboratorio y el anticuerpo monoclonal frente a FLAG M2 (SIGMA). La proteína MR1-FLAG es secretada al medio extracelular por las células NS-0 de ratón. Por otra parte, las células linfoblastoides humanas C1R transfectadas con MR1-FLAG son incapaces de secretar la proteína al medio extracelular, siendo detectada intracelularmente por técnicas de citometría de flujo y Western-blot. Los análisis por inmunohistoquímica revelan que la proteína se acumula en vesículas intracelulares. Nuestra hipótesis es que la proteína MR1 es retenida intracelularmente por chaperonas de la célula C1R porque carece del ligando (¿péptido?) necesario para su correcto plegamiento. La molécula recombinante MR1-FLAG generada será de gran utilidad en diversos estudios que estamos realizando para determinar la estructura y función de MR1.

**C-0007-08-O. PRESENTACIÓN DE SUPERÓXIDO DISMUTASA Cu/Zn DE *Brucella abortus* POR MACRÓFAGOS TRANSFECTADOS CON VACUNA pcDNA-SOD.**

*E. Andrews, P. Salgado, S. Céspedes, C. Muñoz, A. Gonzalez, R. Rivers, Oñate A. Departamento de Microbiología, Facultad de Ciencias Biológicas Universidad de Concepción Casilla, Concepción Chile.*

**Introducción.** *Brucella abortus* parásito intracelular facultativo, causa grandes pérdidas económicas en países en que es endémica. El control de la brucelosis se realiza por la vacunación de animales susceptibles, con cepas vivas atenuadas como *Brucella abortus* RB51. Actualmente se está evaluando la vacunación con plásmidos de ADN codificando proteínas de reconocida inmunogenicidad, capaces de inducir una respuesta inmune celular. Se sabe que la superóxido dismutasa Cu/Zn, es capaz de generar una respuesta protectora en ratones frente a una cepa patógena de *Brucella abortus*, así como se conoce que los linfocitos Thelper1 son clave en el desarrollo de una respuesta celular apropiada, para lo cual deberán reconocer a los antígenos procesados y presentados por células presentadoras profesionales, como macrófagos.

**Objetivo:** En este trabajo se evaluó la capacidad de macrófagos transfectados con un plásmido que codifica para la proteína Cu/Zn SOD de *Brucella abortus*, de presentar esta proteína recombinante a través del complejo mayor de histocompatibilidad MHC I o MHC II a células T sensibilizadas.

**Método.** Para esto, esplenocitos de ratones BALB/c inmunizados con *Brucella abortus* RB51 fueron evaluados *in vitro* con ensayos de citotoxicidad y linfoproliferación, utilizando macrófagos J774A.1 transfectados con plásmido pcDNASOD como células presentadoras.

**Resultados.** Los resultados muestran que los macrófagos transfectados con el plásmido pcDNA-SOD inducen en los linfocitos sensibilizados una respuesta de citotoxicidad significativamente superior que en los controles, sin embargo, en los resultados de la linfoproliferación no se observan diferencias significativas con los controles.

**Conclusiones.** Esto nos permite sugerir que los macrófagos que adquieren el plásmido que expresa Superóxido Dismutasa presentarán preferentemente a través de MHC I.

*Financiamiento: Proyectos Fondecyt 1010851 y Dirección de Investigación Universidad de Concepción N° 203.026-1.0.*

## D-0003. Heterogeneidad de los linfocitos B

*Moderadores:* José Antonio Brieva Romero (Cádiz), Ramón Merino Pérez (Santander)

**D-0003-01-O. LA APOPTOSIS DE PROGENITORES B INDUCIDA POR INTERFERÓN GAMMA ES INDEPENDIENTE DE LA ACTIVACIÓN DE CASPASAS.** N. Martín, I. Rubio, M. Sánchez-Pérez, R. Góngora. *Inmunología, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, Salamanca.*

**Introducción.** La ontogenia de los linfocitos B transcurre en la médula ósea del individuo adulto y la mayoría de los progenitores que inician este proceso mueren por apoptosis para asegurar así un repertorio de receptores adecuado. Nosotros hemos descrito que el interferón gamma, producido constitutivamente en la médula ósea, induce la apoptosis de estos progenitores por un mecanismo en el que la proteína nuclear Daxx es esencial.

**Objetivos.** Se piensa que Daxx funciona como un represor de la transcripción génica en el núcleo pero se desconoce su función exacta con relación a la apoptosis. En este trabajo, nosotros buscamos su conexión con las vías convencionales de apoptosis, esto es, la vía «extrínseca» mediada por receptores tipo Fas, y la vía «intrínseca» inducida por cambios en la permeabilidad de la mitocondria.

**Métodos.** Hemos trabajado con líneas celulares dependientes de IL-7 y también hemos crecido progenitores B primarios sobre una capa de fibroblastos a los que se le ha trasfectado el gen de la IL-7 (esencial para el crecimiento de estas células) y sobre la que añadimos el interferón y otros agentes. Determinamos el grado de apoptosis mediante tinción con yoduro de propidio y citometría de flujo, y por enumeración de células vivas en presencia de azul de tripán.

**Resultados.** La apoptosis de estos progenitores inducida por el interferón gamma es independiente de la expresión de Fas y se da incluso en la presencia de altas concentraciones de un inhibidor de caspasas de amplio espectro (Z-VAD-fmk).

**Conclusiones.** El mecanismo de apoptosis inducido por el interferón y mediado por Daxx es independiente de la presencia de Fas y no parece depender de la activación de caspasas. Parece pues que estamos ante un mecanismo puramente nuclear (presumiblemente a través de su efecto represor de la transcripción génica), y dado el bloqueo en el ciclo celular que precede la apoptosis, parece ser mediado por cambios en la expresión de genes reguladores del crecimiento celular.

**D-0003-02-O. EL FENOTIPO CD19+CD45R/B220- DEFINE UNA NUEVA POBLACION DE PROGENITORES B EN EL ESTADIO TEMPRANO PRO-PRE BI CON ALTA CAPACIDAD PROLIFERATIVA.** B. de Andrés, P. Gonzalo, P.G. Soro, I. Cortegano, P. Muñoz, B. Lobo, D. Melero, M.A.R. Marcos, M.L. Gaspar. *Unidad de Inmunobiología. Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda. Madrid.*

Los primeros progenitores unipotenciales B de origen embrionario aparecen en el hígado fetal del ratón a día 11 de ges-

tación, y responden al fenotipo c-kit+ AA4.1+ IL7R+ CD19+ B220-. Dichos progenitores experimentan un gran crecimiento en los días sucesivos de la gestación. A día 14, los progenitores B presentan dos fenotipos: CD19+B220- y CD19+B220+. Ambas poblaciones coexisten durante el resto de la gestación. Un estudio comparativo de ambas poblaciones, muestra un fenotipo inmaduro: ckit+, CD43+, HSA+, IgM-, aunque con niveles diferenciales en la expresión de IL7R+, siendo en el caso de la población CD19+B220- del 30-50% y para la población CD19+B220+ de un 90%. Se procedieron a purificar mediante «sorting» las poblaciones anteriormente citadas además de CD19-B220+ y c-kit+CD19-B220-, poniéndose en cultivo sobre una capa de células estromales e IL-7. Los datos muestran que es la población CD19+B220- la que presenta la mayor frecuencia de progenitores B clonables, seguida de CD19+B220+, CD19-B220+ y por último de la población c-kit+CD19-B220-. Por otro lado, los estudios a tiempos cortos en cultivo señalan que la población CD19+B220- adquiere en estas condiciones la expresión de B220 a las 24 horas de cultivo, mientras que la población CD19+B220+ mantiene dicho fenotipo a lo largo del mismo, llegando ambas poblaciones a expresar un fenotipo maduro (IgM+). La expresión de los transcritos VpreB y Lambda 5 en dichas poblaciones purificadas por sorting, se realizó mediante PCR cuantitativa, mostrando que es la población CD19+B220- la que presenta mayores niveles de ambos transcritos hasta día 15 de gestación siendo igualados y superados estos niveles por la población CD19+B220+ a partir del día 16 de gestación.

Concluimos de todos estos datos, que la población CD19+B220- es la que inicia el proceso de linfopoiesis embrionaria B en el ratón, a partir de día 11 de gestación con una alta tasa de proliferación. Dicha población da lugar progresivamente a la población CD19+B220+ durante el resto del período gestacional, la cual constituye la población mayoritaria en el individuo adulto.

**D-0003-03-O. REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN DEL GEN BLIMP-1 HUMANO MEDIADA POR SECUENCIAS INTRÓNICAS.** F. Mora-López<sup>1</sup>, E. Foncubierta<sup>1</sup>, E. Reales<sup>1</sup>, J.A. Brieva<sup>2</sup>, A. Campos-Caro<sup>1,2</sup>. *Unidad de Investigación y <sup>2</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Puerta del Mar. Cádiz.*

**Introducción.** Blimp-1 es un represor transcripcional clave en la diferenciación del linfocito B en célula plasmática (CP). Poco se conoce de los factores que regulan su expresión. En nuestro laboratorio hemos estudiado la región promotora del gen, la cual no es suficiente para conferir la especificidad de tejido de Blimp-1.

**Objetivos.** Identificar regiones reguladoras en el gen de Blimp-1 fuera de la región promotora que contribuyan a la especificidad de su expresión.

**Métodos.** Distintos fragmentos del gen se clonaron en pGL3-basic, que contiene el gen de la luciferasa (LUC). Se transflectaron dis-

tintas líneas celulares y se midió la actividad luciferasa. Para estudiar la acción reguladora del intrón 1 de Blimp-1, éste se insertó en LUC en la posición donde originariamente se encuentra el intrón 1 en la luciferasa de *Photinus*. Se estudió la expresión del nuevo gen LUC<int> bajo el control del promotor de Blimp-1. Para identificar regiones reguladoras en el intrón se buscaron regiones homólogas entre el humano y el murino.

**Resultados:** La construcción LUC<int> es funcional: el intrón 1 de Blimp-1 introducido en la luciferasa de pGL3 es removido del ARNm mediante *splicing* en las células transfectadas. La actividad luciferasa producida por LUC<int> es mayor que la producida por el gen original LUC: el *splicing* potencia la transcripción y la exportación del ARNm al citoplasma.

El intrón 1 de Blimp-1 inhibe la expresión del gen en células no plasmáticas, mientras que no se produce dicha inhibición en CP. Una región de 400 pb altamente conservada es la responsable de esta actividad inhibidora.

**Conclusiones.** El clonaje del intrón dentro del gen LUC permite estudiar su actividad reguladora en una posición más similar a la natural, y con un nivel de expresión de proteína mayor. El intrón 1 de Blimp-1 puede ser responsable de la especificidad de la expresión del gen en CP. La comparación de los genes de distintos organismos nos ha permitido identificar la región reguladora.

**D-0003-04-O. ISOFORMAS DE BLIMP-1. E. Foncubierta, F. Mora-López, E. Reales, J.A Brievea, A. Campos-Caro. Unidad de Investigación. Hospital Puerta del Mar. Cádiz.**

La diferenciación del linfocito B a célula plasmática requiere la expresión del factor de transcripción Blimp-1 (también llamado PRDI-BF1). Blimp-1 reprime la transcripción de genes específicos como c-myc, CIITA, Pax-5 y CD23b. Blimp-1 se asocia con proteínas co-represoras e histona deacetilasas a través de un dominio PR. Se han descrito dos isoformas de Blimp-1 (alfa y beta) producidas por transcripción a partir de dos promotores diferentes. La isoforma beta se produce por un promotor alternativo localizado en el intrón-3 de la isoforma alfa, la proteína que se sintetiza tiene un dominio PR truncado por lo que no puede llevar a cabo su papel represor. Además, se ha descrito un *splicing* alternativo de Blimp-1α en el exón 1 que produciría una proteína con 36 aminoácidos adicionales que sería más parecida a la proteína descrita en ratón. Principalmente tratamos de identificar las regiones reguladoras en el gen de Blimp-1 tanto de la isoforma alfa como de la beta para tratar de saber qué factores y en qué condiciones se determina la especificidad de la transcripción de uno u otro promotor dando lugar a proteínas funcionalmente opuestas. Para identificar las regiones promotoras tanto de la isoforma alfa como de la beta se clonaron distintas regiones del gen Blimp-1 humano en el vector pGL3 para que actuaran como promotores del gen de la luciferasa. Las construcciones se transfectaron mediante electroporación en las líneas celulares plasmáticas NCI-H929 y U266 y en líneas celulares no plasmáticas y se determinó la actividad luciferasa. Hemos podido caracterizar las regiones promotoras de ambas isoformas proteicas. Mediante ensayos con luciferasa se han determinado algunas regiones mínimas necesarias para la transcripción en ambos promotores. De los resultados obtenidos se puede concluir que el exón 1 de la isoforma alfa de Blimp-1 contiene una región reguladora potenciadora de la transcripción y que existen diferencias de expresión entre las líneas celulares estudiadas.

**D-0003-05-O. IMPLICACIÓN DE LA PROTEÍNA VAMP-2 (VESICLE-ASSOCIATED MEMBRANE PROTEIN) EN LA SECRECIÓN DE ANTICUERPOS. V. Rivas<sup>1</sup>, E. Reales<sup>1</sup>, F. Mora-López<sup>1</sup>, J.A. Brievea<sup>2</sup>, A. Campos-Caro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Investigación y <sup>2</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.**

Las células plasmáticas (CP) son el resultado final de los procesos madurativos de la denominada respuesta inmune humoral, caracterizadas por presentar una alta tasa de secreción de anticuerpos. El estudio de la maquinaria proteica secretora en células eucariotas ha llevado a la identificación de un gran número de proteínas denominadas «SNAREs» (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptors) que median la secreción de vesículas. Nuestro grupo ha identificado algunas de estas proteínas en CP humanas normales y en líneas de CP humanas. En este trabajo presentamos la implicación de la proteína VAMP-2 (vesicle-associated membrane protein-2) en la secreción de inmunoglobulinas, proteína que se localiza en membranas de vesículas. Utilizamos para el estudio principalmente la línea de CP humana U266-B1 (secretora de IgE). Detectamos la presencia de esta proteína mediante análisis de amplificación por RT-PCR y *western-blot*. La realización de centrifugación diferencial a partir de un homogeneizado de células nos ha permitido caracterizar la localización subcelular de VAMP-2 principalmente en la fracción mitocondrial pesada (3.000 xg) y la fracción mitocondrial ligera (17.000 xg), fracciones donde se obtienen gran parte de los orgánulos de membrana de una célula eucariota. Experimentos de microscopía de fluorescencia confocal confirman la expresión de VAMP-2, obteniéndose una imagen en forma de gránulos en el citoplasma de la CP. La toxina tetánica actúa específicamente a nivel de VAMP-2, provocando una inhibición de la exocitosis. Para el estudio funcional de VAMP-2 en la secreción de anticuerpos transfectamos las células plasmáticas con toxina tetánica y analizamos por una parte el efecto sobre la secreción mediante la técnica de ELISA y el efecto proteolítico de la toxina tetánica sobre VAMP2 a nivel de *western-blot*. Los resultados obtenidos presentan una significativa inhibición de la producción, pudiéndose concluir una implicación de VAMP-2 en la secreción de inmunoglobulinas por las CP humanas.

**D-0003-06-O. EFECTO DE LA EDAD EN RESPUESTAS FRENTE AL HAPTENO NP EN RATONES QUASIMONOCLONALES. ESTUDIO DE LA INCORPORACIÓN DE MUTACIONES. E. Fernández Mastache<sup>1</sup>, K. Lindroth<sup>2</sup>, C. Fernández<sup>2</sup>, Á. González Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Área de Inmunología, Universidad de Vigo, Pontevedra. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología, Universidad de Estocolmo.**

Los individuos de edad avanzada generan respuestas humorales de anticuerpos de baja afinidad debido, principalmente, a defectos en el proceso de maduración de la afinidad que tiene lugar en los centros germinales (CGs). De hecho, estudios de la respuesta inmune timo-dependiente (TD) frente al hapteno (4-hidroxi-3-nitrofenil) acetil (NP) han demostrado que la principal diferencia entre las respuestas en CGs de ratones viejos y jóvenes, es la ausencia casi completa de mutaciones somáticas en reagrupamientos VDJ en ratones viejos.

Con el fin de estudiar la influencia de la inmunización en edades tempranas sobre respuestas en edad senil, estamos analizando el

proceso de hipermutación somática en respuestas TD frente al NP comparando ratones viejos inmunizados o no cuando eran jóvenes. Como modelo de ratón utilizamos ratones quasimonoclonales (QM) que poseen un repertorio de linfocitos B limitado. Así, el 80% de las células B de estos ratones expresan el receptor antigénico que es específico tanto para el hapteno NP como para su forma yodada (4-hidrox-5-yodo-3-nitrofenil) acetil (NIP), y que está codificado por el transgen  $V_H17.2.25$  de la cadena pesada y por la cadena ligera  $\lambda 1$  o  $\lambda 2$ . Estamos analizando las mutaciones incorporadas en el transgen de la cadena pesada de células B esplénicas de CG (B220<sup>+</sup> PNA<sup>high</sup>) de ratones viejos inmunizados con NIP conjugado a ovoalbúmina de pollo (OVA) en presencia de toxina colérica (TC) como adyuvante, para compararlos con aquéllos obtenidos de ratones viejos que previamente fueron inmunizados de jóvenes con el mismo Ag. Los resultados nos permitirán analizar la respuesta TD en ratones viejos y el efecto de una inmunización en etapas tempranas sobre respuestas en edad avanzada.

**D-0003-07-O. LA HIPEREXPRESION DE Bcl-2 JUNTO CON LA DELECIÓN DE E2F1 INDUCE UN SÍNDROME AUTOINMUNE EN RATONES C57BL/6. M.J. Marín Vidalledá<sup>1</sup>, I. García Aranaga<sup>2</sup>, M. Peña Salmón<sup>1</sup>, A. Zubiaga<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Marqués de Valdecilla, Santander. <sup>2</sup>Unidad de Genética, Facultad de Ciencias Biológicas, UPV, Lejona.

Bcl-2, además de su función antiapoptótica, influye en el ciclo celular retardando la progresión G1-S. La sobreexpresión de Bcl-2 en células B puede inducir un síndrome autoinmune (SAI) dependiendo del background genético. E2F1, miembro de la familia E2F de factores de transcripción, además de regular el ciclo celular, induce apoptosis en determinadas células. Los ratones E2F1<sup>-/-</sup> muestran una alteración en la selección tímica negativa debido a un defecto en la apoptosis. Sin embargo, estos ratones no muestran signos de autoinmunidad ya que la tolerancia periférica no parece alterarse.

Utilizando ratones E2F1<sup>-/-</sup>, que expresen el transgén Bcl-2 humano (Tg Bcl-2h) en un background C57BL/6, pretendemos conocer si el fallo de la regulación de ambos procesos influye en los mecanismos de tolerancia y puede inducir un síndrome autoinmune (SAI). Para ello, empleamos dos tipos de ratones Tg Bcl-2h: uno que hiperexpresa el transgén sólo en células B y otro que lo hace en células B y en un pequeño porcentaje de células T. Evaluamos el desarrollo de SAI mediante determinaciones mensuales en suero de anticuerpos (Acs) anti-DNA y signos de glomerulonefritis en cortes histológicos de riñón.

Los datos indican que, en ausencia de un background genético predisponente a desarrollar SAI, la presencia del Tg Bcl-2h en células B con una delección total de E2F1 induce un SAI caracterizado por aumento de títulos de Acs anti-DNA y glomerulonefritis. Por el contrario, aquellos ratones que hiperexpresan Bcl-2h en células B y T junto con la delección de E2F1, prácticamente no producen Acs.

En conclusión, la combinación de la hiperexpresión del Tg Bcl-2h en células B, junto con la alteración del ciclo celular inducida por la ausencia de E2F1, desencadena un SAI. Por el contrario, si el Tg Bcl-2h se hiperexpresa en células B y T disminuye la incidencia de SAI en dichos ratones.

Financiación: FIS y Fundación Marqués Valdecilla.

**D-0003-08-O. DEFECTOS EN LA REGULACION DE LA APOPTOSIS LINFOCITARIA B PROVOCA EL DESARROLLO DE UNA NEFROPATÍA IgA EN RATONES TRANSGÉNICOS (NZW x C57BL/6)F1-bcl-2. R. Marquina<sup>1</sup>, M.A. Díez<sup>1</sup>, M. López-Hoyos<sup>2</sup>, L. Buelta<sup>1</sup>, J. Villegas<sup>1</sup>, M. Arias<sup>2</sup>, J. Merino<sup>1</sup>, R. Merino<sup>1</sup>.** <sup>1</sup>Departamentos de Biología Molecular, Anatomía y Biología Celular y Ciencias Médicas y Quirúrgicas, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria. <sup>2</sup>Servicios de Inmunología y Nefrología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

A pesar de que la nefropatía IgA es la forma más prevalente de glomerulonefritis en el mundo, se conoce muy poco acerca de los mecanismos patogénicos implicados en ella. En ratones (NZW x B6)F1, predispuestos a enfermedades autoinmunes, la hiperexpresión de Bcl-2 humano en células B promueve la aparición de un síndrome lúpico dependiente de células CD4 caracterizado por hiper-gammaglobulinemia IgG e IgA, producción de autoanticuerpos y el desarrollo de una glomerulonefritis fatal. El análisis de las lesiones glomerulares por microscopía óptica, electrónica e inmunofluorescencia indican que la glomerulonefritis observada en estos ratones es similar a la nefropatía IgA humana. La hiperexpresión de Bcl-2 en las células B también aumenta la respuesta inmune sistémica IgA frente a antígenos T dependientes. Además, la IgA purificada de ratones (NZW x B6)F1-hbcl-2 Tg, pero no la de (NZW x B6)F1 no Tg, presenta un patrón de galactosilación terminal reducido y una mayor capacidad para depositarse en el mesangio glomerular, como se observa en pacientes con nefropatía IgA. En conclusión, el presente estudio indica que defectos en la regulación de la supervivencia de los linfocitos B pueden estar involucrados en la patogénesis de la nefropatía IgA. Además, describimos un nuevo modelo experimental de nefropatía IgA útil para el estudio de los mecanismos celulares y moleculares relacionados con la patogénesis de esta forma de glomerulonefritis.

**D-0003-09-O. PATRÓN DE RECONOCIMIENTO ANTIGÉNICO DE LAS CÉLULAS B GENERADAS EN LOS FOLÍCULOS LINFOIDES INTRATIROIDALES. M.P. Armengol, M. Juan, R. Pujol-Borrell.** Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i el Diagnòstic (LIRAD). Centre de Transfusions i Banc de Teixit. Hosp. Univ. Germans Trias i Pujol (Badalona), Universitat Autònoma de Barcelona (Barcelona).

El rol de los folículos linfoides intratiroides (LFs) en la generación de células B autoreactivas y su contribución a los anticuerpos antitiroides circulantes es poco conocido. Para dilucidarlo, hemos estudiado el reconocimiento de antígenos biotinados (tiroglobulina (Tg) y peroxidasa tiroidal (TPO)) sobre 44 LFs en secciones de criostato de enfermos de Graves-Basedow y Hashimoto, analizando la especificidad de los linfocitos B intratiroidales mediante técnica de «over-lay». En ambas enfermedades se distinguen dos tipos celulares: unas células pequeñas con marcage de membrana (linfocitos B) localizados en el área de células B del LF y otras células grandes con una fuerte tinción citoplasmática (células plasmáticas) distribuidas aleatoriamente alrededor de los folículos y también en los infiltrados sin estructura. Mayoritariamente, las células reconocidas son IgG<sup>+</sup> aunque existe una proporción menor de IgM<sup>+</sup>. En los enfermos de Hashimoto, 16 de 28

LFs son Tg+, 17 de 27 son TPO+ y 5 de 28 son Tg+TPO+. En los pacientes de Graves-Basedow, 7 de 16 LFs són Tg+, 8 de 21 son TPO+, 2 de 16 son Tg+TPO+ y 3 de 16 no son reconocidos por ninguno de los antígenos utilizados. Proporciones similares se han confirmado por FACS en células B intratiroidales y en linfocitos B transformados con el EBV. Para cuantificar el porcentaje de linfocitos que reconocen específicamente autoantígenos tiroideos, hemos generado heterohibridomas por fusión de linfocitos B con la línea heterohíbrida. A partir de 14 líneas que mantenían la secreción de Ig superior a 75 ng/ml, se han

generado clones de los que se ha estudiado su reactividad contra Tg y TPO mediante ELISA. 4/40 y 11/40 clones reconocen Tg y TPO respectivamente, 4/40 reconocen ambos autoantígenos y 21/40 son Tg-TPO-. En la actualidad se están llevando a cabo experimentos similares utilizando el TSRH como autoantígeno. Los resultados indican que las células B producen anticuerpos específicos de antígenos tiroideos en los LFs intratiroidales, pudiendo tanto los autoanticuerpos como los linfocitos B participar activamente en la patogenia de la enfermedad.

## D-0006. Células NK y células T citotóxicas

**Moderadores:** José Peña Martínez (Córdoba), Manuel Santamaría Ossorio (Córdoba)

D-0006-01-O. EL GEN KIR3DP1 ES TRANSCRIPCIONALMENTE ACTIVO EN ALGUNOS INDIVIDUOS. N. Gómez Lozano<sup>1</sup>, E. Estefanía<sup>1</sup>, F. Williams<sup>2</sup>, I. Halfpenny<sup>2</sup>, D. Middleton<sup>2</sup>, R. Solís<sup>1</sup>, C. Vilches<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio Inmunología, H. U. Puerta de Hierro, Madrid, España. <sup>2</sup>City Hospital, Belfast, Irlanda del Norte, Reino Unido.

Los receptores KIR (Killer-cell Ig-like receptors) regulan la respuesta de las células NK a través del reconocimiento de moléculas HLA de clase I. Los quince genes y dos pseudogenes que codifican para estos receptores están agrupados en el complejo génico LRC (Leukocyte Receptor Cluster) situado en la región cromosómica 19q13.4. Este complejo ha sufrido múltiples recombinaciones asimétricas debido a la similitud estructural de los genes KIR, su disposición cabezala y la corta distancia intergénica. En consecuencia, la organización, el número y la identidad de los genes KIR varía entre distintos individuos. No obstante, están bien conservados los genes situados en los extremos del complejo (KIR3DL3 y KIR3DL2) y en su centro (KIR3DP1-KIR2DL4-KIR3DL/S1).

KIR3DP1 es un gen truncado (carece de exones para las porciones transmembrana y citoplásmica) y normalmente no transcrito, debido probablemente a ciertos polimorfismos de su región promotora. En este trabajo identificamos una nueva variante química de KIR3DP1, en la que la región promotora y el exón 1 (péptido señal) han sido sustituidos por los del gen KIR2DL5A. La nueva variante se asocia a una duplicación del grupo de genes KIR3DP1-KIR2DL4-KIR3DL/S1 y se detecta en, aproximadamente, el 5% de la población española.

Dado que la nueva variante de KIR3DP1 posee una región promotora idéntica a la de un gen funcional, razonamos que dicha variante podría ser expresada. Para probar esta hipótesis, realizamos análisis por RT-PCR con cebadores para KIR3DP1, encontrando producto de amplificación únicamente en los individuos con la forma recombinante. Mediante RACE obtuvimos el cDNA completo de KIR3DP1, cuyo análisis muestra que su mRNA se procesa de manera análoga a los transcritos de los KIR con 3 dominios extracelulares. Su último exón (tercer dominio extracelular), se une a un exón críptico de ~370 pb derivado de la región intergénica situada entre KIR3DP1 y KIR2DL4. De ser traducido, el mRNA de KIR3DP1 codificaría para una proteína con 3 dominios tipo Ig, seguidos por una corta cola rica en aminoácidos cargados.

D-0006-02-O. INFECCIÓN POR HSV-1: ANÁLISIS DE LA DIVERSIDAD KIR Y HLA. E. Estefanía<sup>1</sup>, N. Gómez-Lozano<sup>1</sup>, S. Sepúlveda<sup>1</sup>, R. Solís<sup>1</sup>, R. de Pablo<sup>1</sup>, F. Portero<sup>2</sup>, G. Roustán<sup>3</sup>, M. Vaquero<sup>4</sup>, C. Vilches<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología, <sup>2</sup>Microbiología, <sup>3</sup>Dermatología y <sup>4</sup>Oftalmología. H.U. Puerta de Hierro. Madrid.

La infección por Herpes simplex tipo 1 (HSV-1) muestra una elevada prevalencia en la población. Esta infección se manifiesta de distintas formas, variando desde individuos asintomáticos a otros que sufren episodios ocasionales o recurrentes que afectan a piel y/o mucosas, o formas más complicadas (queratitis, encefalitis y eritema multiforme). Estas distintas formas de presentación sugieren la implicación de diferencias genéticas. Unos buenos candidatos para explicar estas diferencias son los receptores KIR y sus ligandos HLA, ya que su interacción regula la actividad de las células NK frente a células infectadas por virus. Ambos tipos de molécula se caracterizan por una gran diversidad genética, debida tanto a polimorfismo alélico como, en el caso de los KIR, al número de genes presentes en cada haplotipo. Además, las moléculas HLA son objeto de sabotaje en células infectadas por HSV-1, y experimentos realizados in vitro involucran a los KIR en la respuesta inmune frente a HSV-1.

Nuestro objetivo es determinar si el polimorfismo de los genes KIR y HLA influye en la defensa frente a HSV-1. Para ello hemos estudiado donantes voluntarios, que son clasificados en distintos grupos en función de la presencia o ausencia de sintomatología relacionada con la infección, del número de episodios y de la existencia de complicaciones. Se han recogido muestras de sangre de todos los donantes, en las que determinamos presencia o ausencia de anticuerpos frente a HSV y, mediante PCR, los genotipos KIR y HLA de clase I. En cada uno de los grupos de pacientes mencionados, se mostrará la distribución de los genes KIR, de sus ligandos y del número de parejas funcionales KIR:HLA.

D-0006-03-O. LA INHIBICIÓN DE LA ACTIVIDAD CITOTÓXICA DE CÉLULAS NK POR CD1d ES DEPENDIENTE DE LIGANDO. Y. Campos-Martín, M. Gómez del Moral, B. Gozalbo-López, J. Suela, E. Martínez-Naves. Dpto. Inmunología, Facultad de Medicina de la U.C.M., Madrid.



El sistema CD1 codifica varias proteínas pertenecientes a la familia MHC de clase I «no clásicas» que se dividen en dos grupos. Las de grupo I: CD1-a,-b y -c presentan lípidos bacterianos a células T y pueden inhibir la actividad citotóxica de células NK en humanos. Las de grupo II: CD1d presentan antígenos ( $\alpha$ -GalCer) a células NKT.

**Objetivo.** Investigar si la molécula CD1d inhibe la actividad citotóxica de células NK en humanos y estudiar el efecto de antígenos lipídicos presentados por CD1d.

**Metodología.** Como células diana utilizamos las líneas L721.221 y C1R transfectadas con CD1d humano. Las células efectoras fueron: 1) PBMCs, 2) Células CD56+CD3- aisladas de PBMC, 3) Líneas celulares T CD8+ inmortalizadas con Herpesvirus Saimiri (HVS), con actividad NK y 4) La línea celular NKL. La actividad citotóxica se midió por el test no radiactivo de detección de LDH en sobrenadante.

**Resultados:** Todas las células efectoras mostraron citotoxicidad natural frente a las líneas Mock.221 y Mock.C1R. Esta citotoxicidad se vio disminuida de modo estadísticamente significativo en todos los casos frente a las líneas CD1d.221, B48.221 y CD1a.221 y CD1d.C1R. La especificidad en la inhibición de la citotoxicidad se comprobó bloqueando el efecto con el fragmento F(ab')<sub>2</sub> de anticuerpos anti-CD1d humano. También estudiamos el efecto de diferentes ligandos lipídicos para CD1d. Observamos que la preincubación de células dianas CD1d+ con  $\alpha$ -GalCer y  $\beta$ -GalCer anula el efecto protector de CD1d en nuestros ensayos de citotoxicidad de forma estadísticamente significativa. Este efecto no fue observado con otros lípidos como el ácido micólico, que se une a CD1b, pero no a CD1d. Además, tetrámeros de CD1d cargados con  $\alpha$ -GalCer no tiñen nuestras células efectoras, aunque si lo hacen, como es esperable, las células NKT.

Nuestros resultados sugieren que las células NK poseerían un receptor, que reconoce CD1d unido a un glicolípido endógeno e inhibe la actividad citotóxica. Este receptor no sería capaz de reconocer CD1d cargado con  $\alpha$ -GalCer o  $\beta$ -GalCer.

D-0006-04-O. COMPLEJOS DE CÉLULAS NK Y CÉLULAS DENDRÍTICAS EN LA DECIDUA HUMANA. I. Tirado, R. Muñoz Fernández, M. Kimatrai, O. Blanco, F. Martín, E. García Olivares. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Granada.

**Introducción.** La decidua es el tejido materno en íntimo contacto con el trofoblasto fetal. Durante el embarazo normal se desarrollan a nivel de la decidua, mecanismos de tolerancia inmunológica de la madre hacia el feto; mientras que en el aborto espontáneo, se activan mecanismos de reacción inmunológica que lesionan el trofoblasto. Así, en el embarazo normal hay una producción local de citoquinas Th2; sin embargo, en el aborto espontáneo hay una producción de citoquinas Th1. Las células dendríticas (DC, dendritic cells) deciduales probablemente son las responsables de la diferenciación hacia Th1 o Th2. Nosotros hemos observado la formación de conjugados de células NK y DC en la decidua humana normal.

**Objetivos.** En el presente trabajo se han estudiado estos conjugados y su posible significado

**Métodos.** La conjugados NK-DC han sido estudiados mediante citometría de flujo utilizando anticuerpos monoclonales frente CD56, que identifica las NK deciduales y DC-SING, que identifica las DC. Las células en apoptosis han sido detectadas mediante la técnica TUNEL.

**Resultados.** Hemos observado una proporción de las DC (DC-SING+) que formaban conjugados con las NK (CD56+). Se detectó,

además, que mientras que una proporción significativa de las DC se encontraban en apoptosis, las NK no lo estaban.

**Conclusiones.** De estos resultados podemos inferir que la formación de conjugados NK-DC tiene como consecuencia que las NK inducen apoptosis a las DC. Esto evitaría que las DC emigraran a los órganos linfoides locales para inducir la activación de Th1, lo que determinaría el inicio del aborto espontáneo. Por otra parte, las DC desviarían a las NK de un posible ataque al trofoblasto. La muerte de las DC y el bloqueo de las NK pueden constituir un importante mecanismo en la tolerancia materno-fetal.

D-0006-05-C. AUMENTO DE CÉLULAS NK (CD56+CD3-) EN PACIENTES CON ABORTO DE REPETICIÓN DE CAUSA DESCONOCIDA. J. Carbone, E. Sarmiento, D. Micheloud, J. Gil, E. Fernández-Cruz. Unidad de Inmunología Clínica. Inmunología Reproductiva. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

**Introducción.** La modulación inmune local es importante para el mantenimiento de la gestación. La mayoría de los linfocitos que migran de la médula ósea materna a la decidua son linfocitos grandes granulares (LGL). Algunas células NK pueden producir citoquinas tipo Th1 como IL-2, IFN-gamma y TNF alfa, implicadas en la patogenia del aborto recurrente.

**Pacientes y métodos.** Realizamos un estudio transversal de la prevalencia de niveles aumentados de células NK en pacientes con aborto recurrente de causa desconocida. De un total de 261 pacientes con aborto recurrente de la Unidad de Inmunología Clínica, se realizó estudio de subpoblaciones T (CD3+CD4+, CD3+CD8+), B (CD19+) y NK (CD56+CD3-) por citometría de flujo de tres colores en 87 pacientes. Como puntos de corte utilizamos datos de la literatura que demuestran que niveles por encima del 12% de células CD56+CD3- se asocian a mayor riesgo de aborto y mayores del 18% con alto riesgo de aborto.

**Resultados.** La media del porcentaje de células CD56+CD3- en las pacientes fue de  $11.36 \pm EEM 0.57$  con una mediana del 10% y rango de 3-27%. En cifras absolutas la media fue de  $205 \pm 11$  células/mm<sup>3</sup>, mediana 180 células/mm<sup>3</sup>, rango 50-594 células/mm<sup>3</sup>. 30 (34.5%) pacientes tenían niveles mayores al 12% y 9 (10.3%) mayores al 18%. Las pacientes con más del 12% de células CD56+CD3- tuvieron una media de abortos de menos de 10 semanas significativamente mayor que aquellas con un porcentaje menor del 12% (3,5 vs 1,8,  $p=0.024$ ).

**Conclusiones.** El nivel aumentado de células NK (CD56+CD3-) podría ser un indicador de aborto de causa aloinmune en mujeres con aborto recurrente.

D-0006-06-C. EXPRESION DE NK-R EN LAS POBLACIONES MEMORIA DE CÉLULAS T CITOTÓXICAS DE INDIVIDUOS SANOS. I. Gayoso, O. DelaRosa, E. Peralbo, J.G. Casado, M.L. Pita, M. Ramirez, R. Tarazona, R. Solana. Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología. Sección Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía.órdoba.

**Introducción.** Estudios previos en este laboratorio han demostrado el incremento en la expresión de marcadores NK en las poblaciones CD8brillantes en comparación con las CD4+. Otros autores han definido distintos estadios de diferenciación hacia células memoria,

según la expresión del marcador de superficie CD45RA y el receptor de quimioquinas CCR7 en cuatro grupos: naive, memoria central, memoria efector y efector.

**Objetivo.** Análisis de la expresión de CD56, CD16, NKB1, CD94, CD158b, ILT-2 CD244 y perforina intracelular en los diferentes estadios de diferenciación de la población CD8brillante.

**Resultados.** En este trabajo encontramos cambios en la distribución de las poblaciones de diferenciación hacia memoria entre células T CD8brillantes y T CD4+. En células CD8brillantes de individuos sanos el marcador de citotoxicidad CD244 estaba expresado de forma mayoritaria en la población memoria efectora (CCR7-CD45RA-), mientras que la expresión de CD56, CD94, CD158b e ILT-2 fue mayor en la población efectora (CCR7-CD45RA+) y mínima en la población naive (CCR7+CD45RA+). No se encontró la misma distribución en el análisis de CD16 y NKB1. La expresión del marcador de activación CD69 fue mínima en la población efectora. Así, encontramos un incremento en la expresión de la mayoría de los NK-R desde la población naive y memoria central hacia memoria efectora y efectora.

**Conclusiones.** La expresión de NK-R en células T CD8brillante está principalmente restringida a la subpoblación de células efectoras citotóxicas, y en una menor proporción a la subpoblación memoria efectora. Por el contrario la expresión de CD244 está particularmente incrementada en la población de células T memoria efectora.

La expresión diferencial de NK-R en la subpoblación CD8brillante en los diferentes estadios de diferenciación, contribuye a explicar las alteraciones en la expresión de estos receptores en las distintas situaciones clínicas de activación crónica del Sistema Inmune (envejecimiento, enfermedades autoinmunes y cáncer).

D-0006-07-O. **CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE CÉLULAS NKT  $V\alpha 24+$   $V\beta 11+$  EXPANDIDAS IN VITRO.** E. Peralbo1, O. de la Rosa1, Y. Campos-Martín2, JG. Casado3, R. Tarazona3, J. Peña1, E. Martínez Naves2, R. Solana1. 1Dpto. de Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba. 2Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina de la UCM. Madrid. 3Dpto. de Inmunología. Facultad de Veterinaria. Cáceres.

Las células NKT son células  $T\alpha\beta$  que coexpresan receptores NK (NKR) y un TCR constituido en humanos por una cadena  $\alpha V\alpha 24$ - $J\alpha Q$  asociada preferentemente a la cadena  $V\beta 11$ . Éste reconoce antígenos glucolipídicos, como la  $\alpha$ -galactosilceramida ( $\alpha$ -GalCer), presentados por la molécula CD1d. Tras su activación producen IL4 e IFN- $\gamma$  y presentan actividad citotóxica.

El objetivo es establecer un sistema de expansión in vitro de células NKT  $V\alpha 24+$   $V\beta 11+$  de sangre periférica y estudiar alteraciones fenotípicas y mecanismos de lisis.

Para la expansión de las células NKT, PBMCs de donantes sanos fueron cultivados in vitro con  $\alpha$ -GalCer e IL2 durante varias semanas, analizando cada 7 días la expresión de CD28, CD161, CD94, C1.7 y CD85. En otro modelo, tras 14 días de cultivo de los PBMCs, las células NKT fueron purificadas y expandidas in vitro con IL2 reestimulando cada 7 días con células 221 transfectadas con CD1d incubadas con  $\alpha$ -GalCer e irradiadas, estas células se utilizaron como efectoras en ensayos de lisis donde las dianas fueron las líneas celulares 221 CD1d+ y 221 Mock y U937 negativas para CD1d.

**Resultados y conclusión.** En ambos sistemas las células NKT  $V\alpha 24+$   $V\beta 11+$  se expandieron significativamente. En el primer

modelo las células NKT expandidas fueron preferentemente CD4+ y CD4-CD8- (DN), la expresión de NKR fue mayoritaria en las células DN y la expresión de CD28 disminuyó. La expansión con 221-CD1d+ favoreció sólo el fenotipo CD4+. En la lisis, las células NKT no mostraron actividad citotóxica frente a las células 221 Mock y U937, pero sí frente a las 221-CD1d+, aunque las células preincubadas con  $\alpha$ -GalCer fueron más sensibles a la lisis, por lo que en este modelo la actividad citotóxica de las células NKT es dependiente de la interacción TCR-CD1d y se ve incrementada por la presencia de  $\alpha$ -GalCer.

Hemos desarrollado así un sistema de expansión in vitro de células NKT que nos permitirá profundizar en las características fenotípicas y funcionales de las mismas.

D-0006-08-O. **REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE NKG2D EN LINFOCITOS T CD8+ HUMANOS ACTIVADOS.** P. Romero, C. Ortega, A. García de Vinuesa, A. Palma, C. Román, R. Gonzalez, M. Santamaría. Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Fac. de Medicina. U. de Córdoba. Serv. de Inmunología. H.U. Reina Sofía. Córdoba.

NKG2D es un miembro de la familia NKG2 cuya homología con el resto de genes NKG2 esta limitada al 20-30%. A diferencia del resto no se une a CD94 y sus ligandos son las moléculas MICA, MICB, RAE y ULP. NKG2D es expresado en células NK, LT CD8+ TCRab+ y en determinadas patologías en LT CD4+. En los últimos años, numerosos estudios, han demostrado el papel regulador que diferentes citoquinas (IL-10, IL-12, IL-15 o TGF- $\beta$ 1) ejercen sobre la expresión de moléculas NKG2 (NKG2A), en la superficie de los linfocitos T. Sin embargo, hasta el momento los factores que la regulación de la expresión de NKG2D en este mismo compartimento celular, no han sido plenamente aclarados. Así, hasta el momento, solo se conoce que IL-15 induce su expresión en células NK y LT CD8+ de biopsias yeyunales y no existen evidencias de que su expresión en células T pueda ser down-regulada. Con objeto de ampliar el conocimiento sobre los factores que regulan la expresión de NKG2D en LT, hemos analizado el papel que diferentes citoquinas ejercen sobre la expresión de NKG2D en LT CD8+ humanos de sangre periférica. El análisis de los resultados, muestra que mientras que IL-10 e IL-15 aumentan la expresión de NKG2D en LT CD8+ activados mediante OKT3, IL-12 inhibe significativamente la expresión de NKG2D en la membrana celular.

D-0006-09-O. **CARACTERIZACIÓN DE LÍNEAS T/NK OBTENIDAS A PARTIR DE LOCALIZACIONES EMBRIONARIAS TEMPRANAS DEL EMBRIÓN DE RATÓN.** P. Gonzalo, P. Muñoz-Pacheco, B. de Andrés, D. Meleiro, I. Cortegano, PG. Soro, M.A.R. Marcos, M.L. Gaspar. Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III. Majadahonda, Madrid.

En estudios anteriores describimos el establecimiento in vitro de líneas celulares polarizadas, asimilables según los estudios preliminares a linaje NK, T/NK. Se obtuvieron a partir de localizaciones embrionarias tempranas. El saco vitelino de 9 dpc es la primera estructura capaz de diferenciar a este linaje, aunque a medida que se avanza en la gestación se establecen también a partir de Ep/AGM, hígado, bazo, timo y sangre fetales.

El objetivo fue ampliar la caracterización preliminar de las líneas con el fin de concretar su fenotipo y desarrollo en cultivo en relación con diversos factores (estroma y/o factores solubles).

Se utilizó como herramienta básica la citometría de flujo analítica, vital en la caracterización fenotípica de estas líneas. Los análisis citométricos mostraron poblaciones  $\alpha$ TCR+, CD3 $\epsilon$ +, V $\beta$ 11+, tetrámero ( $\alpha$ Gal-Cer-CD1d)+, NK.1.1+, Pan NK+. Para evaluar el establecimiento de estas líneas se analizaron diversas condiciones de cultivo; 1. IL-7, 2. Expansión con Flt3-L, SCF, IL-7, seguido de IL-2, o IL-15. 3. Sobre monocapa estromal, suplementada con a) IL-7, b) IL-7+IL-2, c) IL-2, d) IL-15. Los estudios de expansión celular sólo se analizaron en cultivos con estroma suplementado con IL-7 versus IL-7+IL-2. Los resultados demuestran que el establecimiento de estas líneas celulares depende directamente del componente estromal, aunque su posterior mantenimiento es estroma-independiente. Las citoquinas IL-2 y IL-15 no aumentan el rescate de progenitores T/NK versus a la IL-7 sola, aunque la IL-2 provoca un aumento en la expansión de clones ya establecidos. En los cultivos con Flt3-L, SCF, IL-7 se aumenta la diferenciación, sobre todo a partir de poblaciones de 11 dpc en adelante.

En conclusión este trabajo ha caracterizado en detalle el establecimiento y desarrollo a largo plazo de líneas celulares polarizadas, detallando las condiciones óptimas de cultivo, así como las características fenotípicas que han servido para clasificarlas como líneas pertenecientes a linaje T/NK.

D-0006-10-O. EXPANSIÓN DE LAS POBLACIONES MEMORIA EFECTORA Y EFECTORA EN LAS CÉLULAS T CITOTÓXICAS DE ANCIANOS. O. DelaRosa, E. Peralbo, J.G. Casado, Tarazona, R. Solana. Departamento de Biología celular, Fisiología e Inmunología. Sección Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía. Córdoba.

Introducción. Estudios previos han confirmado la expansión de la población CD8brillanteCD28- en individuos ancianos. Dicha población ha sido caracterizada como una población citotóxica-efectora, con telómero corto y resistente a la apoptosis. Se han definido diferentes estadios de diferenciación dentro de las poblaciones memoria utilizando el marcador de superficie CD45RA y el receptor de quimioquinas CCR7.

Objetivo. Estudio fenotípico de los estadios de diferenciación hacia células memoria de la población CD8brillanteCD28- en individuos jóvenes y en ancianos sanos, mediante el uso de CD45RA y CCR7 para definir las poblaciones, naive, memoria central, memoria efectora y efectora.

Metodología. A partir de linfocitos de sangre periférica de individuos jóvenes y ancianos sanos, se realizó cuádruple fluorescencia utilizando anticuerpos monoclonales contra CD8, CD28, CCR7 y CD45RA.

Resultados. Los resultados mostraron que, tanto en individuos jóvenes como en ancianos, la población CD8brillanteCD28- de linfocitos T no presentaba expresión del receptor de quimioquinas CCR7, definiéndose así dos estadios de diferenciación dentro de esta población: población memoria efectora (CD8+CD28-CCR7+CD45RA-) y efectora (CD8+CD28-CCR7-CD45RA+). Asociado al envejecimiento, encontramos un incremento significativo en el porcentaje de ambas pobla-

ciones memoria efectora y efectora que, cuando fue expresado en número de células por millón de células T CD8brillantes demostró una expansión significativa de la población memoria efectora en ancianos.

Conclusiones. Los resultados demuestran que el incremento de células T CD8brillanteCD28- encontrado en ancianos es debido a una expansión de las poblaciones memoria efectora y efectora.

El estudio cuantitativo de estas células demuestra que si bien ambas poblaciones están incrementadas en ancianos en comparación con jóvenes, el incremento observado en ancianos es debido prioritariamente a la expansión de células con fenotipo memoria efector más que al incremento de células memoria.

D-0006-11-C. LA EXPRESIÓN DEL ANTÍGENO CD27 SEGREGA A LAS CÉLULAS T CD8 CON DIFERENTES PATRONES DE PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS. H. Barceñilla1, A. Prieto1, D. Díaz1, M.A. Sánchez1, P. Prieto1, J. Montserrat1, A. Orfao2, A. de la Hera2, M. Álvarez Mon-Soto1, 3. 1Departamento de Medicina, Unidad Asociada al CSIC, University of Alcalá, Alcalá de Henares, Madrid. 2Unidad de Citometría de flujo, Centro de Investigación del Cáncer y Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca, Salamanca. 3Servicio de Oncología y Enfermedades del Sistema inmunitario, Hospital Universitario «Príncipe de Asturias», Alcalá de Henares, Madrid.

Introducción. En los últimos años se ha reconocido la heterogeneidad de las respuestas secretoras de los linfocitos T.

Objetivos. Nos preguntamos si diferentes subpoblaciones de células T, definidas por su expresión del antígeno CD27, tienen diferente patrón de secreción de citoquinas.

Materiales y Métodos. Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica de donantes sanos y fueron cultivados 24 o 72 horas en medio con o sin micropartículas recubiertas de anticuerpos anti-CD3 y anti-CD28. Después del cultivo, las células se marcaron con anticuerpos monoclonales. Se llevó a cabo un marcaje intracelular para IL-2, INF $\gamma$  y TNF $\alpha$  y los porcentajes de células que expresan citoquinas de cada subpoblación de células T fueron medidos por citometría de flujo.

Resultados. Los porcentajes de células productoras de IL-2 en las subpoblaciones CD45RA+ y CD45RO+ fueron mayores en las células T CD8 que expresaban CD27 que en las que no lo expresaban. El porcentaje de células productoras de TNF $\alpha$  fue mayor en todas las subpoblaciones T CD8+CD27- estudiadas con la única excepción de las células CD8+CD45RO+ a 72 horas de cultivo con micropartículas recubiertas de anti-CD3 y anti-CD28. En las células T CD4+, el porcentaje de células productoras de TNF $\alpha$  fue mayor en las células CD27- con la única excepción de las células CD27-CD45RO+ a 72 horas de cultivo cuyo porcentaje estuvo disminuido respecto a las células CD27+CD45RO+. El porcentaje de células productoras de INF $\gamma$  fue mayor en todas las subpoblaciones T CD8+CD27-.

Conclusiones. La expresión del marcador CD27 en los linfocitos T segrega a las células en diferentes estados de activación que implican diferentes patrones de producción de citoquinas. Las células que expresan CD27 en la subpoblación CD8 tienden a producir IL-2 pero producen menos TNF $\alpha$  e INF $\gamma$ . Estas diferencias son sólo claras para TNF $\alpha$  en la subpoblación CD4+CD45RA+.

## F-0009–F-0010. Respuesta inmunitaria contra patógenos

**Moderadores:** Carmen Álvarez Domínguez (Santander), Manuel Fresno Escudero (Cantoblanco)

**F-0009-01-C. REPERCUSIÓN DE LOS CAMBIOS ESTRUCTURALES DEL LIPOPOLISACÁRIDO EN LA INTERACCIÓN CON EL SISTEMA INMUNE INNATO.** C. Pérez-Gutiérrez<sup>1,2,3</sup>, M.D. Arraiza<sup>4</sup>, J. Ferrer<sup>5</sup>, J. Pons<sup>5</sup>, M.A. Campos<sup>1,2,3</sup>, I. Moriyón<sup>4</sup>, J.A. Bengoechea<sup>1,2,3</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Investigación, Hospital Son Dureta. <sup>2</sup>Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS). <sup>3</sup>Àrea de Microbiologia, Dpto. de Biologia, Universitat de les Illes Balears. <sup>4</sup>Dpto. de Microbiologia, Universitat de Navarra. <sup>5</sup>Serv. de Inmunologia, Hospital Son Dureta.

**Introducción.** El sistema inmune innato representa la primera barrera frente a las infecciones. La activación de este sistema se basa en el reconocimiento celular de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), siendo el lipopolisacárido (LPS) uno de los PAMPs más importantes. Además, el PAMP del LPS también es la diana de dos de las armas más importantes del sistema innato: los péptidos antimicrobianos y el sistema del complemento. Por tanto, es razonable postular que variaciones en el PAMP del LPS afectarían a la interacción con los elementos del sistema innato. Además, el grado de virulencia de los microorganismos patógenos puede estar relacionado con el grado de activación del sistema innato.

**Objetivos.** Para comprobar esta hipótesis determinaremos la interacción entre el sistema innato y distintos LPSs pertenecientes a tres especies del género *Yersinia*. Teniendo en cuenta que la especie menos virulenta es *Y. enterocolitica* seguida de *Y. pseudotuberculosis* y *Y. pestis*.

**Métodos.** Se cuantificó por HPLC la unión de péptido antimicrobiano, polimixina B, al LPS. Se determinó la capacidad de los distintos LPSs de activar la cascada del complemento en ausencia de anticuerpos (actividad «anti-complementaria»). La secreción de citoquinas inflamatorias se tomó como medida de la activación de monocitos por los LPSs (2,2 pmol de LPS por ml).

**Resultados.** La cantidad de polimixina B unida por el LPS de *Y. enterocolitica* fue el doble que la unida por los LPSs de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*. Esto se correlacionó con la sensibilidad de las tres especies a este péptido antimicrobiano. La actividad anticomplementaria del LPS de *Y. enterocolitica* fue significativamente mayor ( $p < 0.05$ ) que la de los LPSs de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis*. Finalmente, el LPS de *Y. enterocolitica* indujo mayor cantidad de TNF $\alpha$  ( $400 \pm 80$  pg/ml) e IL-6 ( $20 \pm 5$  ng/ml) que el LPS de *Y. pseudotuberculosis* ( $20 \pm 3$  pg/ml y  $5 \pm 2$  ng/ml respectivamente). El LPS de *Y. pestis* no indujo la liberación de estas citoquinas.

**Conclusiones.** El PAMP de los LPSs de *Y. pestis* y *Y. pseudotuberculosis* no es tan eficazmente reconocido por los elementos del sistema innato como el de *Y. enterocolitica*. Este hecho se correlaciona con la virulencia de estas especies.

**F-0009-02-O. PAPEL DE LBP, CD14 Y TOLL-LIKE RECEPTORS EN LA INTERACCIÓN ENTRE EL EPITELIO PULMONAR Y PATÓGENOS GRAM-NEGATIVOS.** M.A. Campos<sup>1,2,3</sup>, V. Regueiro<sup>1,2</sup>, C.M. Llompert<sup>1,2</sup>, C. Pérez Gutiérrez<sup>1,2,3</sup>, J.A. Bengoechea<sup>1,2,3</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Investigación, Hospital Universitario Son Dureta. <sup>2</sup>Institut Universitari d'Investigacions en Ciències de la Salut (IUNICS). <sup>3</sup>Àrea de Microbiologia, Dpto. de Biologia, Universitat de les Illes Balears, Illes Balears.

**Introducción.** El tracto respiratorio es una de las superficies corporales que recibe un mayor número de agresiones externas siendo el epitelio pulmonar la primera barrera defensiva. Sin embargo, todavía no están claros los mecanismos moleculares que utiliza este epitelio para detectar infecciones.

Se sabe que los receptores «Toll-like» (TLRs) están implicados en el reconocimiento de los microorganismos patógenos, y que otras proteínas accesorias facilitan este reconocimiento: LBP, CD14 y MD-2. Estas últimas, junto con el TLR-4, participan en el reconocimiento del lipopolisacárido.

**Objetivos.** Determinar los receptores expresados por las células epiteliales pulmonares para la detección de microorganismos patógenos y estudiar el papel de estos receptores en la detección de un típico patógeno Gram-negativo causante de neumonías como es *Klebsiella pneumoniae*.

**Métodos.** Como modelo de célula alveolar de tipo II hemos utilizado la línea A549. La expresión de receptores se estudió mediante citometría de flujo y RT-PCR semi-cuantitativa. La producción de IL-8 se utilizó como marcador de activación celular y se cuantificó por ELISA.

**Resultados.** Las células A549 expresan en su superficie TLR2, TLR4 y MD-2, pero no CD14, por lo que no respondieron frente al LPS (agonista TLR-4) y sí frente al peptidoglicano (agonista TLR-2). *Klebsiella pneumoniae* no estimuló la secreción de IL-8 por las células A549. La falta de activación celular fue debida a que el polisacárido capsular enmascara el LPS pues un mutante descapsulado sí activó la secreción de IL-8. Cuando la infección con el mutante descapsulado se realizó en presencia de LBP ó CD14 se incrementó la secreción de IL-8. Experimentos de bloqueo demostraron que tanto TLR-2 como TLR-4 fueron necesarios para la activación celular.

**Conclusiones.** Las células A549 expresan TLR-2 y TLR-4 pero no CD14 y por ello no responden eficazmente frente al LPS pero sí frente al peptidoglicano. La presencia de cápsula en la superficie de *Klebsiella pneumoniae* evita la secreción de IL-8 por las células epiteliales.

**F-0009-03-O. LA INTERNALIZACIÓN DE PATÓGENOS GRAM-NEGATIVOS DESENCADENA UNA RESPUESTA INFLAMATORIA EN LAS CÉLULAS EPITELIALES PULMONARES.** V. Regueiro, J. Pons, M. A. Campos, J. A. Bengoechea. Unidad de Investigación, Hospital Son Dureta, Institut Universitari en Ciències de la Salut (IUNICS), Palma Mallorca.

**Introducción.** El tracto respiratorio es una de las superficies humanas más amplias en contacto con el medio externo.

Trabajos anteriores han puesto de manifiesto que las células epiteliales pulmonares participan activamente en la defensa del pulmón. Sin embargo, todavía son poco conocidos qué mecanismos defensivos activa el epitelio frente a las infecciones así como cuales son las vías de señalización intracelular son activadas tras una infección.

**Objetivos.** Estudiar qué respuestas activan las células epiteliales pulmonares tras una infección con *Klebsiella pneumoniae* y *Haemophilus influenzae*, patógenos asociados con infecciones del tracto res-

piratorio, y determinar cuáles son los mecanismos moleculares utilizados.

**Métodos.** Se utilizó la línea celular A549 representativa de los neumocitos de tipo II. La secreción de citoquinas se cuantificó mediante ELISA. La expresión de CD54 (ICAM-1) se determinó por citometría de flujo. La activación del factor NF- $\kappa$ B se estudió mediante EMSA. La expresión de I $\kappa$ B $\alpha$  se determinó mediante Western blot.

**Resultados.** Tanto *K. pneumoniae* como *H. influenzae* activaron una respuesta inflamatoria en células A549 caracterizada por un aumento en la expresión de CD54 y la secreción de IL-8 pero no otras citoquinas (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , e IL-6). Experimentos de invasión demostraron que ambas bacterias eran internalizadas por las células A549 y utilizando citocalasina D, un inhibidor de la fagocitosis, comprobamos que sólo las bacterias internalizadas fueron las responsables del incremento en la expresión de CD54 y la secreción de IL-8.

La infección también causó la degradación de I $\kappa$ B $\alpha$  con la consecuente translocación al núcleo del factor NF- $\kappa$ B. Finalmente, constatamos que en presencia de un inhibidor de la activación de NF- $\kappa$ B no se incrementó la expresión de CD54 tras la infección.

**Conclusiones.** La internalización de patógenos por las células A549 incrementa la expresión de CD54, causa la secreción de IL-8 así como la activación de NF- $\kappa$ B.

**F-0009-04-O. LA CONEXIÓN STAT1-RAB5a ES RESPONSABLE DE LA ELIMINACIÓN INTRAFAGOSOMAL DE *Listeria monocytogenes*.** C. Peña Macarro, E. del Cerro Vadillo, L. Fernandez Prieto, F. Leyva-Cobian, E. Carrasco Marín, C. Alvarez Dominguez. Servicio de Inmunología. HUMV. Santander. Cantabria.

La señal listericida inducida por IFN- $\gamma$  está controlada por Rab5a que participa en dos mecanismos eficaces contra *Listeria monocytogenes* (LM): (i) el regulado por Rac2 induciendo la Phox y (ii) el regulado por la acción lisosomal de catepsina-D. Ambos mecanismos son importantes a nivel fagosomal para impedir el escape de la bacteria al citosol. TNF, IL-6, IL-10 e IL-12 son importantes *in vivo* para la resistencia frente a éste patógeno por ello en este estudio se abordará si la capacidad listericida de éstas linfocinas está también controlada por Rab5a. El análisis se correlacionará con la viabilidad intrafagosomal dependiente o no de catepsina-D (en presencia del inhibidor de ésta, cloroquina) y con la activación de la Phox (producción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Se utilizarán técnicas convencionales para obtener fagosomas, la activación de Rab5a y Rac2 se estudiará mediante inmunoprecipitación de sus formas activas y las formas maduras/inmaduras de catepsina-D mediante westerns. La viabilidad intrafagosomal de LM se analizará en los fagosomas por conteo de viables en placas de agar-BHI. Estos datos se correlacionarán con los perfiles de fosforilación/activación de los diferentes Stats característicos de cada citocina y con la presencia de reguladores de señalización: GEF, GAP ó PI3K. Nuestros resultados demuestran que sólo IL-6 e IFN- $\gamma$  están controladas por Rab5a, la cuál controla tanto los mecanismos intrafagosomales oxidativos (i) como los no oxidativos (ii). Stat1 es el mediador de conexión de ambas vías de señalización, encontrándose su presencia en los fagosomas que contienen dicho patógeno. Estos mediadores de conexión entre ambas vías de señalización podrían ser responsables de bloquear factores de virulencia indispensables para la supervivencia del patógeno.

**F-0009-05-O. EVIDENCIA DE LA PRESENCIA DE HERPESVIRUS HUMANO 8 EN EL MIXOMA ATRIAL ESPORÁDICO.** P. Sánchez-Velasco<sup>1</sup>, G. Ocejo Vinyals<sup>1</sup>, R. Flores<sup>2</sup>, J.J. Gómez-Román<sup>3</sup>, J. López de Rego<sup>2</sup>, C. Hornero<sup>1</sup>, F. Val Bernal<sup>3</sup>, F. Leyva-Cobián<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología, y <sup>2</sup>Anatomía Patológica, Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla», Santander; <sup>3</sup>Departamento de Biología Celular, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid.

El herpesvirus humano 8 (HHV-8) contribuye al desarrollo del sarcoma de Kaposi, (KS) (una neoplasia multicéntrica compleja, que consiste en la aparición en la piel, mucosas y vísceras de múltiples nódulos vasculares) y de otras neoplasias (V.g.: los linfomas de cavidades, la enfermedad de Castleman y el tumor miofibroblástico inflamatorio). Una de las principales características del substrato histológico de las lesiones del KS consiste en la proliferación celular y angiogénesis persistente. Hipotéticamente, aquellas enfermedades de etiología no aclarada, donde existe un substrato inflamatorio con angiogénesis, serían candidatas para estudiar sistemáticamente la presencia de DNA de HHV-8. Estas características son compartidas por el mixoma cardíaco, una tumoración benigna de crecimiento muy lento y de etiología desconocida. Se sabe, por otra parte, que la expresión transgénica del receptor acoplado a las proteína G codificado por el HHV-8, induce en el ratón una enfermedad angioproliferativa similar al KS humano y que el HV-68 murino, homólogo del HHV-8, provoca la infección en ratones genéticamente deficientes en el receptor del IFN- $\gamma$ . Los hallazgos preliminares obtenidos parecen indicar que esto es lo que ocurre en el mixoma cardíaco esporádico y esta consideración se basa principalmente en las siguientes observaciones: (i) Mediante técnicas de reacción en cadena de la polimerasa y transferencia tipo Southern, demostramos la presencia de DNA de HHV-8 en casos de mixoma esporádico pero no en el mixoma asociado al complejo de Carney; (ii) estos hallazgos se refuerzan por la demostración inmunohistoquímica de proteínas virales en el tumor; (iii) por la detección mediante microscopía electrónica de partículas virales en las células tumorales y (iv) por elevadas concentraciones de IL-6, VEGF y otras quimiocinas en la sangre circulante de estos pacientes.

**F-0009-06-C. ANÁLISIS COMPARATIVO DE LOS ALELOS Y HAPLOTIPOS HLA DE CLASE II EN TUBERCULOSOS PERTENECIENTES A GRUPOS ÉTNICOS DE TRES CONTINENTES DISTINTOS.** A. García-Martín<sup>1</sup>, P. Sánchez-Velasco<sup>1</sup>, C. Fariñas-Álvarez<sup>2</sup>, F. Leyva-Cobián<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla», Santander.

Aunque la tuberculosis es una de las primeras causas de muerte por enfermedad infecciosa, los factores genéticos del hospedador y que podrían asociarse con la progresión de la enfermedad, no están completamente definidos. En este estudio se ha comparado el perfil de alelos y haplotipos HLA-II en tres poblaciones tuberculosas: Europea (caucasoides de Cantabria, España), africana (población bereber sahariana de Tindouff, Argelia) y americana (población mochica-chimú y mestiza del área de Trujillo, Perú). Los alelos HLA-II de susceptibilidad a tuberculosis encontrados en la población cántabra han sido DRB1\*0301 (OR=1.3, p<0.05), DQA1\*0505 (OR=10.6, p<0.05) y

DQB1\*0202 y DQB1\*0301 (OR=11.6 y 6, respectivamente,  $p<0.05$ ). En la población trujillana los alelos de susceptibilidad han sido DRB1\*1402 (OR=1.8,  $p<0.01$ ), DQA1\*0201 (OR=11,  $p<0.01$ ) y DQB1\*0503 (OR=5,  $p<0.01$ ). La evidencia más llamativa de protección ocurrió con el alelo DRB1\*1301 (OR=0.03-0.04,  $p<0.01$ ) en peruanos y saharianos y con el alelo DQB1\*0603 (OR=0.2-0.3  $p<0.01$ -0.05) en las tres poblaciones consideradas. El haplotipo extendido DRB1\*1301-DQA1\*0103-DQB1\*0603 (OR=0.1,  $p<0.01$ ) podría conferir protección frente a la tuberculosis en las poblaciones peruana y sahariana.

**F-0009-07-C. SUSCEPTIBILIDAD GENÉTICA A LA TUBERCULOSIS: POLIMORFISMOS EN GENES DE LINFOCINAS EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA Y OTRA ANDINA.** A. García-Martín<sup>1</sup>, P. Sánchez-Velasco<sup>1</sup>, C. Fariñas-Álvarez<sup>2</sup>, F. Leyva-Cobián<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas, Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla», Santander.

En este estudio se ha investigado el polimorfismo de una serie de genes de linfocinas para conocer si existen patrones de susceptibilidad o resistencia con esta enfermedad. Las poblaciones estudiadas estaban compuestas de tuberculosos españoles (Cantabria, n=112) y peruanos (Trujillo, n=90) y sus correspondientes controles (n=94 y =82, respectivamente). La susceptibilidad a la tuberculosis en pacientes españoles se asocia fundamentalmente con: (i) La variante alélica CC para el gen de la IL-1b (polimorfismo en -511 y +3962) (OR=43,  $p<0.01$ ); (ii) con la variante TT/TC/CC del gen de la IL-4 (polimorfismo en -1098, -590 y -33)(OR=15.2,  $p<0.05$ ); (iii) variante CC del gen del TGFb (codones 10 y 25)(OR=16.6,  $p<0.01$ ) y (iv) variante GG/GA del gen del TNFa (polimorfismos -308 y -238)(OR=4,  $p<0.01$ ). La susceptibilidad a la tuberculosis en pacientes peruanos se asocia fundamentalmente con: (i) con la variante TT/TC/TC del gen de la IL-4 (polimorfismo en -1098, -590 y -33)(OR=2.7,  $p<0.05$ ); (ii) polimorfismo en CG del gen del TGFb (codones 10 y 25)(OR=3.5,  $p<0.01$ ) y (iii) con la variante GT para el gen de la IL-2 (polimorfismo en -330 y +166)(OR=21.6,  $p<0.01$ ). Este estudio demuestra también una reducción significativa de las frecuencias de las siguientes variantes: (i) GG en el gen del TNFa tanto en tuberculosos españoles (OR=0.33,  $p<0.01$ ) como en peruanos (OR=0.24,  $p<0.01$ ) y (ii) CT/CG y CT/GG del gen del TGFb (OR=0.05,  $p<0.01$ ) en tuberculosos españoles y peruanos, respectivamente, lo que sugiere que pueden ser marcadores candidatos de resistencia a tuberculosis. Estos resultados parecen indicar que: (i) los polimorfismos de determinadas linfocinas se relacionan significativamente con susceptibilidad y resistencia a la tuberculosis y (ii) en ciertos casos, existen diferencias alélicas cuando se consideran pacientes étnicamente distintos y de áreas geográficas muy separadas.

**F-0009-08-O. SARS: UNA RESPUESTA INMUNE ANÓMALA AL NUEVO CORONAVIRUS. DATO CLAVE EN LA FISIOPATOGENIA, TERAPIA, DESARROLLO DE VACUNAS Y CONTROL DE LA DISEMINACIÓN.** J.F. Bermejo Martín, M.Á. Muñoz-Fernández. *Inmunobiología Molecular. Hospital Gregorio Marañón.*

**Introducción.** Desde nuestro punto de vista, existe una cuestión aún sin resolver en la patogenia del SARS: ¿cuál es el responsable final del distress respiratorio: un daño viral citopático directo en los neumocitos, un daño mediado por el Sistema Inmune en respuesta contra este virus, o ambos componentes?. Los datos previos proce-

denes de estudios en autopsias, sueros y sangre de paciente adultos sugieren un importante componente inmune-inflamatorio. Los estados de inmunosupresión no están relacionados con un incremento de la mortalidad. Hasta la fecha no se han registrado muertes en población pediátrica.

**Objetivos.** Profundizar sobre las causas fisiopatogénicas del SARS. Proponer alternativas terapéuticas y de control de la enfermedad.

**Métodos.** Análisis comparativo de las evidencias clínicas, virológicas, inmunológicas provenientes de los casos de SARS en los países afectados.

**Resultados.** 1. El comportamiento más leve del SARS en niños descarta un componente citopático directo importante del virus: los niños serían los más afectados dado la inmadurez de su Sistema Inmune. 2. La severidad es mayor en los pacientes con un Sistema Inmune adulto maduro: la respuesta inmune debe jugar un papel relevante en la evolución a distress respiratorio. 3. El papel que los inmunomoduladores podrían jugar en el tratamiento de la enfermedad cobra mayor importancia. En este aspecto, hemos propuesto previamente los inhibidores de fosfodiesterasa como fármacos inhibidores de las citocinas proinflamatorias. Los corticoides inhalados se podrían emplear en vez de los sistémicos para lograr una inmunomodulación local. El uso incorrecto de los corticoides y los antibióticos en el SARS ha conducido a fracturas patológicas, necrosis ósea avascular y sobreinfecciones bacterianas. La Teofilina, el Cromolin Sódico, el Ketotifen y el Nedocromil sódico son drogas capaces de prevenir el reclutamiento de células inflamatorias a la vía aérea. 4. La instauración temprana de la terapia inmunomoduladora, guiada por los niveles de citocinas proinflamatorias, podría prevenir la instauración del distress respiratorio. 5. El diseño de vacunas debería evitar aquellos antígenos del nuevo coronavirus que pudieran desencadenar una respuesta inflamatoria similar a la de la enfermedad natural. Los animales usados para probar la vacuna han de ser adultos. 6. Los pediatras deberían estar atentos acerca de los niños paucisintomáticos con sintomatología pseudogripal.

**Conclusiones.** Tomados en conjunto, los datos disponibles apoyan la idea de que una respuesta inmune anómala frente al nuevo coronavirus está en la base del desarrollo del distress respiratorio. Esto tiene implicaciones en la terapia, diseño de vacunas y control epidemiológico de la enfermedad.

**F-0009-09-O. PATTERNS OF INTRACELULAR CYTOKINE PRODUCTION OF TNF $\alpha$  AND IFN $\beta$  BY CD4 AND CD8 T LYMPHOCYTES ARE ASSOCIATED WITH THE OUTCOME OF SEVERE SEPTIC PATIENTS.** J. Monserrat<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Zapata<sup>1,3</sup>, R. de Pablo<sup>2</sup>, A. Prieto<sup>1</sup>, E. Reyes<sup>1</sup>, D. Díaz<sup>1</sup>, H. Barcenilla<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup>, V. Valero<sup>1</sup>, M. Alvarez-Mon<sup>1,4</sup>. <sup>1</sup>Laboratory of Immune System Diseases and Oncology, National Biotechnology Associated Unit (CNB-CSIC), Department of Medicine, University of Alcalá, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Intensive Care Unit Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid Spain. <sup>3</sup>Internal Medicine Service, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Spain. <sup>4</sup>ESI Service, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid Spain.

Severe sepsis (SS) is one of the principal cause of death in the intensive care unit (ICU).

**Objetivos.** To determine the production of intracellular TNF $\alpha$  and IFN $\gamma$  by CD4+ and CD8+ T cells in patients with SS and MOF in a prospective study.

**Design and methods.** We studied peripheral blood mononuclear cells from thirty-four patients with SS. We classified the patients between patients who died or not. We included thirty-six healthy controls. We recollected samples at the moment at these patients enter in the ICU (basal time), at 3, 7, 14 and 28 days. We assessed the intracellular production by flow cytometry.

**Results.** In all patients at admission time the percentage of CD45RA+CD8+ TNF $\alpha$  producing lymphocytes was significantly higher than that found in the controls. In this subset, the percentage of TNF $\alpha$  producing cells at 3 days was significantly lower than that at admission. The percentage of CD45RO+CD8+ TNF $\alpha$  producing cells was significantly higher in patients who died than in healthy controls. We also found significant increases in the percentage of CD45RO+CD4+ TNF $\alpha$  producing cells at 3 and 7 days in the patients who died with respect to the patients who survived and healthy controls. The percentage of CD45RA+CD8+ IFN $\gamma$  producing lymphocytes was significantly higher in all patients at admission time compared to the controls. In patients who survived, we found a significant decrease in the percentages of both CD45RA+CD8+ and CD45RO+CD8+ IFN $\gamma$  producing cells after 3 and 7 days. The percentage of CD45RO+CD4+ IFN $\gamma$  producing cells from patients who survived at 3 and 7 days was significantly lower than that found in those who died.

**Conclusion.** The patterns of production of pro-inflammatory cytokines between the patients who survived and those who did not are clearly different. There were alterations in the percentage of TNF $\alpha$ -producing CD45RO+ Th cells and TNF $\alpha$ -producing Tc cells from both CD45RA+ and CD45RO+ cell subsets. Similar results were found in IFN $\gamma$  production.

**F-0009-10-O. PRONOSTIC VALUE OF THE NUMBER OF CD3+CD8+ PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTE COUNTS IN WITH SEVERE SEPTIC PATIENTS.** J. Monserrat<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Zapata<sup>1,3</sup>, R. de Pablo<sup>2</sup>, A. Prieto<sup>1</sup>, E. Reyes<sup>1</sup>, D. Díaz<sup>1</sup>, H. Barcenilla<sup>1</sup>, C. Sánchez<sup>1</sup>, V. Valero<sup>1</sup>, M. Alvarez-Mon<sup>1,4</sup>. <sup>1</sup>Laboratory of Immune System Diseases and Oncology, National Biotechnology Associated Unit (CNB-CSIC), Department of Medicine, University of Alcalá, Madrid, Spain. <sup>2</sup>Intensive Care Unit Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid Spain. <sup>3</sup>Internal Medicine Service, Hospital Universitario de Guadalajara, Guadalajara, Spain. <sup>4</sup>ESI Service, Hospital Universitario Príncipe de Asturias, Alcalá de Henares, Madrid Spain.

**Introduction.** Severe sepsis (SS) is one of the principal causes of death in the intensive care units (ICU).

**Objetivos.** In a prospective study we studied the blood count and percentage of lymphocyte CD3+CD4+(Th) and CD3+CD8+(Tc) cells to determine their role in SS patients, and if this populations have predictive value on the outcome of these patients.

**Design and methods.** We studied peripheral blood cells from thirty-four patients with SS. We classified the patients in those who died or not. We included thirty-six healthy controls (HC). We recollected samples at the moment these patients enter in the ICU (basal time), at 3, 7, 14 and 28 days.

**Results.** The percentage of Th cells from patients who survived was significantly higher than that found in those who died and the healthy controls. The percentage of Tc lymphocytes in the patients who survived was decreased with respect to those who died and HC. The absolute peripheral blood count of Th and Tc populations in patients who survived decreased with respect to HC. The ratio CD4/CD8 was only increased in the group of patients who survived with respect to HC, but not in those who died. In the patients who survived, the decreased count of CD4+ lymphocytes was normalized at 14 days, but at 28 days the count of CD8 lymphocytes did not normalize. The patients with lesser number of CD3+CD8+CD28+ and CD3+CD8+CD62L+ subsets had the better outcome. A different pattern of behavior was found for activation markers: the count of CD4+CD45RA+CD45RO- cells was decreased in patients with respect to controls in all determinations, but in contrast the number of CD4+CD45RA-CD45RO+ cells was decreased at 0, 3 and 7 days and increased since 14 days.

**Conclusion.** These data indicate that T lymphopenia affects differently to CD4 and CD8 cells: the decrease of CD8 T cells in patients who survived is higher than that observed for CD4 T cells at the admission in ICU. The patients with less number of CD3+CD8+ had better outcome.

**F-0009-11-O. ASOCIACIÓN ENTRE HLA-B44 Y RESPUESTA SOSTENIDA AL TRATAMIENTO INTERFERON+RIVABIRINA EN PACIENTES CON HEPATITIS CRÓNICA POR VIRUS C.** M. Encarnación, M. Romero, B. Torres, N. Barroso, M. Antonio Montes-Cano, J. Aguilar-Reina, M.F. González-Escribano, A. Núñez-Roldán. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Virgen del Rocío. Sevilla.

**Introducción.** La respuesta al tratamiento con determinados agentes anti-virales depende tanto de factores del huésped como del hospedador.

**Objetivo.** Estudiar la influencia de factores inmunogenéticos del hospedador en la respuesta al tratamiento con interferon (IFN) solo y a la terapia combinada IFN+rivabirina (RB) en pacientes con hepatitis crónica por virus C (HCVC).

**Material y métodos.** Un total de 248 pacientes con HCVC, 143 de los cuales recibieron tratamiento con IFN y 105 recibieron tratamiento combinado IFN+RB fueron genotipados en HLA-clase I utilizando la técnica de CDC estándar y en HLA-clase II mediante PCR-SSOP reverso. Los polimorfismos en -307 y -237 del gen TNFA fueron genotipados utilizando PCR-ARMS. Los datos de genotipo y carga viral y los valores de función hepática y ferritina se determinaron en el suero de los pacientes. Se recopilaron los datos de ingesta diaria de alcohol y tiempo de evolución de la enfermedad.

**Resultados.** En el análisis univariante, los pacientes más jóvenes, infectados por virus de genotipo no-1, con niveles elevados de transaminasas y menor duración de infección portadores de las especificidades HLA-B44 y DRB1\*03 presentaban una mayor respuesta sostenida al tratamiento combinado IFN+RB. El análisis multivariante demostró que el genotipo viral no-1 ( $p=0.026$ , OR=2.42, CI95% 1.12-5.55) y la especificidad HLA-B44 ( $p=0.017$ , OR=4.84, CI95% 1.3-17.8), eran variables independientes asociadas con la respuesta sostenida.

**Conclusión.** Determinados factores genéticos del hospedador como la especificidad HLA-B44 pueden influir en la respuesta al tratamiento con determinados fármacos.

**F-0009-12-O. RELACIÓN ENTRE LA INFECCIÓN CRÓNICA POR VIRUS C Y LOS GENES MCP-1 Y CCR2.** M.A. Montes-Cano<sup>1</sup>, N. Barroso<sup>2</sup>, B. Torres<sup>1</sup>, M. Romero-Gómez<sup>3</sup>, J. Aguilar-Reina<sup>2</sup>, A. Núñez-Roldán<sup>1</sup>, M.F. González-Escribano<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. <sup>2</sup>Servicio de Digestivo, Hospital Universitario Virgen del Rocío y <sup>3</sup>Unidad de Hepatología, Hospital Universitario de Valme. Servicio Andaluz de Salud. Sevilla.

**Introducción.** La hepatitis por virus C se caracteriza histológicamente por un infiltrado intralobular de células mononucleares. Las citoquinas quimiotácticas son mediadores críticos que intervienen en el tráfico, reclutamiento y activación de estos tipos celulares. Recientemente se han descrito dos polimorfismos: -2518 (A/G) MCP-1 y 190 (A/G) CCR2 que podrían afectar a la expresión o funcionalidad de estas moléculas.

**Objetivo.** Aportar información sobre la posible asociación de los polimorfismos descritos en los genes MCP1 y CCR2 con la hepatitis crónica por virus C.

**Material y métodos.** Se incluyeron tres grupos de estudio: 65 pacientes con aclaramiento viral espontáneo, 284 pacientes con infección crónica por virus C y 193 controles no infectados. El grupo de pacientes con infección crónica se subdividió en dos categorías basándose en el grado de fibrosis que se establece mediante el índice de Scheuer; 202 pacientes en F0-F2 (fibrosis leve-fibrosis moderada) y 82 pacientes en F3-F4 (fibrosis severa-cirrosis). El genotipaje de los polimorfismos -2518 (A/G) MCP-1, y 190 (A/G) CCR2 se realizó mediante PCR-RFLP y PCR-ARMS respectivamente.

**Resultados.** El análisis del polimorfismo de MCP-1 no reveló diferencias significativas en ninguno de los casos. Al analizar el polimorfismo 190 (A/G) del gen CCR2 comparando la presencia del alelo A (AA+AG) frente a su ausencia (GG) se encontraron diferencias entre el grupo de pacientes con hepatitis crónica y los grupos de aclaramiento viral y controles (AA+AG: 27.8%, 16.9% y 19.1% respectivamente) aunque sólo se alcanzaba la significación estadística al comparar pacientes con infección crónica y controles no infectados ( $p=0.03$ , OR=1.62, 95%CI 1.02-2.59). Dentro del grupo de pacientes con infección crónica no se encontró ninguna diferencia en relación con el grado de fibrosis.

**Conclusión.** Nuestros datos sugieren la existencia de una relación entre el polimorfismo de CCR2 y el desarrollo de hepatitis crónica por virus C.

**F-0009-13-O. EL POLIMORFISMO DEL GEN NRAMP1 NO AFECTA LA SUSCEPTIBILIDAD NI PROTECCIÓN FRENTE A LA BRUCELOSIS HUMANA.** M.J. Bravo<sup>1</sup>, J.D. Colmenero<sup>3</sup>, S. López<sup>3</sup>, J. Martín<sup>2</sup>, A. Alonso<sup>1</sup>, A. Caballero<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Medicina Interna, Hospital Regional Universitario Carlos Haya, Málaga. Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra, Granada.

**Introducción-** La brucelosis es una enfermedad que tiende a ser crónica. Hay un importante número de fallos terapéuticos, recaídas y complicaciones y presenta un comportamiento heterogéneo dentro los miembros de una misma familia, sugiriendo que la respuesta frente a *Brucella* es individual. Entre los factores genéticos del huésped relacionados con susceptibilidad frente a *Brucella*, se han estudiado los genes HLA, los genes de citocinas (TNF, IFN $\alpha$  e IL-10) y el gen iNOS. Con respecto a la respuesta innata podríamos considerar candidato

el gen NRAMP1, ya que estudios funcionales han demostrado que la proteína que codifica este gen regula las etapas iniciales de las vías de señalización que conducen a la estimulación y activación de macrófagos para que éstos realicen su actividad antimicrobiana.

**Objetivos.** Analizar el polimorfismo del gen NRAMP1 en los pacientes de brucelosis humana para correlacionar determinadas variantes génicas con susceptibilidad para padecer la enfermedad.

**Métodos.** Se estudiaron 65 pacientes de brucelosis diagnosticados por la Unidad de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos Haya de Málaga y 95 individuos sanos. El ADN de todos los pacientes y controles se extrajo por métodos estándar. En este trabajo hemos analizado cuatro polimorfismos del gen NRAMP1: 5'(GT)n, -236 C/T, D543N, y 3' UTR.

**Resultados.** No encontramos diferencias significativas en la distribución de estas variantes entre controles y pacientes. Los puntos polimórficos D543N y la delección en el 3' UTR parecen encontrarse en fuerte desequilibrio de ligamiento. De los cuatro alelos correspondientes al microsatélite (GT)n, el alelo 4 no se encontró en ninguno de los individuos estudiados y el alelo 1 se encontró en muy baja proporción.

**Conclusiones.** Aunque para confirmar estos datos sería necesario un número mayor de casos, creemos que las variantes del gen NRAMP1 no confieren susceptibilidad ni protección frente a brucelosis humana y sus complicaciones.

**F-0009-14-O. RELACIÓN ENTRE LA LECTINA DE UNIÓN A MANOSA (MBL) Y LA TUBERCULOSIS.** M.I. García-Laorden<sup>1</sup>, J. Caminero<sup>2</sup>, M.J. Pena<sup>3</sup>, M.I. Campos<sup>3</sup>, A. García-Saavedra<sup>1</sup>, A. Domínguez-Acosta<sup>1</sup>, M. Cárdenas-Bilbao<sup>1</sup>, C. Rodríguez-Gallego<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología, <sup>2</sup>Neumología y <sup>3</sup>Microbiología. Hptal. de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

La MBL es una proteína de fase aguda que reconoce carbohidratos específicos sobre la superficie de determinados patógenos, promoviendo su fagocitosis y activando la vía lectin-dependiente del complemento. Deficiencia y bajos niveles de MBL se deben a variantes estructurales frecuentes en la mayoría de poblaciones (alelos 0, siendo A el normal). Además el alelo X del promotor se asocia a baja producción respecto al alelo Y. *M. tuberculosis* utiliza la opsonización por complemento para infectar al macrófago.

Se analizaron los genotipos del gen de la MBL en 127 pacientes con tuberculosis (TBC) no-VIH, 106 VIH-TBC, 414 VIH no-TBC y 344 controles. El tipaje se realizó mediante técnicas de PCR. Se analizó también la correlación entre los alelos 0 y la incidencia de TBC en varios países del oeste de Europa.

Al comparar TBC no-VIH con controles se observaron frecuencias no significativamente mayores de alelo 0 (23.6% vs 27.3%) y genotipos bajo/nulo productores (XA/0+0/0: 15% vs 20.1%). La comparación VIH-TBC frente a VIH no-TBC mostró frecuencias menores de alelos 0 (18.4% vs 25%;  $P=0.046$ ) y genotipos A/0+0/0 (34% vs 44.4%;  $P=0.06$ ). Aunque los individuos VIH no-TBC eran similares a los controles en frecuencias alélicas y genotípicas, la comparación VIH-TBC con controles mostró menores frecuencias en los VIH de alelos 0 (18.4% vs 27.3%;  $P=0.009$ ), de genotipos A/0+0/0 (34% vs 46.8%;  $P=0.025$ ) y de genotipos XA/0+0/0 (10.4% vs 20.1%;  $P=0.028$ ). Se encontró una correlación positiva significativa entre la frecuencia de alelos 0 y la incidencia de TBC en Europa occidental ( $r=0.916$ ;  $P=0.01$ ).

Los niveles bajos o nulos de MBL son un factor de protección frente a TBC en presencia de otros factores de predisposición, como



VIH. Estos resultados, junto con la correlación entre frecuencias de alelos 0 e incidencia de TBC, apoyan la idea de que *M. tuberculosis* es una de las fuerzas selectivas que ha colaborado en la selección positiva de los alelos no productores de MBL en las poblaciones.

**F-0009-15-O. RELACIÓN ENTRE LOS POLIMORFISMOS DE LA MBL Y LA SUSCEPTIBILIDAD Y SEVERIDAD DE LA NEUMONÍA ADQUIRIDA EN LA COMUNIDAD.** A. García-Saavedra<sup>1</sup>, F. Rodríguez de Castro<sup>2</sup>, J. Solé-Violán<sup>3</sup>, M.I. García-Laorden<sup>1</sup>, A. Caballero<sup>4</sup>, A. Marcos<sup>3</sup>, M.A. Ponce<sup>2</sup>, J.M. Ferrer<sup>3</sup>, C. Rodríguez-Gallego<sup>1</sup>. RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. <sup>2</sup>Servicio de Neumología, 3 U.M.I y <sup>4</sup>Unidad de Investigación. Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.

La Neumonía Adquirida en la Comunidad (NAC) es la principal causa de muerte por infección en países desarrollados. Su severidad es muy variable, desde asintomática hasta shock séptico, fracaso multiorgánico (FMO) y muerte. La lectina de unión a manosa (MBL) es una proteína sérica de fase aguda que reconoce diversos carbohidratos presentes en muchos microorganismos, activando la cascada del complemento por la vía lectin- dependiente y promoviendo la opso-

nización. La deficiencia y los bajos niveles de MBL se deben a las variantes estructurales B, C y D (alelos 0, siendo A, el alelo normal). Se analizaron los alelos del gen de la MBL en 202 individuos adultos con NAC, que posteriormente fueron estratificados según severidad, y un grupo control de 386 individuos. El tipaje se realizó con técnicas de PCR. El alelo más frecuente en nuestra población (alelo B) se encontró en mayor frecuencia en NAC que en controles (P=0.01). Los pacientes con sepsis y sepsis severa mostraron frecuencias alélicas y genotípicas similares y fueron agrupados (no-shock séptico-NSS; N=159). Los pacientes con NSS presentaron mayor frecuencia de genotipos bajo/no productores que los controles (A/0+0/0: 46.5% vs 37.8%; P=0.06). La diferencia fue mayor cuando se compararon los pacientes fallecidos con NSS (NSSex) respecto a controles (A/A: 75% vs 37.8%; P=0.06). Sin embargo, los pacientes fallecidos por shock séptico (N=17) presentaron mayores frecuencias de genotipos normales que los NSS (A/A: 76.5% vs 53.5%; P=0.05) y que los pacientes con NSSex (A/A: 76.5% vs 25%; P=0.03). Similares resultados se observaron al comparar pacientes con FMO frente a NSS (A/A: 88.9% vs 53.5%; P=0.04) y frente a NSSex (A/A: 88.9% vs 25%; P=0.015). Nuestros datos indican que bajos niveles de MBL se asocian a mayor susceptibilidad a NAC, mientras que los genotipos alto productores presentan un mayor riesgo de desarrollar las formas más severas de la enfermedad, probablemente por una mayor respuesta inflamatoria.

## F-0011. Inmunodeficiencias

**Moderadores:** Nuria Matamoros Florí (Mallorca), Margarita López Trascasa (Madrid)

**F-0011-01-O. LINFOHISTIOCITOSIS HEMATOFAGOCÍTICA. ESTUDIO FENOTÍPICO Y GENOTÍPICO DE UNA FAMILIA.** M.E. Seoane Reula<sup>1</sup>, M. Camacho Lovillo<sup>2</sup>, J.L. Jiménez<sup>2</sup>, J.A. León Leal<sup>2</sup>, M.A. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Enfermedades Infecciosas Pediátricas, Hospital Virgen del Rocío, Sevilla.

**Introducción.** La linfocitosis hematófagocítica (LHH) es una enfermedad rara que tiene una alta morbimortalidad. Se caracteriza por tener un defecto en las células efectoras del sistema inmunológico que se puede deber a un defecto congénito o adquirido. Clínicamente se manifiesta con un cuadro febril, hepatoesplenomegalia y síntomas neurológicos. A nivel analíticos se detecta citopenia, alteración en la coagulación, en el perfil lipídico, elevación de citocinas inflamatorias e infiltración de órganos por histiocitos y fenómenos de hemofagocitosis.

**Pacientes y Métodos.** Se estudia una familia de dos progenitores consanguíneos y dos hijas gemelas. Se analiza la expresión de perforina en las subpoblaciones celulares CD3+CD8+, CD56+ CD3-, CD56+CD3+ por citometría de flujo de cuatro colores y se realiza el análisis del gen de la perforina por secuenciación automática.

**Resultados.** Entre los datos inmunológico más relevantes observamos que uno de los progenitores (padre) y una de las niñas tienen menor expresión de perforina por citometría de flujo en la subpoblación celular CD56+ CD3- que puede corresponder con un patrón heterocigoto, hecho que se comprobó en el análisis del gen de la perforina por secuenciación, donde encontramos una mutación en el mismo

progenitor y niña igualmente en heterocigocia. La ventaja de realizar el estudio por citometría de flujo, es que si hay un déficit de expresión de perforina lo podemos detectar en horas, siendo un screening rápido. Es aconsejable realizar un estudio genético para poder detectar o bien mutaciones ya descritas o describir nuevas mutaciones relacionadas con un defecto en la perforina para en un futuro poder hacer con certeza un diagnóstico prenatal.

**Conclusión.** En la actualidad los pacientes con LHH se pueden beneficiar de nuevas técnicas diagnósticas específicas y rápidas como la citometría de flujo para la detección de déficit en la expresión de perforina. También es importante la realización de estudios genéticos que lo confirmen por técnicas automáticas de secuenciación. Todo ello servirá para que los pacientes puedan disponer en la mayor brevedad posible de un tratamiento.

**F-0011-02-O. RECONSTITUCIÓN FUNCIONAL DE CÉLULAS DE PACIENTES CON EL SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH MEDIANTE VECTORES LENTIVIRALES ESPECÍFICOS DE CÉLULAS HEMATOPOYÉTICAS.** F. Martín<sup>1</sup>, M.G.<sup>a</sup> Toscano<sup>2</sup>, M. Blundell<sup>4</sup>, C. Frecha<sup>1</sup>, G. K. Srivastava<sup>2</sup>, M. Santamaría<sup>3</sup>, A.J. Thrasher<sup>4</sup>, I.J. Molina<sup>2</sup>. <sup>1</sup>IPB «López Neyra» CSIC. Granada. <sup>2</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. <sup>3</sup>Departamento de Fisiología e Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba. <sup>4</sup>Institute of Child Health, University College London.

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia causada por mutaciones en el gen *WASP*, expresado en célu-

las hematopoyéticas. Los pacientes de WAS podrían beneficiarse de una terapia génica sobre células madre hematopoyéticas (HSC). No obstante, incluso las poblaciones de HSC altamente purificadas arrastran células contaminantes que pueden fundirse con, o diferenciarse hacia, tejidos no hematopoyéticos. Por ello, es importante diseñar vectores que no sólo transporten eficientemente el gen terapéutico hasta las HSC, sino que además dirijan la expresión del transgen de una manera restringida a células hematopoyéticas.

Hemos usado un fragmento de 500 bp de secuencias proximales del promotor endógeno del gen WASP para dirigir la transcripción del cDNA de WASP en un vector lentiviral autoinactivado. La transducción de células de pacientes de WAS inmortalizadas con HVS, así como células alogénicas primarias de WAS, nos permitió obtener un 60-70% de células WASP<sup>+</sup> tras una ronda de infección lentiviral a niveles similares a los de los individuos normales. Las células no hematopoyéticas fueron transducidas con una eficiencia similar, y la PCR a tiempo real reveló que los niveles de integración del transgen eran comparables a los obtenidos en células T. No obstante, los niveles de expresión de la proteína en células no hematopoyéticas eran al menos 100 veces inferiores a los detectados en células hematopoyéticas. Las células T de los pacientes de WAS fueron rescatadas de sus defectos funcionales, con normalización de la morfología celular, restauración de las respuestas mediadas por CD3 y ventaja selectiva de crecimiento *in vitro*.

En resumen, vectores lentivirales que incorporan secuencias proximales del gen WASP confieren una expresión de WASP que es estable, eficiente, fisiológica y restringida a células hematopoyéticas.

**F-0011-03-O. DIAGNÓSTICO DE PACIENTES CON SÍNDROME DE WISKOTT-ALDRICH MEDIANTE ANTICUERPOS MONOCLONALES CON PATRONES DIFERENCIADOS DE REACTIVIDAD EN CITOMETRÍA Y WESTERN BLOT.** M. G<sup>a</sup>-Toscano<sup>1</sup>, C. Frecha<sup>2</sup>, I.J. Molina<sup>1</sup>, F. Martín<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad de Granada. <sup>2</sup>IPB «López Neyra». CSIC. Granada.

El Síndrome de Wiskott-Aldrich (WAS) es una inmunodeficiencia debida a mutaciones en el gen WASP. Estas se localizan en los pacientes se a lo largo de todo el gen, sin correlación entre el genotipo y la severidad de la enfermedad. No obstante, aquellos pacientes que presentan cantidades detectables de WASP en sus leucocitos presentan enfermedades atenuadas. Por tanto, es deseable contar con métodos que permitan una detección de los niveles intracelulares de WASP. Sin embargo, los métodos de análisis, en especial la citometría de flujo, se han revelado hasta el momento poco reproducibles y fiables para establecer el diagnóstico de WAS.

Hemos utilizados dos AcMo (D1 y B9) dirigidos contra los AAs 1-250 de la proteína, estableciendo las condiciones para su utilización diagnóstica. El AcMo D1 detecta con fiabilidad WASP en Western Blot, pero exhibe una alta inespecificidad en citometría de flujo. El protocolo de citometría fue modificado para incluir un bloqueo extenso de proteínas intracelulares. Esto ha permitido concluir que sólo el AcMo B9 reacciona específicamente con WASP en citometría de flujo, pero no es suficientemente sensible en Western Blot.

El estudio fue realizado sobre un panel de células T de pacientes de WAS inmortalizadas con HVS así como células primarias alogénicas de enfermos de WAS y sujetos normales. Igualmente, se han utilizado células de pacientes de WAS transducidas con vectores len-

tivirales conteniendo un gen WASP intacto, estableciendo con precisión los niveles de expresión proteica derivada del transgen. Los porcentajes de células transducidas correlacionaban con los resultados de integración del vector obtenidos mediante PCR en tiempo real. Por último, se estudiaron linfocitos de 5 pacientes con un cuadro clínico de sospecha de WAS. El análisis combinado de citometría y Western Blot con estos anticuerpos permitió determinar que sólo un paciente era compatible con WAS, lo que ha sido corroborado por la evolución clínica posterior de todos ellos. Este método es por tanto de potencial interés a la hora de establecer el diagnóstico de WAS.

**F-0011-04-O. CARACTERIZACIÓN DE UN PACIENTE CON DEFICIENCIA DE IRAK-4.** M.P. Cárdenes, E.I. Santiago, A. Puel, H. Bernuth, M.C. Alvarez-Santana, J.L. Casanova, E. Colino, J.C. Rodríguez-Gallego. Servicio de inmunología, Hospital General de Gran Canaria Doctor Negrín.

La respuesta de las células fagocíticas de la inmunidad innata frente a los diversos microorganismos depende del reconocimiento de patrones moleculares presentes en los diferentes patógenos, induciendo la activación celular. Este reconocimiento es llevado a cabo por los receptores Toll-like (TLRs) presentes en estas células. Los TLRs, el IL-1R y el IL-18R señalizan al interior celular a través de una cascada que comparte varias moléculas de señalización, como IRAK-4.

El paciente es un varón de 7 años de edad, que desde los primeros meses de vida ha sufrido infecciones diseminadas recurrentes (dos episodios de artritis, sinusitis y otitis media recurrente, abscesos de pared abdominal y cutáneos y, celulitis) por Gram positivos (*S. pneumoniae*, *S. equi*, *S. pyogenes* y *S. aureus*). Dos primos en segundo grado del paciente fallecieron a las edades de seis meses y de dos años debido a meningitis y osteomielitis por pneumococo y meningitis por *S. aureus* respectivamente. Todos los resultados inmunológicos previos habían sido normales. Sin embargo, el paciente presenta un defecto severo de respuesta (producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-12p70) a diversos agonistas de TLR-2 (ácido lipoteicoico), TLR-3 (poly I:C) y TLR-4 (lipopolisacáridos de *E. coli*, *Salmonella enteritidis* y *S. minnesota*). Sin embargo otros activadores de TLR-2 (zymosán, peptidoglicanos) inducen una respuesta sólo discretamente disminuida. Además detectamos una ausencia completa de respuesta (producción de IL-12p70, IL-6, IL-8, IL-10) frente a IL-1 $\beta$ .

El análisis molecular del gen *IRAK-4* puso de manifiesto una mutación en el exón 11, en el extremo 3' del gen, que introduce un codon stop en el residuo 402.

Se describe un nuevo caso de déficit de IRAK-4. Los datos aportados sugieren un déficit parcial de IRAK-4.

Financiación: RedRespira-ISCiii-RTIC-03/11.

**F-0011-05-C. DEFICIENCIA DE IL12RB1 EN UN PACIENTE CON INFECCIONES DISEMINADAS POR Salmonella enteritidis Y CARCINOMA EPIDERMÓIDE ESOFÁGICO.** M.P. Cárdenes, M.I. García-Laorden, A.D. García-Saavedra, A. Moreno, M.C. Álvarez-Santana, E.I. Santiago, A.R. Domínguez-Acosta, J.C. Rodríguez-Gallego. Servicio de Inmunología del Hospital de GC Dr. Negrín, Las Palmas de Gran Canaria.

Los defectos de producción de IL-12 y de la cadena  $\beta$ 1 del receptor de la IL-12 (IL-12R $\beta$ 1) se asocian a un defecto severo de pro-

ducción de IFN- $\gamma$  y, como consecuencia, a una alta susceptibilidad a infección diseminada por micobacterias. Además, en menos de la mitad de los pacientes se presentan infecciones diseminadas por salmonelas. Los defectos de IFN- $\gamma$ R1, IFN- $\gamma$ R2 y Stat-1 se asocian a presentaciones clínicas similares.

Presentamos la caracterización clínica, funcional y genética de un nuevo caso de deficiencia de IL-12R $\beta$ 1. El paciente presentó numerosos episodios de osteomielitis, enterocolitis y septicemias, causadas por *Salmonella enteritidis*. A los 26 se le diagnosticó una candidiasis oroesofágica «primaria» y un carcinoma epidermoide de esófago (TII-III). Tras el tratamiento, a los 28 años aparece una recidiva del tumor, con metástasis vertebrales y compresión medular, falleciendo tres meses después. Un hermano del paciente había fallecido a los 6 años de edad, con infecciones recurrentes por *Salmonella enteritidis*. En ninguno de los dos se constató infección por micobacterias.

El estudio inmunológico reveló una linfopenia severa de linfocitos T CD4+, siendo todos los linfocitos T CD4 CD45RO+ (memoria). La respuesta proliferativa de los PBMCs del paciente era ausente a PHA y prácticamente normal a MAbs anti-CD3 y a IL-2. Además, se observó un defecto drástico en la producción de IFN $\gamma$  de los PBMCs del paciente en respuesta a PHA/IL-12, CD2/IL-12, CD2/CD28 y PMA/ION. El paciente era homocigoto para la mutación 1791+2T>G, en el intrón 15, dando lugar a un procesamiento anómalo del mensajero que impide la expresión de IL12R $\beta$ 1 en membrana. Anteriormente, habíamos diagnosticado una paciente con la misma mutación asociada a infección diseminada por *M. avium* y *S enteritidis*.

Este es el primer paciente diagnosticado con estos defectos que ha desarrollado un cáncer. Se discute el papel del sistema IL-12/IFN- $\gamma$  en la vigilancia y defensa antitumoral.

**F-0011-06-C. SÍNDROME DE MUCKLE-WELLS: UN TRASTORNO HEREDITARIO DEBIDO A LA DISREGULACIÓN DE LA SEÑAL INFLAMATORIA MEDIADA POR IL-1 $\beta$ .** J.I. Aróstegui<sup>1</sup>, E. Ramos<sup>2</sup>, A.I. Aldea<sup>1</sup>, J. Rius<sup>1</sup>, S. Plaza<sup>1</sup>, J. Vives<sup>1</sup>, J. Yagüe<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Clínic. Barcelona. <sup>2</sup>Servicio de Pediatría. Hospital Central de Asturias. Oviedo.

**Introducción.** El síndrome de Muckle-Wells, un trastorno autoinflamatorio con un patrón de herencia autosómico dominante, se engloba entre los síndrome periódicos asociados a la criopirina (CAPS), caracterizados por la disregulación de la señal pro-inflamatoria mediada por la IL-1 $\beta$ .

**Objetivos.** Verificar la base fisiopatológica en un paciente de 3 años de edad que padece episodios recurrentes de exantema urticariforme, fiebre periódica, meningitis crónica leve y artropatía, no siendo detectadas ni sordera neurosensorial ni amiloidosis del tipo AA.

**Métodos.** Análisis mutacional mediante secuencia del gen *CIAS1/PYPAF1/NALP3*, asociado a todos los síndromes CAPS. Cuantificación de los reactantes de fase aguda y valoración de los tratamientos instaurados

**Resultados.** Identificación de la mutación misense T348M en heterocigosis en el paciente. La ausencia de la misma en los padres y la verificación de la paternidad permite identificarla como *de novo* en el paciente. La constatación de una fuerte reacción de fase aguda permite afirmar la presencia de un proceso inflamatorio disregulado.

**Conclusiones.** La ausencia de etiología infecciosa y autoinmune del cuadro, asociado a un análisis mutacional positivo del gen *CIAS1/PYPAF1/NALP3* permite el correcto diagnóstico de síndrome

de Muckle-Wells en este paciente, de carácter esporádico dada la ausencia de historia familiar. Los prometedores resultados terapéuticos con el antagonista del receptor de IL1 humano anakinra (Kineret®) en estos pacientes abre una alternativa terapéutica en este paciente.

Financiación: Beca 003110 de Marato-TV3.

**F-0011-07-C. UN CASO DE HIPOGAMMAGLOBULINEMIA Y TIMOMA (SÍNDROME DE GOOD).** M.S. Zapico<sup>1</sup>, M.A. Dieguez<sup>2</sup>, L. Caminal<sup>2</sup>, L. Tricas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna del HU Central de Asturias.

La hipogammaglobulinemia ocurre en 3-6% de los pacientes con timoma. Esta rara asociación es el síndrome de Good. Inmunológicamente se caracteriza por ausencia o disminución de linfocitos B, hipogammaglobulinemia, relación de linfocitos T CD4:CD8 invertida y defectos en la inmunidad celular que lo diferencia de la inmunodeficiencia común variable. Desarrollo de infecciones recurrentes y de manifestaciones autoinmunes.

**Caso.** Hombre de 61 años alérgico a amoxicilina. Diagnosticado e intervenido de adenoma de hipófisis en 1996, actualmente con tratamiento hormonal sustitutivo.

Presenta en enero de 2003 neumonía y una masa mediastínica que se diagnostica como timoma de predominio epitelial y fusocelular. Se le practica la timectomía. En el preoperatorio se encuentran autoanticuerpos anti acetil-colina (2.39 nM, el valor normal (VN) es <0.2 nM) sin sintomatología de miastenia gravis. Continúa con infecciones respiratorias que se resuelven con tratamiento y presenta diarreas. Ambos agentes patógenos permanecen desconocidos.

En el momento del estudio presenta hemograma, estudios de coagulación y bioquímica normales. Proteína C reactiva elevada (31.1 mg/l, el VN es 0-5 mg/l) y electroforesis de las proteínas séricas alterada con las fracciones  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 elevadas y la fracción  $\gamma$  disminuida ( $\alpha$ 1 3.1 g/l,  $\alpha$ 2 8.9 g/l,  $\beta$  6.8 g/l y  $\gamma$  2.7 g/l).

Los estudios inmunológicos muestran hipogammaglobulinemia con valores de IgG, IgA e IgM francamente disminuidos (IgG 2.2 g/l, IgA 0.21 g/l e IgM 0.04 g/l). El número total de linfocitos es normal, pero la distribución de estos presenta anomalías, presenta un 91% de linfocitos T CD3+ con CD4+ de 40% y CD8+ de 47% y una relación CD4+:CD8+ de 0.85; no se detectan linfocitos B (estudio con varios marcadores específicos). Respuesta normal de proliferación de linfocitos frente a mitógenos y anticuerpo anti-CD3 pero ausente frente a extracto de *Candida albicans* y frente a los toxoides tetánico y diftérico.

**F-0011-08-C. DILEMAS DIAGNÓSTICOS Y TERAPÉUTICOS EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMUN.** E. Sarmiento, D. Micheloud, J.J. Rodríguez-Molina, J. Gil, E. Fernández-Cruz, J. Carbone. Unidad de Inmunología Clínica. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

Las complicaciones que pueden surgir en los pacientes con IDVC muchas veces nos plantean situaciones complejas de difícil solución.

Presentamos casos clínicos de IDVC de la Unidad de Inmunología Clínica en los que se plantean problemas de diagnóstico y tratamiento. Se expondrá la experiencia descrita en la literatura en estas situaciones.

**El hipercatabolismo de inmunoglobulinas:** Un paciente que había normalizado niveles de IgG (>750 mg/dl) y libre de eventos relacionados con IDVC experimenta disminución de cifras de IgG. La media de IgG (nivel pre-infusional) en los últimos 8 meses de terapia sustitutiva con GGIV (400 mg/kg cada 21 días): 438 mg/dl.

**El trasplante de pulmón:** Antecedentes de infecciones respiratorias de vías bajas, toxoplasmosis, TBC. Pese a terapia con GGIV manteniendo IgG normal desarrolla en un periodo de 10 años insuficiencia respiratoria severa con destrucción de parénquima pulmonar. Asocia leucopenia, trombopenia, esplenomegalia, aumento de eje espleportal. Requiere trasplante de pulmón.

**La infección refractaria:** Conjuntivitis recurrente por hemófilus influenzae y refractaria a diversas combinaciones y ciclos de terapia tóptica y sistémica con rifamicina, cotrimoxazol, amoxicilina, cloranfenicol.

**La autoinmunidad refractaria:** PTI y neutropenia refractarios a ciclos de tratamiento con esteroides, GGIV a alta dosis, imurel, vincristina. Respuesta parcial a anti-CD20. Esplenomegalia importante con hipertensión portal severa.

**El diagnóstico de síndrome linfoproliferativo:** Diabetes mellitus tipo I a los 13 años. 3 neumonías. 11.02: Ingreso en UCI por neumonía. IgG 149, IgA 9, IgM <4 mg/dl. Se inicia terapia sustitutiva. Se objetivan adenopatías de tamaño patológico en varias localizaciones. En adenopatía periférica se demuestra población clonal B por PCR, la anatomía patológica no es concluyente.

Las distintas situaciones planteadas hacen necesario un manejo multidisciplinario y el establecimiento de protocolos de actuación consensuados.

**F-0011-09-C. RECONSTITUCIÓN INMUNE PARCIAL DESPUÉS DEL TRASPLANTE DE MÉDULA ÓSEA EN UN PACIENTE CON DEFECTO EN EL GEN 1 DE ACTIVACIÓN DE LA RECOMBINACIÓN.** J. Muñoz-Robles<sup>1</sup>, M. J. Del Rey<sup>1</sup>, P. de Pablos<sup>1</sup>, P. Paule<sup>1</sup>, J. Ruiz-Contreras<sup>2</sup>, J. Clemente<sup>2</sup>, J. T. Ramos<sup>2</sup>, E. Paz-Artal<sup>1</sup>, L. M. Allende<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología e <sup>2</sup>Inmunodeficiencias, Hospital 12 de Octubre. Madrid.

**Introducción.** Los genes de activación de la recombinación 1 y 2 (RAG-1 y RAG-2) son dos componentes esenciales para la generación de la gran diversidad de receptores de antígenos a través del ensamblaje de los dominios variable (V), de diversidad (D) y de unión (J) en los loci de los genes que codifican las inmunoglobulinas y los receptores de células T (TCR). Las deficiencias de RAG-1 y RAG-2 son enfermedades autosómicas recesivas que producen incapacidad funcional para formar receptores de antígeno a través de la recombinación genética y por tanto conduce a inmunodeficiencias primarias en humanos.

**Objetivos.** Estudiar la reconstitución inmunológica en un paciente con déficit de RAG-1 después de ser sometido a trasplante de médula ósea.

**Métodos.** Se hizo análisis de inmunofenotipo linfocitario determinando las subpoblaciones linfocitarias por citometría de flujo, niveles séricos de inmunoglobulinas por nefelometría y respuesta a mitógenos por incorporación de timidina tritiada. Además se hizo análisis genético de RAG-1 por biología molecular.

**Resultados.** Después del trasplante de médula ósea y hasta ahora (7 años después) el paciente persiste con linfopenia B y T con respuesta linfoproliferativa normal a varios mitógenos. Los niveles de inmunoglobulinas son normales excepto los niveles parcialmente disminuidos de IgG2.

**Conclusiones.** A pesar de la reconstitución inmunológica incompleta, el paciente no ha tenido complicaciones que amenacen su vida (infecciones por microorganismos oportunistas o por encapsulados) y su estado general es bueno sin recibir ningún medicamento profiláctico.

**F-0011-10-C. CARACTERIZACIÓN INMUNOLÓGICA Y MOLECULAR DE DOS CASOS CON SÍNDROME LINFOPROLIFERATIVO AUTOINMUNE.** M.J. Del Rey<sup>1</sup>, J. Muñoz-Robles<sup>1</sup>, J. Gómez-Rial<sup>2</sup>, E. Roldán<sup>2</sup>, J. Ruiz-Contreras<sup>3</sup>, J. Clemente<sup>3</sup>, J.T. Ramos<sup>3</sup>, J. Manzanares<sup>4</sup>, L.M. Allende<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Serv. de Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid. <sup>2</sup>Serv. de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid. <sup>3</sup>Serv. de Pediatría, Secc. de Inmunodeficiencias, Hospital 12 de Octubre, Madrid. <sup>4</sup>Serv. de Pediatría, Secc. Digestivo, Hospital 12 de Octubre. Madrid.

**Introducción.** El síndrome linfoproliferativo autoinmune (SLA) es una inmunodeficiencia primaria que cursa con linfoproliferación crónica no maligna (linfadenopatía y esplenomegalia), manifestaciones autoinmunes y expansión de linfocitos TCR $\alpha\beta$ +CD4-CD8-. La mayoría de los casos se deben a mutaciones en heterocigosis en el gen TNFRSF6 que codifica para la proteína Fas (SLA tipo Ia), también hay casos en los que los defectos se encuentran en otros genes que codifican proteínas implicadas en la vía apoptótica Fas/FasL como son FasL (SLA tipo Ib) y caspasas 8 y 10 (SLA tipo II). Por último, en el SLA tipo III no se detectan defectos moleculares, la apoptosis es normal, pero sí que aparecen la mayoría de las características clínicas.

**Objetivos.** Caracterización molecular y funcional de dos pacientes con sospecha de SLA.

**Métodos.** Para confirmar este diagnóstico realizamos cuantificación de inmunoglobulinas por nefelometría, fenotipo linfocitario y estudio de apoptosis por citometría de flujo, cuantificación de IL10 y CD25 por ELISA, y análisis moleculares mediante secuenciación directa y PCR-RFLP.

**Resultados.** Ambos enfermos presentaron hipergammaglobulinemia, aumento de células TCR $\alpha\beta$ +CD4- CD8-, linfocitos activados (CD38+, DR+, CD57+) y aumento de IL10 y CD25. El paciente 1 presentaba la mutación T979G (Ile 246 Ser) en heterocigosis heredada de su padre, esta mutación no descrita anteriormente se localiza en el exón 9 del gen TNFRSF6 y afecta al dominio de muerte de la proteína Fas. En la paciente 2 el estudio de apoptosis fue normal y no se encontraron defectos moleculares en el gen TNFRSF6.

**Conclusiones.** Los resultados del estudio molecular en el paciente 1 apoyan el diagnóstico de SLA, concretamente tipo Ia, en el que se da un patrón de herencia autosómico dominante con penetrancia incompleta. Tras la secuenciación de FasL aclararemos si la paciente 2 tiene un SLA tipo Ib o III.

**F-0011-11-O. REGISTRO ESPAÑOL DE INMUNODEFICIENCIAS PRIMARIAS (REDIP) 2004. INFORME DE ACTUALIZACIÓN.** J. Pons, A. Etxagibel, M. Pérez-Castellano, J. Milà, N. Matamoros. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Son Dureta. Palma de Mallorca.

El Registro Español de Inmunodeficiencias Primarias (REDIP) inició sus actividades en 1993 con el fin de obtener datos epidemiológicos y clínicos de Inmunodeficiencias Primarias. Actualmente (marzo 2004) tiene registrados 2.525 casos. Por grandes grupos el 68% son defi-

ciencias predominantemente de anticuerpos, el 12.4% corresponde a inmunodeficiencias combinadas, el 11.8% son déficits del sistema complemento, el 4.5% corresponde a déficits de la fagocitosis y el 3.2 % corresponde a otras inmunodeficiencias bien definidas.

Al compararlo con el registro europeo (ESID) los porcentajes de inmunodeficiencias por grandes grupos son similares. Sin embargo, al evaluar los casos registrados por Comunidades Autónomas, existe una desigual distribución geográfica de los mismos. Este bajo índice de correlación con el número de habitantes y de camas hospitalarias públicas indica un nivel bajo del diagnóstico y/o registro en algunas de las Comunidades Autónomas.

Entre las variables estudiadas hay que destacar el tiempo transcurrido entre el inicio de síntomas y el establecimiento del diagnóstico. Este puede alcanzar un máximo de 21 años en la Agammaglobulinemia ligada al X, 52 años en la Inmunodeficiencia Variable Común, 53 años en el déficit de IgA, 25 años en la Enfermedad Granulomatosa Crónica, 44 años en el Síndrome de hiper-IgE y 8 años en el Síndrome de Wiskott-Aldrich. Otras variables evaluadas en el registro lo constituyen las patologías asociadas a las diferentes inmunodeficiencias así como los tratamientos aplicados a las mismas.

Con el fin de obtener datos de importancia epidemiológica sería necesaria una actualización permanente de los casos para lo que se está desarrollando una página web (<http://virtualbits.com/redip/>). Desde el inicio del registro se mantiene un incremento medio anual de 200 casos. Las 3 principales especialidades que registran pacientes en el REDIP son Inmunología, Pediatría y Alergia. El REDIP mantiene colaboración con el ESID.

**F-0011-12-C. MODULACIÓN DEL PERFIL DE CITOQUINAS TRAS TRATAMIENTO CON GAMMAGLOBULINA INTRAVENOSA EN PACIENTES CON SÍNDROME DE HIPER-IgE. I. Muñoz-Saa, M.T. Pérez-Castellano, F. Pujalte, A. Cambra, J. Iglesias-Alzuet, J. Pons, N. Matamoros. Servicio de Inmunología. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca**

El síndrome de hiper-IgE (S.HIE) es una inmunodeficiencia primaria caracterizada clínicamente por abscesos y dermatitis crónica, infecciones de repetición y niveles elevados de IgE. Estudios previos en nuestro laboratorio, han demostrado que pacientes con el S.HIE presentan una mayor proporción de linfocitos CD4+IL-13+ y menor de CD4+IFN- $\gamma$ +, sugiriendo una respuesta hacia Th2 en estos pacientes. Por otra parte, el tratamiento con gammaglobulina intravenosa (IVIG) disminuye de manera progresiva los niveles séricos de IgE y produce una mejoría en la sintomatología clínica e infecciosa. Estos datos apuntan a que una desviación del patrón de citoquinas, inducida por el tratamiento con IVIG podría ser la base en la mejoría clínica de esta enfermedad.

Por ello, decidimos estudiar el efecto modulador de la IVIG sobre el perfil de citoquinas en el S.HIE. Analizamos la producción de citoquinas (IL-4, IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF e IL-2), pre y postinfusión de IVIG, en linfocitos T CD4 y CD8 estimulados con PMA (100 ng/ml) e Ionomicina (1  $\mu$ g/ml), en 5 pacientes con S.HIE.

Tras el tratamiento, se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de TNF ( $p < 0.01$ ). También se observó un aumento en el porcentaje de linfocitos T CD4+ productores de IFN- $\gamma$ , aunque las diferencias entre pre y post tratamiento no fueron significativas. Así mismo, tras el tratamiento, se observó un aumento en el ratio CD4+ IFN- $\gamma$  / CD4+IL-13+ en todos los pacientes.

Un aumento, tanto en la proporción de linfocitos T CD4+ productores de TNF, como en el ratio de producción IFN- $\gamma$ / IL-13, tras tratamiento con IVIG contribuiría a corregir el desequilibrio de la respuesta hacia Th2, que característicamente se observa en el S.HIE, y podría explicar la disminución paulatina de los niveles de IgE en los pacientes tratados con IVIG.

**F-0011-13-O. ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DE BTK EN UNA SERIE DE AGAMMAGLOBULINEMIA LIGADA AL CROMOSOMA X. R. Pérez De Diego, A. Ferreira, G. Fontán, M.C. García Rodríguez. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario «La Paz» (Madrid)**

**Introducción.** La agammaglobulinemia ligada al cromosoma X (ALX) se debe a mutaciones en el gen de la Btk (tirosina quinasa de Bruton), proteína citoplasmática que se expresa en la línea mielo-monocítica y en células B, pero no se expresa en células plasmáticas y linfocitos T.

**Objetivo.** El estudio funcional de la Btk en pacientes con ALX.

**Material y métodos.** 62 pacientes pertenecientes a 48 familias no relacionadas. La identificación de las mutaciones se realiza mediante PCR y secuenciación. El estudio proteico de Btk se hizo mediante Western blot y citometría de flujo. Estudiamos la actividad quinasa de Btk por Western blot con detección del residuo tirosina-223 de Btk fosforilado. Se están realizando estudios de clonaje de cDNA de Btk para posterior transfección en líneas celulares.

**Resultados.** Hasta el momento hemos identificado el defecto en el gen de la Btk en 46 familias (19 missense, 13 deleciones, 8 nonsense, 4 mutaciones a nivel de intrón, una inserción y una duplicación). La expresión proteica estudiada por Western blot y citometría en 44 familias muestra que 10 de ellas expresan proteína (9 mutaciones missense y una deleción). En estos pacientes hemos observado que dos mutaciones no autofosforilan y en tres mutaciones sí, estando pendientes las cinco restantes.

**Conclusiones.** El estudio de expresión proteica por citometría no es definitivo para el diagnóstico de ALX ya que las mutaciones que expresan proteína son indistinguibles del control. Se observa que mutaciones fuera del dominio quinasa (R288W y K374N) permiten la autofosforilación de la tirosina 223 implicada en la activación de la Btk, mientras que mutaciones en dicho dominio (K430E y F540S) la impiden. La mutación R544S a pesar de estar en el dominio quinasa muestra autofosforilación, debido a que dicha arginina está implicada en mantener inactiva a la Btk. En la actualidad estamos tratando de transfectar cDNA de Btk en líneas celulares para realizar estudios de corrección del defecto genético.

**F-0011-14-O. DIAGNOSTICO NEONATAL DE UN PORTADOR DE LINFOHISTIOCITOSIS HEMOFAGOCITICA FAMILIAR CON DEFECTO EN PERFORINA. J. Gil<sup>1</sup>, C. Rodríguez-Sainz<sup>1</sup>, E. Cela<sup>2</sup>, P. Calvo<sup>1</sup>, A. García-Segovia<sup>1</sup>, R. Lillo<sup>3</sup>, M.A. Martín<sup>4</sup>, A. Madrid<sup>5</sup>, E. Fernández-Cruz<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Oncología Hematológica Pediátrica del Hospital General Universitario «Gregorio Marañón». <sup>3</sup>Unidad Funcional de Biología Molecular. Centro de Transfusión de Madrid. <sup>4</sup>Servicio de Anatomía Patológica Hospital «12 de Octubre». <sup>5</sup>Servicio de Pediatría del Hospital General «La Mancha Centro».**

**Introducción.** La linfocitosis hemofagocítica familiar (LHF) se caracteriza por fiebre, hepatoesplenomegalia, citopenias y

afectación neurológica, con infiltración tisular de linfocitos y macrófagos activados con hemofagocitosis. Aproximadamente un 30% de los casos presentan defectos en perforina, molécula mediadora en los mecanismos de citotoxicidad T y NK. El gen de perforina (PRF1) se localiza en 10q21.3-22, siendo su expresión constitutiva en los gránulos citolíticos de las células NK.

**Pacientes y métodos.** Varón con antecedentes de consanguinidad y diagnóstico de LHF a los 9 meses; padres y hermanos sanos. Análisis de la expresión intracitoplásmica de perforina (Pharmingen) en los linfocitos NK circulantes definidos por marcaje de superficie con CD56, CD8 y TCR  $\alpha\beta$  (Becton&Dickinson) por citometría de flujo. Extracción de DNA genómico y amplificación de los exones 2 y 3 de PRF1 por PCR (4 min a 94°C, 40 ciclos de 30 seg a 94°C, 30 seg a 60°C y 1 min a 72°C, y 10 min a 72°; Perkin Elmer 9700). Purificación de los fragmentos amplificados (Qiagen) y secuenciación directa utilizando terminadores marcados en un secuenciador automático ABI 3100.

**Resultados.** Hemos encontrado una transición de C por T en la posición 1304 del exón 3 de PER1 (C1304T) en esta familia, que no aparece en los controles sanos analizados. Los familiares portadores sanos estudiados presentan esta mutación en heterocigosis y una reducción de más del 50% en la expresión de perforina en sus células NK (intensidad media de fluorescencia: 32.6  $\pm$  6.6 vs 110.5  $\pm$  10.6 en controles sanos).

**Conclusiones y discusión.** La mutación C1304T determinaría una alteración en la secuencia de aminoácidos (thr435met) en un dominio muy conservado de unión a calcio en la molécula de perforina. La citometría de flujo es informativa para la identificación de portadores de LHF con defectos de perforina previa al estudio genético; permitiendo un diagnóstico neonatal en esta familia.

**F-0011-15-C. CÉLULAS T CD4+ CD25+ EN PACIENTES CON INMUNODEFICIENCIA VARIABLE COMÚN (IDVC).** S. Lopes da Silva<sup>2</sup>, D. Detková<sup>1</sup>, S. Urban<sup>1</sup>, E. Oliveros<sup>1</sup>, I. Caragol<sup>1</sup>, A. Alvarez<sup>3</sup>, A. Vidaller<sup>4</sup>, JM. Bertran<sup>5</sup>, T. Español<sup>1</sup>, M.Hernandez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Neumología y <sup>4</sup>Unidad de inmunodeficiencias del Hospital Vall d'Hebron. <sup>5</sup>Servicio de Medicina Interna del Hospital de Bellvitge (Barcelona) y <sup>2</sup>Unidad de Inmunoalergología de Hospital Santa María (Lisboa).

**Introducción.** La IDVC es una Inmunodeficiencia Primaria con defecto predominantemente de anticuerpos. Alrededor de un 30% de los pacientes con IDVC presentan patología autoinmune. A las células CD4+CD25+ de sangre periférica se les ha definido una función reguladora-efectora y parecen estar relacionadas con la etiología de las enfermedades autoinmunes.

**Objetivos.** Estudiar las células CD4+CD25+ en grupos de pacientes con IDVC y su relación con la clínica autoinmune.

**Métodos.** Se incluyeron en el estudio 30 pacientes con IDVC de los que se recogieron datos clínico-inmunológicos. Para subdividir el grupo de pacientes se utilizó la Clasificación de Freiburg: grupo 1 (n=25) (células B de memoria CD27+IgM-IgD- <0.4%), grupo 2 (n=5) (CD27+IgM-IgD- >0.4%). Subgrupo 1a (n=6) linfocitos B inmaduros (CD19+CD21- >20%), subgrupo 1b (n=19) (CD19+CD21- <20%). La caracterización fenotípica (CD45RO, HLA-DR) de las células T CD4+CD25+ se realizó mediante citofluorometría en la población CD25<sup>high+</sup> en un FACScalibur. Los resultados obtenidos en los pacien-

tes se compararon con un grupo control de donantes sanos (n=30). Análisis estadístico programa SPSS.

**Resultados.** 12 del total de pacientes presentaron patología autoinmune. La incidencia de autoinmunidad no presentó diferencia estadísticamente significativa entre los 3 grupos. Los porcentajes de células T CD4+CD25<sup>high+</sup> no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los 3 grupos. El porcentaje de células T CD4+CD25<sup>high+</sup> en los pacientes IDVC con autoinmunidad estuvo significativamente disminuido frente al grupo control (p<0.05). Los pacientes con porcentajes de células T CD4+CD25<sup>high+</sup> <1,21 presentaron una incidencia de enfermedad autoinmune significativamente superior (p<0,0001) con un riesgo relativo de 2,14 (IC95% =1,4-3,28).

**Conclusión.** Encontramos una asociación entre la presencia de patología autoinmune en pacientes con IDVC y el porcentaje de células T CD4+ CD25<sup>high+</sup>.

**F-0011-16-O. ESTUDIO DE LA ENFERMEDAD GRANULOMATOSA CRÓNICA LIGADA AL CROMOSOMA X EN 6 FAMILIAS.** E.M. Romo<sup>1</sup>, M.I. González<sup>2</sup>, P. de Pablos<sup>1</sup>, M. Guibelalde<sup>3</sup>, N. Nieto<sup>3</sup>, M. Cañellas<sup>3</sup>, J.T. Ramos<sup>2</sup>, J. Clemente<sup>2</sup>, J. Ruiz-Contreras<sup>2</sup>, L.M. Allende<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y de <sup>2</sup>Inmunodeficiencias. Hospital 12 de Octubre. Madrid. <sup>3</sup>Servicio de Hematología. Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca.

**Introducción.** La EGC es una inmunodeficiencia primaria con una incidencia de 1/250.000. Los fagocitos presentan un defecto en la capacidad bactericida y fungicida, por mutaciones en algún componente estructural del sistema NADPH-oxidasa, que les hace incapaces de producir radicales tóxicos para destruir los microorganismos. La clínica se caracteriza por infecciones recurrentes por gérmenes catalasa positivos y formación de granulomas en órganos como hígado, pulmones, bazo y órganos linfoides. El 75% de los pacientes con EGC tienen un defecto de la subunidad gp91-phox (citocromo b<sub>558</sub>) del complejo NADPH-oxidasa, codificada por el gen CYBB que se encuentra en el cromosoma X.

**Objetivos.** Estudio de la capacidad bactericida de fagocitos en 6 familias, que han sido diagnosticados de EGC por criterios clínicos y caracterización genética del gen CYBB.

**Métodos.** La capacidad bactericida de fagocitos se midió en sangre periférica mediante citometría de flujo y bioluminiscencia El estudio genético se llevó a cabo por PCR de los 13 exones del gen y secuenciación directa.

**Resultados.** Todas las familias estudiadas presentaban un estallido respiratorio prácticamente nulo, con lo que los datos clínicos concordaban con los hallazgos de laboratorio. El estudio genético nos reveló que dos de las familias presentaban mutaciones previamente descritas de los exones 7 y 10 del gen CYBB. El paciente que presentaba la mutación en el exón 7 era un caso de EGC atípica, ya que presentaba granulomas en el SNC y no en los órganos habituales. La mutación encontrada era una mutación de splicing que implicaba una delección completa del exón 7. La mutación del exón 10 se observó en dos hermanos varones que presentaban un cambio en el codon 415 de una C por una A (Prolina por Histidina).

**Conclusiones.** No deberíamos descartar que los individuos con granulomas atípicos y clínica sugerente sean enfermos de EGC. Los estudios funcionales y moleculares se correlacionan completamente con los casos descritos.

**F-0011-17-C. DÉFICIT CONGÉNITO TIPO I DEL COMPONENTE C2 DEL COMPLEMENTO. ESTUDIO FAMILIAR.** A. Prada<sup>1</sup>, M. Azkárate<sup>1</sup>, N. Maruri<sup>1</sup>, M. Riñón<sup>1</sup>, J.M.García<sup>2</sup>, M.López Trascasa<sup>3</sup>, A. Arrieta<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Inmunología, <sup>2</sup>Sección de Alergia e Inmunología Pediátrica, Hospital de Cruces. Barakaldo. Bizkaia. <sup>3</sup>Servicio Inmunología. Hospital La Paz. Madrid.

El déficit congénito tipo I del componente C2 del complemento es la más común de las deficiencias de factores de complemento en población caucasoide. La herencia descrita es de carácter autosómico recesivo. El déficit genético se ha descrito como una delección de 28pb del exón 6 del gen que codifica para C2, éste gen está situado en el brazo corto del cromosoma 6 en el MHC III localizado entre la región HLA Clase I y la región HLA clase II. Se ha descrito la asociación de éste déficit con el Haplotipo HLA A25 B18 DR15.

Este déficit se asocia a infecciones piógenas en la infancia y a procesos autoinmunes, aunque un porcentaje de individuos permanece asintomático.

Presentamos el estudio familiar de una paciente de 5 años con procesos catarrales de repetición, un episodio de celulitis periorbitaria y sinusitis maxilar y posteriormente neumonía lili y meningitis purulenta.

Se ha estudiado la paciente, los padres, tía y abuelo maternos. En los estudios realizados se incluye la cuantificación de los factores C3 y C4, capacidad hemolítica global del complemento, capacidad hemolítica de C2, cuantificación de inmunoglobulinas, subclases de IgG y Tipaje HLA clase I y II.

En todos los miembros de la familia fueron normales los valores de C3, C4, inmunoglobulinas y subclases de IgG.

La capacidad hemolítica global del complemento así como la capacidad hemolítica de C2 eran nulas en la paciente y su madre, estaban disminuidas en la tía y abuelo, y eran normales en el padre.

En el estudio de HLA se vio que tanto la paciente como la madre eran homocigotas B18 DRB1\*15, la tía, el abuelo y el padre eran heterocigotos B18 DRB1\*15.

Los resultados del estudio de complemento en el padre no muestra que sea portador del déficit, sin embargo habría que estudiar la delección asociada al déficit, ya que la hija presenta déficit completo de C2.

**F-0011-18-O. DETECCIÓN DE ALTERACIONES FUNCIONALES DEL REGULADOR DEL COMPLEMENTO FACTOR H EN SUERO: RELEVANCIA PARA EL ESTUDIO, DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL SÍNDROME HEMOLÍTICO-URÉMICO.** P. Sánchez-Corral<sup>1</sup>, C. Abarrategui<sup>1</sup>, J. Esparza<sup>2</sup>, S. Rodríguez de Córdoba<sup>2</sup>, M. López-Trascasa<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología. Hospital Universitario La Paz, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología. Centro de Investigaciones Biológicas, Madrid.

El Síndrome Hemolítico-Urémico, SHU, es una enfermedad poco frecuente que, sin embargo, constituye la causa más frecuente de fallo renal agudo en niños menores de 5 años. La forma más grave, denominada SHU atípico y presente también en adultos, se caracteriza por la recurrencia de la patología, que produce una elevada mortalidad y conduce a la mayoría de los supervivientes hacia insuficiencia renal crónica. En estos enfermos, el porcentaje de recidivas postransplante es también muy elevado. Un 20-30% de los enfermos de SHU

atípico presentan mutaciones en el gen de factor H. Factor H regula la activación de la vía alternativa del Complemento en el plasma y sobre superficies celulares. Las mutaciones identificadas en enfermos de SHU atípico alteran específicamente la capacidad de factor H para controlar la activación del Complemento sobre superficies celulares. Hemos desarrollado un ensayo hemolítico que permite detectar estas alteraciones de factor H en muestras de suero o plasma. El ensayo determina la capacidad del Complemento para lisar hematíes de carnero por la vía alternativa, y se ha llevado a cabo en enfermos de SHU y en individuos control. Los resultados revelan que el suero de los enfermos con mutaciones en factor H es capaz de lisar estos hematíes en condiciones en las que el suero de los individuos control no lo hace, y que esta lisis anómala se previene mediante la adición de factor H purificado de individuos sanos. Estos resultados confirman que el SHU resulta de una protección insuficiente de los propios tejidos frente a la acción del Complemento. El ensayo hemolítico puede ser una herramienta de gran utilidad en el diagnóstico y pronóstico del SHU asociado a factor H, que facilite la elección del tratamiento más adecuado.

**F-0011-19-C. DETECCIÓN DE INMUNOCOMPLEJOS C3-FH EN LA DEFICIENCIA DE FACTOR I, Y EN OTRAS PATOLOGÍAS DEL COMPLEMENTO. SEGUIMIENTO EN EL TIEMPO Y CORRELACIÓN CON LA CLÍNICA.** I. M. Ponce, P. Sánchez-Corral, C. González-Rubio, G. Fontán, M. López-Trascasa. Unidad de Inmunología. Hospital Universitario La Paz. Madrid.

**Introducción.** La deficiencia del factor regulador del Complemento Factor I, es una enfermedad poco frecuente de herencia autosómica recesiva, que se asocia mayoritariamente con infecciones frecuentes y con patologías tipo Lupus y Glomerulonefritis por una deficiente eliminación de Inmunocomplejos.

La disponibilidad en la Unidad de Inmunología de dos familias deficientes en Factor I nos ha permitido estudiar las alteraciones analíticas y moleculares, que se describieron en Congresos anteriores. En esta comunicación se presentan las alteraciones bioquímicas observadas, relacionadas con la regulación del Complemento.

**Objetivos.** Detección y cuantificación de los complejos C3-FH, que se han descrito en algunos deficientes de Factor I. Seguimiento de los niveles de complejos en el tiempo y correlación con la clínica. Análisis de los complejos en otras patologías en las que el complemento está implicado. Cuantificación de Factor I y análisis mutacional del gen en los enfermos en los que se detecten complejos C3-FH.

**Métodos.** Se han utilizado técnicas de ELISA para determinar los niveles de Factor I y para analizar los complejos C3-Factor H. Las muestras estudiadas son sueros procedentes de todos los miembros de las familias deficientes en Factor I, de enfermos con Síndrome Urémico Hemolítico, Glomerulonefritis y Lupus Eritematoso y controles sanos.

**Resultados y conclusiones.** Hemos detectado la presencia de complejos C3-FH en los enfermos con deficiencia de Factor I y en algunos pacientes con otras patologías. En cambio no se han detectado estos complejos ni en los padres de los deficientes ni en controles. Se ha observado una asociación entre la presencia de estos complejos y niveles bajos de C3, pero no así con los niveles de Factor I. El análisis mutacional del gen de Factor I, permitirá determinar la posible existencia de una deficiencia funcional de Factor I en estos enfermos.

Financiación: Fundación Lair.

**F-0011-20-O. ESTUDIO CLÍNICO Y EPIDEMIOLOGICO DEL ANGIOEDEMA HEREDITARIO EN ESPAÑA.** A. Blanch<sup>1</sup>, O. Roche<sup>1</sup>, N. Sastre<sup>2</sup>, D. Callejo<sup>2</sup>, MC. López Serrano<sup>3</sup>, G. Fontán<sup>1</sup>, MT. Caballero<sup>3</sup>, M. López Trascasa<sup>1</sup>. *Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Bioestadística y <sup>3</sup>Alergia del Hospital Universitario La Paz. Madrid.*

**Introducción.** El angioedema hereditario (HAE) es una enfermedad autosómica dominante causada por la deficiencia de C1-inhibidor (C1-Inh). La manifestación clínica más severa es el edema de glotis, que puede producir la muerte por asfixia. El tratamiento profiláctico se realiza con andrógenos atenuados, antifibrinolíticos, o C1-Inh; y el tratamiento de crisis agudas con infusiones de C1-Inh. No hay datos precisos sobre la prevalencia del HAE, que se estima en 1/10.000-100.000 habitantes.

**Objetivos.** Conocer los datos epidemiológicos y clínicos de la población española afectada de HAE.

**Métodos.** Las familias se han localizado contactando con la Asociación Española De Angioedema Familiar (AEDAF), y los distintos servicios hospitalarios que pudieran estar implicados en el tratamiento y/o diagnóstico del HAE. Finalmente se ha contactado telefónicamente con todos los pacientes entre Junio de 2003 y Febrero de 2004.

**Resultados.** Se han localizado 440 pacientes con HAE pertenecientes a 135 familias, lo cual da una prevalencia mínima de 1/100.000 habitantes. La prevalencia del HAE es claramente menor en algunas regiones del país, lo cual sugiere la existencia de casos no detectados o sin diagnosticar. La edad media de aparición de los síntomas es 12.7 años, y la edad media al diagnóstico 25.0, lo cual deja un retraso medio en el diagnóstico de 12.3 años. El 23% de los pacientes son asintomáticos. De los casos que sí presentan síntomas clínicos, el 29% no sigue ningún tratamiento profiláctico. Del total de pacientes sintomáticos, el 53% ha recibido infusiones de C1-Inh, y el 16% de ellos ha tenido alguna dificultad para conseguir este medicamento. Entre las 135 familias se recuerdan 38 casos de familiares muertos por causas atribuibles al HAE.

**Conclusiones.** El HAE es una enfermedad poco frecuente (prevalencia mínima 1/100000). Esta enfermedad representa un claro peligro para la vida. Hay que destacar las deficiencias que todavía existen tanto en el tratamiento como en el diagnóstico.

**F-0011-21-C. PRIMER CASO DE DEFICIENCIA HOMOCIGOTA DE C1 INHIBIDOR.** O. Roche<sup>1</sup>, A. Blanch<sup>1</sup>, M. A. Saboya<sup>1</sup>, I. Urrutia<sup>2</sup>, P. Gamboa<sup>2</sup>, G. Fontán<sup>1</sup>, M. López Trascasa<sup>1</sup>. *<sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario La Paz. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Alergia, Hospital de Basurto. Bilbao.*

**Introducción.** El Angioedema hereditario (HAE) es una enfermedad causada por la deficiencia del inhibidor de C1 (C1-inh) del sistema de complemento, ya sea antigénico (HAE Tipo I) o funcional (HAE Tipo II). El patrón de herencia es autosómico dominante, y la deficiencia homocigota es aparentemente letal. Sólo hay descrita una mutación en la zona promotora del gen que da lugar a una transmisión recesiva de la enfermedad. Esta mutación afecta a la transcripción del ADN pero no a la función de la proteína. Las principales manifestaciones de esta enfermedad son edemas no inflamatorios, recurrentes y localizados que afectan al tejido subcutáneo o submucoso.

**Objetivos.** Estudiar las mutaciones presentes en el gen del C1-inh en la población española afectada de HAE.

**Materiales y Métodos.** Se ha analizado una serie de 90 familias españolas con HAE mediante PCR, SSCP, Southern blot y secuenciación.

**Resultados.** En uno de los pacientes estudiados se ha encontrado el cambio Ile440Ser en homocigosis. Esta mutación, que no ha sido descrita previamente, afecta a un residuo próximo al centro activo que es la Arg 444. El paciente, de 20 años de edad, presenta niveles disminuidos de C4 y C1-inh (HAE Tipo I), y unos niveles indetectables de C1q. Los primeros síntomas de la enfermedad aparecieron cuando tenía 9 años y desde entonces presenta un episodio al año que cursa con edema de labios y pómulos. No realiza ningún tratamiento debido a la poca severidad de los síntomas. Los padres que portan la misma mutación en heterocigosis presentan niveles disminuidos de C4, normales de C1-inh pero con la función disminuida (HAE Tipo II) y normales de C1q. Hasta el momento permanecen asintomáticos.

**Conclusiones.** Este es el primer caso descrito de deficiencia homocigota de C1-inh producido por una mutación en la zona codificadora del gen. Las consecuencias del cambio Ile440Ser en la proteína serán estudiadas para determinar como afecta a su secreción y función.

**F-0011-22-C. HIPOCOMPLEMENTEMIA SEVERA PERSISTENTE.** A. Andrés<sup>1</sup>, M. Rubio<sup>1</sup>, J. Campos<sup>1</sup>, L. Sánchez<sup>1</sup>, R.R. Pena<sup>1</sup>, J.A. García-Trujillo<sup>1</sup>, C. Quereda<sup>2</sup>, J.L. Casañer<sup>1</sup>, A. Bootello<sup>1</sup>. *<sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Servicio de Enfermedades Infecciosas. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.*

**Caso Clínico.** Paciente de 29 años en la que se detectan cifras muy disminuidas de complemento (C3 21.4 mgr/dl, C4 3.1 mgr/dl) coincidiendo con meningitis meningocócica con sepsis y coagulopatía, con buena respuesta al tratamiento antibiótico. Es remitida a nuestra consulta un mes después del alta, encontrándose asintomática y persistiendo, durante los 10 meses siguientes, cifras de C3 1.5 mgr/dl y C4 12 mgr/dl.

No presenta ninguna sintomatología excepto un episodio de urticaria/vasculitis en miembros inferiores a los 6 meses de seguimiento, con buena respuesta a antihistamínicos y corticoides. Antecedentes personales: Alergia a Tobramicina. Anisakiasis hace 3 años. Tuberculosis pulmonar hace 7 años. Neumonía hace 9 años. Cuadro cutáneo etiquetado de Raynaud atípico desde hace cuatro años, cursa en brotes sin clara estacionalidad. Infecciones ORL frecuentes en la infancia. No se dispone de cifras de complemento previas. AF Un hermano muerto a los 4 días de vida por rubeola. Resto sin interés.

Hemograma y bioquímica sin hallazgos significativos. Estudio del complemento: Cifras profundamente disminuidas de: C3, C4, C1q, C5, C7, C8. Inmunoglobulinas séricas: dentro de la normalidad. Inmunofenotipo de sangre periférica: normal. Serología VHC, VHB, CMV: negativa. EBV: IgG +, IgM -. ANA y ANCA: negativos. Crioglobulinas: negativas.

**Conclusiones:** Presentamos un caso de hipocomplementemia severa persistente que cursa de forma oligosintomática. El estudio de complemento sugiere patología de consumo pero no se detectan alteraciones clínicas ni analíticas asociadas que justifiquen la disminución profunda y persistente de las cifras de complemento.



**F-0011-23-C. DEFECTOS FAMILIARES DEL FACTOR C2 DEL COMPLEMENTO TIPO I (28 BP DEL). FRECUENCIA EN POBLACIÓN ESPAÑOLA Y HAPLOTIPOS HLA ASOCIADOS.** S. Calleja Antolín<sup>1</sup>, M.J. Del Rey Cerros<sup>1</sup>, P. Varela Peña<sup>1</sup>, L. Allende Martínez<sup>1</sup>, J. Clemente<sup>2</sup>, E. Giangaspro<sup>2</sup>, S. Negreira<sup>2</sup>, D. Oliver Miñarro<sup>1</sup>, E. Mancebo Sierra<sup>1</sup>, E. Paz Artal<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Pediatría, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

El déficit del Factor C2 por deleción de 28 pares de bases (28 bp del) en el exón 6 (defecto tipo I) es la deficiencia más frecuente del sistema del complemento. En este trabajo se presenta el estudio familiar de dos casos. El primero de ellos (AP) fue un varón de 12 años con sepsis repetidas antes de los 3 años y que ingresa en la actualidad con un cuadro infeccioso y hemocultivo positivo para *N. meningitidis*. El

segundo caso (VP) fue un varón de 5 años que ha sufrido tres episodios de bacteriemia con cultivos positivos para *S. Pneumoniae* en dos ocasiones y *N. meningitidis* en otra. Ambos pacientes muestran niveles de C2 y complemento hemolítico total muy disminuidos. Hasta el momento no han presentado rasgos clínicos ni analíticos de autoinmunidad.

Se realizó el estudio genético de la «28 bp del» y el tipaje HLA en los propósitos y sus familiares: ambos casos se identificaron como homocigotos para la mutación. AP es portador de los haplotipos A\*25-B\*18-DR\*15 y A\*26-B\*18-DR\*15; y VP lleva los haplotipos A\*25-B\*18-DR\*15 y A\*31-B\*18-DR\*09.

Se ha realizado, además, un estudio epidemiológico de la frecuencia de la mutación «C2 28 bp del» en una amplia muestra de población española sana, y un análisis de su asociación con los haplotipos HLA.

## F-0012. HIV y SIDA

**Moderadores:** Emilio Cuadrado del Barrio (San Sebastián), Eduardo Fernández-Cruz Pérez (Madrid)

**F-0012-01-O. LA GLICOPROTEÍNA GP120 DEL VIH ES INDUCTORA DE LA COX-2.** S. Álvarez<sup>1</sup>, M.J. Serranía<sup>1</sup>, M.A. Iñiguez<sup>2</sup>, M. Fresno<sup>2</sup>, M.A. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, HGUGM. <sup>2</sup>CBM «Severo Ochoa», UAM.

**Introducción.** Entre un 20-30% de los individuos infectados por el VIH-1 desarrollan demencia desconociéndose los mecanismos que inducen daño neurológico en estos individuos, parece evidente que la proteína viral gp120 puede ser el principal agente causal de la muerte celular característica de esta enfermedad. Resultados recientes proponen que la ciclooxigenasa 2 (COX-2) desempeña un papel importante en esta patología.

**Objetivo.** Estudiar la inducción de COX-2 por la gp120 en células de neuroblastoma (NB) y las rutas implicadas.

**Métodos.** Utilizamos las células SK-N-MC. Medimos ARNm-COX-2 mediante PCR cuantitativa y proteína mediante Western-Blot e IFI. Además realizamos ensayos de transfección transitoria con el plásmido que expresa el gen de la luciferasa dirigido por el promotor de la COX-2 (P2-1900), que incluye la región de -1796 a +104 del gen de COX-2 humano. Para determinar el papel de diferentes factores de transcripción en la regulación del promotor realizamos experimentos de cotransfección con el plásmido P2-1900 más plásmidos que controlan la expresión de proteínas como p65, Iκβ-α, una forma mutante dominante negativa de NFAT (dn-NFAT) y una forma dominante negativa de c-jun (dn-cjun). Analizamos el efecto del agente bloqueante de NF-κB, PDTC y de varios inhibidores de MAPK sobre la actividad del promotor de la COX-2 así como la actividad de MAPK por Western-Blot.

**Resultados.** La gp120 induce ARNm-COX-2 y la proteína. Aumenta la actividad del promotor en células SK-N-MC. La superexpresión de la forma dn-cjun así como la de Iκβ-α suprimió la actividad del promotor inducida por gp120 así como la de p65 la indujo. La cotransfección con el dn-NFAT no inhibió esta actividad. Tanto el PDTC como el inhibidor de MAPKp38, SB202190, redujeron la síntesis de proteína y la actividad del promotor. La gp120 aumenta la actividad de MAPK.

**Conclusión.** Nuestros resultados muestran que la gp120 aumenta la actividad del promotor de la COX-2 y la expresión de la proteína en células SK-N-MC, asignando por primera vez un papel determinante a los factores NF-κB y AP-1.

**F-0012-02-C. CAMBIOS EN EL SISTEMA INMUNE DE NIÑOS INFECTADOS VERTICALMENTE POR EL VIH EN TRATAMIENTO CON TERAPIA ANTIRETROVIRAL DE GRAN ACTIVIDAD CON LOPINAVIR/RITONAVIR.** S. Resino<sup>1</sup>, I. Galán<sup>1</sup>, A. Pérez<sup>1</sup>, J.T. Ramos<sup>2</sup>, J.M. Bellón<sup>3</sup>, P. Martín Fontelos<sup>4</sup>, M.I. de José<sup>5</sup>, M.D. Gurbindo Gutiérrez<sup>6</sup>, E. Cabrero<sup>7</sup>, M.Á. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, Hospital General Universitario «Gregorio Marañón». <sup>2</sup>Sección de Inmuno-Pediatría, Hospital «12 de Octubre». <sup>3</sup>Unidad de Investigación, Hospital General Universitario «Gregorio Marañón». <sup>4</sup>Servicio de Pediatría-Infeciosas, Hospital «Carlos III». <sup>5</sup>Sección de Inmuno-Pediatría, Hospital «La Paz». <sup>6</sup>Sección de Inmuno-Pediatría, Hospital General Universitario «Gregorio Marañón». <sup>7</sup>Abbott Laboratories, Madrid.

**Objetivos.** Estudiar los cambios de varias características inmunológicas (subpoblaciones de linfocitos T, función tímica) y virológicas (carga viral (CV), fenotipo viral) en 20 niños infectados por el VIH en terapia antiretroviral de gran actividad (TARGA) con Lopinavir/ritonavir (LPV/r).

**Pacientes.** Estudio longitudinal en el que los niños fueron controlados cada 3 meses durante un periodo de seguimiento de 18 meses. Se realizó una estadística para datos apareados (Test de Wilcoxon) tomando como referencia siempre el valor basal a la entrada en el estudio.

**Resultados.** Los niños infectados por el VIH mostraron un incremento en los valores de linfocitos T CD4+ y de TRECs, y un descenso de los valores de linfocitos T CD8+. Sin embargo, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre el inicio y el final del estudio. Por otro lado, los niños VIH tuvieron un significativo descenso de la CV

( $p=0,019$ ). El porcentaje de niños VIH con CV detectable (CV >400 copias/ml) ( $p=0,007$ ) y fenotipo viral inductor de sincitios (SI) ( $p=0,002$ ) descendió al final del estudio. Solo los linfocitos T CD4+ de memoria tuvieron un descenso estadísticamente significativo durante el seguimiento. Sin embargo, los linfocitos T CD8+ de memoria (CD8+CD45RO+ y CD8+CD45RO+CD38+), activados (CD8+HLA-DR+CD38+, CD8+HLA-DR+, CD8+CD38+) y efectores (CD8+CD57+, CD8+CD28-CD57+) tuvieron un importante descenso durante el seguimiento.

**Conclusión.** Los niños infectados verticalmente por el VIH y tratados con TARGA con LPV/r tuvieron un descenso importante en la activación del sistema inmune aunque el control de la replicación del VIH no fue completo en todos los niños VIH.

**F-0012-03-C. RESPUESTA VIROLÓGICA A LA TERAPIA DE RESCATE CON LOPINAVIR/RITONAVIR EN NIÑOS INFECTADOS POR EL VIH-1 CON TRATAMIENTO PREVIO CON UN INHIBIDOR DE LA PROTEASA.** S. Resino<sup>1</sup>, J.M. Bellón<sup>1</sup>, I. Galán<sup>1</sup>, J.T. Ramos<sup>2</sup>, M. Gonzalez-Rivera<sup>1</sup>, M.I. de José<sup>3</sup>, M.I. González<sup>2</sup>, D. Gurbindo<sup>4</sup>, M.J. Mellado<sup>5</sup>, E. Cabrero<sup>6</sup>, M.Á. Muñoz-Fernández<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, Hospital Gregorio Marañón, Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Pediatría, Hospital «12 de Octubre», Madrid. <sup>3</sup>Departamento de Pediatría, Hospital la Paz, Madrid. <sup>4</sup>Departamento de Pediatría, Hospital Gregorio Marañón, Madrid. <sup>5</sup>Departamento de Pediatría, Hospital Carlos III, Madrid. <sup>6</sup>Laboratorios Abbott, Madrid.

**Antecedentes.** Lopinavir/ritonavir (LPV/r) ha demostrado actividad antiviral en pacientes infectados por VIH.

**Objetivo.** Analizar la respuesta virológica a la terapia con LPV/r en niños infectados por el VIH-1 en tratamiento previo con un inhibidor de la proteasa (IP).

**Pacientes y métodos.** Sesenta y siete niños VIH-1+ en terapia con LPV/r fueron incluidos en un estudio de cohorte observacional prospectivo multicéntrico. Las variables consideradas fueron carga viral indetectable (CVi; CV ≤400 copias/ml) y fallo virológico después de CVi con un repunte de CV >400 copias/ml. La CV y el genotipo de los aislados VIH-1 se midieron utilizando ensayos estándar.

**Resultados.** El 83,5% de los niños tuvo una caída de 1 log10 CV, incluyendo el 65,6% que alcanzaron CVi. Los niños con más de 2 cambios de terapia antirretroviral (TAR) o con más de 5 drogas, necesitaron una mediana de tiempo de 3-4 meses más que los niños con 2 o menos cambios de TAR, o 5 drogas o menos previas a la terapia con LPV/r, para alcanzar esos valores. La proporción relativa (PR) fue 2,2 ( $p=0,038$ ) y 1,9 ( $p=0,050$ ) respectivamente. Los niños con CD4+ >15% ( $p=0,122$ ), CV ≤30.000 ( $p>0,001$ ) copias/ml, y edad mayor a 12 años ( $p=0,096$ ) lograron un control temprano de la CV durante el seguimiento. Los niños con fallo virológico o repunte de la CV, tuvieron valores basales más altos de CV, menores linfocitos T CD4+/mm<sup>3</sup>, y habían tomado un mayor número de drogas antes de la terapia con LPV/r. Los niños VIH con un nuevo NRTI, o IP, o IP más un NNRTI en el régimen actual, tuvieron una mejor respuesta virológica que los niños sin esas drogas. Además, los niños con menos de 6 mutaciones en el gen de la proteasa tuvieron una PR de 2,31 para alcanzar CVi.

**Conclusiones.** La TARGA incluyendo LPV/r induce efectos beneficiosos en la respuesta virológica, y es una opción efectiva como terapia de rescate en niños infectados por VIH-1 con un tratamiento previo con IP.

**F-0012-04-C. MARCADORES BIOLÓGICOS IMPLICADOS EN LAS ALTERACIONES DERMATOLÓGICAS EN LOS NIÑOS VIH+ ANTES Y DESPUÉS DE LA UTILIZACIÓN DEL TRATAMIENTO ANTIRRETROVIRAL DE ALTA EFICACIA.** M.E. Seoane Reula<sup>1</sup>, J.T. Ramos<sup>2</sup>, J.M. Bellón<sup>1</sup>, M.L. Navarro<sup>3</sup>, M.D. Gurbindo Gutierrez, M.A. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, HGU «Gregorio Marañón» Madrid. <sup>2</sup>Consulta de Pediatría del Hospital Doce de Octubre, Madrid. <sup>3</sup>Consulta de Pediatría-Infeciosas HGU «Gregorio Marañón». <sup>4</sup>Consulta de Inmuno-Pediatría HGU «Gregorio Marañón», Madrid.

**Introducción.** La infección por el VIH resulta en una grave inmunodeficiencia celular, lo que se traduce en una gran susceptibilidad a alteraciones de etiología infecciosas e inflamatorias y enfermedades malignas. La piel es el órgano más frecuentemente afectado en los pacientes infectados por el VIH. Objetivos: Determinar la incidencia de las alteraciones dermatológicas en un grupo de niños infectados verticalmente y la correlación con los marcadores inmunológicos (linfocitos T CD4+, TCD8+) y marcadores virológicos (carga viral y el fenotipo de los aislados virales) y el tipo de tratamiento recibido por cada niño.

**Materiales y métodos.** Estudio retrospectivo, observacional en una cohorte de 210 niños infectados verticalmente tras 22 años, pertenecientes a dos hospitales de referencia de la Comunidad de Madrid, el Hospital Doce de Octubre y el Hospital Gregorio Marañón. La prevalencia de las alteraciones dermatológicas se relaciona con los marcadores inmunológicos y virológicos y se distribuye por periodos de calendario según la estrategia terapéutica mayoritaria de cada periodo.

**Resultados.** El 56% de los niños presentaron alteraciones dermatológicas durante el periodo de seguimiento de estudio. Las alteraciones dermatológicas más frecuentes fueron las de etiología infecciosa y entre ellas, la más frecuente, la infección por *Candida albicans*. El periodo de calendario comprendido entre los años 1997 y 1998, fue el periodo con mayor número de niños con alteraciones dermatológicas, periodo que se caracterizó porque el tratamiento mayoritario fue en forma de terapia combinada. Además, el 69% de las alteraciones dermatológicas de etiología infecciosa se relacionaron con un fenotipo viral muy citopático, inductor de sincitios. En el último periodo de calendario, caracterizado por la terapia con TARGA (1999-2002) la prevalencia de las alteraciones dermatológicas descendió drásticamente al 10% y siendo un 5% alteraciones etiología infecciosa y el otro 5% de etiología inflamatoria.

**Conclusión.** La terapia antirretroviral de alta eficacia, ha tenido un gran impacto sobre prevalencia y el espectro de las alteraciones dermatológicas asociadas a la infección por el VIH en niños.

**F-0012-05-C. ÓPTIMA RECONSTITUCIÓN INMUNE Y REACTIVACIÓN DEL HERPES ZOSTER EN UN PACIENTE VIH+ TRATADO CON DOS ANÁLOGOS DE NUCLEÓSIDOS.** M.E. Seoane Reula<sup>1</sup>, M.D. Gurbindo Gutierrez<sup>2</sup>, M.A. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmuno-Biología Molecular, HGU «Gregorio Marañón». <sup>2</sup>Consulta de Inmuno-Pediatría «Gregorio Marañón».

**Introducción.** En la infección por el VIH, se producen un elevado número de alteraciones dermatológicas. Entre ellas la infección por el Virus Varicela-Zoster (VVZ) que se ha relacionado con el pro-

greso de la infección hacia la inmunodepresión como con la recuperación inmune tras tratamiento con los inhibidores de la proteasa (IPs). En la actualidad, se están valorando otras estrategias terapéuticas más conservadoras, ya estos tratamientos antirretroviral de alta eficacia (TARGA) son de muy larga duración, no están exentos de efectos secundarios, sobre todo los IPs.

**Métodos.** Determinación de carga viral (CV) mediante un ensayo molecular estándar, se cuantificaron las cifras de linfocitos T CD4+ y T CD8+ mediante citometría de flujo, y se realizó el análisis de la función tímica a través de la cuantificación, mediante una PCR cuantitativa a tiempo real, de los círculos de excisión producidos en el reordenamiento génico del receptor del linfocito T: TRECS, que se generan durante la formación de linfocitos T en el timo.

**Caso clínico.** Niña VIH+ infectada verticalmente, que desarrolla varios episodios de herpes zoster en la región glútea izquierda, durante un periodo de inmunosupresión severa (linfocitos TCD4+: 1,26%, T CD8+: 60,2% y cociente CD4/CD8:0,02 y TRECS: 410 copias/100,000 células PMN de SP) y una carga viral (CV):2900 copias/ml. A los seis meses de tratamiento con dos inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (ITIN) desarrolla otro episodio de herpes en la misma zona, con un porcentaje de linfocitos T CD4+: 34,37%, T CD8+: 45,15% y TRECS: 5 766 copias/100000 PMN y CV indetectable.

**Conclusión.** Este caso muestra como con el tratamiento con dos ITINs se obtiene una óptima reconstitución inmune y como consecuencia, se produce la reactivación de VHZ. El tratamiento con dos ITINs, en este caso, produce una óptima reconstitución inmune aunque más tardía que con la TARGA, podría ser una opción a tener en cuenta en algunos casos.

**F-0012-06-C. PAPEL DE LA PROGESTERONA EN LA DISMINUCIÓN DE LA TRANSMISIÓN VERTICAL A TRAVÉS DE LA DISMINUCIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE TNF-ALPHA.** L. Díaz Muñoz, M.A. Muñoz-Fernández. Laboratorio Immunobiología Molecular. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

**Introducción.** La transmisión vertical del VIH es un gran problema de salud mundial. Sin tratamiento antirretroviral (AR) el riesgo de transmisión es de un 10-39%, del cual un 30% ocurre *in utero*. El virus podría atravesar la barrera placentaria de la sangre materna a la fetal. El trofoblasto placentario (T) está en contacto directo con la sangre materna y, puede ser infectado por VIH.

**Métodos.** Utilizamos cultivos primarios de citotrofoblastos purificados y dos líneas trofoblásticas JAR y JEG-3. Realizamos ensayos de infección con distintos aislados virales procedentes de madres y de laboratorio. Realizamos estudios de expresión de receptores/correceptores virales por citometría de flujo y RT-PCR. Estudiamos el efecto de la progesterona (P4) y TNF en la transmisión del virus. Hicimos estudios a nivel molecular transfectando las células con distintos plásmidos: TNF, factor de transcripción NFkB y regiones LTR del VIH.

**Resultados.** La transmisión transplacentaria del VIH resulta de una compleja interconexión de distintos factores, siendo la adhesión de los linfocitos infectados por VIH con el T la principal vía de transmisión. La P4 disminuye la expresión del correceptor CXCR4 en linfocitos T no inhibiendo de manera significativa esta expresión en el T. P4 estimula la transcripción del NF-KB no inhibiendo la transcripción basal del LTR viral. El tratamiento con P4 de células trofoblásticas inhiben la síntesis del TNF inducida por la infección del VIH.

Además la transfección con el plásmido TNF-luc del T tratado con P4 produce una inhibición de la transcripción del TNF.

**Conclusiones.** En la infección del T están implicadas las moléculas de adhesión. Tras los tratamientos AR se observa un incremento de P4 que indicarían que la P4 inhibe la replicación del VIH disminuyendo la producción de TNF. El modelo sería P4 inhibe TNF, produciendo un desbalance hacia la producción de citocinas Th2 relacionado con la protección frente a la infección por VIH y éxito de la gestación.

**F-0012-07-C. CITOMETRIA DE FLUJO COMO METODO PARA DETECTAR ADHESION DE MEMBRANAS EN PACIENTES INFECTADOS POR EL VIH.** A. Garcia Segovia, S. Resino, M.J. Serramía, MA. Muñoz-Fernández. Laboratorio Immunobiología Molecular. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid

**Introducción.** Tras la introducción de la TARGA se ha comprobado que las características de adhesión del VIH varían con respecto a la historia natural de la infección. La citometría de flujo resulta un método viable para la determinación de la adhesión en células MT-2 infectadas por VIH NL 4.3.

**Objetivos.** 1) Comprobar la eficacia de la citometría de flujo como método para la determinación de la adhesión viral en células de pacientes VIH+. 2) Evaluar la correlación entre el método de co-cultivo con la línea celular MT-2 y la citometría de flujo. 3) Determinar, si las características fenotípicas pueden relacionarse con otras genotípicas.

**Métodos.** Células de pacientes VIH+ fueron marcadas tanto con 6 µM CMTMR en rojo como con 6 µM CMFDA en verde durante 30'. Células MT-2 fueron marcadas con CMTMR o CMFDA según el caso. Se realizaron co-cultivos de células de paciente con MT-2 marcadas. El análisis por citometría se realizó a las 24, 48 y 72 h. Por otra parte, 2 x 10<sup>6</sup> de células de paciente fueron co-cultivadas con 2 x 10<sup>6</sup> de PBLs de donante sano estimuladas con PHA e IL-2. Cada semana se añaden 2 x 10<sup>6</sup> de PBLs de donante estimuladas al co-cultivo. Transcurridas tres semanas se añaden al co-cultivo 2 x 10<sup>6</sup> de células MT-2 para determinar el fenotipo viral (SI o NSI).

**Resultados.** Nuestros resultados muestran que el doble marcaje obtenido por citometría se corresponde con la positividad para la adhesión de cada aislado viral, existiendo una correlación positiva entre los resultados obtenidos por citometría y los aportados por el método de co-cultivo en pacientes VIH+. Se están llevando a cabo los estudios genotípicos de secuenciación de envueltas virales para ver si existe una correlación entre genotipo y fenotipo (adhesión) viral.

**Conclusiones.** La citometría de flujo es fiable y rápida para el estudio de las características de adhesión viral en individuos VIH+. Los aislados VIH con una mayor adhesión viral se corresponden, al menos en los pacientes con peor pronóstico, con un fenotipo más citopático (X4/SI) observado por técnica de co-cultivo.

**F-0012-08-O. EFECTO DE LA PRODUCCIÓN DE RANTES INDUCIDA POR IL-7 EN LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH-1 Y LA APARICIÓN DE CEPAS X4.** A. Llano, J. Barretina, B. Clotet, J.A. Esté. Laboratorio de Retrovirología, Fundación IRSICAIXA, Hospital Universitario Germans Trias i Pujol, Badalona.

**Introducción.** En pacientes HIV-1 positivos, la interleucina (IL-7) es un marcador de la progresión de la infección y que podría

estar asociado a la aparición del fenotipo viral X4 (uso de CXCR4 como coreceptor viral) que se correlaciona con progresión rápida de la enfermedad y aparición del SIDA. Las  $\beta$ -quimiocinas actúan como potentes inhibidores de la fusión del VIH que utiliza CCR5 (cepas R5) en cultivo pero aumentan la producción viral de células ya infectadas por VIH.

**Objetivos.** Entender el efecto de IL-7 en la evolución del fenotipo del VIH y la aparición de cepas X4.

**Métodos.** Determinación de niveles de citoquinas y quimiocinas en plasma y en cultivos de células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos, en tejido linfóide de amígdala y en PBMC de pacientes HIV-1+, cuantificación de expresión de receptores por citometría de flujo.

**Resultados.** Hemos encontrado que IL-7 induce la sobre-expresión de CXCR4 y producción de  $\beta$ -quimiocinas (MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$  y RANTES) de manera dosis dependiente en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de donantes sanos, en tejido linfóide de amígdala y en PBMC de pacientes HIV-1+. La expresión de  $\beta$ -quimiocinas inducida por IL-7 parece inducir una leve pero clara down-regulación del CCR5 de manera similar al RANTES exógeno. En un estudio cross-seccional de 130 pacientes se observó una débil correlación positiva ( $r = 0.379$ ,  $p < 0.001$ ) entre los niveles plasmáticos de IL-7 y de RANTES, que mejoraba significativamente cuando eran excluidos de la correlación los individuos con menos de 200 células T CD4+ ( $r = 0.798$ ,  $p < 0.001$ ). Un análisis multivariado en un subgrupo de pacientes HIV+ con CD4 <200 cell/  $\mu$ l, IL-7 >7 pg/ml y RANTES >25 ng/ml la probabilidad de aparición del VIH de fenotipo X4 fue del 81%. Cuando estudiamos el efecto de HAART sobre la correlación entre IL-7 y RANTES, encontramos que HAART era capaz de reestablecer bajos niveles de IL-7 y generar un descenso concomitante de la producción de RANTES en pacientes previamente inmunodeprimidos.

**Conclusión.** Nuestros resultados permiten concluir que niveles elevados de IL-7 estimulan la aparición de cepas de VIH X4 por I) Sobre-expresión del coreceptor CXCR4, II) bloqueo del coreceptor CCR5 por la sobreproducción de  $\beta$ -quimiocinas dependiente de IL-7 y III) estimulación de la entrada y replicación del VIH de fenotipo X4.

*Financiación: MCyT BFI-2003-00405 y el European TRIOH Consortium*

**F-0012-09-O. DISFUNCION DE LA INMUNIDAD INNATA EN PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS VIH. I ALTERACION FUNCIONAL DE LAS CELULAS NK.** R. Sáez, P. Echaniz, M.D. de Juan, N. Olivares, J.A. Iribarren, E. Cuadrado. Sección de Inmunología y Unidad de Infecciosas. Hospital Donostia San Sebastián.

**Introducción.** A pesar de que numerosos datos sugieren que la inmunidad innata juega un papel clave en el control de la infección VIH, pocos estudios se han dirigido a analizar respuestas funcionales de la inmunidad innata en grupos de pacientes con distinta evolución clínica. Los linfocitos NK son un componente esencial de la inmunidad innata y pueden ser selectivamente estimulados directa o indirectamente a través de los TLRs (TLR3,7,9).

**Objetivo.** Evaluar la respuesta de linfocitos NK a estímulos selectivos de la inmunidad innata en dos grupos de sujetos infectados por VIH: Veinte pacientes no tratados con progresión analítica, caída de linfocitos CD4 y aumento de carga viral; y 18 sujetos LTNP (asintomáticos de evolución superior a 10 años).

**Metodología.** Cultivos celulares con oligonucleótidos-CpG no metilados de tipo A y B, RNA de doble cadena, y PMA + ionomicina; análisis de activación celular y de producción de IFN $\gamma$  en células T y NK por citometría de flujo. Comparación estadística de datos en ambos grupos por tests no paramétricos y análisis de regresión.

**Resultados.** Todos los sujetos LTNP respondieron al ODN-tipo A con producción de IFN  $\gamma$  similar a los controles (sujetos sanos, VIH negativos), mientras que los progresores mostraron un defecto significativo de la respuesta a este oligonucleótido. La respuesta funcional al RNA de doble cadena no difería significativamente entre los dos grupos, y en todos los casos dio lugar a la expansión de una subpoblación de células CD3- que expresa CD56 con muy alta densidad, cuyas características fenotípicas y funcionales están actualmente en estudio.

**Conclusión.** A diferencia de los sujetos LTNP, los progresores muestran un defecto funcional de la inmunidad innata que se traduce en la menor capacidad de producir IFN- $\gamma$  en respuesta a oligonucleótidos-CpG de tipo A. Esta deficiencia podría ser utilizada en la evaluación clínica de los sujetos infectados por VIH.

**F-0012-10-C. DISFUNCION DE LA INMUNIDAD INNATA EN PACIENTES INFECTADOS POR VIRUS VIH. II ALTERACION FUNCIONAL DE LAS CELULAS DENDRITICAS.** R. Sáez, P. Echaniz, M.D. de Juan, N. Olivares, J.A. Iribarren, E. Cuadrado. Sección de Inmunología y Unidad de Infecciosas. Hospital Donostia San Sebastián.

**Introducción.** Las células dendríticas (DCs) juegan un papel fundamental en el control de las enfermedades infecciosas, como células presentadoras y también como células efectoras y moduladoras que actúan como elementos de enlace de la inmunidad innata y la inmunidad específica. Estas funciones efectoras / reguladoras, las realizan mediante la secreción de citoquinas, como la IL12 y el IFN alfa, por subpoblaciones diferenciadas: CD tipo1 (mieloide) y CD tipo 2 (plasmocitoides), en respuesta a los estímulos reconocidos por sus TLRs (TLR3; IL12) (TLR7,9; IFN $\alpha$ , IL6).

**Objetivo.** Evaluar la respuesta funcional de las células dendríticas mieloides y plasmocitoides a estímulos selectivos de la inmunidad innata en dos grupos de sujetos infectados por VIH: Veinte pacientes con progresión analítica, no tratados, y 18 sujetos LTNP (asintomáticos de larga evolución).

**Metodología.** Cultivos celulares con una batería de estímulos de la inmunidad innata que incluye oligonucleótidos CpG tipos A y B; RNA de doble cadena y LPS; Cuantificación de citoquinas IL-12 e IFN alfa en sobrenadantes por elisa.

**Resultados.** Todos los sujetos LTNP dieron fuertes respuestas al oligonucleótido ODN-19 y la mayoría también respondieron al AAC30 (ambos de tipo A) produciendo altas concentraciones de IFN- $\alpha$  (>5000 pg/ml); la respuesta de los progresores a estos oligonucleótidos se encontró disminuida o ausente en el 37% (ODN19) y en el 45,5% (AAC30) de los casos. Un 87,5% de los LTNP y el 100% de los progresores mostraron fuerte respuesta al RNA-poli-IC, secretando cantidades de IL-12 superiores a 5000 pg/ml, y en menor grado en respuesta a un oligonucleótido de tipo B. La estimulación con el oligonucleótido AAC30, dio lugar a la secreción de IL-12 en el 12% de los LTNP y el 22% de los progresores. Por análisis de regresión se observó una correlación directa entre el número de linfocitos CD4 y la respuesta de IFN $\alpha$  a los oligonucleótidos CpG

**Conclusión.** Los resultados funcionales sugieren la utilidad de evaluar la respuesta a estímulos de la inmunidad innata en el seguimiento clínico de los pacientes infectados por virus VIH.

**F-0012-11-O. NIVELES ALTOS DE LINFOCITOS T CD4+ DE MEMORIA QUE NO EXPRESAN EL RECEPTOR PARA LA IL-2 SE ASOCIAN A DISMINUCION DEL NUMERO DE CELULAS T CD4+. J. Carbone, J. Gil, J.M. Benito, C. Rodríguez-Sainz, J. Navarro, E. Fernández-Cruz. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.**

**Introducción.** Durante la replicación activa del VIH se ha observado una disminución *in vitro* de la proliferación de células T CD4+ anti-VIH, posiblemente debida a una producción disminuida de IL-2. Cambios en la expresión del receptor de la IL-2 (r-IL-2) se han observado en pacientes que tienen fallo terapéutico para aumentar la cifra de CD4. Por otro lado, el uso terapéutico de IL-2 aumenta la expresión de la cadena alfa del receptor de la IL-2 (CD25).

**Pacientes y métodos.** Estudio transversal retrospectivo de 85 pacientes estratificados según progresión a SIDA (19 progresores y 66 no progresores). Comparación de los porcentajes de subpoblaciones linfocitarias a la entrada en un estudio prospectivo donde se objetivó la progresión a SIDA (test de ANOVA). Correlación con el número absoluto de células T CD4+ basales (Tests de Spearman y Pearson). Subpoblaciones linfocitarias: citometría de flujo de tres colores.

**Resultados.** En comparación con pacientes no progresores y con controles VIH negativos (27 sujetos ADVP y 39 controles sanos), los pacientes progresores tenían en el estudio basal un nivel significativamente mayor de células T CD4+CD45RO+CD25- ( $71 \pm 4$ ,  $49 \pm 2$ ,  $49 \pm 2$  y  $51 \pm 2\%$ ,  $p < 0.05$ ). En los pacientes progresores, el porcentaje de células CD4+CD45RO+CD25- tuvo una correlación negativa con la cifra basal de CD4 [ $-0.631$  ( $p < 0.05$ )]; pero positiva con células CD4+ de memoria con pérdida de expresión de la molécula CD7 [CD4+CD45RO+CD7-,  $+0.49$  ( $p < 0.01$ )] y con las subpoblaciones activadas T CD4+CD38+DR+ [ $+0.486$  ( $p < 0.01$ )]. En los pacientes no progresores no se observaron las correlaciones antes descritas.

**Conclusiones.** Además de inducir activación inmunológica, el VIH puede regular negativamente la expresión de marcadores de membrana. Se ha descrito que las células expandidas CD4+CD45RO+CD25- pueden ser células con defecto en la producción de IL-2 y de proliferación, dos factores implicados en la patogénesis de la deficiencia de CD4 que se produce en estos pacientes.

**F-0012-12-C. EL ALELO HLA-B\*5703 CONFIERE SUSCEPTIBILIDAD A DESARROLLAR ESPONDILOARTROPATÍAS EN PACIENTES DE ZAMBIA CON INFECCIÓN POR VIH-1 Y CON PROGRESIÓN LENTA A SIDA. C. López-Larrea<sup>1</sup>, P.D. Njobvu<sup>2</sup>, S. González<sup>3</sup>, M.A. Blanco-Gelaz<sup>1</sup>, J. Martínez-Borra<sup>1</sup>, A. López-Vázquez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup>University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.**

En años recientes los países sub-saharianos han experimentado un aumento considerable de la incidencia de las espondiloartropatías (SpA). Hasta el advenimiento del VIH, las SpA estaban prác-

ticamente ausentes en estas poblaciones. Por otra parte, ciertos alelos HLA-B artritogénicos (B27, B57) se han relacionado con la ausencia de progresión de la infección por VIH. En este trabajo, hemos analizado la distribución de HLA en una población de Zambia para establecer una posible relación entre la progresión de la infección por VIH y el desarrollo de SpA.

Se realizó un extenso análisis epidemiológico de los pacientes reumáticos que vivían en Zambia, para identificar a aquellos que presentaban SpA. Seleccionamos a 64 pacientes con esta enfermedad y encontramos que 54 eran portadores de VIH-1 y 10 eran negativos. Seleccionamos además a 57 individuos VIH+ pero sin SpA y 43 controles sanos. De todo el grupo de pacientes con infección por VIH-1, 29 pacientes con SpA y 25 pacientes sin SpA se clasificaron como progresores lentos a SIDA (PL), y 8 con SpA y 26 sin SpA como progresores rápidos (PR). Todos fueron tipados para HLA-B.

La infección por VIH-1 se encontró en el 84% del total de pacientes con SpA, de los cuales el 54% eran progresores lentos y 23.5% eran progresores rápidos ( $p=0.007$ ). La frecuencia de B\*5703 estaba aumentada de los pacientes SpA+ve/HIV+ve comparados con SpA-ve/HIV+ve ( $p=0.0002$ ,  $OR=8.28$ ). Este alelo estaba también incrementado en pacientes con progresión lenta a SIDA y SpA comparados con aquellos que no presentaban SpA ( $p=0.00007$ ,  $OR=20.12$ ).

HLA-B\*5703 parece actuar como un alelo protector contra la progresión de la infección por VIH, pero influye de manera notable en el aumento de las espondiloartropatías en esta población.

**F-0012-13-O. LA INTERACCIÓN ENTRE KIR3DL1 Y HLA-B\*5703 INFLUYE EN LA PROGRESIÓN DE LA INFECCIÓN POR HIV-1 EN UNA POBLACIÓN DE ZAMBIA. A. Miña-Blanco<sup>1</sup>, J. Martínez-Borra<sup>1</sup>, P. D. Njobvu<sup>2</sup>, B. Suárez-Alvarez<sup>1</sup>, M. A. Blanco-Gelaz<sup>1</sup>, S. González<sup>3</sup>, A. López-Vázquez<sup>1</sup>, C. López-Larrea<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup>University Teaching Hospital, Lusaka, Zambia. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.**

Tanto los receptores de células NK KIR los genes HLA son altamente polimórficos. Determinadas proteínas HLA de clase I son capaces de unirse y accionar a los receptores de superficie de la célula NK especificados por los genes de KIR. Hemos analizado si los genes KIR actúan en concierto con HLA-B para controlar la infección HIV-1 en una muestra de pacientes zambianos.

Se analizaron muestras de DNA de 88 pacientes zambianos infectados por el virus HIV-1. Se clasificó a los pacientes como progresores lentos ( $n=54$ ), y progresores rápidos ( $n=34$ ) a SIDA. Todos fueron tipados para HLA-B y para los distintos genes KIR.

Nuestros resultados mostraron una asociación de HLA-B\*5703 y la progresión retrasada a SIDA ( $p < 0.004$ ;  $OR=10.3$ ). También observamos una incidencia del aumento de Bw4-Ile80 en pacientes con progresión lenta ( $p < 0.003$ ,  $OR=5$ ). Este aumento resultó secundario a B\*5703. La presencia conjunta de los genes KIR3DL1 y del alelo B\*5703 tiene un efecto significativo en la progresión a SIDA ( $p < 0.0002$ ;  $12.59$ ). La protección debida al alelo B\*5703 no se encontró en ausencia de KIR3DL1. Se puede concluir que la presencia del gen inhibidor KIR3DL1 conjuntamente con el alelo HLA-B\*5703 que contiene el epítopo Bw4-Ile80, tiene un efecto altamente protector contra la progresión de la infección por HIV-1 a SIDA en pacientes zambianos.

**F-0012-14-O. VACUNACIÓN TERAPÉUTICA CON CÉLULAS DENDRÍTICAS CARGADAS CON VIH AUTÓLOGO INACTIVADO EN PACIENTES VIH+ CRÓNICOS.** F. García<sup>1</sup>, M. Lejeune<sup>2</sup>, C. Gil<sup>3</sup>, N. Climent<sup>2</sup>, Ll. Alós<sup>4</sup>, A. Ruiz<sup>5</sup>, A. Pereira<sup>6</sup>, JM Miro<sup>1</sup>, T. Pumarola<sup>3</sup>, M. Plana<sup>2</sup>, J. Alcamí<sup>7</sup>, J.M. Gatell<sup>1</sup>, T. Gallart<sup>2</sup>. *Servicios de* <sup>1</sup>Enfermedades Infecciosas, <sup>2</sup>Inmunología, <sup>3</sup>Microbiología, <sup>4</sup>Anatomía Patológica, <sup>5</sup>Medicina Nuclear y <sup>6</sup>Hemoterapia, Hospital Clínic de Barcelona-IDIBAPS, Barcelona. <sup>7</sup>Instituto de Salud Carlos II, Madrid.

**Introducción.** La terapia antiretroviral de alta actividad (TARV) no erradica la infección y no restaura la inmunidad T anti-VIH, siendo necesario administrarla de por vida para poder controlar el virus, una opción médicamente inviable. Se cree urgente investigar si una vacuna anti-VIH pudiera ayudar a controlar el virus en ausencia de TARV. Las células dendríticas (CD) son las células presentadoras de antígeno más potentes, únicas por su capacidad de activar tanto a células T naive como memoria y por inducir respuesta tanto Th1 como CD8 frente a antígenos no infectivos de la vía exógena.

**Objetivos y Métodos.** Investigar si una vacuna terapéutica consistente en CD derivadas de monocitos (CD-DM) generadas y cargadas ex vivo con VIH plasmático autólogo inactivado por calor, es capaz de inducir respuesta Th y CD8 anti-VIH y de proporcionar un control de la carga vírica tras la suspensión de la TARV. Se administraron 4 inmunizaciones por vía subcutánea (2 millones de CD-DM cargadas con una media de 2 millones de viriones en cada inmunización).

**Resultados.** Tras la suspensión de la TARV después de las inmunizaciones, hubo una disminución significativa en la carga vírica respecto de la basal, así como un enlentecimiento significativo del tiempo de duplicación de la replicación vírica cuando ésta rebrotó. Esta respuesta virológica se asoció con una respuesta significativa de la respuesta proliferativa T CD 4 frente a p24 y con cambios notables en los CD8 anti-VIH circulantes (medidos por Elispot frente a péptidos HLA-I-restrictos). Hubo una tendencia a una menor replicación de VIH en órganos linfoides unida a un incremento de CD4 y de CD8 con marcadores de CTL. No fuimos capaces de detectar migración hacia los ganglios deas CD-DM radiomarcadas con Indio.

**Conclusiones.** Esta vacuna terapéutica es segura, bien tolerada y factible y mostró resultados virológicos e inmunológicos prometedores. Son necesarios otros estudios con una mayor dosis de viriones/vacuna y tal otros métodos de inactivación.

**F-0012-15-O. EL TRATAMIENTO CON DIDANOSINA E HIDROXIUREA INCREMENTA LA RESPUESTA INMUNE ESPECÍFICA FRENTE A VIH EN PACIENTES CON INFECCIÓN CRÓNICA.** M. López<sup>1</sup>, J.M. Benito<sup>1</sup>, S. Lozano<sup>1</sup>, P. Barreiro<sup>1</sup>, P. Martínez<sup>2</sup>, J. González-Lahoz<sup>1</sup>, V. Soriano<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Enfermedades infecciosas y <sup>2</sup>Unidad de Hematología. Hospital Carlos III. Madrid.

**Introducción.** Estudios previos han sugerido que la hidroxiurea (HU) podría ejercer un efecto inmunomodulador en el tratamiento de la infección por VIH.

El objetivo de este estudio fue analizar el impacto de una terapia de simplificación conteniendo didanosina (ddI) e HU sobre parámetros de inmunidad específica.

**Pacientes y métodos.** 84 pacientes que iniciaron terapia de simplificación con ddI-HU tras terapia prolongada con TAAE, y que mantuvieron cargas virales (CV) inferiores a 5.000 copias/ml durante 12 meses de simplificación, fueron incluidos en el estudio. 22 pacientes que continuaron con TAAE y 22 pacientes sin tratamiento en el momento del estudio fueron incluidos como grupos control. Para analizar el nivel de linfocitos T CD8 citotóxicos (CTLs) específicos frente a VIH, se utilizó un ensayo de producción de IFN-g en respuesta a 125 péptidos óptimos procedentes de proteínas de VIH (Gag, Pol, Env, Nef y proteínas reguladoras). Para analizar respuesta CD4 helper se utilizó un ensayo de linfoproliferación standard en respuesta a antígenos de recuerdo y antígenos de VIH.

**Resultados.** Después de 12 meses de tratamiento, el nivel de CTLs estaba incrementado en el grupo de pacientes tratados con ddI-HU cuando se comparó con el encontrado en pacientes con TAAE y fue similar al del grupo de pacientes sin tratamiento. Este incremento se observó incluso en pacientes tratados con ddi-HU que mantuvieron niveles indetectables de CV. La respuesta CD4 helper específica de VIH estaba prácticamente ausente en pacientes con TAAE y en pacientes sin tratamiento, mientras que estaba presente en el 22% de los pacientes tratados con ddI-HU.

**Conclusión.** Los pacientes tratados con una terapia que contenga HU muestran niveles más elevados de respuestas CD8 y CD4 específicas de VIH que pacientes tratados con TAAE. Estos resultados sugieren que la HU podría tener un efecto inmunomodulador beneficioso en la infección por VIH.

**F-0012-16-C. LA DISMINUCIÓN PROLONGADA DE LA ACTIVACIÓN DE LINFOCITOS T CD8+ EN PACIENTES VIH+ TRATADOS EFICAZMENTE CON TARGA, ESTÁ ASOCIADA A UNA MAYOR RECUPERACIÓN DE CÉLULAS CD4+.** J.M. Benito, Mariola López, Sara Lozano, Celia Ballesteros, Juan González-Lahoz, Vicente Soriano. *Servicio de Enfermedades Infecciosas, Hospital Carlos III. Madrid.*

**Introducción:** En pacientes VIH+ tratados con TARGA, la expresión de CD38 en células CD8 se ha propuesto como un marcador de replicación viral residual. La supresión de la carga viral que se produce durante los primeros meses de tratamiento va asociada a una disminución en la expresión de CD38 y a un aumento en la cifra de células CD4+. Sin embargo, no se conoce la relación entre la evolución de dicho marcador y la evolución de la cifra de células CD4 a largo plazo en pacientes con TARGA y supresión viral prolongada. En este trabajo hemos analizado la evolución de dichos parámetros en un grupo de pacientes tratados con TARGA y supresión viral completa durante un periodo de 24 meses.

**Métodos.** Se han incluido 34 pacientes tratados con TARGA y que han mantenido carga viral (CV) indetectable durante 24 meses. El seguimiento comenzó a los 12 meses del inicio de TARGA y se prolongó hasta los 36 meses. En cada visita se analizó la expresión de CD38 en células CD8 mediante citometría de flujo cuantitativa y se expresó como número de moléculas de CD38 por célula CD8+. Para cada paciente se calculó la pendiente de CD38 y de CD4 durante los 24 meses de seguimiento empleando un análisis de regresión lineal.

**Resultados.** Al analizar la evolución de CD38 individualmente, se observó la existencia de dos grupos distintos: 20 pacientes (grupo A) en los que CD38 disminuyó (pendiente negativa), y 14 (grupo B) en los que aumentó (pendiente positiva) durante el seguimiento. En la mayo-

ría de los pacientes se observó un aumento de CD4 durante el seguimiento. Sin embargo, dicho incremento fue sólo significativo en el grupo A de pacientes. Asimismo, la pendiente de CD4 fue mayor en el grupo A con respecto al grupo B, aunque la diferencia no fue significativa.

**Conclusiones.** La activación inmune influye en la capacidad para recuperar células CD4 en pacientes con TARGA y CV indetectable. CD38 es un marcador potencial para ser usado en el seguimiento de los pacientes en tratamiento.

**F-0012-17-C. LOS ANÁLOGOS DE LOS NUCLEÓSIDOS INDUCEN LA EXPRESIÓN DE LA MOLÉCULA HLA-G EN LOS MONOCITOS DE INDIVIDUOS HIV-1+ TRATADOS.** A. Cabello<sup>1</sup>, A. Rivero<sup>2</sup>, M.J. García<sup>1</sup>, J. M. Lozano<sup>1</sup>, R. González<sup>1</sup>, J. Luque<sup>1</sup>, J. Marín<sup>1</sup>, E. Vidal<sup>2</sup>, M. Santamaría<sup>1</sup>, R. Solana<sup>1</sup>, A. Camacho<sup>b</sup>, J. M. Kindedlán<sup>2</sup>, J. Peña<sup>1</sup>. Servicio de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Unidad de Infecciosos, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba.

**Introducción.** Hemos descrito recientemente que la expresión de la molécula tolerogénica HLA-G se encuentra aumentada en los monocitos de individuos HIV-1+ con HAART (Cabello et al, 2003), mientras que los individuos HIV-1+ que no reciben HAART muestran bajos niveles de expresión de esta molécula.

**Objetivos.** Como el HAART se compone de diferentes fármacos, nos hemos propuesto estudiar cual de estos fármacos está implicado en el aumento de HLA-G en los monocitos de estos pacientes.

**Métodos.** Hemos seleccionado 3 individuos HIV-1+ clasificados en el grupo A (CDC-1993) que han recibido HAART durante al menos 2 años, tratados con análogos de los nucleósidos (NRTIs) e inhibidores de la proteasa (IPs), a los que se les retiran los análogos de los nucleósidos, con HIV-RNA < 50 copias/μL y T CD4 > 500 cels/μL durante al menos los 12 meses previos. Como control, hemos incluido 8 individuos naive. La expresión de HLA-G fue analizada en células de sangre periférica por inmunofluorescencia indirecta en células CD14 y CD3, usando anti-HLA-G (MEN-G/9; EXBIO, Praga) mediante citometría de flujo, con un FACSVantage SE (Becton Dickinson)

**Resultados.** En nuestros datos se observa que los tres enfermos tienen altos niveles de HLA-G cuando están tratados con los dos fármacos combinados (NRTIs y IPs) (50%), mientras que al retirar del tratamiento los NRTIs los niveles de HLA-G descienden progresivamente hasta alcanzar los niveles basales (10%), que se mantienen.

**Conclusión.** Nuestros datos indican que los análogos de los nucleósidos están implicados en el aumento de expresión de HLA-G en monocitos de individuos HIV-1+ con HAART, mientras que los inhibidores de la proteasa no parecen tener ningún efecto sobre la expresión de esta molécula. Estos resultados pueden tener importantes implicaciones en el tratamiento de enfermedades autoinmunes y en trasplantes.

**F-0012-18-C. EXPRESIÓN DE HLA-G+ EN LAS SUBPOBLACIONES DE MONOCITOS, PBLs Y CÉLULAS NK EN INDIVIDUOS HIV-1+.** M.A. Cabello<sup>1</sup>, M.D. Galiani<sup>1</sup>, M.J. García-Moreno<sup>1</sup>, J.M. Lozano<sup>1</sup>, J. Luque<sup>1</sup>, J.M. Kindedlán<sup>2</sup>, A. Rivero<sup>2</sup>, R. Solana<sup>1</sup>, M. Santamaría<sup>1</sup>, E. Vidal<sup>2</sup>, A. Camacho<sup>2</sup>, J. Marín<sup>1</sup>, C.A. Ojeda<sup>1</sup>, J. Peña<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Unidad de Infecciosos, Hospital Reina Sofía, Universidad de Córdoba.

**Introducción.** Como continuación de estudios previos (Cabello et al, 2003), nos planteamos analizar la distribución de HLA-G en

las subpoblaciones de monocitos, CTLs y células NK de individuos HIV-1+ con o sin HAART.

**Métodos.** Las subpoblaciones de PBMCs fueron analizadas por citometría de flujo usando los anticuerpos específicos anti-CD3, CD8 (CCR7 y CD45RA) y CD56 (Becton Dickinson). Para analizar la expresión de HLA-G se utilizó anti-HLA-G (MEN-G/9; EXBIO, Praga). Las medidas se realizaron con el citómetro FACSVantage SE (Becton Dickinson).

**Resultados.** Los resultados muestran un incremento en el número de células CD14+ (52.6±5.3%) y CD3+ (9,15±6,0%) que expresan HLA-G en pacientes con HAART en contraste con los que no reciben HAART (CD14+HLA-G+=14.5±5.6% y CD3+HLA-G+=0.7±0.5%). También se observó un incremento tanto de las células CD4+ como CD8+ que expresan HLA-G en individuos tratados en relación a los no tratados. En las células CD8+ este incremento se observó principalmente en las células efectoras (CD8+ CD45RA+ CCR7-). Por otra parte, encontramos que el 10.07±2.75% y 10.77±2.7% de las células CD3-CD56+ expresan HLA-G en individuos infectados por HIV-1 tratados y no tratados respectivamente, esta expresión se encontró en su mayor parte en la subpoblación CD3-CD56+bright en individuos tanto tratados como no tratados. En individuos sanos encontramos que: CD14+HLA-G+=7.1±1.5%; CD3+HLA-G+=1.0±0.1%; CD4+HLA-G+=0.5±0.10%; CD8+HLA-G+=0.40±0.10%; CD56+HLA-G+=2.05±0.85.

**Conclusión.** Nuestros datos indican que, aunque otros factores puedan participar en el control de la expresión de HLA-G, la terapia antirretroviral es capaz de inducir la expresión de HLA-G en monocitos, CTLs y células NK. Estos datos ofrecen una nueva perspectiva inmunológica del HAART, la cual puede ser analizada y considerada en futuras aplicaciones terapéuticas.

**F-0012-19-C. EXPRESIÓN DE RECEPTORES DE QUIMIOKINAS Y PRODUCCIÓN ESPONTÁNEA DE CITOCINAS INFLAMATORIAS POR LOS MONOCITOS Y CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN PACIENTES VIH-1+.** M. Almeida<sup>1,2</sup>, M. Cordero<sup>2,3</sup>, J. Almeida<sup>1,2</sup>, A. Orfao<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Citometría y Centro de Investigación del Cáncer, Universidad de Salamanca. <sup>2</sup>Departamento de Medicina, Universidad de Salamanca. <sup>3</sup>Servicio de Medicina Interna, Hospital Universitario de Salamanca. Salamanca.

**Introducción.** Las células dendríticas (CDs) son susceptibles de ser infectadas por el VIH-1, ya que expresan los receptores necesarios para la entrada del virus

**Objetivos.** Analizar la distribución, la expresión de receptores de quimioquinas y la producción de citocinas inflamatorias en ausencia de estimulación *in vitro* en monocitos y CDs de sangre periférica (SP) de pacientes VIH-1+.

**Métodos.** Se han estudiado 30 pacientes VIH-1+ asintomáticos, no tratados. Además, 10 adultos sanos, 7 pacientes Hepatitis C+ (VHC+)/VIH-1- y 5 pacientes VIH-1+ «no progresores» (NP) y no tratados se incluyeron como controles. Los estudios se realizaron a partir de muestras de SP mediante citometría de flujo.

**Resultados.** El número absoluto de CDs mieloides (CDM) y linfoplasmocitoides (CDL) estaba reducido en VIH-1+ frente a los controles (p<0.05). Sin embargo, el número absoluto de CDs CD16+ y monocitos en VIH-1+ era similar al de los sanos y estaba incrementado en NP (p<0.05).

El porcentaje de monocitos CXCR1+ y CXCR2+ y de CDM CXCR2+ era menor en VIH-1+ con respecto a los sanos ( $p < 0.05$ ). La expresión de CXCR4 y CCR5 estaba significativamente reducida (en todas las subpoblaciones celulares para CXCR4, y en las CDL para CCR5), en VIH-1+ frente a los sanos.

Los monocitos y las CD8 CD16+ de pacientes VIH-1+ y VHC+/VIH- producían espontáneamente IL-6 y TNF- $\alpha$ , siendo la producción ligeramente inferior en este último grupo. Las CDL producían espontáneamente IL-12 y TNF- $\alpha$  en VIH-1+, y sólo IL-12 en VHC+/VIH- ( $p > 0.05$ ). Los sanos y NP no producían citocinas inflamatorias de manera espontánea ( $p < 0.05$ ).

**Conclusiones.** La distribución y expresión de receptores de quimiocinas están alterados en las CD8 y monocitos de individuos VIH-1+. Ambos tipos celulares producen citocinas inflamatorias de manera espontánea, lo cual sugiere la existencia de una activación del sistema inmune *in vivo* en pacientes VIH-1+.

*Financiación:* MSD España y BMS S.L. M.A. es becario del MECED (Ref. AP2000-3818).

**F-0012-20-C. CONTROL DE CALIDAD DE LA CUANTIFICACIÓN DE NÚMEROS ABSOLUTOS DE LINFOCITOS SANGUÍNEOS MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.** L.A. García Astudillo, A. Albarracín Castillo, L.M. Saíenz Rey, F. Leyva-Cobián, M. López-Hoyos. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

**Introducción.** Habitualmente la cuantificación periódica de los números absolutos de poblaciones linfocitarias en pacientes HIV+ se ha realizado extrapolando los porcentajes obtenidos mediante citometría a los datos del hemograma (plataforma doble) lo que conlleva importantes coeficientes de variación (CV). Con la reciente implantación de la plataforma única (Trucount®) es posible realizar el análisis citométrico con un único tubo. Este cambio supuso en este laboratorio problemas de variabilidad entre ambos métodos.

**Objetivos.** Realizar un control de calidad y determinar la validez del método.

**Métodos.** Se determinaron y compararon números absolutos de linfocitos sanguíneos (CD45, CD3, CD4, CD8) en 669 pacientes mediante la plataforma única y la doble tradicional. En 27 muestras con discrepancia intra-ensayo para CD3 y CD45 se repitió el ensayo dos veces y se estudiaron las subpoblaciones CD19, CD16, CD3-CD16, CD8-CD16 y CD3 gd.

**Resultados.** En las 642 muestras no discordantes existió una correlación (r de Pearson) significativa ( $p < 0,001$ ) muy buena para CD3 (0,976) y CD4 (0,979), y algo peor para CD8 (0,783) y, sobre todo, para CD45 (0,565). A pesar de la discordancia intra-ensayo para CD45 y CD3 en la primera determinación, se observó una correlación similar entre medias en las siguientes repeticiones. La mejor correlación entre medias fue en CD8. En ningún caso el CV en las repeticiones fue  $> 10\%$ , salvo para CD4 (20%). La discordancia intra-ensayo para CD45 y CD3 no se pudo achacar a cambios en CD19, CD3-CD16, CD8-CD16 y CD3 gd.

**Conclusiones.** Las principales discrepancias entre las dos técnicas fueron en CD8 y CD45. De las muestras con discordancia intra-ensayo, la subpoblación CD8 fue la medida más estable en las diferentes repeticiones. Aunque las discordancias intra-ensayo de CD45 y CD3 fueran grandes, generalmente se ajustaron a la media. Las mayores variaciones fueron en CD4, posiblemente debido al menor número de células en los pacientes estudiados.

**F-0012-21-C. EXPRESIÓN DE MÚLTIPLES TRÁNSCRITOS DEL SEGUNDO LOCUS (SCYA4L) DE CCL4.** R. Colobran, P. Adreani, A. Yaqoub, P. Caro, I. Gómez, J.M. Pujol-Borrell. LIRAD. Unitat d'Immunologia. SSR-CTBT, HUGTiP, UAB, Badalona.

CCL4/MIP-1 $\beta$  y su homólogo CCL3/MIP-1 $\alpha$  pertenecen al cluster de quimiocinas inflamatorias CC situado en el cromosoma 17 y son, junto con CCL5/RANTES, los principales factores inhibidores de la infección por HIV secretados por los linfocitos T CD8. CCL4 y CCL3 han surgido por duplicación de un gen ancestral común originando los genes SCYA4/ACT-2 y SCYA3/LD78 $\alpha$ . A su vez estos genes tienen en el genoma una segunda copia no alélica (SCYA4L/LAG-1 y SCYA3L1/LD78 $\beta$ ) en número variable.

Estudios recientes de nuestro laboratorio han demostrado que los dos loci de CCL4 expresan, además de la forma ya descrita, una variante originada por *splicing* alternativo que excluye el segundo exón en la formación del mRNA. Además, estudiando la organización genómica de esta quimiocina hemos encontrado que el locus SCYA4L es un gen polimórfico, presentando una segunda variante alélica (SCYA4L2) que muestra varias sustituciones nucleotídicas en el segundo intrón respecto a la variante alélica originalmente descrita (SCYA4L1). Uno de estos cambios nucleotídicos es crítico en la expresión final del locus SCYA4L2 de CCL4 por afectar al dinucleótido canónico del lugar aceptor de *splicing*. Las consecuencias de este cambio son que el patrón de mRNAs generado durante la expresión del locus SCYA4L2 difiere completamente del que genera el locus SCYA4L1, detectándose un nuevo mRNA predominante (78,2%) y otros 5 mRNAs de baja proporción (2,5%; 4%; 4,3%; 4,3%; 6,6%). Se ha analizado, mediante RT-AFLP y Real-time PCR, la expresión total y de ambos loci de CCL4 en células T CD8 de individuos L1L1, L1L2 y L2L2. Los individuos L2L2 muestran una expresión total de CCL4 menor que los L1L1. Además la proporción de transcritos procedentes del locus SCYA4L en individuos L2L2 es también claramente más baja (12%) que la que presentan los individuos L1L1 (52%).

Finalmente, la distribución poblacional de este polimorfismo muestra una mayor incidencia de la variante alélica L2 en individuos HIV+ (28,6%) respecto a la población sana (16,6%).

**F-0012-22-C. ALTERACION DE LA FAGOCITOSIS EN PACIENTES CON INFECCION POR VIH Y RECUPERACION TRAS TRATAMIENTO ANTIRETROVIRAL DE ALTA ACTIVIDAD.** M. Peris<sup>1</sup>, J. Lopez-Aldeguer<sup>2</sup>, D. Benahmed<sup>3</sup>, A.Mir<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Hospital de la Ribera (Valencia). <sup>2</sup>Hospital Universitario La Fe de Valencia. <sup>3</sup>Unidad Mixta de Investigación Hospital Clínico de Valencia y Hospital F. de Borja de Gandía.

**Introducción.** El tratamiento antiretroviral de alta actividad (TARV) ha producido una significativa disminución de la mortalidad y de la incidencia de infecciones oportunistas en pacientes con infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). Han sido descritos múltiples mecanismos para explicar estos efectos clínicos, en particular la restauración parcial de las funciones de la célula T.

**Objetivos.** Analizar el efecto del TARV sobre la función del neutrófilo en pacientes VIH+, determinando la capacidad fagocítica de PMN y la producción de anión superóxido antes y después del tratamiento.



**Métodos.** Estudio observacional prospectivo en 28 pacientes con infección VIH, atendidos en los hospitales La Fe y Dr Moliner de Valencia y en un grupo control. Determinación de la fagocitosis Fc-dependiente con hematíes de carnero opsonizados con IgG anti-hematíe y de la fagocitosis de *Candida albicans*. Los resultados se expresan como el número de partículas ingeridas por cien PMN (índice de fagocitosis. IF) determinado por recuento a microscopio óptico. Cuantificación de la producción de anión superóxido mediante el microensayo descrito por Pitrak et al. (1993) los resultados se expresan en nanomoles de anión superóxido / 500.000 células a los 20 minutos de incubación con fmlp.

**Resultados.** Los pacientes presentan una disminución de la

fagocitosis Fc-dependiente: IF  $25 \pm 16$  (pacientes)  $87 \pm 14$  (controles)  $p < 0.001$  y de la fagocitosis de candida: IF  $28 \pm 16$  (pacientes)  $67 \pm 8$  (controles)  $p > 0.001$ .

Tras el tratamiento antitroviral la fagocitosis aumenta significativamente, aunque no llega a recuperarse del todo. IF hematíes:  $67 \pm 11$  (pacientes) /  $86 \pm 11$  (controles). IF candida:  $67 \pm 12$  (pacientes),  $76 \pm 8$  (controles). No hay cambios significativos en la producción de anión superóxido.

**Conclusiones.** La acción del tratamiento antiretroviral de alta actividad sobre la función de fagocitosis del neutrófilo podrían contribuir a los efectos beneficiosos de este tratamiento en pacientes VIH+.

## F-0013. Hipersensibilidad inmediata, asma y respuesta alérgica

*Moderadores:* Ignacio Moneo Goiri (Madrid), Carlos Lahoz Navarro (Madrid)

### F-0013-01-O. IMPLICACIÓN DE LOS RECEPTORES NK EN REACCIONES ADVERSAS A MEDICAMENTOS.

E. Morel<sup>1</sup>, B. Tapia<sup>1</sup>, E. Sánchez-Sabaté<sup>1</sup>, M. Blanca<sup>2</sup>, T. Bellón<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Apoyo a la Investigación. Hospital Universitario La Paz, Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Alergia. Hospital Carlos Haya, Málaga.

Las reacciones adversas a fármacos no inmediatas representan una amplia gama de manifestaciones clínicas (desde la urticaria generalizada hasta enfermedades graves como la Necrosis Epidérmica Tóxica y el Síndrome de Stevens Johnson) en las que han sido implicados CTLs. En el presente trabajo se propone estudiar el posible papel de los receptores NK expresados en estas células y de las moléculas de HLA en el establecimiento y desarrollo de estas reacciones, así como la posible interferencia que el fármaco (hapteno) pueda provocar en la interacción de estos receptores con sus ligandos y, por tanto, en la regulación de la activación celular.

Se analizó por citometría de flujo la expresión de receptores NK en PBMCs de pacientes en fase aguda y en fase de resolución. La posible influencia que la presencia del fármaco pudiera ejercer en la interacción receptor-ligando se estudió mediante ensayos *in vitro* utilizando como fármaco modelo la amoxicilina, que forma espontáneamente uniones covalentes con proteínas celulares y del medio. Se haptenizaron transfectantes estables de los distintos alelos de HLA en la línea linfoblastoide 721.221 y se evaluó la actividad citotóxica frente a los mismos. Así mismo, se realizaron ensayos de conjugación para valorar la fosforilación del receptor ILT2 y el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 tras la interacción con el ligando.

Se observó un aumento en el porcentaje de células NK y de CTLs que expresan receptores NK en sangre periférica de pacientes en fase aguda. Además, la haptenización celular disminuyó el reclutamiento de la fosfatasa SHP-1 al receptor ILT2 tras la interacción con la molécula de HLA.

Los resultados sugieren que las células NK y CTLs que expresan receptores NK juegan un papel importante en este tipo de respuestas adversas a medicamentos. La regulación de la activación celular a través de receptores para moléculas del MHC posiblemente sea un mecanismo implicado en la fisiopatología de estas reacciones no inmediatas.

### F-0013-02-O. IMPLICACIÓN DE CTACK/CCL27 EN EL RECLUTAMIENTO DE LINFOCITOS A LA PIEL EN REACCIONES CUTÁNEAS INDUCIDAS POR FÁRMACOS.

B. Tapia<sup>1</sup>, E. Morel<sup>1</sup>, E. Sánchez-Sabaté<sup>1</sup>, M. Blanca<sup>2</sup>, T. Bellón<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Apoyo a la Investigación. Hospital Universitario La Paz, Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Alergia. Hospital Carlos Haya, Málaga.

La Necrosis Epidérmica Tóxica y el Síndrome de Stevens Johnson son reacciones cutáneas severas inducidas por fármacos que se caracterizan por la formación de ampollas y desprendimiento de epidermis. Debido a su presencia mayoritaria en el líquido de las ampollas se ha sugerido una implicación de células T citotóxicas CD8+ en estas patologías. Sin embargo, poco se sabe acerca de los mecanismos moleculares que dirigen la migración específica de estos linfocitos a la piel.

En el presente trabajo estudiamos la implicación de la quimioquina específica de queratinocitos CTACK y su receptor CCR10 en el reclutamiento de linfocitos T a la piel en estas reacciones y en diversos exantemas causados por fármacos de menos severidad. La expresión de CTACK se determinó mediante RT-PCR cuantitativa y análisis inmunohistoquímico en biopsias de piel procedentes de pacientes.

En paralelo se cuantificó la expresión del mRNA de CCR10 en células mononucleares de sangre periférica a lo largo del curso de la enfermedad. Así mismo se realizaron ensayos de migración frente a CTACK en los que se estudió la respuesta de las subpoblaciones linfocitarias presentes en sangre periférica y en el líquido de las ampollas. Se observó que el nivel de expresión de la quimioquina en piel inflamada es significativamente mayor que en piel sana. La expresión de CCR10 en linfocitos de sangre periférica aumentó de forma paralela a la expresión de la quimioquina, así como la respuesta migratoria de células CD8+ a CTACK. Además la resolución de los síntomas se asoció con una recuperación de los niveles basales de expresión de CTACK y CCR10 (similares a los detectados en individuos control).

Los resultados sugieren una implicación de las interacciones CTACK-CCR10 en el reclutamiento específico de células CD8+ a la piel en estos pacientes.

**F-0013-03-O. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS IgG4 ESPECÍFICOS FRENTE A ALÉRGENOS ALIMENTARIOS CON MANIFESTACIONES DE ALERGIA A LOS ALIMENTOS.** S. Cantisán, C. Román, M. Miró, M. Jiménez, R. Solana, J. Peña, C. Alonso. Servicio de Inmunología. Hospital Reina Sofía. Córdoba.

**Introducción.** La alergia a los alimentos es una reacción adversa debida a una hipersensibilidad desencadenada por la ingestión de ciertos alimentos. La implicación de la IgE en la hipersensibilidad inmediata a los alimentos está bien definida, sin embargo, se discute sobre si algún otro mecanismo, independiente de la IgE, pudiera estar implicado en dicha alergia, tales como la hipersensibilidad Tipo III (inmocomplejos) o Tipo IV (mediada por células). Se señala a la IgG como otra Ig posiblemente implicada y más concretamente a las subclases IgG1 e IgG4.

**Objetivos.** El objetivo de este trabajo es la determinación de los niveles de anticuerpos IgG4 específicos frente a alérgenos alimentarios en el suero de pacientes con manifestaciones de alergia a los alimentos.

**Métodos.** Para el estudio se seleccionaron una serie de pacientes que mostraban diversas manifestaciones de alergia a los alimentos pero no presentaban en el suero niveles detectables de anticuerpos IgE específicos frente a ninguno de los alérgenos alimentarios estudiados, como se había comprobado en un análisis anterior. Se extrajo suero de estos pacientes y se determinaron, mediante fluoroenzaimunoensayo, los niveles de anticuerpos IgG4 específicos frente a los mismos alérgenos utilizados para la determinación de los anticuerpos IgE.

**Resultados y conclusión.** Una vez realizados todos los análisis se pudo observar que dichos pacientes, en los que no se detectaban anticuerpos IgE específicos, sí presentaban anticuerpos IgG4 específicos frente a alguno de los alérgenos. Además, cuando se sometía a dichos pacientes a dieta de exclusión de los alimentos frente a los cuales presentaba anticuerpos IgG4, en muchos casos mejoraban las manifestaciones alérgicas, sugiriendo este hecho la idea de la posible implicación de la IgG4, directa o indirectamente, en el desarrollo de la alergia a los alimentos.

**F-0013-04-O. ANAFILAXIA POR CLOXACILINA: DIAGNÓSTICO POR ANÁLISIS SERIADOS MEDIANTE TEST DE ACTIVACIÓN DE BASÍFILOS.** A. Rodríguez Trabado<sup>1</sup>, C. Cámara Hijón<sup>2</sup>, L. Fernández Pereira<sup>2</sup>, S.L. Porcel Carreño<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección de Alergología. <sup>2</sup>Sección de Inmunología. Hospital San Pedro de Alcántara. Cáceres.

**Introducción.** Presentamos un caso de anafilaxia por cloxacilina en un paciente de 13 años de edad. Se realizó estudio seriado de hipersensibilidad a beta-lactámicos mediante test de activación de basófilos, previa y posteriormente a la reacción. La utilidad del test de activación de basófilos en el diagnóstico de hipersensibilidad a beta-lactámicos ha sido validada en estudios recientes.

**Métodos y resultados.** La determinación de IgE específica frente a antibióticos  $\beta$ -lactámicos fue positiva frente a penicilina G, V, Ampicilina y Cefaclor, y negativa frente a Amoxicilina. Se realizó estudio de hipersensibilidad medicamentosa mediante Test de Activación de Basófilos al cabo de 25 días de la reacción anafiláctica frente a Cloxacilina, que resultó positivo frente a penicilina G, Amoxicilina y Cloxacilina y negativo frente a Ibuprofeno, tolerado por el paciente con posterioridad a la reacción. El estudio realizado a los 17 días de la reac-

ción no fue valorable al observarse que el 70% de la población de basófilos estaba activada basalmente. Este hallazgo también se evidenció en el estudio que se había realizado a este mismo paciente tomado como control sano para un estudio de alergia a AINES realizado con este mismo test. Dicho análisis se realizó al cabo de 4 días después de la finalización de un tratamiento con Amoxicilina, probablemente en relación con el desarrollo de una sensibilización.

**Conclusión.** En nuestro caso, el Test de Activación de Basófilos fue útil tanto en el diagnóstico de hipersensibilidad a cloxacilina y otros antibióticos  $\beta$ -lactámicos. La activación importante de basófilos en condiciones basales probablemente refleje el desarrollo de una sensibilización a  $\beta$ -lactámicos.

**F-0013-05-O. ESTABLECIMIENTO DE UN MODELO CRÓNICO MURINO DE INFLAMACIÓN ASMÁTICA Y ANÁLISIS DE LA MODULACIÓN POR GALECTINA-3.** E. López<sup>1</sup>, M.L Baeza<sup>2</sup>, C. Seoane<sup>1</sup>, E. Civantos<sup>1</sup>, E. Llanes<sup>1</sup>, B. Cárdbaba<sup>1</sup>, B. Sastre<sup>1</sup>, C. Lahoz<sup>1</sup>, J.M. Zubeldia<sup>2</sup>, V. Pozo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Fundación Jiménez Díaz. Departamento de Inmunología. Madrid. <sup>2</sup>Hospital Gregorio Marañón. Servicio de Alergología. Madrid.

**Introducción.** El asma es un desorden inflamatorio crónico, que conlleva al remodelamiento de las vías aéreas; como consecuencia se produce una hiperrespuesta bronquial y obstrucción variable del flujo aéreo, entre otros síntomas. El principal componente inflamatorio está formado por mastocitos, eosinófilos, linfocitos polarizados al fenotipo Th2, que promueve la producción de citoquinas.

En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio, hemos demostrado la implicación de la galectina-3 en la regulación de la reacción alérgica/inflamatoria, mediante la inhibición del gen de la IL-5. Esto ha sido demostrado tanto *in vitro* como *in vivo*, en un modelo agudo.

**Objetivo.** Establecimiento de un modelo crónico de ratones asmáticos, y evaluación de la eficacia del tratamiento con el gen de la galectina-3, en dicho modelo.

**Metodología.** 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 además se les administra el plásmido que contiene el gen de la Galectina-3.

El grupo 1 recibe solución salina estéril intranasalmente. Los grupos murinos 2 y 3 se les instila con OVA (1mg/ml) intranasalmente 3 veces por semana durante las 12 semanas del protocolo.

A lo largo de estudio longitudinal se sacrifican varios ratones de cada grupo, en diferentes semanas del estudio con el fin de poder evaluar los efectos del antígeno, así como de la terapia génica utilizados.

En las 2<sup>a</sup>, 4<sup>a</sup>, 6<sup>a</sup>, 8<sup>a</sup> y 12<sup>a</sup> semanas de este estudio se analizan las funciones pulmonares y subpoblaciones celulares en sangre y lavados broncoalveolares, así como la respuesta humoral y la histopatología del tejido pulmonar de los ratones de cada uno de los grupos.

**Resultados y conclusión.** En los animales tratados con el plásmido que contiene el gen de la galectina se observa una mejoría tanto en los parámetros pulmonares como celulares, frente a los ratones que sólo reciben el antígeno intranasalmente, en los que se manifiesta una persistente inflamación eosinofílica, durante las 12 semanas en las que se desarrolla este estudio. La hiperreactividad a lo largo de la sensibilización es cada vez más evidente, de forma que a menor dosis de metacolina la hiperrespuesta es mayor en las últimas semanas del estudio.

**F-0013-06-O. OLE E 2 Y OLE E 10: NUEVOS ASPECTOS CLÍNICOS Y RESTRICCIONES GENÉTICAS EN LA ALERGINIA AL POLLEN DE OLIVO.** E. Llanes, E. Civantos, E. López, V. Del Pozo, B. Sastre, C. Seoane, S. Gallardo, P. Palomino, J. Quiralte, R. Rodríguez, C. Lahoz, B. Cár-daba. *Servicio de Inmunología. Fundación Jiménez Díaz, Madrid.*

**Introducción.** Las características clínicas de la sensibilización al polen de olivo son dependientes de la carga antigénica, el patrón de alérgenos capaces de producir sensibilización y la restricción genética.

**Objetivos.** Estudiar la sensibilización a 2 nuevos alérgenos: Ole e 2 y Ole e 10, en una población de alérgicos al polen de olivo, sus características clínicas y asociaciones genéticas.

**Métodos.** Estudiamos 146 pacientes con síntomas de rinitis estacional y/o asma y con test cutáneo positivo al polen de *Olea europaea* y 50 controles sanos. Los anticuerpos IgE específicos contra Ole e 2 y Ole e 10 se cuantificaron mediante test cutáneo y ELISA. Los loci HLA-DRB1 y HLA-DQB1 se tipificaron con primers específicos de secuencia mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

**Resultados.** 102 pacientes presentaban una respuesta significativa de anticuerpos IgE específicos frente a Ole e 2, mientras 79 pacientes la mostraban frente a Ole e 10. Encontramos asociación significativa entre la sensibilización a Ole e 2 (OR 2.2 p=0.04) y Ole e 10 (OR 2.8 p=0.007) y el asma bronquial. Los niveles de anticuerpos IgE totales y específicos aparecieron correlacionados significativamente con el asma (p<0.05). Los pacientes que reaccionaban a los dos alérgenos tenían un mayor riesgo de padecer asma (OR 4.3 p=0.002). La frecuencia fenotípica de DR7 y DQ2 estaba significativamente incrementada en los pacientes sensibilizados a Ole e 2 (p=0.003 y p=0.02 respectivamente) comparada con la de los controles, mientras la frecuencia fenotípica de DR2 (15) aparecía significativamente incrementada en los pacientes sensibilizados a Ole e 10 (p=0.02) comparada con la de los controles.

**Conclusiones.** Encontramos una asociación entre la sensibilización a Ole e 2 y Ole e 10 y la patología del asma. Por otra parte, la regulación genética de la respuesta IgE específica observada frente a Ole e 2 y Ole e 10 podría ser importante en la clínica de la alergia al polen de olivo.

**F-0013-07-O. REACTIVIDAD CRUZADA ENTRE ANHÍDRIDO FTÁLICO Y MALÉICO EN UN PACIENTE CON ASMA OCUPACIONAL.** F.M. Marco<sup>1</sup>, Ll.M. Tubella<sup>2</sup>, T. Santiago<sup>2</sup>, J. Pruñonosa<sup>2</sup>, J.M. Sempere<sup>3</sup>. <sup>1</sup>IPI, S.A, Alicante. <sup>2</sup>Servei Salut Laboral y Unitat de Proves Funcionals Respiratòries. Fundació Hospital Sant Pere Claver, Barcelona. <sup>3</sup>Laboratorio de Inmunología. Departamento de Biotecnología. Universidad de Alicante.

**Introducción.** Los anhídridos de ácidos orgánicos (AAO) son sustancias de bajo PM (100-200 Da) utilizadas en la fabricación de resinas sintéticas, plásticos y colorantes, que pueden producir cuadros irritativos y de hipersensibilidad. Aunque son químicamente similares, se ha descrito reactividad cruzada (CR) entre ellos.

**Objetivos.** Determinar la existencia de CR entre AAO, en un varón de 48 años, jefe de producción de una fábrica de pinturas, que desde hace 10 años sufre crisis de broncoespasmo (asma) relaciona-

das con la exposición laboral. Expuesto a anhídrido maléico (AM) y ftálico (AF) durante 20 años. No a trimelítico (ATM).

**Métodos.** Preparamos conjugados de albúmina humana (HSA) con diferentes AAO (Topping MD, 1986). Las IgE e IgG específicas y los ensayos de inhibición, se determinaron mediante ELISA en microplaca.

**Resultados.** Tests cutáneos (+) a conjugados de AM y AF-HSA; (-) a ATM-HSA. IgE específica: (+) a AM y AF-HSA, (-) a ATM-HSA. IgG (-) a todos los anhídridos. Los ensayos de inhibición muestran que los conjugados de AM y AF se inhiben entre sí de manera similar (D<sub>50</sub> AM 119 µg/ml; AF 85 µg/ml). Los de ATM-HSA no mostraron inhibición de la actividad IgE frente al resto de AAO.

**Conclusiones.** Nuestros resultados muestran una considerable CR entre AM y AF, aunque no entre éstos y ATM. La CR entre AM y AF, podría haber contribuido a la sensibilización de este paciente al producirse un efecto aditivo en la exposición a los dos AAO. El prick y la serología pueden ser herramientas eficaces para diferenciar una posible sensibilización laboral a AAO, de los cuadros irritativos inespecíficos.

**F-0013-08-O. ASOCIACIÓN ENTRE ALERGINIA ALIMENTARIA Y ENFERMEDAD CELIACA: EMPLEO DE MARCADORES SEROLÓGICOS.** D. San Segundo<sup>1</sup>, J. Crespo<sup>1</sup>, L. García-Astudillo<sup>1</sup>, N. Saiz<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Alergología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

**Introducción.** La enfermedad celiaca (EC) y la alergia alimentaria (AA) son dos entidades que pese a tener un origen y un abordaje terapéutico diferente, plantean un problema de diagnóstico diferencial ya que pueden presentarse con signos clínicos similares. No todos los pacientes con EC evolucionan favorablemente con la dieta exenta de gluten y, a veces, una AA puede enmascarar una EC subyacente que precisa un diagnóstico precoz para evitar posibles complicaciones. Este estudio analizó la presencia concomitante de IgE específica frente a alérgenos alimentarios junto con anticuerpos anti-transglutaminasa (tTGA).

**Métodos.** Se analizaron los sueros de 90 pacientes remitidos por sospecha de AA y los de 101 pacientes con diagnóstico mediante biopsia de EC. La determinación de IgE específica se realizó frente a un panel de alérgenos alimentarios (fx5e) en UNICAP®. La determinación de tTGA se realizó mediante ELISA comercial.

**Resultados.** Ocho pacientes del grupo con AA (8,88%) fueron positivos para tTGA: 4 de clase IgA y otros 4 de clase IgG. En ninguno se dio la presencia simultánea de clases IgA e IgG. 5 de los 8 pacientes (62,5%) con tTGA positivos, tuvieron IgE específica para algún alimento (2 huevo y pollo, 3 leche y 1 frutas), siendo uno alérgico a más de un alimento. Los 4 pacientes con tTGA IgA partían de una sospecha diagnóstica de AA muy heterogénea, mientras que los que tenían tTGA IgG mostraban IgE siempre frente a 3 grupos concretos (huevo y pollo, leche y pescados). Por otro lado, 16 pacientes con diagnóstico definitivo de EC (15,84%) mostraron títulos positivos de IgE frente a fx5E y, de los 16, 2 no respondieron bien a la dieta exenta de gluten.

**Discusión.** La existencia concomitante de una AA en el contexto de una EC, y viceversa, es un hecho con suficiente peso como para ser tenido en cuenta en el momento del diagnóstico. Se recomienda el cribado de EC mediante tTGA en una AA y el de AA en una EC mediante la cuantificación de IgE e IgG frente a fx5E o similar.

**F-0013-09-O. IgE ESPECIFICA FRENTE A LAS PROTEINAS DE LA LECHE DE LA SOJA EN SUEROS ESTUDIADOS POR SOSPECHA DE ALERGIA A LECHE DE VACA.** C. Ruiz de Alegría Puig, J. Crespo Del Pozo, C. Gómez García, M. González García, M. López-Hoyos. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Marques de Valdecilla, Santander.

Existe controversia acerca de la relación entre la alergia a las proteínas de la leche de vaca y la alergia a la soja. El estudio realizado intenta analizar la prevalencia de la alergia a la soja en niños estudiados por intolerancia a las proteínas de la leche de vaca.

Para ello, en 144 sueros de 57 niños y 87 niñas remitidos a nuestro laboratorio para estudio de IgE específica a las proteínas de la leche de vaca, se cuantificaron los niveles de IgE específica frente a leche de vaca, y a la soja, además del huevo y el pollo (Pharmacia Diagnostics).

Treinta y siete sueros (25.69%) fueron positivos para al menos una IgE específica a las proteínas de la leche de vaca, y de ellos 8 (21.62%) fueron también positivos a la soja. De aquellos sueros negativos para la IgE específica a las proteínas de la leche de vaca (107), 4.6% fueron positivos a las proteínas de la soja, mientras que el resto fueron negativos. Destacó que aquellos sueros que tenían mayor concentración de IgE frente a las proteínas de la leche de vaca, mostraron un mayor porcentaje de IgE frente a la soja positiva (clase  $\geq 2$ ): 100% y 50% de los sueros con clases 5 y 6, respectivamente; frente a un 23,5% y 14,28% de aquellos con 1 y 2, respectivamente. Por otro lado, de los sueros positivos con IgE específica a la leche de vaca, el 67.56% mostraron títulos positivos de IgE frente al huevo, al pollo o a ambos; y, de los que además eran positivos frente a la soja, 62.5% lo fueron también al huevo, pollo o a ambos. Sin embargo, de los sueros negativos frente a la leche de vaca, sólo el 17.75% fue positivo.

En conclusión, en niños con sospecha de alergia a la leche se observa una menor relación de los niveles de IgE frente a la leche con los de IgE frente a la soja, que con los de IgE frente al huevo o pollo. Sin embargo, ésta relación aumenta cuando la concentración de IgE a las proteínas de la leche de vaca es mayor, de modo que niveles de IgE específica  $\geq 50$  KU/ml exigen cuantificar la IgE específica a la soja.

**F-0013-10-O. ANALISIS DEL POLIMORFISMO -403G/A EN EL PROMOTOR DE RANTES EN PACIENTES ASMÁTICOS.** M. Muro<sup>2</sup>, A. Torio<sup>2</sup>, L. Marín<sup>2</sup>, R. Moya<sup>2</sup>, N. Guerra<sup>2</sup>, O. Montes<sup>2</sup>, M. Montes<sup>2</sup>, C. Navarro<sup>1</sup>, J. Pagan<sup>1</sup>, R. Álvarez<sup>2</sup>. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Juan Canalejo, A Coruña y Servicios de Inmunología y <sup>1</sup>Alergología, Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

RANTES, un miembro de las quimioquinas C-C, es un potente quimioatrayente de eosinófilos, monocitos, basófilos y linfocitos al lugar de inflamación con preferencia particular por las células T CD45RO+ y eosinófilos. Estudios recientes han revelado que la mutación a -403 en el promotor puede tener significado en dermatitis atópica, asma bronquial, sarcoidosis, artritis reumatoide e infección VIH. Nuestro objetivo fue investigar el polimorfismo de RANTES en los diferentes tipos de asma bronquial.

En este estudio, se analizaron 181 pacientes con asma intrínseco (n=57) y extrínseco (n=124) y 100 controles. El DNA extrajo con técnicas estándar. La PCR y los productos de digestión de la PCR se diseñaron como lo descrito por Hajeer y cols para el genotipaje de RANTES por PCR-RFLP. Los primers utilizados para la PCR amplificaron un fragmento de 135 bps por delante de la región 5' de RANTES entre los nucleótidos -513 y -378 respecto al sitio de inicio de la transcripción. Se mutó una base G por una C en el extremo de 3' del primer reverso para introducir un sitio de restricción para MaeIII. Los productos PCR se digirieron con 2U de MaeIII (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) a 37°C durante 2 h, y se visualizaron en geles de agarosa (low melting point, Sigma).

De los 124 pacientes asmáticos extrínsecos, 5 presentaron el genotipo AA (4.1%), 34 el GA (27.4%), y 85 el genotipo GG (68.5%). La frecuencia del alelo G fue 82.2% y la del alelo A un 17.7%. De los 57 asmáticos intrínsecos, 2 tuvieron genotipo AA (1.6%), 19 GA (33.3%), y 36 el genotipo GG (63.1%). La frecuencia del alelo G fue 79.8% y del alelo A un 20.1%. La distribución genotípica y alélica observada entre los pacientes asmáticos extrínsecos e intrínsecos y controles no mostró diferencias significativas ( $p > 0.05$ ).

En conclusión, el polimorfismo génico del promotor de RANTES humano no parece influir en los diferentes tipos de asma bronquial.

## F-0015. Genética de la autoinmunidad

*Moderadores:* Ana Suárez Díaz (Oviedo), Javier Martín Ibáñez (Granada)

**F-0015-01-C. ALELOS HLA ASOCIADOS CON LA ENFERMEDAD CELIACA EN LA POBLACIÓN DE CÓRDOBA.** M. Miró, RA. González, MF. Rodríguez-Reynoso, P. Romero, S. Cantisán, C. Román, M. Santamaría, J. Peña. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Reina Sofía de Córdoba.

**Introducción.** La enfermedad celiaca (EC) es una enfermedad inflamatoria de la mucosa intestinal de base inmunitaria, debida a intolerancia al gluten en individuos genéticamente predispuestos que presenta asociación con determinados genes del siste-

ma HLA. Se ha descrito que ciertos alelos HLA de clase II DQ y DR están involucrados en la susceptibilidad primaria de esta enfermedad. Sin embargo el grado de asociación varía entre los diferentes grupos étnicos e incluso entre poblaciones relativamente cercanas ya que depende de la frecuencia de los diferentes alelos HLA en cada lugar.

**Objetivo.** Estudiar la asociación entre determinados genes y haplotipos HLA y enfermedad celiaca en la población de Córdoba.

**Pacientes y métodos.** Se presentarán los datos obtenidos mediante el estudio de los loci HLA-A, B, Cw, DRB1, DQA1 y DQB1 (PCR-SSO y/o PCR-SSP y/o secuenciación) en una muestra de 40 fami-

lias con al menos uno de sus miembros diagnosticados de EC. El estudio familiar nos permitió el estudio de la frecuencia de los diversos genes por separado así como de los haplotipos. También se estudiaron para la asignación de los haplotipos en la población control 50 familias. Se calculó el riesgo relativo y la fracción etiológica para cada alelo y haplotipo.

**Resultados y conclusión.** En nuestro medio también se encontró que el principal riesgo relativo corresponde a DQA1\*0501, DQB1\*0201 y DRB1\*0301. Se analizará si el estado heterocigoto u homocigoto influencia el grado de susceptibilidad. Se presentarán también los datos correspondientes al estudio de haplotipos con mayor asociación a EC, así como aquellos haplotipos más frecuentes en los hermanos sanos de pacientes con EC y que comparten uno de estos haplotipos.

**F-0015-02-O. ASOCIACIÓN DEL MARCADOR CT60 (A/G) DEL GEN CTLA-4 CON EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. ESTUDIO DE HAPLOTIPOS.** B. Torres<sup>1</sup>, F. Aguilar<sup>1</sup>, E. Franco<sup>1</sup>, E. Sánchez<sup>2</sup>, J. Sánchez Román<sup>3</sup>, J. Jiménez Alonso<sup>4</sup>, A. Núñez Roldán<sup>1</sup>, J. Martín<sup>2</sup>, M.F. González Escribano<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. HU Virgen del Rocío. SAS. Sevilla. <sup>2</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina «López Neyra». CSIC. Granada. <sup>3</sup>Unidad de Colagenosis. HU Virgen del Rocío. SAS. Sevilla. <sup>4</sup>Servicio de Medicina Interna. HU Virgen de las Nieves. SAS. Granada.

**Introducción.** La región cromosómica 2q33 se ha propuesto como zona de susceptibilidad al LES. Dentro de esta región se encuentra el gen CTLA4 que se expresa en la superficie de células T activadas. La unión de la molécula a sus ligandos tiene un papel inhibitorio en la activación de células T. Por lo tanto, CTLA-4 podría estar implicado en la susceptibilidad al LES.

**Objetivos.** Estudiar la posible asociación del dimorfismo CT60A/G recientemente descrito y localizado en la región 3'UTR del gen CTLA-4 con la susceptibilidad al LES, así como identificar posibles haplotipos de susceptibilidad a la enfermedad teniendo en cuenta otros polimorfismos del mismo gen que han sido estudiados con anterioridad: -1722 C/T, -319 C/T, +49 A/G y el microsatélite 3'UTR (AT)<sub>n</sub>.

**Material y métodos.** El genotipaje de CT60 se llevó a cabo en 395 pacientes con LES y 293 controles mediante PCR-RFLP. El resto de los polimorfismos fueron estudiados en un subgrupo de 276 pacientes y 194 controles sanos. Para el genotipaje del resto de los dimorfismos se utilizó un sistema de PCR-ARMS y para el del microsatélite 3'UTR (AT)<sub>n</sub> PCR seguida de electroforesis capilar. El cálculo de la frecuencia de los haplotipos resultantes de la combinación de los diferentes polimorfismos se realizó utilizando el software «Haploview».

**Resultados.** Respecto a CT60 A/G se encontró un aumento significativo de individuos portadores de G entre los pacientes con LES (81.2% vs. 71.7%, p=0.003, OR=1.71, 95%CI 1.18-2.49). La distribución de frecuencias alélicas también fue significativamente distinta entre pacientes y controles (p=0.01, OR(G)=1.32, 95%CI 1.06-1.65). En el análisis de haplotipos se encontraron dos haplotipos neutros +49A:(AT)<sub>7</sub>:CT60A, +49G:(AT)<sub>8-19</sub>:CT60G y un haplotipo de susceptibilidad +49A:(AT)<sub>>19</sub>:CT60G.

**Conclusión.** La región 3'UTR del gen CTLA4 está implicada en la susceptibilidad a padecer LES.

**F-0015-03-C. POLIMORFISMOS DEL GEN CD38 EN PACIENTES ESPAÑOLES CON LUPUS SISTÉMICO ERITEMATOSO.** B. Torres, F. Aguilar, J. Sánchez Román, A. Núñez Roldán, M.F. González Escribano. Servicio de Inmunología y Unidad de Colagenosis. HU. Virgen del Rocío. Servicio Andaluz de Salud. Sevilla.

**Introducción.** El gen CD38 codifica para una glicoproteína de membrana que actúa, por un lado, como una enzima catalizando la interconversión de NAD→ADPRc, y por otro como un receptor de superficie bioactivo interviniendo en la regulación del sistema inmune y en la transducción de señales. El gen mapea en la región 4p15 que ha sido descrita como una zona asociada con la susceptibilidad al LES en estudios de ligamiento. Por consiguiente, CD38 es un gen candidato a la susceptibilidad al LES, tanto desde el punto de vista posicional como funcional.

**Objetivos.** Investigar la posible asociación del gen CD38 con la susceptibilidad y la evolución clínica del LES. Los polimorfismos estudiados consisten en un cambio C/G en la posición 182 del intrón 1 y otro cambio de C/T en la posición 418 del exón 3.

**Material y métodos.** El genotipaje se realizó utilizando un sistema de PCR-ARMS en 276 pacientes diagnosticados de LES y 194 controles sanos.

**Resultados.** No se encontró asociación entre el polimorfismo localizado en posición 182 del intrón 1 y la susceptibilidad a LES. Cuando se dividieron los pacientes según las manifestaciones clínicas se observó un aumento significativo de individuos CC y un descenso paralelo de individuos CG entre los pacientes con eritema discoide (67.9% vs 53.1% en controles, p=0.02, OR=1.87, 95%CI 1.05-3.35; y 23.5% vs.40.2% en controles, p=0.008, OR=0.46, 95%CI 0.24-0.85). Mediante análisis de regresión logística se identificó el genotipo CC como factor de riesgo independiente para el desarrollo de eritema discoide entre pacientes (p=0.01, OR=2.23, 95%CI 1.19-4.18). No se detectaron individuos portadores de T en la posición 418 del exón 3 en ninguno de los grupos estudiados.

**Conclusiones.** El polimorfismo descrito en el intrón 1 del gen CD38 puede contribuir a las características clínicas de nuestros pacientes con LES.

**F-0015-04-O. INFLUENCIA DEL POLIMORFISMO DE MICA EN LA EVOLUCIÓN DE LA ESCLEROSIS MÚLTIPLE.** J.L. Fdez-Moreira<sup>1</sup>, A. Tuñón<sup>2</sup>, C. Laho<sup>2</sup>, S. Rodríguez-Rodero<sup>3</sup>, J. Martínez-Borra<sup>1</sup>, A. López-Vázquez<sup>1</sup>, S. González<sup>2</sup>, C. López-Larrea<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>2</sup>Servicio de Neurología, Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>3</sup>Departamento de Biología Funcional y Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Oviedo.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad desmielinizante del sistema nervioso central (SNC) de supuesta etiología autoinmune donde intervienen factores genéticos y ambientales. Se ha descrito asociación con haplotipo DR2 (DRB1\*1501, DQA1\*0101/2, DQB1\*0602) siendo menos relevante en el sur de Europa.

El objetivo de nuestro estudio es analizar la distribución del polimorfismo transmembrana de MICA (MICA-TM) en diferentes grupos evolutivos de pacientes con esclerosis múltiple.

Hemos seleccionado 100 enfermos de EM diagnosticados bajo criterios clínico-radiológicos y analíticos. Estos pacientes se han divi-

dido en dos grupos según el grado de EDSS (Expanded Disability Status Scale), un grupo con EDSS<3 (n=48) y otro con EDSS≥3 (n=52). Adicionalmente se han seleccionado 116 individuos sanos como controles. Todos ellos fueron tipados para MICA-TM, para HLA-B y HLA-DRB1.

El análisis de las frecuencias mostró disminución estadísticamente significativa del alelo MICA-A5 en población de pacientes que poseían un EDSS<3 comparado con pacientes de EDSS ≥ 3 ( $p=0.00133$ , OR=23.75). También encontramos disminución estadísticamente significativas de la frecuencia MICA-A5 entre pacientes que poseían un EDSS<3 y los controles sanos ( $p_c=0.00363$ , OR=15.10). No existían diferencias estadísticamente significativas entre pacientes con EDSS ≥ 3 y los controles sanos.

Estos resultados sugieren que la ausencia del polimorfismo MICA-A5 podría condicionar una mejor evolución de la enfermedad en pacientes con EM.

**F-0015-05-O. INFLUENCIA DE VARIOS POLIMORFISMOS DE LOS PROMOTORES DE LA INTERLEUCINA-10 Y EL TNF $\alpha$  EN LA INCIDENCIA DE LA COLITIS ULCEROSA(CU) Y LA ENFERMEDAD DE CROHN (EC), LA APARICION DE ANTICUERPOS Y LA RESPUESTA AL TRATAMIENTO.** P. Castro<sup>1</sup>, A. Suárez<sup>2</sup>, L. Mozo<sup>1</sup>, C. Gutiérrez<sup>1,2</sup>. Hospital Universitario Central de Asturias. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>Departamento de Biología celular.

Dada la gran importancia de los niveles de IL-10 y TNF- $\alpha$  en la UC y la CD y que estos dependen de SNPs situados en sus promotores, analizamos la influencia de éstos en la susceptibilidad a desarrollar UC o EC, así como su asociación con la presencia de anticuerpos (ASCA, ANCA, GAB y ANA), con ciertas manifestaciones clínicas y con el requerimiento de tratamiento inmunosupresor. Los polimorfismos se analizaron por PCR a tiempo real con hibridación con sondas fluorescentes aleloespecíficas. Los anticuerpos se determinaron por IFI o por ELISA. Encontramos que la presencia del alelo -1082G\* del promotor de la IL-10, (alto productor), incrementa la susceptibilidad a padecer UC (n=99,  $p=0.04$ ), pero no CD (n=150) con respecto a controles sanos (n=343). Observamos una clara aunque no significativa asociación, del alelo -308\*A del promotor del TNF $\alpha$  (alto productor) con una mayor susceptibilidad a la IBD. Cuando analizamos la influencia de los dos polimorfismos combinados encontramos que la presencia del genotipo bajo productor de TNF $\alpha$ /alto de IL-10 (-1082GG, -308GG) influencia la aparición de IBD ( $p=0.02$ ) y especialmente de UC ( $p=0.005$ ), respecto al genotipo más común (-1082AA/AG, -308GG). El genotipo alto productor de TNF $\alpha$ /bajo de IL-10 (-1082AA/AG, -308AA/AG) incrementa también la susceptibilidad a UC ( $p=0.039$ ).

Al analizar juntos estos dos genotipos combinados (descompensados en la producción de IL-10 y TNF $\alpha$ ) encontramos un elevado incremento de la susceptibilidad a IBD ( $p=0.007$ ). Con respecto a los autoanticuerpos, la presencia de ANCA se encuentra elevada en el bajo productor de IL-10 ( $p=0.004$ ) y el alto de TNF $\alpha$  ( $p=0.014$ ) en los enfermos de UC. En CD la baja producción de IL-10 y alta de TNF $\alpha$  se asocia con mayor presencia de GABs ( $p=0.022$ ). No encontramos asociaciones significativas entre los genotipos y varios parámetros clínicos, con la excepción de la necesidad de terapia inmunosupresiva en aquellos pacientes con genotipo bajo productor de IL-10 en UC ( $p=0.008$ ).

**F-0015-06-O. IMPLICACIÓN DEL GENOTIPO DE LA IL-10 Y EL TNF- $\alpha$  EN EL DESARROLLO DEL LUPUS ERITEMATOSO DISCOIDE Y SISTÉMICO.** P. López<sup>1</sup>, A. Suárez<sup>1</sup>, L. Mozo<sup>2</sup>, C. Gutiérrez<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Area de Inmunología, Departamento de Biología Funcional, Universidad de Oviedo. <sup>2</sup>Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias.

El presente estudio pretende conocer el papel de los polimorfismos de la IL-10 y el TNF- $\alpha$  en la susceptibilidad a padecer lupus eritematoso discoide (LED) y sistémico (LES), así como las posibles asociaciones con autoanticuerpos en la enfermedad sistémica.

Se cuantificaron los niveles basales de RNAm mediante RT-PCR a tiempo real en 106 individuos sanos, y se correlacionaron con los polimorfismos presentes en el promotor de la IL-10 (-1082 G/A, -819 C/T y -592 C/A) y del TNF- $\alpha$  (-308 G/A). La frecuencia de estos polimorfismos se determinó en 248 pacientes (192 LES y 56 LED) y 343 controles mediante amplificación por PCR e hibridación con sondas específicas de alelo.

El genotipo GCC/GCC se asoció con altos niveles basales de IL-10 y el alelo -308A\* con alta producción de TNF- $\alpha$ , lo que permitió clasificar a los individuos en genotipos altos y bajos productores de ambas citocinas. Encontramos asociación del genotipo alto productor de IL-10 con riesgo de desarrollar LED (OR=2,10,  $p=0,029$ ), mientras que el alto productor de TNF- $\alpha$  se asoció con LES (OR=2,37,  $p<0,0001$ ). La clasificación de los pacientes en genotipos combinados de IL-10/ TNF- $\alpha$  permitió observar que la interacción de ambas citocinas influye tanto en la susceptibilidad a desarrollar lupus como en la aparición de autoanticuerpos. El riesgo a desarrollar LED se vio aumentado en el genotipo «alto IL-10/bajo TNF- $\alpha$ » (OR=2.63,  $p=0.010$ ), mientras que la frecuencia de anticuerpos anti-SSa /SSb fue mayor en los pacientes de LES con genotipo «bajo IL-10/alto TNF- $\alpha$ » ( $p=0.0001$  y 0.033, respectivamente). Curiosamente, anticuerpos anti-Sm fueron más prevalentes entre los pacientes con genotipo «bajo IL-10/bajo TNF- $\alpha$ » (13.3% vs 4.9%,  $p=0.040$ ), no asociado a lupus. En conclusión, el genotipo alto productor de TNF- $\alpha$  representa un factor de riesgo para LES, mientras que el genotipo alto productor de IL-10 se asocia con susceptibilidad a padecer LED. Además, se encontró una correlación entre la presencia de anticuerpos anti-Sm y el genotipo «bajo IL-10/bajo TNF- $\alpha$ » y de anticuerpos anti-SSa/SSb con el genotipo «alto TNF- $\alpha$ /bajo IL-10», revelando la existencia de interacción entre ambas citocinas en el desarrollo del lupus.

**F-0015-07-C. LOS HAPLOTIPOS NO TRANSMITIDOS FORMAN UNA MUESTRA POBLACIONAL NO SESGADA: APLICACIÓN EN ESTUDIOS DE ASOCIACIÓN.** M.C. Prado Zamora, A. Martínez, J. Caubín, A. Mas-Fontao, E. Urcelay, M. Fernández-Arquero, E. G. de la Concha. Servicio de Inmunología Clínica, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Introducción.** Los alelos de susceptibilidad son más frecuentes en haplotipos de pacientes (T) que en haplotipos parentales no transmitidos (NT). A veces, la dificultad de conseguir muestras de los padres hace que no podamos ver diferencias por falta de potencia estadística.

**Objetivos.** Comprobar si el conjunto de los haplotipos NT de diversas enfermedades de base inmunológica puede considerarse homogéneo en nuestra población. De ser así, podríamos utilizarlos para construir un grupo control mayor de haplotipos. Aun perdiendo la resistencia a los efectos de una población estructurada, este problema no sería mayor que en un estudio caso-control, con la ventaja de usar haplotipos, reales, no inferidos. Aplicaremos este método al caso particular de la posible susceptibilidad diferencial de los haplotipos DR3-TNFA2b3 (AH8.1) y DR3-TNFA1b5 (AH18.2) en enfermedad celíaca (EC).

**Materiales y métodos.** Se han incluido 58 familias de Artritis Reumatoide (AR), 57 de Esclerosis Múltiple (EM), 114 de déficit de IgA (DIgA) y 140 de EC, además de 594 individuos sanos no emparentados. Las diferencias se estudiaron con el estadístico  $\chi^2$ .

**Resultados.** Las frecuencias de los alelos de susceptibilidad a diversas enfermedades (epítipo compartido en AR, DRB1\*1501 en EM, DR1/3/7 en DIgA y DR3-DQ2 en EC) son iguales en todos los grupos de haplotipos no transmitidos e iguales a las del grupo control. Aplicado a la EC, la proporción de los haplotipos AH8.1 y AH18.2 era diferente pero no significativamente en los T frente a los NT (54/18 vs 10/8;  $p=0.10$ ; OR=2.40). Si añadimos los NT de otras enfermedades obtenemos los siguientes valores: 54/18 vs 27/26 ( $p=0.005$ ; OR=2.89).

**Conclusiones.** Los haplotipos NT en diversas enfermedades de base inmunológica son una muestra representativa de la población, válida como control en estudios caso-control. Nuestra metodología indica que en la enfermedad celíaca, el segundo alelo de susceptibilidad que se ha postulado en el AH8.1 parece no estar presente en el AH18.2.

**F-0015-08-O. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS EN EL GEN DE LA IL-10 EN PACIENTES CON ENFERMEDAD DE CROHN.** L. Fernández Franco<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>1</sup>, J.L. Mendoza<sup>2</sup>, A. Mas-Fontao<sup>1</sup>, E. Urcelay<sup>1</sup>, M. Fernández-Arquero<sup>1</sup>, C. Taxonera<sup>2</sup>, M. Díaz-Rubio<sup>2</sup>, E.G. de la Concha<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología Clínica y <sup>2</sup>Gastroenterología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Introducción.** La IL-10 es una citocina reguladora implicada en la patología de diversas enfermedades autoinmunes. Los polimorfismos descritos en el gen IL-10 podrían alterar los niveles de expresión de esta citocina y ser, por tanto, factores de susceptibilidad para estas enfermedades.

**Objetivo.** Estudiar los polimorfismos en el gen IL-10 y su relación con la susceptibilidad a padecer EC.

**Métodos.** Estudiamos 228 pacientes con EC y 572 controles sanos. Se estudiaron primero los microsatélites IL-10 G y R, y luego las posiciones del promotor -1082, y -819 junto con el microsatélite IL-10G, todo mediante PCR seguida de electroforesis capilar. El análisis estadístico de los datos se realizó a través de un test chi-cuadrado, usando un paquete informático de análisis estadístico (EPI-INFO v. 6.02).

**Resultados.** La frecuencia del alelo IL-10G14 se encontraba aumentada en los pacientes de EC cuando se comparaba con los controles ( $p=0.0047$ , OR=1.75  $p<0.05$ ). La frecuencia de los alelos estudiados para el microsatélite IL-10R no difería estadísticamente en la población enferma cuando se comparó con los controles. Se vió un aumento en la frecuencia del alelo -1082G (GG+AG) en los pacientes de EC cuando se comparó con los controles ( $p=0.01$ , OR=1.54). Las frecuencias de los alelos de la posición -819 del promotor no variaban

entre los enfermos y los controles. En la población control, los alelos IL-10G14 y -1082G no se encontraban en desequilibrio de ligamiento. Ambos alelos (IL-10G14 y -1082G) se asociaban a EC tanto en ausencia o presencia el uno del otro, y ambos conferirían un efecto similar de susceptibilidad a la enfermedad. El riesgo a desarrollar la enfermedad era mayor cuando los pacientes presentaban ambos marcadores ( $p=0.00006$ , OR=3.18). No nos fue posible determinar si este riesgo era mayor en cis o en trans.

**Conclusión.** Los alelos IL-10G14 y -1082G incrementan, sobre todo cuando aparecen combinados, la susceptibilidad a padecer enfermedad de Crohn en la población española.

**F-0015-09-C. MARCADORES DE SUSCEPTIBILIDAD FUERA DEL MHC EN PACIENTES DIABÉTICOS TIPO 1.** J.L. Santiago Alvarez<sup>2</sup>, E. Urcelay<sup>1</sup>, A. Martínez<sup>1</sup>, H. de la Calle<sup>2</sup>, M. Fernández-Arquero<sup>1</sup>, E.G. De la Concha<sup>1</sup>. \*Servicio de Inmunología, H. Clínico San Carlos. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Endocrinología, H. Ramón y Cajal. Madrid.

**Introducción.** Los factores genéticos más importantes en la susceptibilidad a la diabetes tipo 1 (T1D) se encuentran en el MHC. Además es de sobra conocido el papel de las citocinas en toda respuesta inmune, lo cual las convierte en excelentes factores que podrían contribuir a la predisposición a dicha enfermedad.

**Objetivos.** Estudiar polimorfismos en tres citocinas independientes del MHC que pudiesen participar en la susceptibilidad a la T1D.

**Métodos.** Se estudiaron 6 microsatélites y 4 SNPs de 294 pacientes T1D y 574 controles todos del área de Madrid. El análisis de todos los microsatélites y de los SNPs del promotor de IL-10 se llevó a cabo en un secuenciador ABI Prism 3100. Por último el análisis de los SNPs de IL-12 y de IFN- $\gamma$  se realizó en un ABI Prism 7700 mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

**Resultados.** De todos los marcadores analizados se encontraron aumentados significativamente en los enfermos los alelos IL-10G\*12 e IL-10G\*14. En el resto de microsatélites y SNPs estudiados no se apreciaron diferencias significativas entre pacientes y controles.

**Conclusiones.** Hemos encontrado asociaciones débiles con los alelos 12 y 14 del microsatélite IL-10G lo que unido a los factores genéticos ya conocidos del MHC no hace más que corroborar el origen poligénico de la enfermedad. El alelo IL-10G\*12 es el mismo que nuestro grupo ha encontrado asociado a otras dos enfermedades autoinmunes Th1 como son la Esclerosis Múltiple y la Artritis Reumatoide. Este hecho viene a apoyar la hipótesis de la presencia de un grupo de genes de susceptibilidad comunes en enfermedades autoinmunes con manifestaciones clínicas diferentes.

**F-0015-10-O. ESTUDIO DE POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE CITOCINAS EN POBLACION CON DIABETES MELLITUS DEPENDIENTE DE INSULINA (IDDM).** C. Hornero Cimiano<sup>1</sup>, P. Sánchez Velasco<sup>1</sup>, C. Luzuriaga<sup>2</sup>, J.A. Amado<sup>3</sup>, L. Fernández Prieto<sup>1</sup>, E. del Cerro Vadillo<sup>1</sup>, F. Leyva Cobian<sup>1</sup>, E. Carrasco Marín<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Pediatría y <sup>3</sup>Endocrinología. Hospital Universitario Marques de Valdecilla. Santander.

La diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) es una enfermedad autoinmune dependiente de células T en la que especí-

ficamente se destruyen las células beta pancreáticas. En el desarrollo de la enfermedad intervienen factores genéticos y medioambientales. Se han descrito al menos 23 loci de susceptibilidad al desarrollo de la enfermedad. Entre ellos el principal factor de riesgo es la expresión de ciertos alelos del MHCII. Concretamente la expresión de DQ2, DQ8 confiere susceptibilidad mientras que la expresión de DQ6 confiere protección.

En la etiopatogénesis de la enfermedad se produce un proceso inflamatorio dependiente de linfocitos CD4 Th1. Experimentalmente el bloqueo de la respuesta Th1 ó la inducción de la respuesta Th2 protege del desarrollo de la enfermedad. Por tanto factores no MHCII que regulen la intensidad y el tipo de respuesta Th1/Th2 podrían estar implicados. Concretamente en este estudio hemos analizado polimorfismos genéticos de citocinas que en la mayoría de los casos se corresponden con haplotipos de alta/baja producción de las mismas en individuos diabéticos n:62, en población no diabética con haplotipo de protección DQ6 n:63 y en 25 diabéticos y sus familiares (padres y hermanos) no diabéticos n:70. Los polimorfismos estudiados mediante PCR y RFLP han sido: IL1alfa, IL1 beta, IL1R, IL1Ra, IL12, TGF beta, IL2, IL6, IL4Ra, IL4, IL10 y TNF alfa. Los resultados muestran solamente se encuentran diferencias significativas  $p < 0.01$  en la posición pst11970 del IL1R (genotipo TT 19,44% en diabéticos versus 4,11% y 7,14% en familiares y población DQ6 respectivamente) y en la posición mspa111100 del IL1Ra (genotipo CC 12,2% en población diabética versus 4,35% y 1,59% en familiares y población DQ6 respectivamente). El significado fisiológico de estos hallazgos podría interpretarse desde el punto de vista del tratamiento que se efectúa en otras patologías autoinmunes vg artritis reumatoide, con antagonista de receptor de IL1 y con receptor de IL1.

**F-0015-11-C. MARCADORES SEROLÓGICOS Y CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS Y SU ASOCIACIÓN CON LOS ALELOS HLA DE RIESGO EN PACIENTES CELIACOS Y SUS FAMILIARES DE PRIMER GRADO.** C. Ruiz de Alegría Puig<sup>1</sup>, P. Sánchez Velasco<sup>1</sup>, D. González Lamuño<sup>2</sup>, F. Ausín<sup>1</sup>, T. Carrera<sup>1</sup>, P. Fernández<sup>2</sup>, M. López Hoyos<sup>1</sup>, F. Leyva Cobián<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Pediatría. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.

La asociación entre la enfermedad celiaca (EC) y el sistema HLA está bien establecida, de modo que el haplotipo DQA5/DQB2 confiere riesgo a padecerla. Últimamente, se está considerando de importancia diagnóstica al tipaje HLA, aún en ausencia de los autoanticuerpos característicos.

Nuestro objetivo fue analizar si la expresión de los alelos HLA de riesgo, asociados o no a marcadores serológicos y parámetros clínicos, puede predecir el desarrollo de la enfermedad.

Para ello, se realizó tipaje HLA de clase I y II mediante PCR-SSP (Protrans, Diagnostica Longwood) en 108 enfermos celiacos y 222 familiares (82 hermanos, 73 madres y 67 padres). En todos ellos, se recogieron de forma reglada los datos clínicos y demográficos junto con los parámetros serológicos realizados en nuestro laboratorio.

Las frecuencias de alelos HLA DQB\*0201 fue XX% para los pacientes, mientras que para los hermanos fue XX%, 48,6% para las madres y 46,2% para los padres. Las frecuencias del alelo DQA\*0501 fueron, respectivamente, 44,9%, 27,4%, 41,7% y 31,3%. El haplotipo de riesgo DQA05/DQB02 se expresó en el 12,9% de los enfermos,

33,6% de los hermanos, 9,4% de las madres y 4,41% de los padres. Entre los hermanos, 1 tuvo sólo Acs anti-gliadina (AGA) y 2 sólo Acs anti-transglutaminasa (ATGA). De ellos, ninguno tuvo el haplotipo de riesgo.

Sólo un padre fue positivo para los AGA, el cual no expresaba ningún alelo de riesgo. Sólo 2 madres fueron positivas para AGA sin expresión de alelos de riesgo. De todos los familiares seguidos, sólo un hermano ha desarrollado EC, pero no expresó el haplotipo de riesgo. Por último, en los pacientes con el haplotipo de riesgo, el pediatra pautó la Introducción del gluten en 85,7%, frente al 65,9% para el resto de haplotipos. La presentación atípica fue en el 100% frente al 80,8%. Las enfermedades concurrentes, infecciones o asociación con enfermedades autoinmunes fueron independientes del alelo HLA expresado.

En conclusión, los datos reflejan una utilidad limitada del tipaje HLA por sí solo para predecir el diagnóstico de la EC o para predecir el desarrollo de enfermedad en familiares de primer grado en nuestra población.

**F-0015-12-O. ASOCIACION DEL ALELO MICA A5.1 CON SUSCEPTIBILIDAD A ENFERMEDAD CELÍACA EN UN ESTUDIO FAMILIAR.** B. Rueda<sup>1</sup>, M. Pascual<sup>1</sup>, B.P.C. Koeleman<sup>2</sup>, E. Ortega<sup>3</sup>, J. Martín<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra», CSIC, Granada <sup>2</sup>Department of Medical Genetics, U.M.C.U., Utrecht, The Netherlands. <sup>3</sup>Servicio Pediatría, Hospital Clínico San Cecilio, Granada. <sup>4</sup>Servicio Pediatría, Hospital Materno-Infantil, Granada.

La enfermedad celiaca (EC) es una enteropatía caracterizada por la intolerancia al gluten que se presenta en individuos genéticamente susceptibles. Los genes HLA son muy importantes en la susceptibilidad a enfermedad, siendo un 90% de los pacientes portadores de la molécula HLA-DQ2 (DQA1\*05/DQB1\*02). Sin embargo este haplotipo se ha encontrado en un 20-30% de controles sanos por lo que se cree que la susceptibilidad a EC está influenciada por otros genes. El gen MICA, perteneciente a la familia de moléculas relacionadas con el MCH de clase I se expresa principalmente en el epitelio gastrointestinal. Además esta molécula es reconocida por los linfocitos T  $\gamma\delta$ + que se encuentran dramáticamente expandidos en los pacientes con EC. En el exón cinco del gen MICA se describió un microsatélite consistente en un número variable de repeticiones CGT, además de una inserción nucleotídica GCT→GGCT (alelo MICA A5.1) que codifica para un stop codón prematuro. En este trabajo se estudió el papel del microsatélite GCT en susceptibilidad a EC. Se analizaron 61 familias españolas con un hijo afecto de EC. El tipaje del microsatélite GCT se realizó con un método de PCR combinado con tecnología fluorescente.

La transmisión global de los alelos MICA a los hijos enfermos, mostró una desviación estadísticamente significativa ( $p=0.004$ ), observándose un aumento de la transmisión del alelo MICA A5.1 (T: 61.2% NT: 38.7%  $p=0.02$ ). Esta asociación pareció independiente del haplotipo de riesgo HLA-DQ2 en EC. Además se clasificó a las familias según la clínica del hijo afecto en típicas y atípicas. En las familias típicas se observó que el alelo MICA A5.1 seguía estando asociado con susceptibilidad a enfermedad. Nuestros datos sugieren que el alelo MICA A5.1 se asocia con susceptibilidad a EC independientemente del haplotipo HLA-DQ2 y de la clínica con la que curse la enfermedad.



**F-0015-13-C. RELACIÓN ENTRE ALELOS HLA-DRB1 Y ANTICUERPOS ANTI PEPTIDO CICLICO CITRULINADO EN POBLACION ESPAÑOLA CON ARTRITIS REUMATOIDE.** D. Oliver Miñarro<sup>1</sup>, S. Calleja Antolín<sup>1</sup>, E. Mancebo Sierra<sup>1</sup>, M. J. Marín Alcaraz<sup>1</sup>, M.J. Castro Panete<sup>1</sup>, M.A. Pacho de Lucas<sup>1</sup>, B.E. Joven Ibáñez<sup>2</sup>, L. González Hombrado<sup>2</sup>, E. Paz Artal<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica genéticamente relacionada con moléculas de HLA clase II que contienen un motivo aminoácido conservado (QK/RRAA) denominado epítipo compartido (EC). El EC aparece en la tercera región hipervariable de la cadena DR-beta de los alelos DRB1\*0101, DRB1\*0401, DRB1\*0404. En trabajos previos hemos hallado, en una muestra de población española, que HLA-DRB1\*0101 es el principal marcador de susceptibilidad a AR, y que entre un 50 y un 70% de los pacientes son portadores del EC (datos no publicados). Estas moléculas de HLA clase II podrían participar en la patogénesis de la enfermedad por la unión selectiva con secuencias de péptidos implicados en la artritis para la presentación de células T auto-reactivas.

En la AR aparecen unos autoanticuerpos que reconocen proteínas portadoras del aminoácido citrulina (anticuerpos anti-CCP), de forma muy específica para la enfermedad. En ratones transgénicos para HLA-DRB1\*0401, se ha demostrado que la citrulinización de péptidos antigénicos aumenta significativamente su afinidad por dichas moléculas presentadoras, y que su presentación conduce a la activación de linfocitos T CD4+, pudiendo ser éste el mecanismo iniciador de la respuesta autoinmune en pacientes con AR.

En este trabajo se pretende investigar si el EC o determinados alelos HLA-DRB1 se asocian con la presencia de anticuerpos anti-CCP en individuos con artritis reumatoide. Para ello se ha estudiado una población de 90 pacientes con artropatía de inicio reciente, en los que se ha determinado la presencia de anticuerpos anti-CCP por ELISA y se ha realizado la tipificación de HLA-DRB1. Se discuten los resultados obtenidos y sus implicaciones en el diagnóstico, la patogenia y la gravedad de la enfermedad.

**F-0015-14-O. EFECTOS DEL POLIMORFISMO -330 G/T ASOCIADO A ESCLEROSIS MÚLTIPLE EN LA EXPRESIÓN DEL GEN DE LA IL-2.** M. Fedetz, F. Matesanz, A. Alcina. Instituto de Parasitología y Biomedicina López Neyra, CSIC y Hospital Universitario San Cecilio, SAS, Granada.

**Introducción.** La Esclerosis Múltiple (EM) es una enfermedad autoinmune que afecta al sistema nervioso central produciéndose una inflamación crónica y desmielinización. Estudios epidemiológicos apoyan que tanto los agentes ambientales como genéticos influyen en el curso de la enfermedad. Los genes que contribuyen a la susceptibilidad a EM no han sido identificados.

Dado el carácter autoinmune de la enfermedad, las moléculas reguladoras de la respuesta inmune como son las citocinas, podrían ser candidatos relevantes como factores de susceptibilidad a la enfermedad. En trabajos previos hemos definido que el polimorfismo -330 G/T del promotor del gen la IL-2 (IL2) se asocia con la susceptibilidad a padecer EM.

**Objetivos.** Estudiar efectos del polimorfismo -330 G/T de IL2 en la expresión del gen.

**Métodos.** Estudios de la expresión de IL2 mediante transfección en células Jurkat con construcciones de las dos variantes alélicas del promotor de IL2 controlando la transcripción del gen de luciferasa en el plasmido pXP2. Medida de la expresión relativa de los alelos -330 G/T usando como marcador el polimorfismo +114 G/T situado en el primer exon de IL2. Medida de la expresión total por RT-PCR a tiempo real de RNA de linfocitos de sangre periférica de 32 controles sanos y 23 enfermos de EM.

**Resultados.** Los estudios de transfección mostraron que el alelo -330 G se expresa dos veces más que el alelo -330 T. Sin embargo, el análisis de la expresión relativa de los alelos -330 G/T y expresión total en RNA de linfocitos de sangre periférica reveló que la expresión del alelo G era significativamente menor que el alelo T.

**Conclusiones.** Las divergencias entre los datos obtenidos de linfocitos humanos y de células Jurkat transfectadas sugieren la existencia de otros factores que modulen los efectos del polimorfismo -330 en la transcripción. Nuestros datos muestran un incremento en la expresión del IL2 de los genotipos GT y TT previamente asociados con la susceptibilidad a padecer EM.

*Financiación : FIS PI020920 a A.Alcina, FIS 01/3149 a F. Matesanz*

**F-0015-15-C. PREVALENCIA DE MUTACIONES DEL GEN NOD2 EN PACIENTES DEL SUR DE ESPAÑA CON ENFERMEDAD DE CROHN.** J. Cantón, JM Romero, E. Crespo, S. Pedrinaci, F. Ruiz-Cabello. Servicio de Análisis Clínicos, H.U. Virgen de las Nieves. Granada.

**Introducción.** La enfermedad de Crohn (EC) es un tipo de inflamación crónica del tubo digestivo de etiología desconocida, en el que han sido implicados factores medioambientales y genéticos. El gen NOD2, ha sido recientemente identificado como uno de los genes de susceptibilidad para la EC. Este gen pertenece a la superfamilia de NOD1/Apaf-1, implicados en la respuesta inflamatoria a lipopolisacáridos bacterianos a través de la activación de NF-kB. Mutaciones en el gen NOD2 se han encontrado en pacientes de EC.

**Objetivos.** Estudiar la prevalencia de las mutaciones R702W, G908R y L1007fs en pacientes de Crohn del sur de España.

**Métodos.** Se han genotipado 130 pacientes de EC no relacionados, mediante PCR-FRET con sondas específicas para estas 3 variantes.

**Resultados.** Al menos una de las mutaciones estuvo presente en un 30% de los pacientes. El 3.8% fueron heterocigotos compuestos y el 3% homocigotos. La frecuencia alélica de portadores para las mutaciones R702W, G908R y L1007fs, fue del 12.2%, 2.3% y 5.6% respectivamente.

**Conclusiones.** Hasta el momento la prevalencia de estas mutaciones ha sido fundamentalmente analizada en poblaciones distintas a la española (centro de Europa y Norteamérica). De nuestros resultados destaca la baja frecuencia del polimorfismo G908R y una menor frecuencia de la mutación L1007fs en la población analizada con respecto a las series publicadas.

**F-0015-16-O. POLIMORFISMO GENÉTICO DE TNF $\alpha$ , IL 10 Y TGF $\beta$ 1 Y ANTICUERPOS ANTITRANSGLUTAMINASA IgA EN LA ENFERMEDAD CELÍACA.** A. Prada<sup>1</sup>, A. Ayesta<sup>1</sup>, A. Arrieta<sup>1</sup>, M. Riñón<sup>1</sup>, J.C. Vitoria<sup>2</sup>, N. Maruri<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección de Inmunología. <sup>2</sup>Sección Gastroenterología Pediátrica Hospital Cruces. Baracaldo. Vizcaya.

Las citoquinas juegan un papel crítico en el papel de la respuesta inmune. Los polimorfismos de los genes que codifican estas

moléculas se relacionan con la cantidad de citoquina producida. La finalidad de este trabajo es estudiar la relación entre producción de anticuerpos anti-Transglutaminasa y su relación con los polimorfismos de TNF $\alpha$ , IL-10 y TGF $\beta$ 1 en la enfermedad celíaca.

**Materiales y Métodos.** Se estudian a partir de DNA extraído de sangre total, mediante PCR-SSP, los polimorfismos genéticos de la región promotora de TNF $\alpha$  en la posición -308, IL 10 en la posición -1082 y TGF $\beta$ 1 en el codón 10 y en el codón 25 en 61 pacientes celíacos y en 61 controles sanos. Los anticuerpos anti-Transglutaminasa IgA se estudian por la técnica ELISA estableciéndose tres subgrupos: altos, (>300 UI), medios (100-300) y bajos (<100) productores de anticuerpos.

**Resultados.** No encontramos diferencias en la distribución de dichos polimorfismos entre el grupo control y enfermos celíacos. Con respecto al TNF $\alpha$  en el grupo de altos productores de anticuerpos vemos que hay un aumento de homocigotos (-308 AA) del 37% con respecto al grupo control (7%) y con respecto al grupo de medios (3%) y bajos productores (10%) de anticuerpos.

Estudiando IL-10 no encontramos diferencias en la distribución de los polimorfismos entre los tres grupos de pacientes celíacos. En cuanto a TGF $\beta$ 1 en el codon 10, el grupo de bajos productores de anticuerpos presenta un aumento de homocigotos CC del 47% con respecto al grupo control (10%), al grupo de medios (12%) y altos productores (12%) de anticuerpos.

**Conclusiones.** Hay una relación entre el genotipo de TGF $\beta$ 1 codon 10 (CC) asociado a baja producción de TGF $\beta$ 1 y baja producción de anticuerpos anti-Transglutaminasa en enfermedad celíaca. No encontramos relación entre polimorfismos para IL-10 (-1082) y en enfermos celíacos y la producción de anticuerpos anti-Transglutaminas en altos, medios y bajos productores.

**F-0015-17-O. ESTUDIO DEL POLIMORFISMO DEL RECEPTOR Y6 DE NEUROPEPTIDOS (NPY6R) EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL (EII). A. Piñero<sup>1</sup>, F. Corroero<sup>1</sup>, L. Martín<sup>1</sup>, J.A. Brieva<sup>2</sup>, A. Nieto<sup>2</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Digestivo e <sup>2</sup>Inmunología. H.U. Puerta del Mar. Cádiz.**

**Introducción.** La familia de péptidos «PP-fold» (Neuropéptido Y, PéptidoYY, Polipéptido Pancreático) ejercen efectos reguladores en respuestas inflamatorias y se han involucrado en adhesión y migración de células T a sitios de inflamación, actuando a través de una familia de receptores con diferentes afinidades. NPY6R es un miembro de esta familia que se expresa en intestino, especialmente ileon, y cuya función en humanos está por dilucidar. El gen NPY6R es polimórfico y mapea en la región 5q31. Esta región coincide con el locus IBD5, asociado a enfermedad de Crohn (EC) como factor independiente o actuando de forma epistática con CARD15 (IBD1). Asimismo se ha reportado que variantes en 5q31 pueden actuar como locus de susceptibilidad a colitis ulcerosa (CU). Ninguno de los genes estudiados se ha mostrado responsable de esta asociación. Por todo ello, consideramos que NPY6R es un gen candidato apropiado.

**Objetivos.** Analizar la posible asociación del polimorfismo R181H de NPY6R con EII, EC y CU en cuanto a susceptibilidad y fenotipo de la enfermedad y establecer una posible interacción con variantes de CARD15.

**Pacientes y métodos.** 246 pacientes de EII (139 EC, 104 CU) previamente caracterizados para R702W, G908R y L1007fs. Se estu-

diaron 117 controles sanos de similares características demográficas. R181H se tipó mediante PCR-RFLP.

**Resultados.** Las frecuencias del alelo 181H fueron: controles 5.5%, EC 3.23% y CU 1.9%. No se encontraron diferencias cuando se analizaron los pacientes en conjunto (EII). Sin embargo, el análisis por separado mostró una asociación negativa al límite de la significación en pacientes con CU (OR=0.33, 95%CI 0.08-1.10; p=0.047). No se encontraron diferencias con características clínicas en ninguno de los grupos. No se encontró ninguna relación entre ser portador o no de variantes en CARD15 y NPY6R en EC y CU.

**Conclusiones.** No existe relación entre el polimorfismo de NPY6R y la EC en nuestra población. Dicho polimorfismo podría modular la susceptibilidad a padecer CU, si bien nuevos estudios serían necesarios para confirmar estos datos.

**F-0015-18-O. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO DE CARD15 EN ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL EN POBLACIÓN ESPAÑOLA. A. Piñero<sup>1</sup>, F. Corroero<sup>1</sup>, L. Martín<sup>1</sup>, J.A. Brieva<sup>2</sup>, A. Nieto<sup>2</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Digestivo e <sup>2</sup>Inmunología. H. U. Puerta del Mar. Cádiz.**

**Introducción.** Tres variantes de CARD15 (R702W, G908R, L1007fs) se han encontrado asociadas de forma independiente con Enfermedad de Crohn (EC) y no con colitis ulcerosa (CU). Se ha demostrado cierta variabilidad en cuanto a la frecuencia de dichas mutaciones y a su grado de asociación con EC. Asimismo, algunos estudios han encontrado relación de los polimorfismos de CARD15 con el fenotipo de la enfermedad.

**Objetivo.** Determinar la asociación de R702W, G908R y L1007fs con la susceptibilidad a EII y posible relación con el fenotipo de la enfermedad.

**Pacientes y métodos.** 104 pacientes con CU clasificados en función de la extensión y del patrón evolutivo y 142 pacientes con EC agrupados según la Clasificación de Viena. Otros parámetros recogidos fueron antecedentes familiares de EII, manifestaciones extradiigestivas, necesidad de cirugía e inmunosupresores, tabaquismo y uso de anticonceptivos orales. Se estudiaron 117 controles sanos de similares características demográficas. R702W se tipó mediante PCR-SSP; G908R y L1007fs mediante PCR-RFLP.

**Resultados.** Las frecuencias alélicas en EC (vs controles) fueron las siguientes: R702W 12.5% (vs 5.9%; p=0.013); G908R 4.43% (vs 0.85%; p=0.015) L1007fs 6.85% (vs 0.42%; p=0.0002). Se observó una más fuerte asociación con ser portador de una copia de L1007fs (OR=13.04, 95%CI 1.71-273.0; p=0.002) con respecto a ser portador de al menos una de las otras dos mutaciones (OR=2.39, 95%CI 1.16-4.96; p=0.009).

Los individuos doble heterocigotos presentan asimismo un riesgo aumentado (OR=9.78, 95%CI 1.23-432.97; p=0.009). El ser portador de al menos una de las mutaciones se asocia con debut precoz (dif de medias de 6,06 años (IC 95% 2.4-9.2; p=0.001)), afectación ileal (p=0.044), y menor incidencia de manifestaciones extradiigestivas (p=0.040).

No existen diferencias entre pacientes de CU y controles.

**Conclusiones.** Este estudio confirma la implicación del gen CARD15 en la susceptibilidad a EC en nuestra población, especialmente en portadores de L1007fs, y la ausencia de asociación con CU. CARD15 condiciona la forma de presentación de la enfermedad.

**F-0015-19-C. POLIMORFISMOS DEL PROMOTOR DE LA INTERLEUCINA 10 EN LUPUS ERITEMATOSO SISTEMICO.** S. Rosado<sup>1</sup>, T. Martín-Donaire<sup>1</sup>, I. Losada-Fernández<sup>2</sup>, I. Rúa-Figueroa<sup>3</sup>, M.I. García-Laorden<sup>4</sup>, C. Rodríguez-Lozano<sup>3</sup>, C. Rodríguez-Gallego<sup>4</sup>, P. Pérez-Aciego<sup>2</sup>, J.A. Vargas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Medicina Interna I, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. <sup>2</sup>Fundación LAIR, Madrid. <sup>3</sup>Reumatología e <sup>4</sup>Inmunología, Hospital de Gran Canaria Dr. Negrín, Las Palmas G.C.

**Introducción.** El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad caracterizada por una inflamación multisistémica, activación policlonal de los linfocitos B y producción de elevados niveles de anticuerpos anti-nucleares. Alteraciones en la regulación de ciertas citocinas implicadas en la respuesta inflamatoria se han relacionado con la patogénesis del LES, entre ellas la sobreproducción de la citocina Th2: interleucina 10 (IL10). El gen de la IL10 presenta varios polimorfismos en su promotor, cercanos a sitios de unión para factores de transcripción como: NFκB y STAT1, que podrían ser importantes en la susceptibilidad a desarrollar la enfermedad.

**Objetivos.** Estudio de la asociación genética de tres dimorfismos del promotor de IL10 con LES y sus manifestaciones clínicas.

**Métodos.** Comparación de las frecuencias haplotípicas y genotípicas de los dimorfismos del promotor de IL10 situados a -1082 (A/G), -812 (C/T) y -597(C/A) en 79 mujeres sanas canarias y 80 pacientes de LES. Tras la amplificación por PCR del fragmento, se realizó una digestión con enzimas de restricción y posterior electroforesis en geles de acrilamida o agarosa.

**Resultados.** Encontramos diferencias significativas en la distribución haplotípica siendo el haplotipo ACC el más representado en sanas y GCC en enfermas. La distribución genotípica era similar en ambos grupos, si bien el genotipo GCC/GCC estaba más representado en enfermas. Respecto a la asociación con características clínicas, destacamos que el haplotipo ATA podría prevenir de la aparición de anticuerpos Anti-RNP y que el genotipo ACC/GCC podría asociarse con el eritema discoide y el GCC/GCC con pericarditis.

**Conclusión.** Los dimorfismos del promotor de la interleucina 10 se asocian con LES en españoles.

**F-0015-20-O. ESTUDIO DEL MICROSATÉLITE DEL GEN DE CD154 EN ARTRITIS REUMATOIDE (AR).** T. Martín-Donaire<sup>1</sup>, I. Losada-Fernández<sup>2</sup>, S. Rosado<sup>1</sup>, I. Rúa-Figueroa<sup>3</sup>, M.I. García-Laorden<sup>4</sup>, A. García-Saavedra<sup>4</sup>, C. Eraisquin<sup>3</sup>, C. Rodríguez-Lozano<sup>3</sup>, C. Rodríguez-Gallego<sup>4</sup>, J.A. Vargas<sup>1</sup>, M.J. Citores<sup>1</sup>, P. Pérez-Aciego<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Medicina Interna I, Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid. <sup>2</sup>Fundación LAIR, Madrid. <sup>3</sup>Reumatología e <sup>4</sup>Inmunología, Hospital de Gran Canaria Doctor Negrín.

**Introducción.** La AR es una enfermedad de herencia compleja, en la que tanto genes HLA como no-HLA contribuyen a la predisposición y curso clínico. Esta enfermedad se caracteriza por una sinovitis que da lugar a la destrucción de las articulaciones. Se ha descrito una hiperexpresión intrínseca de CD154 (CD40 ligando) en células linfocitos de las articulaciones reumáticas. Esta molécula tiene un papel crucial en el mantenimiento de la inflamación articular, a través de la interacción con el CD40 de superficie de los fibroblastos sinoviales. El gen del CD40L presenta un polimorfismo (microsatélite (CA)<sub>n</sub>) en su región 3'UTR, que previamente se ha relacionado con la susceptibilidad a desarrollar AR en pacientes alemanes que no expresan los antígenos HLA-DR asociados a esta enfermedad (DR4 y DR1).

**Objetivos.** Estudio de la asociación del polimorfismo del gen de CD40L con AR en pacientes de las Islas Canarias.

**Metodología.** Se utilizaron muestras de sangre periférica de 187 enfermos de AR y de 150 donantes sanos, ambos grupos procedentes Las Palmas de Gran Canaria. El polimorfismo del gen de CD40L se analizó por amplificación génica del fragmento que contiene el microsatélite y electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. El tipaje HLA se realizó utilizando la técnica de SSO (Sequence Specific Oligonucleotide).

**Resultados.** Encontramos que el alelo de 24 repeticiones CA del polimorfismo del CD40L está menos representado en enfermos de AR que en sanos ( $p = 0.006$ ; OR = 0.606, 95% CI = 0.427-0.860). Esta asociación es independiente del tipaje HLA-DRB1 y DQB1.

**Conclusiones.** El alelo de 24 repeticiones CA del microsatélite de CD40L podría tener un papel protector en la susceptibilidad a desarrollar AR, independientemente de HLA II.

*Financiación: Fundación LAIR.*

## F-0016. Patogenia de la autoinmunidad

**Moderadores:** Jesús Merino Pérez (Santander), Ricardo Pujol Borrell (Badalona)

**F-0016-01-C. CARACTERIZACIÓN DE LA POBLACIÓN DE CÉLULAS T CD4+ CD25+ REGULADORAS (TRCD4 CD25) EN LA ETIOPATOGENIA DE LA RESPUESTA.** F. Rudilla, J.M. Mercader, M. Costa, D. Jaraquemada, M. Martí. Institut de Biotecnologia i Biomedicina, UAB.

En el mantenimiento de la tolerancia periférica intervienen diferentes mecanismos de regulación que incluyen las células T reguladoras CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> (TrCD4CD25). Estas células TrCD4CD25 representan el 4-10 % de los linfocitos T CD4<sup>+</sup> de sangre periférica y se caracterizan por la expresión de niveles altos de CD25. Su función supresora se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* en modelos animales. Su meca-

nismo de acción es desconocido, aunque ejercen la supresión vía contacto célula a célula y son específicas de antígeno. Se ha sugerido que pueden tener su función disminuida o alterada en autoinmunidad. La presencia de TrCD4CD25 en sangre periférica de individuos sanos se ha demostrado recientemente, en cambio hay pocos datos sobre su frecuencia en sangre de enfermos con patología autoinmune. En este estudio hemos comparado el porcentaje de células TrCD4CD25 (CD25<sup>++</sup>) en PBMC de individuos sanos versus enfermos con diabetes mellitus tipo 1 (DM1), enfermedad de Graves (GD) y esclerosis múltiple (MS). El porcentaje absoluto de células T CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> en DM1 y GD es menor (19% para ambos grupos) comparado con los valores observados en los individuos control y en MS (31% y 27%, respectiva-

mente). Estas diferencias no se ven reflejadas en el % de CD25<sup>++</sup> respecto al total de células T CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>: 10% en DM1, 11% en MS y 16% en GD vs un 19% en individuos sanos. Estos datos contrastan con los valores obtenidos con PBMC de diabéticos de tipo II en los que la población CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> es del mismo nivel que los controles (30%). La diferente representatividad de las células CD25<sup>++</sup> en las enfermedades autoinmunes respecto a la muestra control, sugieren una implicación de la población TrCD4CD25 en la etiopatogenia o evolución de la autoinmunidad. Con el objetivo de determinar si existen diferencias en el fenotipo de las poblaciones CD25<sup>+</sup> y CD25<sup>++</sup>, se ha analizado la expresión de diferentes marcadores (CD122, CD95, CD45RO, CD62L, CCR4, CCR5, GITR, CD54, CD62P). La expresión de todos los marcadores se incrementa en la población CD25<sup>++</sup>, siendo CD122, CCR4 y GITR las moléculas más representadas en la fracción CD25<sup>++</sup>. La distribución de estos marcadores en la población CD25<sup>++</sup>, tanto en enfermos como en individuos sanos, no refleja diferencias significativas sugiriendo que la disminución de la frecuencia de TrCD4CD25 sea su contribución en el desarrollo de autoinmunidad.

**F-0016-02-O. ESTUDIO DE LOS LIGANDOS NATURALES DE CLASE II EN TIROIDES AUTOINMUNES.** L. Muixí, I. Alvarez, M. Carrascal, P. Ruperez, J. Abian, D. Jaraquemada. Laboratori d'Immunologia Cel·lular, Universitat Autònoma de Barcelona, Barcelona.

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

**Objetivo.** En este trabajo se han aislado péptidos naturales presentados por moléculas de HLA-DR de 5 muestras de tiroides afectados por la enfermedad de Graves-Basedow.

**Métodos.** Los péptidos presentados por HLA-DR se han aislado mediante cromatografía de afinidad y la caracterización de los mismos se ha realizado con técnicas de espectrometría de masas, por MALDI-TOF i la secuenciación se ha realizado por nanoESI.

**Resultados.** Se ha obtenido un total de 25 secuencias derivadas de 13 proteínas diferentes y por primera vez se ha conseguido secuenciar un péptido de la tiroglobulina, proteína conocida como uno de los principales autoantígenos en las enfermedades autoinmunes de la tiroides.

**F-0016-03-O. EL PAPEL DEL REGULADOR DEL CICLO CELULAR P21 EN INMUNIDAD INNATA Y ADQUIRIDA.** C.F. Arias, A. Ballesteros, J. Martín-Caballero, J. Flores, M. Serrano, C. Martínez-A, D. Balomenos. Departamento de Inmunología y Oncología. Centro Nacional de Biotecnología. Cantoblanco. Madrid.

**Introducción.** p21 es un importante inhibidor de la proliferación celular. Ratones deficientes en p21 (p21<sup>-/-</sup>), presentan signos de lupus eritematoso sistémico (SLE), de manera asociada al sexo.

**Objetivos.** En vista de la autoinmunidad desarrollada en ratones p21<sup>-/-</sup>, nos dispusimos a estudiar: 1) El efecto de p21 en la activación, proliferación y generación de células de memoria en células T CD4<sup>+</sup>. 2) El efecto de p21 en macrófagos/monocitos, a través de modelos de autoinmunidad e inflamación.

**Resultados.** Describimos dos características proliferativas en linfocitos T CD4<sup>+</sup> *in vitro* de ratones p21<sup>-/-</sup>. Proliferan excesivamente en estimulaciones secundarias y sucesivas, y soportan mayor número de estimulaciones sucesivas que un ratón BL6. Células de memoria *ex vivo* de ratones p21<sup>-/-</sup> inyectados con ovoalbúmina y reestimuladas *in vitro*, también proliferan más que las de un BL6. Ratones p21<sup>-/-</sup> de 6 meses tienen predisposición a desarrollar autoinmunidad y, a acumular macrófagos. Para estudiar el efecto de p21 en macrófagos, utilizamos un clásico modelo de inflamación. Dosis subletales de LPS para BL6, fueron letales para p21<sup>-/-</sup>, vía choque séptico. En el suero de estos ratones se ha detectado incremento en los niveles de óxido nítrico y TNF-alpha.

**Métodos.** Se han utilizado células CD4<sup>+</sup> de BL6 y p21<sup>-/-</sup> aisladas por selección negativa con dynabeads. El modelo *in vitro*, consiste en estimular las células T CD4<sup>+</sup> durante 3 días con Con-A y después someterlas durante de 6 días a un periodo de expansión con IL-2; esto, tanto para la estimulación primaria, como para la secundaria y sucesivas. La proliferación *in vitro* se ha estimado mediante la cuantificación de incorporación de timidina- (H3).

**Conclusiones.** p21 interviene en el control de la proliferación tras estimulaciones repetidas de linfocitos T CD4 y también ejerce un papel crítico en el proceso inflamatorio relacionado con macrófagos en el choque séptico. Por tanto, concluimos que p21 es un importante regulador de la respuesta inmunológica innata y adquirida y que juega un relevante papel en autoinmunidad e inflamación.

**F-0016-04-O. LOS LINFOCITOS T KNOCKOUT PARA E2F1 Y E2F2 PRESENTAN UNA RESPUESTA TH1/TH2 ALTERNADA.** A. Zubiaga<sup>1</sup>, A. Infante<sup>1</sup>, I. García-Aranaga<sup>1</sup>, M. Peña<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Dpto. de Genética, Antropología Física y Fisiología Animal, U. del País Vasco. <sup>2</sup>Dpto. de Inmunología, Hosp. Marqués de Valdecilla, Santander.

Los factores de transcripción E2F juegan un papel crítico en la regulación de la tolerancia inmunológica. Los linfocitos *knockout* para E2F1 exhiben una hipoproliferación tras la estimulación del TCR. Por el contrario, las células *knockout* para E2F2, hiperproliferan bajo estimulación del TCR, y los ratones E2F2 *knockout*, desarrollan un síndrome autoinmune, con características de lupus.

Con el fin de estudiar el papel de E2F1 y E2F2 en la función linfocitaria, medimos la producción de citocinas de linfocitos T CD4<sup>+</sup> activados y/o diferenciados hacia Th1 o Th2. Además las respuestas inmunes humorales fueron estudiadas *in vivo* analizando la respuesta T-dependiente de los linfocitos B a la inmunización por el toxoide tetánico.

Los resultados obtenidos muestran que tanto los linfocitos T CD4<sup>+</sup> *knockout* para E2F1 como para E2F2 estimulados con anti-CD3 y anti-CD28 secretan a las 72h moderadamente más IL-4 e IL-5 y 2 o 3 veces más IL-2 que las células salvajes, mientras que los linfocitos E2F1<sup>-/-</sup> secretan aproximadamente la mitad. Este resultado sugiere que esta citokina es una diana crítica en la regulación de la proliferación mediada por E2F1 y E2F2. La expresión de citocinas en las células diferenciadas también está alterada en los ratones mutantes. Así, la producción de IFN-γ se encuentra incrementada de una manera drástica en los linfocitos E2F2<sup>-/-</sup> diferenciados hacia Th1, y modera-

damente en los linfocitos E2F1<sup>-/-</sup> y la respuesta T-dependiente de las células B al toxoide tetánico fue significativamente mayor en los ratones mutantes, particularmente ratones *knockout* para E2F2. Nuestros datos sugieren que la pérdida de E2F1 y E2F2 perturba la diferenciación de hacia Th1 y Th2 de estas células *knockout in vivo*, particularmente en los ratones *knockout* para E2F2, y puede contribuir al desarrollo del síndrome autoinmune.

**F-0016-05-O. EFECTO PROTECTOR DE LA SOBRE-EXPRESIÓN DE UN TRANSGÉN DE BCL-2 EN CÉLULAS T SOBRE EL DESARROLLO DE ARTRITIS AUTOINMUNE INDUCIDA TRAS INMUNIZACIÓN CON COLÁGENO DE TIPO II.** J. González<sup>1</sup>, R. Marquina<sup>1</sup>, E. Tamayo<sup>1</sup>, M. López Hoyos<sup>2</sup>, R. Merino<sup>1</sup>, J. Merino<sup>1</sup>. Departamentos de <sup>1</sup>Biología Molecular, Universidad de Cantabria. <sup>2</sup>S. Inmunología, Hospital Universitario M. Valdecilla, Santander.

Alteraciones en los mecanismos que regulan la eliminación de los linfocitos T y B están implicados en el desarrollo de enfermedades autoinmunes. En el presente estudio hemos estudiado si la inhibición de los fenómenos de apoptosis linfocitaria modula la aparición de autoinmunidad, usando el modelo de la artritis inducida tras inmunización con colágeno de tipo II (CIA). Para ello, disponemos de dos líneas de ratones B6 transgénicos (Tg) que hiperexpresan Bcl-2 humano (hBcl-2) en linfocitos B: B6-hbcl-2-Ig y B6-SV40-Eμ-hbcl-2. En ambas líneas de ratones Tg la expresión de hBcl-2 en todo el linaje B es similar. Sin embargo, en los B6-hbcl-2-Ig también se expresa el transgén en un porcentaje variable de células CD8+ (20-35%) y CD4+ (7-20%). El desarrollo de CIA se analizó tras inmunización de animales F1, obtenidos tras el cruce de las diferentes líneas de ratones B6-hbcl-2 Tg con ratones DBA/1 (cepa susceptible a CIA), con colágeno tipo II emulsionado en CFA. Mientras los animales F1-no Tg y F1-SV40-Eμ-hbcl-2 desarrollaron una artritis muy severa, no se apreciaron lesiones articulares importantes en los animales F1-bcl-2-Ig. La ausencia de CIA severa en estos últimos animales se correlaciona con la sobre-expresión de hbcl-2 en subpoblaciones CD4+ y con la expansión de células T con fenotipo regulador (CD4+CD25+) dentro de estas subpoblaciones. En este sentido, el efecto protector sobre el desarrollo de CIA se observó también en ratones F1 Tg obtenidos del cruce de ratones DBA/1 con una tercera línea de ratones Tg de hBcl-2 (C3H-lck-hbcl-2) que sobre-expresa hBcl-2 exclusivamente en linfocitos T. Por último, la eliminación selectiva de la población CD4+CD25+ en ratones F1-bcl-2-Ig o F1-lck-hbcl-2, induce la aparición de artritis severa. En conclusión, nuestros estudios indican que la sobre-expresión de Bcl-2 en linfocitos T CD4+ incrementa la generación y/o actividad de células reguladoras capaces de inhibir el desarrollo CIA.

**F-0016-06-C. EL TRATAMIENTO CON FK778 SUPRIME LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS EN UN MODELO EXPERIMENTAL IN VIVO DE INTERACCIÓN ALOGÉNICA T-B.** M.Á. Ramos<sup>1</sup>, I. Santiuste<sup>2</sup>, M. Arias<sup>1</sup>, J. Merino<sup>3</sup>, R. Merino<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Nefrología y <sup>2</sup>Unidad de Investigación, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, <sup>3</sup>Departamento de Biología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander.

Múltiples evidencias indican que aloanticuerpos (alo-Ac) dirigidos frente a antígenos del donante juegan un papel patológico impor-

tante en los rechazos agudos o crónicos de aloinjertos. Lesiones mediadas por alo-Ac surgen a pesar del empleo de potentes agentes farmacológicos, y su control precisa una terapia diferente. En el modelo experimental de inducción de tolerancia neonatal a aloantígenos, la inyección de células linfoides semialogénicas H-2<sup>d/b</sup> de ratones (BALB/Cx57BL/6)F<sub>1</sub> en neonatos BALB/c (H-2<sup>d</sup>) origina la inducción de tolerancia específica de los linfocitos T citotóxicos frente a los aloantígenos. Sin embargo, las células T CD4+ alorreactivas del huésped, reconocen aloantígenos H-2<sup>b</sup> expresados en las células B semialogénicas del donante F<sub>1</sub>, activándolas para producir alo-Ac (en este caso auto-Ac).

**Objetivo.** Explorar *in vivo* los efectos del tratamiento con FK778 en la producción de Ac asociada con respuestas alorreactivas. Además, el modelo que utilizamos permite explorar si el tratamiento con FK778 estimula la inducción de tolerancia de las células T CD4+ alorreactivas.

**Métodos.** Se empleó el modelo experimental de inducción de tolerancia neonatal a aloantígenos. El tratamiento administrado fue FK778 20 mg/kg/2 días, por vía ip desde el día 1 de vida. Los niveles séricos de Ac anti-ssDNA, usados como marcador de la interacción semialogénica T/B, fueron analizados mediante ELISA.

**Resultados.** El tratamiento de ratones BALB/c tolerizados neonatalmente con 20 mg/kg de FK778 cada 2 días origina la completa inhibición de la producción de auto-Ac anti-ssDNA a las 3 semanas de vida. Sin embargo, la interrupción del tratamiento en la 3ª semana de vida promueve la producción de los auto-Ac anti-DNA, indicando que este tratamiento no es eficiente para inducir la tolerancia de las células T CD4+.

**Conclusión.** Nuestros resultados muestran claramente que FK778 es un agente inmunosupresor útil para evitar la producción de alo-Ac asociados con alo-reconocimiento.

**F-0016-07-O. CONTRIBUCIÓN DE LAS SUBPOBLACIONES DE CÉLULAS DENDRÍTICAS DE SANGRE PERIFÉRICA EN LA RESPUESTA ALOGÉNICA.** M. Naranjo, M.A. Fernández, R. Pujol-Borrell, F.E. Borrás. Laboratori d' Immunobiologia per la Recerca i Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD). Serveis Sanitaris de Referència – Centre de Transfusions i Banc de Teixits (SSR-CTBT). Dept. Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia. Universitat Autònoma de Barcelona. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol. Carretera de Canyet s/n. 08916 Badalona (Barcelona).

Las células dendríticas (DC) tienen en su gran capacidad de presentación antigénica una de sus principales características. En sangre periférica han sido identificadas dos subpoblaciones mayoritarias de DCs, las MDCs (DC mieloides o DC1) y las PDCs (DC plasmacitoides o DC2). Clásicamente, en experimentos de cultivo mixto linfocitario (CML), se ha observado una mayor capacidad de las MDCs para inducir la proliferación de los linfocitos T alogénicos, mientras que las PDC inducen una reacción aloproliferativa muy disminuida. A fin de estudiar cuál es la contribución de cada subtipo celular en la inducción de la alorespuesta, hemos llevado a cabo experimentos combinando células DC de ambas subpoblaciones en CML y se ha analizado la respuesta inducida en linfocitos T naïve. Los resultados obtenidos muestran que, en los CML inducidos por la presencia de PDCs, la adición de un número mínimo de MDCs es suficiente para aumentar el grado de respuesta aloproliferativa a los niveles de control positivo. También se ha observado que, en estas condiciones de cultivo,

se incrementa la supervivencia de las PDCs, lo que podría explicar en parte el aumento de la capacidad aloestimulatoria. Esta supervivencia es debida, entre otros posibles factores, a la acción de la interleucina 3, presumiblemente secretada por los linfocitos activados. El análisis fenotípico de los linfocitos T respondedores no muestra diferencias estimables entre los diferentes grupos, excepto en el curso de expresión de CD25. Se ha determinado asimismo la capacidad de producción de citocinas mediante RT-PCR en la población total respondedora, observándose un retardo en la aparición temporal del ARN mensajero para IL2 e IFN $\gamma$ . La determinación del fenotipo funcional mediante el análisis de citocinas intracelulares nos permitirá observar si existe una desviación del balance Th1/Th2 en las diferentes condiciones de cultivo estudiadas. El análisis de la interacción entre las diferentes poblaciones de DCs y las repuestas que se generan puede aportar datos de interés para el estudio de la respuesta inmune y su implicación en la vacunación, el trasplante, y la autoinmunidad.

**F-0016-08-C. QUIMIOCINAS, RECEPTORES Y MARCADORES DE RESPUESTA AUTOINMUNE EN LA DIABETES TIPO 1: ANÁLISIS MEDIANTE MICROARRAYS.** R. Planas<sup>1</sup>, A. Alba<sup>1</sup>, J. Carrillo<sup>1</sup>, M.C. Puertas<sup>1</sup>, R. Ampudia<sup>1</sup>, X. Pastor<sup>1</sup>, R. Pujol-Borrell<sup>1</sup>, O. Domínguez<sup>2</sup>, J. Verdaguera<sup>1</sup>, M. Vives-Pi<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Laboratori d'Immunobiologia per a la Recerca i les Aplicacions Diagnòstiques (LIRAD), Centre de Transfusió i Banc de Teixits (CTBT). Hospital Universitari Germans Trias i Pujol, Badalona, Barcelona. <sup>2</sup>Unidad de Genómica, Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas, Madrid.

**Introducción.** Las quimiocinas son relevantes en el reclutamiento y la formación de infiltrados y en la capacidad de activar procesos autoreactivos en enfermedades autoinmunes. La diabetes tipo 1 (DT1) es una enfermedad autoinmune causada por la destrucción de las células  $\beta$  por linfocitos que migran a los islotes pancreáticos. El ratón NOD (*Nonobese diabetic*) es un modelo espontáneo de DT1 y el modelo transgénico NOD RIP-HuIFN $\beta$  -que expresa IFN $\beta$  en las células b- desarrolla la enfermedad más agresivamente.

**Objetivos.** Determinar la expresión de quimiocinas, receptores y genes implicados en la respuesta autoinmune en la DT1 en distintos estadios de progresión.

**Métodos.** Para determinar expresión génica, se han hibridado *microarrays* de cDNA (diseño «a la carta») con cDNA de islotes de ratón NOD de distintas edades (análisis: programa *QuantArray*). Estos resultados se han validado hibridando *arrays* de anticuerpos anti-quimiocinas/citocinas con extractos proteicos pancreáticos de ratones NOD y NOD RIP-HuIFN $\beta$  sanos y diabéticos y cuantificación por densitometría.

**Resultados.** En los islotes del ratón NOD se expresa un panel de quimiocinas (CCL3, CCL12, CCL19, CCL21, CX3CL1, CXCL10...) y receptores (CCR7, CX3CR1...), citocinas pro-inflamatorias (IFN $\gamma$ , IL1, IL6...), moléculas de adhesión (ICAM, E-selectina, L-selectina...), marcadores leucocitarios (CD19, CD3...) e insulares (insulina, GAD...) que correlacionan con los componentes de la insulinitis. La expresión de estos genes, se detecta al inicio de la autoinmunidad y se mantiene en fases avanzadas. La producción de quimiocinas a nivel proteico se confirma en ratones sanos y diabéticos. Se discutirán las variaciones del perfil molecular en distintas fases.

**Conclusiones.** El análisis mediante *microarrays* diseñados para estudiar la autoinmunidad en la DT1 permite detectar moléculas impli-

cadadas en los estadios del ataque autoinmune, entre ellas, quimiocinas y citocinas asociadas a insulinitis.

Financiación: Instituto de Salud Carlos III (PI020107)

**F-0016-09-O. MECANISMO DE PRESERVACIÓN DE LA SUPERVIVENCIA DE CELULAS PLASMÁTICAS PRODUCTORAS DE Ac ANTI-CCP EN LA SINOVIA DE PACIENTES CON ARTRITIS REUMATOIDE.** B. Rodríguez-Bayona<sup>1</sup>, S. García<sup>2</sup>, J.A. Brieve<sup>1</sup>, C. Rodríguez<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología. Hospital U. Puerta del Mar. Cádiz.

Los Ac anti-CCP (anti-péptidos citrulinados) son marcadores diagnósticos de la artritis reumatoide (AR). Su aparición en fases tempranas de la enfermedad, así como la presencia de proteínas citrulinadas en la membrana sinovial, sugieren un papel en los mecanismos etiopatogénicos de la AR.

El objetivo del trabajo fue analizar la sensibilidad de las células plasmáticas productoras de Ac anti-CCP a la apoptosis inducida a través de CD95, un mecanismo de regulación periférica de células plasmáticas.

**Métodos:** Se purificaron células mononucleares de líquido sinovial (LS) y, como control, de sangre periférica (SP) de pacientes con AR y se analizó la producción de Ac anti-CCP IgG y de IgG total en cultivos control y en presencia de Ac estimulantes anti-CD95 (CH11). Sobre las células plasmáticas (CP), identificadas como células CD20-CD19+CD38+, se analizó la expresión de CD95 y la capacidad de desarrollar apoptosis mediante tinción con anexina V-FITC.

**Resultados:** 1. Las células de LS, pero no de SP, producían Ac anti-CCP de forma espontánea en cultivo. La producción era activa, ya que se inhibía con cicloheximida. La producción de Ac anti-CCP tenía una cinética larga de producción (14 d), sugiriendo que las células plasmáticas productoras de Ac anti-CCP eran de larga vida. 2. Las células plasmáticas de LS expresaban CD95 con una elevada intensidad. 3. La adición a los cultivos de Ac estimulantes anti-CD95 (CH11), inhibía drásticamente la producción de Ac anti-CCP por las CP de LS e inducía apoptosis sobre las mismas.

Estos resultados indican que las CP productoras de Ac anti-CCP de LS expresan y tienen funcional el receptor de muerte CD95. La prolongada supervivencia de las CP en LS podría estar en relación con la falta de expresión de CD95L demostrada en el nicho sinovial, y podría constituir un mecanismo de daño tisular por la producción local continuada de Ac anti-CCP.

**F-0016-10-C. ESTUDIO DE SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS Y APOPTOSIS EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO.** B. Sáez-Gutiérrez<sup>1</sup>, M. Royo-Cañas<sup>1</sup>, C. Diestre<sup>1</sup>, J. Velilla<sup>2</sup>, P. Lasiera<sup>1</sup>, L. Larrad<sup>1</sup>, J. Martínez-Lorenzo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospital Clínico Universitario «Lozano Blesa». Zaragoza. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna. Hospital Universitario Miguel Servet. Zaragoza.

**Introducción.** El Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es una enfermedad que cursa con la presencia de anticuerpos (Acs) circulantes que se dirigen y lesionan estructuras del propio organismo. Se desconocen tanto las causas del mismo, como el mecanismo íntimo inmunológico. Se cree que el estudio de la posible implicación de diferentes mecanismos apoptóticos en la regulación de las dife-

rentes subpoblaciones linfocitarias ayudará a comprender mejor esta patología en función del grado y tipo de actividad de la misma. En relación con esto, se ha descrito que la persistencia de células T activadas autoreactivas, podría paliarse en parte exacerbando la actividad del sistema Fas/FasL.

**Objetivos.** Analizar la expresión de diferentes marcadores de membrana por citometría de flujo a partir de sangre entera de pacientes con LES y donantes sanos (estudio de poblaciones linfocitarias). Estudiar diferentes proteínas implicadas en la apoptosis en linfocitos de LES.

**Métodos.** Los métodos empleados en este estudio son: citometría de flujo, test de proliferación celular para estudios de sensibilidad (MTT) y test de ELISA.

**Resultados y conclusiones.** En el estudio realizado se observó un ligero aumento en el porcentaje de células que expresan CD3 con respecto a donantes sanos. El porcentaje de CD19 disminuyó ligeramente. Se observó un aumento de linfocitos CD8+, manteniéndose el porcentaje de linfocitos CD4+. No hubo diferencias significativas en el porcentaje de linfocitos CD69+ y HLA-DR+. En cuanto a la expresión de proteínas relacionadas con la apoptosis se observó un aumento del porcentaje de linfocitos que expresan Fas en membrana y FasL intracelular y una disminución de linfocitos que expresan APO2L intracelulares. Resultados preliminares de estudios de sensibilidad con inductores apoptóticos indicaron que la muerte celular inducida por anticuerpos anti-Fas o PHA era similar en linfocitos de pacientes sanos o con lupus eritematoso. Sin embargo, los linfocitos de pacientes con lupus fueron menos sensibles a la muerte inducida por APO2L recombinante.

*Financiación: FIS*

**F-0016-11-O. IMPLICACION DE LA APOPTOSIS EN LA ARTRITIS REUMATOIDE: ESTUDIO DE APO2L/TRAIL COMO POSIBLE TERAPIA.** M.J. Martínez-Lorenzo<sup>1</sup>, A. Anel<sup>2</sup>, B. Sáez-Gutierrez<sup>1</sup>, M. Royo<sup>1</sup>, C. Diestre<sup>1</sup>, C. Delgado<sup>1</sup>, P. Lasierra<sup>1</sup>, L. Larrad<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza. <sup>2</sup>Dpto. Bioquímica. Facultad Ciencias. Universidad de Zaragoza

**Introducción.** En los últimos años se ha reconocido el papel fundamental que la apoptosis o muerte celular programada tiene en la mayor parte de los procesos biológicos. Los reguladores más importantes de estos procesos son las moléculas de la familia del TNF, Fas ligando (FasL) y APO2 ligando (APO2L/TRAIL) y sus receptores proapoptóticos. Se sabe que fallos en estos sistemas desencadenan enfermedades autoinmunes sistémicas. En este estudio nos ocupamos de la artritis reumatoide (AR), una enfermedad autoinmune caracterizada por la hiperplasia del tejido sinovial.

**Objetivos.** Estudiar la implicación de Fas, FasL, APO2L u otras moléculas citotóxicas en la AICD de linfocitos infiltrados en la artritis reumatoide en comparación con linfocitos aislados de líquidos sinoviales de pacientes con traumatismo.

**Metodología.** La expresión de proteínas en membrana e intracelular se midió por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. La muerte celular se cuantificó mediante análisis de la exposición de fosfatidilserina por tinción con anexina V-PE y/o por medida del potencial mitocondrial con la sonda DiOC6. La actividad citotóxica de diferentes inductores apoptóticos se midió por el método de Mosmann y azul Trypan.

**Resultados.** Los datos obtenidos indican que las células T infiltradas en el sinovio de los pacientes artríticos son menos sensibles a la deleción, por expresar menos Fas y FasL, reguladores fundamentales de este proceso. Se ha observado que las diferentes poblaciones celulares (linfocitos, macrófagos/osteoclastos y sinoviocitos) presentes en el sinovio de pacientes de AR y de los controles de pacientes con traumatismo son similares. El estudio del marcador de activación CD69 indica que los controles de pacientes con traumatismo se encuentran en un estadio de activación intermedio, mientras que los de los pacientes con AR se encuentran en un estadio de activación crónica. En los estudios de viabilidad celular se observó una menor sensibilidad a anti-Fas en las poblaciones infiltradas de pacientes con artritis reumatoide, confirmándose una mayor sensibilidad a APO2L de las células infiltradas en el sinovio de pacientes con AR.

**Conclusiones.** La observación novedosa de que las células presentes en la sinovia de pacientes de AR son sensibles a APO2L/TRAIL podría abrir la puerta a una intervención terapéutica local por inyección de APO2L recombinante.

*Financiación: FUNDACION LAIR Y FIS*

**F-0016-12-C. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LÍNEAS T-HVS OBTENIDAS DE MUCOSA INTESTINAL DE PACIENTES CON ENFERMEDAD INFLAMATORIA INTESTINAL.** N. Aguilera-Montilla<sup>1</sup>, M. Pérez-Blas<sup>1</sup>, A.P. Valeri<sup>1</sup>, M. López-Santalla<sup>1</sup>, C. Rodríguez-Juan<sup>1</sup>, A. Mencía<sup>1</sup>, G. Castellano<sup>2</sup>, M.L. Manzano<sup>2</sup>, B. Cassis<sup>2</sup>, F. Sánchez<sup>2</sup>, J.M. Martín-Villa<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Gastroenterología. Hospital Universitario 12 de Octubre. Madrid.

**Introducción.** Se ha implicado a los linfocitos T infiltrantes de la mucosa en los mecanismos patogénicos de la enfermedad inflamatoria intestinal. Sin embargo, estos linfocitos no han sido ampliamente estudiados debido a la dificultad de aislarlos en cantidades suficientes.

**Objetivo.** Caracterizar fenotípica y funcionalmente líneas de linfocitos T infiltrantes de mucosa intestinal de pacientes con enfermedad inflamatoria intestinal, obtenidos tras transformación con el Herpesvirus saimiri (HVS).

**Materiales y métodos:** Se infectaron con HVS células procedentes de 19 biopsias de pacientes con enfermedad de Cronh (EC), 11 con colitis ulcerosa (CU) y 7 individuos control, obteniéndose finalmente, 1 línea de EC, 4 de CU y 2 control. Caracterización fenotípica mediante citometría de flujo. Caracterización funcional mediante estimulación con diferentes mitógenos

**Resultados.** Se observa un aumento en la expresión de CD86 en las líneas de pacientes con CU al comparar con la población control, ya sea en líneas CD4+ (94% vs 73%) o CD8+ (49% vs 12%) ( $p < 0,05$  en ambos casos). Además, las líneas de pacientes muestran una mayor capacidad de respuesta a varios mitógenos que las líneas control, alcanzándose una diferencia estadísticamente significativa en el caso de PMA+IONOMICINA, IONOMICINA, CD3, CD3+IL2 y CD2+PMA ( $p < 0,05$  en todos los casos).

**Conclusión.** El hecho de que las líneas celulares de los pacientes, cultivados durante varios meses, muestren una capacidad de proliferación mayor que la de los controles nos indica que, *in vivo*, las células de la mucosa están en un estado de sobreactivación, que puede explicar su implicación en el desarrollo de la enfermedad.

**F-0016-13-C. EFECTO ANTIPROLIFERATIVO DE LOS LINFOCITOS T CD4+CD25+ EN CONDICIONES DE CULTIVO MIXTO (MLR) EN HUMANOS.** J. Gómez, R. Alonso, A. Suárez, C. Gutiérrez. *Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Central de Asturias.*

Recientemente los linfocitos T CD4+CD25+ han emergido como células inmuno-reguladoras que actúan a través contactos intercelulares, en contraposición con otras, como las Tr1o Th3, que inhiben mediante de la secreción de citocinas. Su activación pudiera depender en particular de las células dendríticas mieloides y se les atribuye un papel clave en la tolerancia periférica aunque aún no han sido suficientemente estudiados en humanos. En este trabajo nos propusimos comprobar la actividad inhibitoria de las células T CD4+CD25+ sobre la proliferación de los linfocitos T CD4 estimulados alogénicamente con células dendríticas derivadas de monocitos (MDDC). Se realizaron cultivos mixtos con linfocitos T CD4 y MDDC en una proporción estimuladoras/efectoras de 1:5. A estos se les añadieron linfocitos T CD4+CD25+ o T CD4+CD25- en proporciones de 1:5, 1:10 y 1:20 en relación con las células efectoras T CD4. Todas las combinaciones se realizaron en triplicados y la proliferación se evaluó por incorporación de timidina tritiada. Los linfocitos T CD4, T CD4+CD25+ y T CD4+CD25- fueron aislados mediante el método de separación por columnas magnéticas de Miltenyi Biotec. Los monocitos fueron separados por gradiente de percoll, enriquecidos posteriormente por depleción magnética con partículas de Dynal y derivados a células dendríticas con GM-CSF, IL-4 y TNF $\alpha$ . Encontramos que a diferencia de con las células T CD4+CD25-, la adición de linfocitos T CD4+CD25+ provocó una disminución de la proliferación que guardó una relación directa con la cantidad de células añadidas. No se observó inhibición a la proporción de 1:20 donde la proliferación fue comparable al control positivo (T CD4 + MDDC) mientras que la inhibición fue máxima a la proporción de 1:5 donde la proliferación fue similar al control negativo (T CD4). Concluimos las células T CD4+CD25+ exhiben una inhibición cuantitativamente importante sobre la proliferación de los linfocitos T CD4 estimulados con MDDC.

**F-0016-14-C. CAMBIOS INDUCIDOS POR ttAR EN LA EXPRESIÓN Y FUNCIÓN DE VLA-4. ESTUDIO EN UN MODELO DE ENFERMEDAD AUTOINMUNE.** M. Escribese, A. Molina, L. García Bermejo, D. Sancho, J. Lucio, F. Sánchez-Madrid, F. Mampaso, H. Ramón y Cajal, UAH y H. La Princesa UAM, Madrid.

**Introducción.** El AR es un agente inmunoregulatorio y antiinflamatorio. Estudios *in vitro* han mostrado su capacidad de modificar la expresión de moléculas de adhesión. Una característica de la enfermedad autoinmune inducida por HgCl<sub>2</sub> en ratas Brown Norway, es el desarrollo de una nefritis intersticial, siendo VLA-4/VCAM-1 la vía responsable de la extravasación leucocitaria. (JASN 9:1881-91, 1998).

**Objetivos.** Estudiar *in vivo* el efecto del ttAR sobre la expresión y función de VLA-4 en la adhesión y extravasación leucocitaria al intersticio renal en este modelo.

**Métodos.** Grupos experimentales: Grupo I) ratas tratadas con vehículo; Grupo II) ratas tratadas con HgCl<sub>2</sub>; Grupo III) ratas tratadas con ttAR (15 mg/kg) y Grupo IV) ratas tratadas con HgCl<sub>2</sub> y ttAR, simultáneamente. Los animales se sacrificaron a los 13 días de iniciado el tratamiento. Se cuantificó y caracterizó el componente inflamatorio intersticial (células CD3+ y ED1+) por IHQ, los niveles de IL-

1b y TNF $\alpha$  mediante RT-PCR y la expresión de VLA-4 en leucocitos circulantes por FACS.

**Resultados.** Las ratas del grupo IV muestran una reducción de la expresión de TNF $\alpha$  e IL-1 b respecto al grupo II (0.07 $\pm$ 0.015 y 0.15 $\pm$ 0.03 y 0.59 $\pm$ 0.03 y 0.14 $\pm$ 0.05), respectivamente. La expresión de VLA-4 aumenta en el grupo II (30.9 $\pm$ 3.12) respecto a los controles (14.37 $\pm$ 1.38), y en el grupo IV desaparece. En los animales del grupo IV el infiltrado inflamatorio intersticial disminuye significativamente (CD3+:7.40 $\pm$ 0.97 y ED-1+:5.75 $\pm$ 0.75) en relación con el grupo II (CD3+:32 $\pm$ 2.08 y ED-1+:25.51 $\pm$ 1.66)

**Conclusiones.** El tt-AR bloquea la extravasación de leucocitos al intersticio renal vía VLA-4/VCAM-1 inhibiendo la expresión de VLA-4 y previniendo el desarrollo de la respuesta inflamatoria.

**F-0016-15-O. ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS COESTIMULADORAS EN LINFOCITOS T DE LAMINA PROPIA INTESTINAL DE PACIENTES CELÍACOS.** P. Romero, A. García de Vinuesa, C. Ortega, A. Palma, C. Román, M. Santamaría. *Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Serv. de Inmunología H. U. Reina Sofía Facultad de Medicina. Universidad de Córdoba.*

Los linfocitos T diferencian antígenos extraños de autoantígenos respondiendo positiva o negativamente tras el reconocimiento del complejo péptido antigénico-MHC. Sin embargo, el que un linfocito T responda positiva o negativamente tras su encuentro con el antígeno depende entre otros factores de la señal coestimuladora, que puede amplificar la señal TCR, conduciendo a la activación y al desarrollo de la función efectora, o bien inhibir dicha activación conduciendo al LT a un estado de no función o anergia o incluso a la muerte celular por apoptosis.

En los últimos años, son numerosos los estudios, en los que se postula que la pérdida de la tolerancia periférica a autoantígenos y en consecuencia el desarrollo de patología autoinmune, podría estar relacionado con la expresión alterada de moléculas coestimuladoras en los LT y APCs de los tejidos dañados. Aunque las primeras moléculas coestimuladoras descritas fueron los receptores CD28, CTLA-4 y sus ligandos CD80 y CD86, en los últimos años se ha descrito una pléyade de moléculas con capacidad para regular positiva o negativamente funciones derivadas de la señalización TCR. Entre ellas, se incluye un conjunto de receptores de membrana conocida como familia de receptores CD94 y NKG2, que tras unirse de forma específica a moléculas de MHC clase I no clásicas, regulan funciones derivadas de la activación de las células T, como la secreción de citoquinas o la respuesta citotóxica.

Recientemente, se ha demostrado que los LT CD8+ del epitelio intestinal de pacientes celíacos expresan receptores CD94, siendo esta expresión es up-regulada en fases activas de la enfermedad, y que la expresión de NKG2D en IELs T CD8+ es inducida por IL-15, una citoquina muy abundante en el epitelio intestinal. Sin embargo, y a pesar del importante papel que los T de lámina propia ejercen en la patogenia de la Enfermedad Celíaca, hasta el momento no se ha determinado la expresión de estas moléculas en dicho compartimento celular, por ello en este trabajo hemos estudiado la expresión de los receptores CD94/NKG2 así como de moléculas coestimuladoras clásicas (CD28, CTLA-4, CD80, CD86, CD40L) en LT lámina propia obtenidos a partir de biopsias intestinales de 15 pacientes celíacos y 12 controles.



**F-0016-16-C. MEMBRANE RAFTS LOCALIZATION OF CD38 IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM PATIENTS WITH SYSTEMIC LUPUS ERYTHEMATOSUS.** E.J. Pavón-Castillero<sup>1</sup>, P. Muñoz-Fernández<sup>1</sup>, M.C. Navarro-Raya<sup>1</sup>, E. Raya-Alvarez<sup>2</sup>, F. Navarro-Pelayo<sup>2</sup>, J.L. Callejas-Rubio<sup>2</sup>, N. Ortego-Centeno<sup>2</sup>, J. Sancho-López<sup>1</sup>, M. Zubiaur-Marcos<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina «López-Neyra». CSIC. Granada. <sup>2</sup>Hospital Universitario San Cecilio. Granada.

**Objective.** To determine whether there is a relationship between levels of CD38, T cell activation and disease activity in systemic lupus erythematosus (SLE), CD38 surface expression and composition of lipid rafts in T lymphocytes were examined in SLE patients with active or inactive disease.

**Methods.** Forty patients with SLE compared with nineteen healthy controls were investigated. SLEDAI scores were calculated. Isolated peripheral blood lymphocytes and purified T cells were double stained in various combinations for the lymphocyte subset markers CD3 and CD19, and the activation markers CD38, and CD69. Expression was measured by flow cytometry. Lipid raft and nonraft

fractions from peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and from purified T cells were isolated by ultracentrifugation. Proteins in the lipid raft and nonraft fractions were analyzed by Western blotting, and probed for ZAP-70, Lck, CD38, LAT, CD3-z, and CD3-e.

**Results.** Percentages of CD3+ T cells expressing CD38 were significantly increased in SLE patients with active disease (SLEDAI>0) as compared with those in controls (P=0.0039). SLE patients with inactive disease (SLEDAI=0) also showed an increase in the percentage of CD38+CD3+ cells, although the mean value was not statistically significant as compared with that in healthy controls. A significant proportion of CD38 was found to be associated with lipid rafts in SLE patients as compared with healthy controls, which is indicative of T cell activation. To identify the likely causes of increased CD38, we explored the possibility that chronic activation of normal T cells underlies CD38 translocation into rafts. The results revealed that PHA+IL-2 stimulation of either PBMC, or purified healthy control T cells resulted in increased CD38 translocation into lipid raft microdomains.

**Conclusion.** CD38 expression is augmented in CD3+ T cells from patients with SLE, which correlates with its increased translocation into lipid rafts and disease activity. These changes appear to be associated with *in vivo* chronic T cell activation shown in SLE patients.

## F-00161. Diagnóstico serológico en autoinmunidad

**Moderadores:** Marcos López Hoyos (Santander), José Luis Rodríguez Sánchez (Barcelona)

**F-0017-01-C. EVOLUCIÓN DE LOS MARCADORES SEROLÓGICOS EN EL SEGUIMIENTO DE LA ENFERMEDAD CELÍACA.** A. Prada<sup>1</sup>, A. Ayesta<sup>1</sup>, M. Riñón<sup>1</sup>, N. Maruri<sup>2</sup>, J.C. Vitoria<sup>2</sup>, A. Arrieta<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Inmunología. <sup>2</sup>Sección Gastroenterología Pediátrica Hospital Cruces Baracaldo, Vizcaya.

El objeto de este trabajo es estudiar la evolución de los marcadores serológicos en la enfermedad Celíaca y valorar su utilidad clínica en el seguimiento de la enfermedad.

**Materiales y Métodos.** Se estudian los anticuerpos anti-Transglutaminasa IgA, anti-Gliadina IgA y anti-Endomisio IgA en 85 pacientes diagnosticados de enfermedad Celíaca. Se toman muestras al diagnóstico, y, tras iniciar una dieta sin gluten, a los 15 días y a los 3,6,12,18 y 24 meses de seguimiento clínico. Los anticuerpos anti-Transglutaminasa y anti-Gliadina se valoraron mediante la técnica ELISA, mientras que los anti-Endomisio se detectaron por inmunofluorescencia indirecta.

**Resultados.** El 88% de los pacientes negativizó los anticuerpos anti-Gliadina a los dos meses del seguimiento de la dieta sin gluten. El 83% de los pacientes negativizó los anticuerpos anti-Transglutaminasa a los 12 meses. El 88% de los pacientes negativizó sus anticuerpos anti-Endomisio a los 24 meses de seguimiento.

**Conclusiones.** Los anticuerpos anti-Transglutaminasa y anti-Gliadina son buenos marcadores para la monitorización de la enfermedad Celíaca. Ambos marcadores permiten detectar las transgresiones de la dieta y muestran idéntica efectividad en los tests de provocación dietética. Proponemos la utilización de la anti-Transglutaminasa IgA en el seguimiento de la enfermedad Celíaca, por su mayor sensibilidad y especificidad, salvo en los pacientes meno-

res de 2 años en los que los utilizamos junto a los anticuerpos anti-Gliadina IgA.

**F-0017-02-C. EVALUACIÓN CLÍNICA DE DOS MÉTODOS AUTOMATIZADOS DE ENZIMOINMUNOANÁLISIS PARA LA DETERMINACIÓN DE ESPECIFICIDAD DE ANCA.** B. García Berrocal, C. Gonzalez, T. Talavan, M. Fernández-Tagarro, J.A. Navajo. Hospital Universitario de Salamanca.

La determinación de anticuerpos contra el citoplasma de los neutrófilos (ANCA) y en especial los dirigidos contra la proteinasa3 (PR3) y la mieloperoxidasa (MPO) es fundamental para el diagnóstico de las vasculitis de pequeño vaso y en particular de la Granulomatosis de Wegener (GW), el Síndrome de Churg-Strauss (SCT), la Poliangeitis Microscópica (PAM) y su forma limitada lineal.

**Objetivo.** Evaluación clínica de dos métodos de detección de ANCA, un Enzimoinmunoanálisis (EIA) automatizado con detección colorimétrica (Wieslab, Lund Sweeden) y un EIA automatizado con detección fluorimétrica (EIA Farmacia DCS, Germany) de reciente comercialización. Seleccionamos 92 muestras de suero recibidas para el análisis de ANCA: 4 muestras correspondían a pacientes con vasculitis asociadas a ANCA (1 GW, 1 SCT, 2 PAM), el resto correspondían a 5 pacientes con otras vasculitis, 17 con insuficiencia renal, 9 con enfermedades autoinmunes sistémicas, 3 con enfermedad inflamatoria intestinal y 54 con otras patologías no autoinmunes. Resultados: la comparación de métodos señala un grado de acuerdo elevado (k=0.631; p< 0.0001). Se observó discrepancia en 6/92 pacientes analizados. En la tabla se presentan el número de verdaderos positivos (VP), falsos positivos (FP), verdaderos negativos

(VN), falsos negativos (FN), sensibilidad (S), especificidad (E), cocientes de probabilidad (CP) e índice kappa de los EIA e inmunofluorescencia (IFI). En 3/7 falsos positivos hubo acuerdo entre los tres métodos utilizados.

	VP	FP	VN	FN	S%	E%	CP+	CP-	Kappa
Wieslab	4	5	83	0	100	94	16.7	0	0.59
EIA	4	6	82	0	100	93	14.7	0	0.54
IFI	4	7	80	0	100	92	12.4	0	0.50

**Conclusión.** Ambos métodos estudiados presentan resultados semejantes y es elevada su utilización clínica en la detección de las vasculitis de pequeño vaso.

**F-0017-03-C. ANTICUERPOS ANTITIROIDEOS POR CITOMETRIA DE FLUJO.** T. Talaván, M.L. Casas, C. González, S. Ocaña, B. García Berrocal, F. Cava, J.M. González Buítrago. Servicios de Análisis Clínicos. Hospital Universitario de Salamanca. Fundación Hospital Alcorcón.

**Introducción.** La medida de anticuerpos contra la peroxidasa tiroidea (anti-TPO) y tiroglobulina (anti-Tg) juega un importante papel en el diagnóstico de la enfermedad tiroidea autoinmune. Recientemente, se ha introducido en el mercado un sistema de citometría de flujo que permite la detección simultánea de los dos anticuerpos.

**Objetivos.** En esta comunicación presentamos un estudio de evaluación realizado en dos centros (Hospital Universitario de Salamanca y Hospital Fundación Alcorcón) en el que se compara el método de citometría de flujo con los métodos habituales en los laboratorios.

**Métodos.** Se ha utilizado suero de 175 pacientes: 63 procedían de pacientes con Tiroidopatía Autoinmune, 20 con distintas variedades de Bocio y 92 con patologías no tiroideas. El método habitual en ambos laboratorios es un ensayo inmunoenzimático con detección fluorimétrica (Elia, Pharmacia Diagnostics, Alemania). El método de citometría de flujo lo comercializa BMD (FIDIS, Biomedical Diagnostics, Francia).

**Resultados.** La correlación entre ambos métodos es elevada: anti-Tg, r=0.801, p<0.000; anti-TPO r=0.657, p<0.000. Se ha realizado un análisis de curva ROC con los siguientes resultados:

	antiTg-Pharmacia	antiTPO-Pharmacia	antiTg-BMD	antiTPO-BMD
Area ROC	0.812	0.867	0.776	0.805
Cut off óptimo	174	63	33	99
Sensibilidad %	80	80	67	76
Especificidad %	81	89	86	86
CP+	5.18	7.27	4.73	5.4
CP-	0.25	0.22	0.22	0.11

CP: cociente de Probabilidades

**Conclusiones.** Los resultados indican una eficacia diagnóstica elevada de todos los anticuerpos. Los anti-TPO de Pharmacia son los que confieren una mayor probabilidad de padecer una patología autoinmune, mientras que la ausencia de antiTPO de BMD confiere la mayor probabilidad de no padecer una patología autoinmune.

**F-0017-04-O. CO-EXPRESIÓN DE ANTICUERPOS ANTI CARDIOLIPINA Y ANTICUERPOS ANTI BETA-2-GLICOPROTEINA I: UNA ASOCIACIÓN INVERTIDA.** C. Román, C. Ortega, P. Romero, A. García de Vinuesa, A. Palma, M. Santamaría. Departamento de Inmunología Hospital Reina Sofía. Córdoba.

El mecanismo de desarrollo del síndrome antifosfolípido no está bien establecido todavía. Se acepta que la beta-2-glicoproteína 1 plasmática es el principal antígeno diana para los anticuerpos antifosfolípido, y que juega un papel importante en la patogenia de la enfermedad.

El objetivo de nuestro estudio ha sido determinar los anticuerpos anti-beta-2-glicoproteína (anti-β2-GP1) en sueros de pacientes que contienen anticuerpos anticardiolipina (ACA). Se han testado 80 sueros con ACA positivo y 40 sueros con ACA negativo. Se han determinado ACA tipo IgM e IgG y anti-β2-GP1 tipo IgM e IgG mediante una técnica de ELISA (Varelisa Cardiolipin IgM/IgG Antibodies, Varelisa β2- Glycoprotein 1 IgM/ IgG Antibodies. Pharmacia Diagnostics). Se han obtenido resultados estadísticamente significativos al comparar los anticuerpos tipo IgM de ACA y anti-β2-GP1; y al comparar anticuerpos tipo IgG de ACA y anti-β2-GP1. Analizando los resultados de ACA tipo IgM y tipo IgG por separado encontramos que el 98% de ACA IgM negativo es β2 IgM negativo; un 85% de ACA IgM positivo es β2 IgM negativo; el 100% de ACA IgG negativo es β2 IgG negativo; el 61% de ACA IgG positivo es β2 IgG negativo. Si analizamos los resultados de anti-β2-GP1 tipo IgM y tipo IgG por separado hemos visto que el 60% de β2 IgM negativo es ACA IgM negativo; el 83% de β2 IgM positivo es ACA IgM positivo; el 100% de β2 IgG positivo es ACA IgG positivo. El 100% de los sueros con ACA tanto IgM como IgG negativos tienen anti-β2-GP1 IgM e IgG negativos. La presencia de ACA no implica la presencia de anti-β2-GP1, pero la existencia de anti-β2-GP1 se acompaña de ACA. Por otra parte se ha observado la ausencia de Ac anti-β2-GP1 en sueros que contienen elevados (> 300 U/ml) niveles de anticuerpos anti DNA ds. La significación biológica, la asociaciones clínicas y la especificidad diagnóstica se discutirán.

**F-0017-05-C. EVALUACIÓN DE LA TÉCNICA ELIA EN LA DETERMINACIÓN DE ANCA.** R. Rodríguez<sup>1</sup>, O. Viñas<sup>1</sup>, E. Mirapeix<sup>2</sup>. Servicio <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Nefrología. Hospital Clinic y Provincial de Barcelona.

**Introducción.** Con la descripción de los ANCA (Anticuerpos anticitoplasma de neutrófilo) y su fuerte asociación a casos de vasculitis activa, se comenzó a elaborar la hipótesis en la que los ANCA están directamente involucrados en la patogénesis de la inflamación y el daño vascular.

**Objetivo.** Evaluar el método ELIA para la determinación de anticuerpos, anti-PR3 y anti- MPO, en comparación con el método de referencia (ELISA) de nuestro laboratorio.

**Pacientes.** 213 muestras de 157 pacientes: 70 vasculitis, 10 Goodpasture (GBM), 37 enfer. inflamatorias y 40 controles sanos de Banco de Sangre. Se eligió una muestra por paciente en el momento del diagnóstico. En 10 pacientes se realizó el seguimiento con un total de 58 muestras estudiadas.

**Método.** Determinar ANCAS por Inmunofluorescencia indirecta IFI ( método estandarizado por nuestro laboratorio y descrito por Allan Wiik), ELIA. (Detección de anticuerpos anti-MPO y anti-PR3 utilizando el UNI CAP (Pharmacia) y ELISA método estandarizado (Wielisa WIESLAB).

**Resultados:**

CORRESPONDENCIAS ELIA/ELISA					
ELIA					
+	+/-	-	+	+/-	-
54	1	5	38	2	2
4	0	3	2	1	3
0	1	145	2	3	160

	SENSIB./ESPECIF. Y VALORES PREDICTIVOS		MPO		PR3	
	ELIA	ELISA	ELIA	ELISA	ELIA	ELISA
Sensibilidad	58.6	62.9	42.9	38.6		
Especificidad	97.7	100	100	98.9		
VPP	100	95.7	100	96.4		
VPN	75	76.6	68.5	68.3		

**Conclusiones.** Se observa una buena correspondencia ELIA/ELISA para la determinación de anticuerpos anti-MPO (95.8 %) y anti PR3 (95.3 %). No hay diferencias significativas en el grado de sensibilidad ( ELISA > MPO y ELIA > PR3) ni en la especificidad (ELIA/ELISA 100/98.9 para la MPO y 97.7/100 para la PR3).

**F-0017-06-O. DISCORDANCIA ENTRE ANTICUERPOS ANTI-BETA-2-GLICOPROTEINA-I Y ANTICARDIOLIPINA EN PACIENTES CON CRITERIOS CLINICOS DE SAF.** D. Micheloud, S. Sánchez-Ramón, J. Carbone, JJ Rodríguez-Molina, E. Fernández-Cruz, M. Rodríguez-Mahou. Servicio de Inmunología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

**Introducción.** El síndrome antifosfolípido (SAF) se define como la asociación de anticuerpos antifosfolípidos a títulos moderados o altos o anticoagulante lúpico en dos o más ocasiones separadas al menos por 6 semanas y de criterios clínicos –trombosis y complicaciones gestacionales-.

**Objetivos.** Determinar el significado clínico de la presencia de anticuerpos anti-beta-2-glicoproteína I positivos (anti-B<sub>2</sub>GP-I) con anticardiolipina (ACA) negativos, o viceversa.

**Métodos.** Se analizaron 1.170 muestras de suero de pacientes con sospecha de SAF para determinar la presencia de anticuerpos anti-B<sub>2</sub>GP-I IgG e IgM y ACA IgG e IgM mediante ELISA (Orgentec Diagnostika, Alemania), entre julio de 2002 y julio de 2003. Se estudiaron retrospectivamente las historias clínicas de los pacientes con resultados discordantes.

**Resultados.** En 56 muestras de suero los resultados fueron discordantes, 41 (73,2%) con ACA positivos y anti-B<sub>2</sub>GP-I negativos y 15 (26,8%) de los 56 pacientes con anti-B<sub>2</sub>GP-I positivos y ACA negativos. El 90,2% presentó títulos bajos de anticuerpos antifosfolípidos, siendo en el resto de casos el título moderado. Globalmente, el 74,6% de los pacientes presentaba criterios clínicos de SAF. Mediante análisis de regresión logística ajustado por edad, sexo y factores de riesgo trombótico, los pacientes con anti-B<sub>2</sub>GP-I presentaron 3,8 veces más riesgo de presentar SAF que los pacientes con ACA positivos (p=0,04).

**Conclusiones.** Los pacientes con clínica sugestiva de SAF y títulos bajos de anticuerpos anti-B<sub>2</sub>GP-I deberían ser considerados como un subgrupo de SAF, lo que implicaría medidas profilácticas o/y terapéuticas a considerar en cada paciente.

**F-0017-07-C. ANTICUERPOS ANTICENTRÓMERO EN LAS ENFERMEDADES INFLAMATORIAS SISTÉMICAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO (EITC).** J.L. Ruiz-Tíscar<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Mahou<sup>1</sup>, S. Sánchez-Ramón<sup>1</sup>, B. Santamaría<sup>1</sup>, R. Urrea<sup>1</sup>, E. Sarmiento<sup>1</sup>, M. Escalona<sup>2</sup>, A. Estecha<sup>2</sup>, F.J. López-Longo<sup>2</sup>, E. Fernández-Cruz<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología Clínica y <sup>2</sup>Reumatología del H.G.U. Gregorio Marañón de Madrid.

**Introducción.** Los anticuerpos anticentrómero (AAC) son característicos de la esclerosis sistémica cutánea limitada (ESCL) o síndrome CREST, pero pueden detectarse en otras EITC.

**Objetivo.** Determinar la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo (vp) de los AAC para el diagnóstico de esclerodermia en una consulta especializada (Reumatología e Inmunología Clínica).

**Materiales y Métodos.** Hemos estudiado 1365 pacientes con EITC diagnosticados de esclerosis sistémica cutánea difusa (ESCD) 42, ESCL 39, esclerosis cutánea localizada/morfea 11, artritis reumatoide (AR) 965, lupus eritematoso sistémico (LES) 336, polimiositis (PM) 100, enfermedad mixta del tejido conjuntivo (EMTC) 60 y síndrome de Sjögren primario (SSP) 294. Los AAC se han identificado mediante inmunofluorescencia indirecta sobre células Hep-2 (INOVA Diagnostics)

**Resultados.** Se detectaron AAC en 37/1365 pacientes (2,7%). De ellos solamente 19/37 (51,3%) presentan esclerodermia (especificidad 95,3% y vpositivo 51,3%): 2 (5,4%) ESCD (especificidad 97,3% y vpositivo 5,4%) y 17 (43,6%) ESCL (especificidad 98,5% y vpositivo 45,4%). En total, se detectan AAC en 19/81 pacientes con esclerodermia (23,4%), en 2/42 con ESCD (4,7%) y en 17/39 con ESCL (43,5%). Los otros 18 pacientes con AAC presentan AR (8/37; 21,6%), LES (6/37; 16,2%), EMTC (3/37; 8,1%) y PM (1/37; 2,7%)

**Conclusiones.** Los AAC son muy específicos de esclerodermia (95,3%), en particular de la ESCL (98,5%), pero el vpositivo (51,3%) es bajo. Sólo se detectan en un 23% de los pacientes con ESCL, pudiendo aparecer en otras EITC en un porcentaje menor.

**F-0017-08-O. ANTICUERPOS ANTI-PÉPTIDO CÍCLICO CITRULINADO (PCC) Y ANTI-SA EN EL DIAGNÓSTICO DE ARTRITIS REUMATOIDE EN UNA CONSULTA DE ENFERMEDADES INFLAMATORIAS SISTÉMICAS DEL TEJIDO CONJUNTIVO (EITC).** J.L. Ruiz-Tíscar<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Mahou<sup>1</sup>, S. Sánchez-Ramón<sup>1</sup>, B. Santamaría<sup>1</sup>, R. Urrea<sup>1</sup>, E. Sarmiento<sup>1</sup>, M. Escalona<sup>2</sup>, A. Estecha<sup>2</sup>, F.J. López-Longo<sup>2</sup>, E. Fernández-Cruz<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología Clínica y <sup>2</sup>Reumatología del H.G.U. Gregorio Marañón de Madrid.

**Introducción.** Diversos estudios han demostrado la utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-PCC y anti-Sa en la artritis reumatoide (AR), presentando ambos una especificidad mayor del 90%.

**Objetivos.** Determinar la sensibilidad, la especificidad y el valor predictivo (vp) de los anti-PCC y anti-Sa en una consulta monográfica de AR y EITC.

**Métodos.** Selección aleatoria de sueros de 250 pacientes: 87 AR (34,8%), 90 EITC (56%), 50 espondiloartritis (20%), 19 polimialgia reumática (PMR: 7,6%) y 4 artritis idiopática juvenil (AIJ). Los anticuerpos anti-PCC se testaron mediante técnica de ELISA usando PCC sintético (Euro-Diagnostica Immunoscán). Los anticuerpos anti-Sa se testaron mediante inmunoblotting (Antígeno purificado a partir de placenta humana).

**Resultados.** Se detectan anticuerpos anti-PCC en 63/87 AR (sensibilidad 72,4%, especificidad 94,4%, vpositivo 87,5% y vnegativo 81,9%); 3 PMR, 2 reumatismo palindrómico (RP), 1 lupus eritematoso sistémico, 1 conectivopatía indiferenciada (CI), 1 espondilitis anquilosante (EA) y 1 espondiloartritis indiferenciada. Se detectan anticuerpos anti-Sa en 38/87 AR (sensibilidad 43,6%, especificidad 96,3%, vpositivo 86,3% y vnegativo 76,2%); 2 CI, 1 sd Sjögren, 1 RP, 1 EA y 1 AIJ.

**Conclusiones.** La especificidad y los vp de los anticuerpos anti-PCC y anti-Sa en el diagnóstico de la AR son similares con ambos métodos. El método de ELISA es más sensible en la detección de anticuerpos anti-PCC que la técnica de inmunoblotting.

Financiado por FIS (PI021026 y PI021079), Red G03/152 y beca FER/Abbot

**F-0017-09-C. ANTICUERPOS ANTI- $\alpha$ FODRINA DE CLASE IGG EN PACIENTES CON SÍNDROME DE SJÖGREN (SS).** J.L. Ruiz-Tíscar<sup>1</sup>, M. Rodríguez-Mahou<sup>1</sup>, S. Sánchez-Ramón<sup>1</sup>, B. Santamaría<sup>1</sup>, R. Urrea<sup>1</sup>, E. Sarmiento<sup>1</sup>, M. Escalona<sup>2</sup>, A. Estecha<sup>2</sup>, F.J. López-Longo<sup>2</sup>, E. Fernández-Cruz<sup>2</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología Clínica y <sup>2</sup>Reumatología del H.G.U. Gregorio Marañón de Madrid.

**Introducción.** La  $\alpha$ fodrina se encuentra en la membrana plasmática de la mayoría de las células de los mamíferos. Al romperse durante la apoptosis por la acción de la caspasa 3, aparece un fragmento de 120 kD que actúa como neoantígeno, siendo reconocido por sueros de pacientes con SS. El 52% de los pacientes con SS (criterios europeos Vitali 1993) presentan IgG anti- $\alpha$ fodrina.

**Objetivos.** Estudiar la frecuencia y las asociaciones clínicas de los anticuerpos IgG anti- $\alpha$ fodrina en pacientes con SS de nuestro entorno.

**Materiales y Métodos.** Se seleccionaron aleatoriamente sueros de 128 pacientes con SS, 69 SSprimario y 59 SSsecundario: 36 artritis reumatoide (AR), 16 lupus eritematoso sistémico (LES), 4 enfermedad mixta tejido conjuntivo (EMTC) y 3 polimiositis. Los anticuerpos anti- $\alpha$ fodrina IgG se testaron mediante ELISA comercial que utiliza  $\alpha$ fodrina recombinante humana (AESKULISA).

**Resultados.** Se detectan anticuerpos anti- $\alpha$ fodrina en 7/128 SS (5,4%): 2/69 SSprimario (2,8%) y 5/59 SSsecundario (8,4%): 2/36 AR (5,5%), 2/16 LES (12,5%) y 1/4 EMTC (25%). No encontramos diferencias al comparar los pacientes con/sin anticuerpos anti- $\alpha$ fodrina IgG en los datos epidemiológicos (sexo/edad debut/edad actual), ni en el tiempo de evolución, ni en las manifestaciones clínicas (articular/renal/cutánea/digestiva/neurológica/cardiológico/psiquiátrica/amiloidosis).

**Conclusiones.** En nuestro entorno los anticuerpos anti- $\alpha$ fodrina IgG son muy poco frecuentes en los pacientes con SS (5,4% vs. 52%), y no parecen presentar una asociación clínica particular, aunque convendría testar un mayor número de pacientes con dichos anticuerpos para comprobar este supuesto.

**F-0017-10-C. LA PROTEINA OLIGOMERICA DE LA MATRIZ DEL CARTILAGO COMO MARCADOR SERICO EN LA ARTRITIS REUMATOIDE.** S. López-Saiz<sup>1</sup>, P. Muñoz<sup>2</sup>, C. Barbadillo<sup>2</sup>, A. Plaza<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología del Hospital Puerta de Hierro. Madrid.

La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad autoinmune sistémica de etiología desconocida que afecta a un 2% de la población. El marcador sérico más utilizado para el diagnóstico de AR es el fac-

tor reumatoide (FR). Debido a su baja especificidad, en los últimos años se han estudiado otros posibles marcadores como RA-33, anticuerpos antifilagrina, anti-Sa y más recientemente la determinación de anticuerpos anti-péptidos citrulinados, que son muy específicos. Otro posible marcador, en este caso del grado de lesión articular, con posible aplicación en el diagnóstico precoz sería el estudio de la proteína oligomérica de la matriz del cartílago (COMP), cuyos fragmentos aparecen en el suero de pacientes con artrosis, osteoartritis y artritis reumatoide.

Los objetivos de nuestro estudio son establecer las correlaciones existentes entre el diagnóstico de AR con niveles positivos de FR, CCP y COMP; entre el grado de erosión articular y el valor positivo de CCP y COMP y entre el diagnóstico de artrosis con el valor positivo de COMP. Al mismo tiempo, se pretende ver si los niveles séricos de COMP pueden ser un indicador complementario más sensible, aunque menos específico, que los CCP para el diagnóstico precoz de AR.

Para ello seleccionamos 84 pacientes divididos en tres grupos: 29 con AR, 13 con artrosis y 42 con otras patologías (enfermedades articulares, autoinmunes y otras).

Del grupo de pacientes con AR, el 55% tenían valores positivos de FR y CCP, el 48% de CCP y COMP y el 45% de FR, CCP y COMP. En este grupo, la sensibilidad del COMP era superior a la de CCP (86% frente a 57%). Dentro de este grupo, en los pacientes en que existía un grado de erosión articular, el 62% y 85% tenían valores positivos de CCP y COMP respectivamente. La presencia positiva simultánea de ambos marcadores ocurría en el 46% de los enfermos.

Del grupo de pacientes con artrosis, el 100% tenía valores positivos para COMP.

En el tercer grupo de pacientes, hay algunos con enfermedades relacionadas con la AR y poco tiempo de evolución en los que el valor de CCP y COMP es positivo. Un seguimiento de estos pacientes para confirmar la aparición de AR refrendaría la utilidad de COMP como marcador para el diagnóstico precoz de AR.

**F-0017-11-C. EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE CD62L EN LINFOCITOS T CD4+ Y CD8+ DE SANGRE PERIFÉRICA DE PACIENTES AFECTADOS DE SÍNDROME DE SJÖGREN (SS) PRIMARIO (SSp) Y SECUNDARIO (SSs).** E. Perucha<sup>1</sup>, P. Prieto<sup>1</sup>, C. López<sup>1</sup>, A.B. Mallo<sup>1</sup>, E. Reyes<sup>1</sup>, A. Rodríguez<sup>2</sup>, A. Zea<sup>3</sup>, M. Álvarez de Mon<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Unidad Asociada al Centro Nacional de Biotecnología (CNB-CSIC), Dpto. Medicina, Universidad de Alcalá (Alcalá de Henares). <sup>2</sup>Servicio de Enfermedades del Sistema Inmune y Oncología, Hospital Universitario Príncipe de Asturias (Alcalá de Henares). <sup>3</sup>Servicio de Reumatología, Hospital Universitario Ramón y Cajal (Madrid).

**Introducción.** El SS es una exocrinopatía autoinmune de etiología desconocida. Puede adoptar formas primarias (SSp) y secundarias a otras patologías (SSs). En las glándulas afectadas se establecen estructuras semejantes a órganos linfoides secundarios, en las que se lleva a cabo el reclutamiento leucocitario. En este proceso, el CD62L desempeña un papel relevante, considerándose diana terapéutica en patologías con un claro carácter inflamatorio.

**Objetivo.** Analizar la expresión de CD62L en el compartimento linfocitario T CD4+ y CD8+ de pacientes con SSp y con SSs.

**Materiales y métodos.** Se incluyeron 21 pacientes con SSp, 10 con SSs a Artritis Reumatoide y 20 sujetos sanos de edad y sexo simi-

lar. Se obtuvieron linfocitos de sangre periférica en los que se determinó la expresión de antígenos de superficie mediante citometría de flujo. Se realizó un análisis jerárquico empleando CellQuest. Los resultados fueron valorados en términos de número absoluto de células.

**Resultados.** Hemos detectado una disminución significativa en el número de linfocitos CD4 y CD8 que expresan CD62L y CD62L<sup>brillante</sup> de pacientes con SSp respecto a los controles sanos ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.001$  para las CD+ y  $p = 0.014$  y  $p = 0.016$  para las CD8+). En los pacientes con SSs, hemos objetivado un descenso significativo en el número de células CD8+CD62L<sup>tenue</sup> respecto a los controles sanos ( $p = 0.022$ ). Al comparar las formas primarias y secundarias de esta patología, encontramos una disminución significativa en el número de células CD4+ que expresan CD62L y CD62L<sup>brillante</sup> en los pacientes con SSp ( $p = 0.031$  y  $p = 0.027$  respectivamente).

**Conclusión.** Nuestro estudio revela una disminución en la expresión de CD62L en linfocitos CD4 y CD8 en pacientes con SS. En los pacientes con SSp, esta disminución es atribuible a linfocitos Th que expresan el CD62L en alta intensidad. Sin embargo, la disminuida expresión de CD62L en pacientes con SSs, se adscribe a la población Tc que expresa CD62L en baja intensidad.

**F-0017-12-O. VALOR DIAGNÓSTICO Y PREDICTIVO DE LOS ANTICUERPOS CONTRA EL PÉPTIDO CÍTRICO CITRULINADO EN PACIENTES CON POLIARTRITIS.** C. Martín<sup>1</sup>, A. Valdivia<sup>1</sup>, J.L. Santiago<sup>1</sup>, M.C. Prado<sup>1</sup>, E. Loza<sup>2</sup>, M.A. Figueredo<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. <sup>2</sup>Servicio de Reumatología. Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Introducción.** Los pacientes de AR presentan, Igs anticitrulina, incluso años antes de que se desarrolle la enfermedad. En los casos de poliartritis de comienzo sin filiar la determinación del título de estos anticuerpos permitiría determinar los casos de AR tempranamente por su elevada especificidad.

**Objetivos.** Valorar la utilidad de la determinación de estos anticuerpos como método diagnóstico diferencial y predictivo de AR en pacientes con poliartritis de comienzo reciente. Determinar la especificidad y sensibilidad relativa de los anti-CCP con respecto al RF, así como la eficiencia diagnóstica al utilizarlos conjuntamente.

**Materiales y métodos.** Se estudiaron 99 pacientes con poliartritis de comienzo en los que se realizó la determinación por ELISA (INOVA®, IMMUNOSCAN®, AXIS®) de los anti-CCP, así como la de RF por nefelometría (IMAGE®). El diagnóstico de los pacientes con AR siguió los criterios del A.C.R. Los datos obtenidos se analizaron con el programa STATCALC ver. 2000 y PRISM 4.0.

**Resultados:** Al comparar los datos obtenidos para anti-CCP y FR se encontró que, aunque la sensibilidad de ambos marcadores es muy similar, la especificidad, VPP y VPN de los anti-CCP para la AR son significativamente mayores. Si se consideran además casos de AR probable (con 3 criterios), la sensibilidad es también mayor con los anti-CCP.

Cuando se ven conjuntamente ambos marcadores frente a RF solo se encuentra que se mejora tanto la sensibilidad como el VPN (la especificidad y VPP solo aumentan si al menos uno de los dos es positivo).

Si se consideran los dos marcadores en contraste con los anti-CCP en solitario y considerando los AR clínicos, se encuentra que no hay diferencias significativas de sensibilidad, especificidad, VPP ni VPN.

**Conclusiones.** Utilizando el RF y anti-CCP se aumenta la eficiencia del diagnóstico diferencial de AR en pacientes con poliartritis de comienzo. Este aumento parece estar determinado principalmente por la eficacia de los anti-CCP como marcador de AR.

**F-0017-13-O. ANTICUERPOS ANTI-MIDBODY EN ENFERMEDAD DE GRAHAM-LITTLE.** B. Rodríguez-Bayona<sup>1</sup>, M. Linares<sup>2</sup>, J.A. Brieva<sup>1</sup>, C. Rodríguez<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Dermatología. Hospital Puerta del Mar e Instituto Social de la Marina. Cádiz.

El Síndrome de Graham-Little es una patología dermatológica de etiología desconocida. Afecta a mujeres de 30-70 años y se caracteriza por alopecia cicatricial progresiva a nivel del área interparietal del cuero cabelludo con tapones córneos característicos. Otros rasgos son alopecia en pubis, axilas, queratosis pilar en tronco, miembros, cara, cejas. Presentamos el caso de una mujer de 57 años afectada por esta enfermedad. La histología de las lesiones muestra tapones foliculares córneos, destrucción y atrofia folicular y epidérmica progresiva acompañada de esclerosis dérmica en cuero cabelludo.

En el estudio de autoinmunidad, la determinación de ANA sobre células HEp-2 mostró una reacción moteada atípica a título medio, dependiente de ciclo celular. En interfase el auto-antígeno (auto-Ag) aparecía en el nucleoplasma y nucleolos con intensidad variable según la fase del ciclo celular. En profase, la tinción se concentraba en la zona del centrómero de los cromosomas, y en metafase se visualizaba a nivel de la placa metafásica. Según avanzaba la segregación anafásica, el auto-Ag se translocaba hacia la región central del huso. Finalmente, en telofase, la tinción se concentraba a nivel del cuerpo medio (midbody). El estudio de ENAs y otros autoanticuerpos (auto-Ac) asociados a conectivopatías fue negativo. Mediante inmunoblotting sobre extracto celular HEp-2, el suero mostraba reactividad frente a una proteína de 75-80 kDa. El reconocimiento del cuerpo medio por autoAc se asocia a diferentes especificidades antigénicas. Hay pocos estudios sobre la asociación clínica de los Ac frente a cuerpo medio, relacionándolos con Síndromes tipo Esclerodermia. En este paciente no había signos clínicos sugestivos de esclerodermia. Por otro lado, la distribución del autoAg a lo largo de las distintas fases del ciclo celular se corresponde con la dinámica de un grupo de proteínas dependientes de ciclo celular: las proteínas *passengers* cromosómicas.

En este estudio mostramos la posible asociación del Síndrome de Graham Little con fenómenos autoinmunes.

**F-0017-14-O. ESPECIFICIDAD DE LAS BOC de IgM EN LA EM y RELACIÓN CON LA EVOLUCIÓN DE LA ENFERMEDAD.** M.C. Sádaba<sup>1</sup>, J. Masjuan<sup>2</sup>, P. González-Porqué<sup>1</sup>, J.C. Álvarez Cermeño<sup>2</sup>, M. Espiño<sup>1</sup>, E. Roldán<sup>1</sup>, A. Bootello<sup>1</sup>, L.M. Villar<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología y <sup>2</sup>Neurología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

**Introducción.** La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad inflamatoria desmielinizante del sistema nervioso central. Anticuerpos y complemento contribuyen al desarrollo de las lesiones desmielinizantes. Se postula que la IgM juega un papel importante en este proceso. La presencia de IgM en líquido cefalorraquídeo se relaciona con la activación del complemento y aumento de la concentración de MBP, indicador de desmielinización. Además, la presencia de BOC de IgM es un marcador de mal pronóstico en la EM.

**Objetivo.** Estudiar la especificidad de las bandas oligoclonales (BOC) de IgM en los pacientes con EM y su relación con la evolución de la enfermedad

**Materiales y métodos.** Se ha puesto a punto un método para la detección de BOC de IgM específicas frente a los fosfolípidos y glicolípidos mayoritarios de la mielina. Incluye isoelectrofoque, transferencia a membranas tapizadas con los distintos lípidos e inmunodetección. Se analizó la especificidad de la IgM en 44 pacientes con EM que presentaban BOC de IgM. Para ver la relación con la actividad de la enfermedad se evaluó el tiempo transcurrido hasta al segundo brote en 29 pacientes divididos según la presencia y ausencia de bandas de IgM frente a los lípidos ensayados.

**Resultados.** El 90,9% de los pacientes mostraron especificidad frente a alguno de los lípidos mayoritarios de la mielina siendo el antígeno mayoritario la fosfatidilcolina. Todos los enfermos con bandas de IgM frente a lípidos habían sufrido un segundo brote antes de un año de evolución, mientras que el 45,75% de los pacientes que no presentaban BOC de IgM frente a lípidos aún no había sufrido un segundo brote al cabo de más de dos años de evolución. Las diferencias entre los dos grupos fueron muy significativas ( $p < 0,0001$  según test de Kaplan-Meier).

**Conclusiones.** La mayoría de las BOC de IgM presentes en los pacientes con EM reaccionan frente a los lípidos de la mielina. Esta reactividad se asocia con una peor evolución de la enfermedad.

**F-0017-15-C. CLASIFICACIÓN Y HETEROGENEIDAD DE AUTOANTÍGENOS EN PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTIMITOCONDRIALES M2. E. Delgado Cerviño, R. Álvarez Doorno, J.M. González Tarrío, C. Salcedo Moreno, G. Fontán Casariego. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario La Paz, Madrid.**

**Introducción.** Los anticuerpos antimitocondriales (AMA) son marcadores serológicos de la cirrosis biliar primaria (CBP). Las dianas antigénicas más frecuentes se encuentran en la membrana mitocondrial interna y son componentes del complejo 2-oxoácido deshidrogenasa (tipo M2). Más del 90% de sueros de pacientes con CBP reaccionan contra uno o más de estos antígenos.

**Objetivo.** Estudiar los distintos patrones autoantigénicos dentro de un grupo de pacientes con AMA tipo M2 por IFI.

**Metodología.** 1) Detección por IFI de AMA M2 en portas de triple tejido (hígado/riñón/estómago) de rata y células Hep-2, 2) Cuantificación de AMA tipo M2 en EU/ml mediante un ELISA comercial, 3) Detección por Western blot de distintos patrones autoantigénicos utilizando extracto de hígado humano.

**Resultados.** 1) Por IFI se detectaron AMA tipo M2 en 40 pacientes. 2) Por blot un 95% de los pacientes AMA M2 reaccionaban contra la subunidad E2 de la piruvato deshidrogenasa (E2-PDH) de 70 KDa, un 32% contra la proteína X de 55 KDa, un 77% contra la subunidad E2 de la cadena ramificada de la 2-oxoácido deshidrogenasa (E2-BCO-ADC) de 52 KDa, un 58% contra la subunidad E2 de la 2-oxoglutarato deshidrogenasa (E2-OGDC) de 48 KDa y un 35% contra la subunidad E1β de la piruvato deshidrogenasa (E1β-PDC) de 36 KDa. 3) Por ELISA 1 de los sueros fue dudoso.

**Conclusiones.** 1) Los sueros de pacientes con AMA presentan distintas reactividades antigénicas. 2) El 5% de sueros que no reaccionan contra la banda de 70 KDa (E2-PDH), reaccionan exclusivamente contra la banda de 52 KDa (E2-BCOADC), uno de ellos además es dudo-

so por ELISA. 3) En un futuro será necesario relacionar los distintos patrones con los diagnósticos y el distinto estadio de la enfermedad.

**F-0017-16-C. UTILIDAD DE LA MEDICIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CCP EN LÍQUIDOS ARTICULARES DURANTE EPISODIOS DE ARTRITIS AGUDA. C. Ruiz de Alegría Puig, F. Ausín Ortega, M. López-Hoyos. Servicio Inmunología. Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla». Santander.**

**Introducción.** La medición de los anticuerpos dirigidos frente a los péptidos citrulinados (Acs anti-CCP) ha supuesto un gran avance en el diagnóstico precoz de artritis reumatoide (AR). Estos Acs están presente tanto en líquido sinovial (LS) como en sangre de pacientes con AR. Además, existe expresión de péptidos citrulinados en el tejido sinovial de pacientes con AR. Los cuadros de artritis aguda suponen un cuadro frecuente en las urgencias hospitalarias, siendo la mayoría de ellos artropatías por depósito de cristales y un bajo porcentaje debidas a AR.

**Objetivo.** Valorar la utilidad de la detección de Acs anti-CCP en el LS de pacientes que acuden a urgencias por episodios de artritis para el diagnóstico precoz de AR.

**Materiales y métodos.** Se estudiaron 107 LS llegados a nuestro laboratorio desde urgencias durante un período de un año. Se analizó la presencia de Acs anti-CCP mediante ELISA (Eurodiagnostica). El diagnóstico definitivo de los casos incluidos se confirmó en la historia clínica, repartiéndose del siguiente modo: 9 (8,4%) AR, 11 (10,2%) artritis gotosas, 7 (6,54%) pseudogotas, 12 (11,2%) artritis sépticas, 28 (26,16%) osteoartritis, 12 (11,2%) artritis reactivas, 11 (8,4%) bursitis y tendinitis, 8 (7,47%) artritis indeterminadas y 9 (8,4%) miscelánea.

**Resultados.** Se detectaron sólo 5 casos positivos de Acs anti-CCP en LS, todos ellos dentro del grupo con diagnóstico definitivo de AR (4,67% del total de LS y 55,6% dentro del grupo con AR). De los 9 casos de AR, pudimos estudiar el suero de 6 de ellos (3 con Acs en LS y 3 sin Acs en LS), siendo positivos los Acs anti-CCP en el suero de los 3 pacientes con Acs en LS. No encontramos ningún paciente con Acs anti-CCP en LS pero no en suero.

**Conclusiones.** Los LS remitidos por AR suponen un bajo porcentaje del total remitido a nuestro laboratorio. La medición de los Acs anti-CCP en LS procedentes de urgencias no aporta ningún beneficio en el diagnóstico precoz de AR.

**F-0017-17-O. RELACIÓN ENTRE NIVELES DE ANTICUERPOS ANTI-DNA NATIVO DETECTADOS MEDIANTE UN NUEVO ENSAYO DE INMUNOFLORESCENCIA AUTOMATIZADO Y ACTIVIDAD LÚPICA. H. López Escribano<sup>1</sup>, R. Cabeza<sup>2</sup>, V. Martínez Taboada<sup>2</sup>, J. Crespo<sup>1</sup>, R. Blanco<sup>2</sup>, M. Peña<sup>1</sup>, V. Rodríguez Valverde<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Cantabria.**

Recientemente se ha desarrollado un nuevo método automatizado para la detección de anticuerpos anti-DNA nativo (Acs anti-DNAn; EliA dsDNA, Pharmacia Diagnostics). Dicho ensayo se ha planteado como alternativa a los de inmunofluorescencia indirecta sobre C. Luciliae (CLIFT) y de FARR. Este nuevo método permite una cuantificación de Acs anti-DNAn en UI/ml, según el patrón internacional de la OMS (Wo/80).

El objetivo planteado fue evaluar la correlación entre los títulos de Acs anti-DNA, medidos mediante EliA dsDNA, y el índice de actividad clínica (SLEDAI) en 1037 sueros procedentes de 180 pacientes con LES. Estos resultados se compararon también con los obtenidos mediante CLIFT y con los niveles séricos de C3 y C4 (mediante nefelometría). El SLEDAI empleado excluía los datos de complemento y Acs anti-DNA, para evitar sesgos en el análisis estadístico.

Los sueros obtenidos en momentos de actividad de LES (SLEDAI  $\geq 3$ ) mostraron títulos más elevados de Acs anti-DNA mediante EliA dsDNA que los de fases inactivas ( $59,3 \pm 102,9$  vs  $38 \pm 90,6$  UI/ml,  $p < 0,05$ ). Con CLIFT, el porcentaje de sueros positivos fue mayor en fases activas que en las inactivas (46% vs 41%, pNS). Los títulos de Acs por ambos métodos mostraron una buena correlación ( $r = 0,402$ ,  $p < 0,001$ ). Sin embargo, los títulos mediante EliA dsDNA presentaron una mejor y significativa correlación con el SLEDAI ( $r = 0,134$ ,  $p < 0,001$ ) que con el CLIFT ( $r = 0,082$ ,  $p < 0,001$ ). Los niveles de C3 y C4 mostraron una asociación significativa negativa con el SLEDAI, aunque menor que los Acs anti-DNA nativo mediante EliA dsDNA (C3 =  $-0,123$  y C4 =  $-0,027$ ,  $p < 0,001$  en ambos casos).

La detección de Acs anti-DNA mediante EliA dsDNA muestra, por tanto, la mejor asociación significativa con la actividad del LES de los parámetros analizados lo que, junto a la posibilidad de automatización y su rapidez, le sitúan como un método de elección para la cuantificación de Acs anti-DNA en el manejo de los pacientes con LES.

**F-0017-18-C. PREVALENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN ESPONDILOARTROPATÍAS.** *J. Crespo<sup>1</sup>, V. Martínez-Taboada<sup>2</sup>, C. Ruíz de Alegría<sup>1</sup>, D. San Segundo<sup>1</sup>, R. Blanco<sup>1</sup>, M. Peña<sup>1</sup>, V. Rodríguez-Valverde<sup>2</sup>, M. López-Hoyos<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.*

**Introducción.** Los anticuerpos anti-saccharomyces cerevisiae (ASCA) tanto IgA como IgG han ganado importancia en el diagnóstico y pronóstico de la enfermedad de Crohn (EC), dado que son bastante específicos, aunque tengan una sensibilidad limitada. El uso combinado de ASCA y ANCA es útil para discriminar entre EC y colitis ulcerosa. La prevalencia de estos autoanticuerpos se ha estudiado únicamente en la enfermedad inflamatoria intestinal (EII) y no en otras alteraciones de origen claramente inflamatorio, como por ejemplo las espondiloartropatías (SPA). El propósito del estudio fue investigar la presencia de ASCA (IgA o IgG) en suero de pacientes con SPA y en el subgrupo de las espondilitis anquilosantes (EA).

**Material y Métodos.** Se estudió la presencia de ASCA mediante ELISA comercial en el suero de 41 pacientes con SPA: 24 indiferenciadas, 6 artritis psoriásicas, 7 EA y 4 secundarias EII. Como control se utilizaron los sueros de 20 pacientes con artritis reumatoide y 10 sujetos sanos. La prevalencia de ANCA fue evaluada por IFI en portadas de neutrófilos humanos comerciales.

**Resultados.** 22% de los pacientes con SPA resultaron positivos para ASCA IgA y/o IgG: 6/24 indiferenciados, 1/7 EA, 2/4 secundarias EII. Sólo un paciente con EA resultó positivo para ANCA. No se detectó ASCA en el grupo control. La presencia de ASCA fue más frecuente en pacientes con enfermedad activa (7/27 para ambas ASCA IgA e IgG) que en aquellos con proceso no activo (2/14 y 3/14 respectivamente). Los pacientes con SPA con ASCA IgA positivos mostraron una frecuencia mayor de historias clínicas con artritis perifé-

ricas. La presencia de ASCA séricos se asoció con un tiempo menor de evolución clínica de la enfermedad.

**Discusión.** Los resultados muestran una cierta prevalencia de ASCA en SPA, con una frecuencia similar para los isotipos IgA e IgG. Parece existir una asociación con la actividad de la enfermedad aunque no es significativa, probablemente debido al escaso tamaño de la muestra.

**F-0017-19-C. COMPARACIÓN DE ENZIMOINMUNOENSAYOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-FOSFOLÍPIDOS.** *M. Peña Salmón, J. Crespo, D. San Segundo, L. García Astudillo, C. Ruiz de Alegría, A. Albarracín, H. López Escribano, M. López-Hoyos. Servicio Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander.*

La determinación de los anticuerpos anti-fosfolípido (APL) ha adquirido un gran peso en la cartera de servicio de los laboratorios de Inmunología, debido en gran parte a la mayor conciencia del síndrome antifosfolípido (SAF) entre los clínicos. La metodología para su detección ha generado múltiples problemas y abundante literatura, lo que ha hecho que no se haya impuesto ningún ensayo comercial y se empleen métodos de ELISA propios. Sin embargo, la gran carga asistencial que supone actualmente esta determinación obliga a buscar métodos comerciales más rápidos y reproducibles.

En el presente trabajo hemos comparado dos ELISA comerciales (A y B) frente al de elaboración propia (C) para detección de anticuerpos anti-cardiolipina y anti-beta 2 glicoproteína I, tanto de clase IgG e IgM. Se estudiaron 184 sueros de LES (66), SAF (16), patología gravídica (14), artritis reumatoide (20), hepatitis (20), sujetos sanos ancianos (24) y jóvenes (24).

El ensayo más sensible fue el C (22-50% en LES, 25-80% en SAF y 25-83% en patología gravídica) y el menos el A (3-18%, 0-25% y 0%, respectivamente). El ensayo B tuvo una sensibilidad intermedia (11-33%, 6-19%, 0-7%, respectivamente). El ELISA más específico fue el comercial A (98-100%), mientras que el comercial B y el propio C mostraron una especificidad alrededor del 80%. La mejor correlación se encontró entre los ensayos B y C para todas las clases de APL, aunque el coeficiente de Pearson nunca superó 0,450. Los coeficientes de variación fueron altos y similares en los tres sistemas evaluados, especialmente para los anticuerpos de clase IgM. Los coeficientes intra-ensayo fueron 5-20% mientras que los inter-ensayo 7-31%.

En conclusión, nuestros datos demuestran una vez más la alta variabilidad en los distintos ELISA para la detección de APL, lo que obliga a una correcta evaluación del método a emplear en cada laboratorio, siendo muy exigente con los grupos de patologías y controles a incluir.

**F-0017-20-C. PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-SACCHAROMYCES CEREVISIAE EN PACIENTES CELIACOS.** *M.A. Albarracín, H. López Escribano, J. Crespo, D. San Segundo, M. Peña, M. López-Hoyos. Servicio Inmunología. Hospital Universitario Marqués de Valdecilla. Santander.*

Las manifestaciones clínicas de la enfermedad celíaca (EC) y de las enfermedades inflamatorias crónicas intestinales (EICI) son en ocasiones similares y pueden dificultar el diagnóstico diferencial. En principio, ambas patologías se caracterizan por la presencia de un

patrón de autoanticuerpos diferentes y característicos. De todos ellos, los de más reciente introducción en el diagnóstico clínico son los anticuerpos anti-Sacharomyces Cerevisiae (ASCA), bastante específicos de enfermedad de Crohn. El objetivo perseguido fue estudiar la prevalencia de ASCA séricos en pacientes con EC.

Para ello, analizamos la presencia de ASCA (IgG e IgA) en el suero de 88 pacientes con EC y 63 pacientes con EICI (ambos grupos diagnosticados por biopsia) mediante ELISA comercial. Como grupos controles de enfermedad estudiamos 22 pacientes con espondiloartritis, 35 con artritis reumatoide y 50 con hepatitis.

19/68 (21,6%) pacientes con EC tuvieron títulos de ASCA IgG y/o IgA positivos. 11/63 (17,5%) pacientes con EICI (10 con enfermedad de Crohn y una paciente con colitis autoinmune gestacional) mostraron positividad para ASCA. Tres sujetos con hepatitis crónica y uno con AR fueron positivos a títulos bajos. Los sueros positivos de EC tuvieron un título de  $49,1 \pm 21,8$  U/ml frente a los de EICI ( $97,2 \pm 79,3$ ).

Los resultados mostrados indican una prevalencia de ASCA en EC similar a la de EICI, donde se ha establecido su utilidad diagnóstica. La presencia de ASCA no excluye el diagnóstico de EC. Desde el punto de vista patogénico, no es extraña la producción de ASCA en la EC dado que su producción se asocia a un aumento de la permeabilidad del intestino, que ocurre tanto en la EC como en las EICI. Por último, la EC se asocia a otras enfermedades autoinmunes y es posible que los pacientes con EC y ASCA constituyan un subgrupo que llegue a desarrollar una EICI. Muchos de los pacientes estudiados son niños y se precisan estudios prospectivos que confirmen esa hipótesis.

**F-0017-21-C. VARIABILIDAD INTERENSAYO EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTIFOSFOLÍPIDOS.** F. San Segundo, J. Crespo, M. Peña, M. Lopez-Hoyos. Servicio de Inmunología, Hospital Universitario Marqués de Valdecilla, Santander, Cantabria.

Son muchos los laboratorios de inmunología que no han adaptado ningún método comercial para la determinación de anticuerpos antifosfolípido (aPL), utilizando desde hace varios años otros métodos fundamentalmente ELISA. Estos protocolos son, normalmente artesanales y de elevado consumo de tiempo. Ello, unido a que los lípidos son moléculas poco antigénicas y a que los aPL constituyen un grupo muy heterogéneo, lleva a plantear periódicamente la validez y utilidad de la técnica. El propósito de este estudio fue valorar, en base a nuestra técnica, la estabilidad de este tipo de anticuerpos en el tiempo y la correlación entre distintos tipos de anticuerpos de una misma clase de inmunoglobulina (IgG e IgM).

Se analizaron los resultados de aPL en los sueros de 230 pacientes separados al menos 6 semanas. Se evaluó la presencia de anticuerpos anticardiolipina (ACA) y anti beta2 glicoproteína (GBA) de clase IgG e IgM, mediante un ELISA propio.

Se observó una correlación positiva significativa estadísticamente para el caso de los ACA para ambas clases (IgG e IgM, Pearson 0,330 y 0,387 respectivamente) que no se apreció en los GBA. Por otra parte, al analizar correlaciones entre determinaciones de una misma clase de inmunoglobulina dentro de un mismo ensayo, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para las clases IgM (Pearson 0,236 y 0,237 para el primer y el segundo ensayo, respectivamente), siendo esto así para la clase IgG únicamente en un ensayo (Pearson 0,203). El coeficiente de variación intra-ensayo varió entre el 0-20% según el tipo de aPL, mientras que el inter-ensayo fue del 0-30%, sobre todo debido a la IgM.

Los resultados muestran que, para nuestra técnica, los ACA tuvieron un comportamiento más estable en el tiempo que los GBA. Además esto es así para ambas clases IgG e IgM. Por otra parte los aPL de la clase IgM mostraron una mayor concordancia entre los dos autoanticuerpos analizados ya que se observó una correlación significativa en ambas determinaciones. Para la clase IgM sólo se observó en una de las mismas.

**F-0017-22-O. EFICACIA DIAGNÓSTICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CITRULINA EN POLIARTRITIS DE INICIO.** A. Fernández-Suárez<sup>1</sup>, S. Reneses Cesteros<sup>2</sup>, I. Wichmann Schlipf<sup>1</sup>, R. Criado Pizarro<sup>2</sup>, A. Núñez Roldán<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y de <sup>2</sup>Reumatología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla.

**Introducción.** La artritis reumatoide (AR) es una enfermedad reumática de curso incierto e insidioso, lo que dificulta su identificación. Se ha demostrado la utilidad diagnóstica de los anticuerpos anti-peptido cíclico citrulinado (Ac a-CCP), aunque la mayoría de los estudios incluyen pacientes con AR ya instaurada, sin abordar la sospecha diagnóstica en el inicio de la enfermedad.

**Objetivos.** Determinar la eficacia diagnóstica en términos de sensibilidad y especificidad de los Ac a-CCP y comparar tres métodos de ELISA comerciales para su detección.

**Métodos.** Se analizó la presencia de Ac a-CCP en el suero de 78 pacientes, derivados desde atención primaria por primera vez a la consulta de poliartritis de inicio (edad  $\geq 16$  años; tiempo evolución  $\geq 4$  semanas  $\leq 1$  año; 2 o más articulaciones inflamadas). Ningún paciente había sido tratado con fármacos modificadores de la enfermedad. Al año de seguimiento se diagnosticaron 53 pacientes con AR según los criterios de la ACR. También se incluyó un grupo de 10 controles sanos. Los ELISA ensayados fueron IMMUNOSCAN RA (Euro-Diagnostica AB), QUANTA LiteTM CCP IgG ELISA (INOVA Diagnostic, Inc.) y DIASTATTM Anti-CCP (Axis-Shield Diagnostics Limited).

**Resultados.** La sensibilidad los tres ELISAs citados fue del 52.83%, 50.94% y 52.83%, con una especificidad del 100%, 100% y 96.5%, respectivamente. Los Ac a-CCP detectaron entre el 21% y 26% (según el método) de los pacientes con AR FR-. Al comparar los tres métodos se obtuvieron correlaciones altamente significativas. La combinación de los Ac a-CCP con el FR incrementa la sensibilidad hasta el 67%, con cifras de especificidad que oscilan entre el 94% y el 97%.

**Conclusiones.** Los Ac a-CCP son altamente específicos de la presencia de AR. La combinación de los Ac a-CCP junto al FR incrementa la sensibilidad un 15%. Los tres métodos utilizados ofrecen la misma rentabilidad diagnóstica. La técnica analítica en todos los casos es sencilla, fácilmente interpretable y automatizable.

**F-0017-23-C. SIGNIFICACIÓN CLÍNICA DE LOS ANTICUERPOS ANTI-CENP-F EN POBLACIÓN PATOLÓGICA NO SELECCIONADA.** I. Wichmann Schlipf, R. Magariño, I. Magariño, A. Torres, N. Respaldiza, M. Encarnación Carrizosa, A. Fernández-Suárez, A. Núñez Roldán. Servicio de Inmunología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla.

**Introducción.** CENP-F es una proteína centromérica de 330 kD, ciclodependiente, detectable en prometafase/metafase. Los anti-



cuerpos anti-CENP-F (Ac.) son muy poco frecuentes; su interés radica en un trabajo previo de Casiano y Rattner, en que se asociaron en un 50% a tumores epiteliales o hiperproliferaciones celulares.

**Objetivos.** Se ignora si la aparición de estos Ac. precede a una enfermedad maligna. Desde hace cuatro años hemos iniciado un estudio prospectivo de los pacientes que son portadores de este Ac., para investigar su frecuencia y sus correlaciones clínicas.

**Métodos.** Los sueros se estudiaron mediante inmunofluorescencia indirecta en células HEP-2. Se revisaron las historias y evoluciones clínicas.

**Resultados.** Hemos detectado 13 pacientes (11 mujeres; edad 14-78 años), positivos a Ac. anti-CENP-F, con los siguientes diagnósticos: 1) hipertransaminasemia; 2) hepatitis crónica VC, vasculitis en MMII; 3) poliartritis FR+; 4) caso con antecedentes de eritema nodoso, anticoagulante lúpico positivo; 5) aftas orales recurrentes; 6) LES

con nefropatía terminal, 7) vasculitis granulomatosa con afectación cutánea y adenopatías no malignas; 8) varón de 14 años, antecedentes de ictiosis vulgar, úlceras corneales de repetición; 9) mujer de 42 años, antecedentes familiares de LES y un aborto de 3 meses; 10) mujer de 78 años de edad con síndrome constitucional, aumento de fosfatasa alcalina, pólipos en colon; 11) parálisis incompleta del III par; 12) paciente de 80 años con carcinoma epidermoide de cervix; 13) varón con neumopatía intersticial.

**Conclusiones.** 1. En nuestra serie se ha detectado un solo caso de enfermedad maligna, y una lesión hiperproliferativa (pólipos). 2. Se confirma la baja frecuencia de este Ac. (aprox. 0.04% de sueros patológicos diversos). 3. Observamos una gran heterogeneidad en los diagnósticos de los pacientes. 4. Dada la rareza de estos Ac. son necesarios estudios multicéntricos para llegar a conclusiones válidas de su significado.

## F-0019. Inmunología del trasplante

*Moderadores:* Jaume Martorell Pons (Barcelona), Ana María García Alonso (Madrid)

**F-0019-01-C. LAS NUEVAS TECNOLOGÍAS EN LA DETECCIÓN Y SEGUIMIENTO DE ANTICUERPOS ANTI HLA. SU UTILIDAD CLÍNICA: ¿CUÁL ES EL VALOR PRONÓSTICO DEL %PRA EN EL TRASPLANTE?.** C. Muñoz<sup>1</sup>, J.M. Llima<sup>1</sup>, M.A. Miguelsanz<sup>1</sup>, J.M. Sempere<sup>2</sup>, M.L. de la Sen. <sup>1</sup>Sección de Inmunología. Hospital General de Alicante. <sup>2</sup>Dpto de Biotecnología. Universidad de Alicante.

Cuando el %PRA, en conjunto, varía en el transcurso del tiempo no sabemos si en esas variaciones se mantiene la intensidad relativa de cada uno de los Acs. que conforman la reactividad total de un suero, o si, por el contrario, el grado de reacción de una especificidad particular anti-HLA puede aumentar cuando el conjunto disminuye o viceversa.

Si una especificidad determinada puede variar independientemente del conjunto, la importancia del hecho es notable, pues indicaría que la medición sólo del %PRA y las especificidades presentes es insuficiente, siendo necesario añadir la intensidad de reacción de cada una de aquellas.

Para intentar responder a esta cuestión hemos estudiado 60 sueros de 20 pacientes sensibilizados (3 s/paciente): 30 sueros de 10 pacientes (6h/4m) en lista de espera para el trasplante y 30 sueros postrasplante de 10 pacientes (5h/5m) que rechazaron el injerto. El nivel de %PRA era diferente para cada suero del mismo paciente.

La técnica empleada ha sido la citometría múltiple LABScreen® (One Lambda) con antígenos individualizados, que mejora la especificidad frente al método homónimo con antígenos múltiples y la sensibilidad frente al método ELISA con antígenos individualizados.

Los datos obtenidos nos han permitido llegar a las siguientes conclusiones:

- La variación del título de reactividad frente a un antígeno específico no siempre guarda correlación con el % PRA.
- Dos muestras secuenciales de un mismo paciente y de similar %PRA pueden no tener el mismo perfil anticuerpos HLA.

- Algunas reacciones y títulos anti HLA se mantienen inalterables, o con pequeños cambios, al margen del valor de %PRA.
- Muestras secuenciales del mismo paciente pueden mostrar aparición o desaparición de especificidades individuales al margen de los niveles de PRA.

Estos resultados nos han llevado formular dos hipótesis complementarias:

1. El %PRA estadístico no es el parámetro más relevante en la estrategia de búsqueda de un órgano.
2. El estudio detallado de los anticuerpos HLA incrementa las posibilidades de trasplante de pacientes con un alto valor de %PRA.

**F-0019-02-C. NUEVAS TECNOLOGIAS CON ANTIGENOS HLA PURIFICADOS FRENTE A MICROLINFOCITOTOXICIDAD (CDC) PARA EL ESTUDIO DE ESPECIFICIDADES ANTI-HLA EN PACIENTES SENSIBILIZADOS.** C. Muñoz, J.M. Llima, M.A. Miguelsanz, M.L. de la Sen. Sección de Inmunología. Hospital General de Alicante.

Para prevenir posibles rechazos en el trasplante de órganos, tradicionalmente se ha usado la técnica CDC como la única alternativa de estudio y conocimiento del estado de inmunización de pacientes en lista de espera.

Las limitaciones que afectan a los métodos CDC respecto de su sensibilidad, desviación del resultado según las frecuencias antigénicas empleadas y enmascaramiento de unos anticuerpos por otros más frecuentes, bien conocidas, se solventan sólo parcialmente mediante la prueba cruzada previa al trasplante permite y esto a costa de alargar la isquemia del órgano y la carga de trabajo.

La reciente aparición de nuevas técnicas mediante las que se pueden investigar, con antígenos HLA purificados, las especificidades anti HLA presentes en un suero permite su mejor identificación y definición.

En este trabajo hemos elegido 50 sueros preTx de 50 pacientes sensibilizados: 20 de esos enfermos recibieron un Tx renal con rechazo

posterior. Estos sueros los hemos estudiado mediante la técnica de citometría múltiple LABScreen®, que emplea grupos de bolas fluorescentes cubiertas con un antígeno único HLA (One Lambda). Finalmente hemos comparado las especificidades detectadas mediante esta técnica con las obtenidas por CDC y realizado un estudio retrospectivo de la compatibilidad/incompatibilidad entre donante y receptor.

Nuestros resultados han confirmado: a) Presencia de anticuerpos frente al donante no detectados por CDC. b) Asignación por CDC de especificidades en apariencia falsamente positivas ya que no se detectan por citometría. c) Confirmación por citometría de asignaciones por CDC no frente al donante.

Además el método citométrico presenta dos ventajas indudables: 1ª. Permite la distinción clara y directa entre anticuerpos HLA de clase IgG e IgM. 2ª. Mide la intensidad de fluorescencia reflejo número de anticuerpos presentes, de su afinidad o de ambos.

En conclusión, la identificación individualizada de anticuerpos HLA facilitará la selección de los receptores hiperinmunizados, evitando la necesidad del intercambio de sueros entre los centros de trasplante.

**F-0019-03-O. EVOLUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LAS SUBPOBLACIONES LINFOCITARIAS DE LA MUCOSA INTESTINAL EN EL PRIMER CASO DE TRASPLANTE DE INTESTINO DELGADO AISLADO EN ADULTO EN ESPAÑA.** L. Sánchez<sup>1</sup>, Y. Quijano<sup>2</sup>, J. Campos<sup>1</sup>, E. de Vicente<sup>2</sup>, C. Redondo<sup>3</sup>, J.L. Castañer<sup>1</sup>, A. Bootello<sup>1</sup>, G. Roy<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Unidad de Trasplante Hepato-Intestinal, y <sup>3</sup>Anatomía Patológica. Hospital Ramón y Cajal, Madrid.

**Introducción.** El Trasplante intestinal (Tx) es una terapia en continuo avance pero aún limitada por la alta tasa de rechazo y la baja supervivencia de los pacientes. El examen anatomopatológico de la mucosa intestinal es la única prueba para el diagnóstico del rechazo, en cuyo desarrollo es probable la implicación del tejido linfoide asociado al intestino.

**Objetivos.** 1) Analizar las características fenotípicas y funcionales de los linfocitos intraepiteliales (LIE) y de lámina propia (LPL) de la mucosa intestinal y sus cambios post-Tx. 2) Correlacionar los resultados con la evolución clínico-histológica con el objeto de implicar al sistema inmune intestinal en los mecanismos de tolerancia/rechazo del injerto. 3) Utilidad del fenotipaje de LIE en el seguimiento post-Tx.

**Material y Métodos.** Se analizaron 24 muestras de intestino delgado (ID) a lo largo de los 15 meses tras la realización del Tx. Por medio de la Citometría de Flujo (CF) se caracterizaron fenotípicamente los LIE y LPL, determinando su capacidad de producción de citocinas *in vitro*, y su procedencia donante/receptor.

**Resultados.** Durante toda la evolución se observó una proporción baja de LIE (5,4±1,6; normal: 8-12%), con una distribución normal de las subpoblaciones de TcR alfa-beta y gamma-delta, CD4+ y CD8+, una ausencia de los LIE NK y una escasa expresión de antígenos de activación (CD25: 1,9±0,8; HLA-DR/CD3+: 11,3±5,1). A partir del 4º mes se detectó la presencia de LIE NK, que aumentaron hasta valores normales (46,2±16,1), con un moderado incremento de los marcadores de activación (CD25: 21,5±10,4 y HLA-DR/CD3+: 23,7±17,2). En los últimos meses se detectó un aumento de expresión de CD95L (15,7±8,6), sin observar la presencia intracelular de perforinas. La pro-

ducción de citocinas fue baja manteniendo un perfil de tipo 1. Inicialmente los LIE expresaban HLA del donante, excepto los NK que desde su aparición fueron positivos para HLA del receptor; a partir del 6º mes el reemplazamiento de los LIE fue completo, aunque las células epiteliales siguen procediendo del donante.

**Conclusión.** Es el 1º análisis evolutivo post-Tx de las subpoblaciones linfocitarias de la mucosa intestinal. Estos resultados se correlacionan con una evolución clínica muy satisfactoria.

**F-0019-04-C. AUSENCIA DE ASOCIACIÓN ENTRE RECHAZO AGUDO POST-TRASPLANTE HEPÁTICO Y LOS GENES MCP-1 Y CCR-5.** E. Franco-López<sup>1</sup>, I. Aguilera-García<sup>1</sup>, J.M. Pascasio<sup>2</sup>, F. Pareja<sup>3</sup>, A. Bernardos<sup>3</sup>, M.F. González-Escribano<sup>1</sup>, A. Núñez-Roldán<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Digestivo y <sup>3</sup>Unidad de Trasplante Hepático del Hospital Universitario Virgen del Rocío. Servicio Andaluz de Salud. Sevilla.

**Introducción.** El rechazo agudo de trasplante hepático es un proceso inmune en el que se produce infiltración del órgano trasplantado por monocitos y linfocitos.

Las β-quimiocinas y sus receptores juegan un papel clave en la atracción y acúmulo de monocitos hacia los sitios de rechazo. Se ha descrito que la proteína quimiotáctica de monocitos 1 (MCP-1) está involucrada en los procesos de rechazo agudo pulmonar, renal, cardíaco y hepático. También se ha sugerido que CCR-5, un receptor de β-quimiocinas como RANTES, MIP-1α y MIP-1β, presente en monocitos, puede estar involucrado en procesos de rechazo.

El gen MCP-1 presenta un polimorfismo de cambio de base en posición -2518 (G/A) con influencia en su transcripción, de forma que los individuos homocigotos para el alelo A producen menos cantidad de proteína que los que poseen el alelo G. En el gen CCR-5 se ha encontrado una delección de 32 pb que da lugar a un receptor no funcional.

**Objetivo.** Determinar la posible influencia de los citados polimorfismos en la susceptibilidad al rechazo agudo post-trasplante hepático.

**Material y métodos.** Se incluyeron en el estudio 150 receptores de trasplante hepático (54 con rechazo agudo y 96 sin rechazo) sometidos a una pauta inmunosupresora similar. El polimorfismo -2518 (G/A) del gen MCP-1 se determinó mediante PCR-RFLP con la enzima PvuII y la delección del gen CCR-5 se genotipó mediante PCR.

**Resultados.** No se encontraron diferencias significativas en la distribución de los polimorfismos estudiados entre los grupos de pacientes con y sin rechazo.

**Conclusión.** Los polimorfismos estudiados en los genes MCP-1 y CCR-5 no parecen tener influencia en la susceptibilidad a rechazo agudo en pacientes trasplantados hepáticos.

**F-0019-05-C. TRASPLANTE HEPATO-RENAL SIMULTÁNEO EN UN PACIENTE SENSIBILIZADO.** R. Atencia<sup>1</sup>, M. Azkarate<sup>1</sup>, A. Arrieta<sup>1</sup>, A. Prada<sup>1</sup>, M. Riñón<sup>1</sup>, J. Amenabar<sup>2</sup>, N. Maruri<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección Inmunología, <sup>2</sup>Servicio Nefrología, Hospital Cruces. Baracaldo. Vizcaya.

**Introducción.** La prueba cruzada (CM) positiva representa la contraindicación absoluta en el caso de trasplante renal. No obstante, se sabe que, en el trasplante simultáneo de hígado y riñón, aquel es capaz de proteger de algún modo contra el rechazo, aún en los casos de CM positivo.

**Objetivo.** Realizar un estudio seriado de la presencia de anticuerpos en un paciente hiperinmune sometido a un doble trasplante hepato-renal. El paciente recibió una dosis pre-trasplante de gammaglobulinas inespecíficas en un intento de minimizar su presencia de anticuerpos.

**Materiales y métodos.** El estudio seriado se realizó empleando sueros del paciente obtenidos antes, en el momento del trasplante y a los 7, 14, 30, 61 y 83 días post-trasplante. La evaluación de la presencia de anticuerpos se realizó mediante las pruebas de Citotoxicidad Dependiente de Complemento (CDC), CM por Citometría de Flujo (CF) para la detección de anticuerpos de tipo IgG e IgM y FlowPRA (PRA) para la detección de anticuerpos anti-HLA de clase I y II (HLAI y HLAII).

**Resultados.** En el momento del trasplante, el análisis de anticuerpos por CDC resultó negativo, aunque mediante CF se pudo detectar la presencia de anticuerpos IgG específicos del donante que no fijan complemento. La presencia de estos anticuerpos decrece progresivamente con excepción de un pico observado a las dos semanas post-trasplante. Por su parte, el estudio mediante PRA de la presencia de anticuerpos anti-HLAI y II muestra que, en todas las sueros analizados, existe un porcentaje elevado de anticuerpos frente a antígenos HLAI, sin observarse presencia de anticuerpos anti-HLAII. Hasta el momento la evolución del trasplante es positiva, por lo que los anticuerpos anti-HLAI detectados mediante PRA no afectan a la viabilidad del injerto.

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que el papel protector del hígado observado en el doble trasplante hepato-renal está estrechamente relacionado con los antígenos HLA del donante, ya que los anticuerpos específicos frente a éste dejan de ser detectados.

**F-0019-06-O. ANALISIS DE DISCREPANCIAS EN LA ASIGNACION DE ANTIGENOS Y ALELOS HLA EN 442 TIPAJES CONFIRMATORIOS PREVIOS AL TRASPLANTE DE PROGENITORES HEMATOPOYETICOS.** D. Planelles<sup>1</sup>, G.F. Sanz<sup>2</sup>, P. Solves<sup>3</sup>, F. Moscardó<sup>2</sup>, E. Vila<sup>1</sup>, N. Puig<sup>1</sup>, D. Jarque<sup>1</sup>, R. Granell<sup>1</sup>, M. Gómez<sup>1</sup>, L. Súñer<sup>1</sup>, A. Moret<sup>1</sup>, M. Rodríguez<sup>1</sup>, R. Rodríguez<sup>1</sup>, J. Montoro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Biología Molecular y <sup>3</sup>Banco de Cordón Umbilical, Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. <sup>2</sup>Unidad de Trasplante de Médula, Hospital La Fe de Valencia.

Según la normativa dictada por la Federación Europea de Inmunogenética (EFI) en lo referente al «trasplante de médula y *stem cell*», para la selección final de un donante debe repetirse el tipaje HLA, en éste y en el receptor, con una nueva muestra, para confirmar el tipaje previo de cada uno (estándares I1.130 e I2.240, v5.3).

El **objetivo** de este trabajo ha sido analizar las discrepancias detectadas en la asignación de antígenos y/o alelos HLA en 442 tipajes confirmatorios previos al trasplante de progenitores hematopoyéticos, realizados durante un periodo de tres años (de 01.03.2001 a 29.02.2004).

La **metodología** seguida para el tipaje confirmatorio varió en función de que el trasplante fuera de donante emparentado o no-emparentado. En el primer caso, el tipaje confirmatorio de donante y receptor se realizó por métodos de ADN a nivel de 2 dígitos para los loci A, B y DRB (ó 4 dígitos en clase II -loci DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1 y DPB1- si el tipaje previo se realizó por técnicas de baja resolución). En el caso del trasplante no emparentado, el tipaje confirmatorio del

donante siempre se realizó por técnicas de ADN de alta resolución en clases I y II (loci A, B, C, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1 y DPB1). El tipaje del receptor se realizó a nivel de 2 ó 4 dígitos según el tipaje previo se hubiera realizado por técnicas de alta o baja resolución, respectivamente.

Los **resultados** obtenidos revelaron que en 28 de los 442 tipajes confirmatorios realizados (6.3%) se detectó al menos un resultado discrepante. De éstos, 16 casos discrepantes fueron identificados entre las 257 confirmaciones de muestras tipadas originalmente en un Centro Externo y 12 entre las 185 muestras tipadas previamente en nuestro propio Centro. Las discrepancias fueron clasificadas como sigue: discrepancias a nivel alélico (6 externas vs 1 interna); asignación incorrecta de antígeno (1 externa vs 2 internas) o de split serológico (1 externa vs 6 internas); homocigosis en serología vs heterocigosis por biología molecular (4 externas vs 2 internas); heterocigosis en serología vs homocigosis por biología molecular (1 externa y 1 interna); discrepancia debida a nomenclatura (1 externa), y discrepancia debida a error en la muestra (2 externas).

En **conclusión**, los resultados obtenidos revelan que el porcentaje de casos discrepantes detectados en nuestro Centro es muy similar al identificado con respecto a Centros Externos, aunque el tipo de discrepancia mayoritaria es diferente. Además, enfatizan la necesidad de realizar el tipaje HLA confirmatorio previo al trasplante de progenitores hematopoyéticos para optimizar, en la medida de lo posible, la evolución del mismo.

**F-0019-07-C. TRASPLANTE NO-EMPARENTADO DE PROGENITORES HEMATOPOYETI-COS: PROBABILIDAD DE ENCONTRAR UN DONANTE HLA-A/B/C/DRB1/DRB3-4-5/DQA1/DQB1/DPB1 TOTALMENTE IDENTICO.** D. Planelles<sup>1</sup>, G.F. Sanz<sup>2</sup>, D. Jarque<sup>1</sup>, F. Moscardó<sup>2</sup>, P. Solves<sup>3</sup>, E. Vila<sup>1</sup>, R. Granell<sup>1</sup>, M. Gómez<sup>1</sup>, L. Súñer<sup>1</sup>, A. Moret<sup>1</sup>, M. Rodríguez<sup>1</sup>, R. Rodríguez<sup>1</sup>, J. Montoro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Biología Molecular y <sup>3</sup>Banco de Cordón Umbilical, Centro de Transfusión de la Comunidad Valenciana. <sup>2</sup>Unidad de Trasplante de Médula, Hospital La Fe de Valencia.

La determinación de la compatibilidad HLA entre donante y receptor en el contexto de un trasplante de progenitores hematopoyéticos (TPH) no emparentado es una consideración que varía con el tiempo y de unos lugares a otros. En el momento actual, según la normativa dictada por la Federación Europea de Inmunogenética en enero de 2003, el requerimiento mínimo de tipaje HLA para la selección de un donante no emparentado para TPH consiste en la determinación de los genes HLA por técnicas de ADN de baja resolución, para clase I, y alta resolución, para clase II. En la mayor parte de los casos, esta normativa se aplica sólo a los loci considerados relevantes en el TPH (A, B y DRB1). Sin embargo, parece que otros loci HLA «secundarios», como HLA-C y -DPB1, puedan tener también una influencia importante en la evolución del mismo.

El **objetivo** de este trabajo ha sido analizar la probabilidad de encontrar un donante no-emparentado HLA-A/B/C/DRB1/DRB3-4-5/DQA1/DQB1/DPB1 totalmente idéntico y compararla con la probabilidad de identificar un donante sólo compatible a los loci clásicos A/B/DRB1.

Para ello se analizaron 223 donantes que habían sido seleccionados para 88 pacientes durante el periodo comprendido entre el 01.03.2001 y el 29.02.2004. El tipaje HLA tanto del donante como del

receptor se realizó por métodos de ADN a nivel de 4 dígitos en todos los loci (A, B, DRB1, DRB3/4/5, DQA1, DQB1 y DPB1).

Los **resultados** obtenidos revelaron que el nº medio de donantes seleccionados para cada paciente fue de  $2.53 \pm 1.3$  (rango 1-5). Para 7 de los 88 pacientes (8%) se encontró un donante HLA-A/B/C/DRB1/DRB3-4-5/DQA1/DQB1/DPB1 idéntico, y para uno de ellos se identificaron dos. Por tanto, el 9.1% de las parejas donante-receptor fueron HLA totalmente compatibles. Un 43.2% de los pacientes encontró un donante HLA compatible a nivel alélico en los tres loci clásicos A/B/DRB1; en el 56.8% restante todos los donantes seleccionados para un paciente presentaban al menos una disparidad alélica y/o antigénica en estos loci. Del total de parejas donante-receptor A/B/DRB1 compatibles (a nivel alélico), 71 presentaban alguna disparidad en los loci secundarios; de éstas en el 52.1% se detectó disparidad sólo en el locus DPB1 y en un 95.8% la disparidad en DPB1 aparecía acompañada de otra disparidad en C, DRB3/4/5, DQA1 y/o DQB1.

En **conclusión**, los resultados obtenidos revelan que la probabilidad de encontrar un donante no emparentado HLA-A/B/C/DRB1/DRB3-4-5/DQA1/DQB1/DPB1 totalmente idéntico es muy baja y que, de los loci secundarios, el locus DPB1 es el que presenta mayor disparidad.

**F-0019-08-C. ESTUDIO DE LA EFICACIA DEL TRASGÉN HUMANO DAF EN LA INHIBICIÓN DE LA CITOTOXICIDAD MEDIADA POR EL COMPLEMENTO EN LOS MODELOS DE XENOTRASPLANTE CERDO TRANSGÉNICO hDAF-BABUINO.** T. Díaz-Román, I. Moscoso, A. Centeno, D. Ortega, I. Santamarina, R. Mañez N. Doménech. Unidad de Investigación. CHU Juan Canalejo. A Coruña.

**Introducción.** La incapacidad para evitar el rechazo xenogénico humoral agudo (RXHA) en modelos de xenotrasplante cerdos-babuinos cuando se usan órganos de cerdos transgénicos que expresan la molécula reguladora del complemento humano DAF (hDAF), cuestiona la eficacia de estos modelos en la prevención del daño humoral.

**Objetivo.** Evaluar la capacidad funcional de la molécula transgénica hDAF para inhibir *in vitro* la acción citotóxica del complemento de sueros de primates sobre células porcinas.

**Metodología.** Mediante un ensayo de citotoxicidad mediado por complemento en citometría de flujo (CCCF) se analizó la capacidad lítica de: 1) sueros de babuinos sometidos a un xenotrasplante de corazón porcino o 2) una mezcla de sueros humanos (SHN), utilizando como dianas PBLs de cerdos hDAF-transgénicos. También se estudió por inmunofluorescencia los niveles de anticuerpos (Acs) anti- $\alpha$ Gal en dichos sueros, y el grado de expresión de moléculas hDAF o de epitopes  $\alpha$ Gal sobre los PBL porcinos empleados.

**Resultados.** La flexibilidad del ensayo CCCF permitió evaluar el grado de restricción inter-especie entre hDAF y la fuente de complemento. El trasgén humano fue capaz de inferir protección a las células de cerdos transgénicos frente a la citotoxicidad tanto de los sueros de babuino como del SHN, pero de forma muy variable. La molécula hDAF es más eficaz frente al complemento humano que al de babuino. El daño humoral producido por los sueros de los primates está directamente relacionado con la concentración de Acs anti- $\alpha$ Gal que contienen e inversamente relacionado con el grado de expresión de moléculas hDAF en las PBLs diana.

**Conclusión.** Los resultados confirman *in vitro* el papel protector de hDAF en células de cerdos transgénicos frente a la respuesta humoral de primates, independientemente de la especie de origen del complemento. Sin embargo, sugieren que el grado de protección disminuye en presencia de altos niveles de Acs anti-porcinos o de una baja expresión de hDAF.

**F-0019-09-C. HIPOGAMMAGLOBULINEMIA Y RIESGO DE INFECCION EN PACIENTES SOMETIDOS A TRASPLANTE CARDIACO TRATADOS CON ANTICUERPOS ANTI-RECEPTOR DE LA IL-2 (DACLIZUMAB).** E. Sarmiento<sup>1</sup>, J.J. Rodríguez-Molina<sup>1</sup>, J. Fernández-Yáñez<sup>2</sup>, J. Palomo<sup>2</sup>, P. Muñoz<sup>3</sup>, E. Bouza<sup>3</sup>, E. Fernández-Cruz<sup>1</sup>, J. Carbone<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Inmunología Clínica, Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Cardiología, <sup>3</sup>Servicio de Microbiología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.

**Introducción.** Las infecciones y el rechazo se encuentran entre las principales causas de mortalidad en pacientes sometidos a trasplante cardiaco (TC). La presencia durante el primer año de infecciones están asociadas a mayor riesgo de mortalidad.

**Objetivos.** Correlacionar la hipogammaglobulinemia post-TC y el riesgo de desarrollo de procesos infecciosos.

**Pacientes y Métodos.** Medimos niveles de inmunoglobulinas (por nefelometría) basales y el día 30 post-TC. N=29 pacientes en 2 grupos. Grupo A (n=14) [inducción con Daclizumab, MFm y prednisona (PDN)] y Grupo B (n=15) (inducción con ATGAM, azatioprina y PDN). Definimos infección a los episodios infecciosos que requirieron tratamiento específico. Establecimos asociación estadística entre el nivel de IgG al mes post-TC y el desarrollo de eventos infecciosos. Comparación de medias: prueba T de Student. Comparación de frecuencias: prueba exacta de Fisher.

**Resultados.** Se observó una disminución de los niveles de IgG en ambos grupos. Medias de los niveles basales y post-TC en grupos A y B: 1141 y 739 (p=0.002), 913 y 632 mg/dl (p=0.007), respectivamente. Globalmente la hipogammaglobulinemia (IgG <750 mg/dl) se asoció a un mayor riesgo de desarrollo de evento infeccioso (RR 8.75, p=0.034). En el grupo A, niveles de IgG <600 mg/dl se asociaron a mayor riesgo de desarrollo de enfermedad CMV (p=0.08). La media de descenso de IgG en ambos grupos fue similar (399 vs 344 mg/dl, p=0.59). La frecuencia de evento infeccioso en el grupo A fue inferior al grupo B (36 vs 73%, p=0.048). La frecuencia de rechazo que requirió tratamiento fue inferior en el grupo A (14% vs 47%, p=0.068).

**Conclusiones.** La hipogammaglobulinemia post-TC se asocia a mayor riesgo de desarrollo de evento infeccioso, lo que nos permite sugerir la realización rutinaria de niveles de IgG en el periodo pre y post-trasplante. Podría considerarse como medida del impacto del tratamiento inmunosupresor utilizado.

**F-0019-10-O. LUMINEX DETECTA ANTICUERPOS CONTRA ANTIGENOS HLA INDETECTABLES POR CDC.** M.S. Monteiro<sup>1</sup>, J.F. Teixeira<sup>1</sup>, G. Oliveira<sup>2</sup>, A. Castro Henriques<sup>3</sup>, E. Osório<sup>1</sup>, H. Alves<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro Histocompatibilidade do Norte, Porto, Portugal. <sup>2</sup>Hospital S.João, Porto. <sup>3</sup>Hospital G.Santo António, Porto

**Introducción.** Desde 1960 sabemos que los anticuerpos anti-HLA están implicados en el proceso de rechazo agudo y crónico del

alotransplante renal. Por eso es importante el conocimiento del perfil de anticuerpos en los pacientes en lista de espera para TX.

**Material y Métodos.** Nuestra población de 623 pacientes en lista activa para TX fué estudiada por CDC y Luminex LifeScreen (Orchid Diagnostics) y Luminex LifeMatch ID clase I y II (Orchid Diagnostics). Verificamos que 36 pacientes (5.7%) presentaban PRA por CDC repetidamente negativo y Luminex positivo para clase I y /o II (17 pacientes eran candidatos a 1º TX, 18 a 2º TX y 1 a 3º TX).

Por Luminex LifeScreen detectamos que 9 pacientes presentaban anticuerpos clase I, 17 clase I e II y 10 solamente para clase II.

En los 17 candidatos a 1º TX con anticuerpos, 16 eran de sexo femenino (100% con gravideces y/o transfusiones), y 1 de sexo masculino (con transfusión). En los 19 pacientes en espera del 2º/3º TX, fueron detectados anticuerpos anti-donante en 18 (94.7%).

**Conclusión.** 1) La utilización de esta nueva tecnología mas sensible, permitió elaborar el perfil de anticuerpos de estos pacientes. 2) Las especificidades detectadas van a llevar a la exclusión de estos candidatos no permitiendo su selección para el crossmatch cuando el donante presente los respectivos antígenos. Actualmente consideramos que CDC es una técnica útil, aunque insuficiente para la identificación de anticuerpos y realización de CM, incluso para el 1º TX.

**F-0019-11-C. HISTORIA NATURAL DE UNA INFECCIÓN POR HERPESVIRUS HUMANO 8 DURANTE EL CURSO DE UN TRASPLANTE HEPÁTICO.** P. Sánchez-Velasco<sup>1</sup>, J.J. Gómez-Román<sup>2</sup>, G. Ocejo-Vinyals<sup>1</sup>, F. Val Bernal<sup>2</sup>, F. Leyva-Cobián<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología, y <sup>2</sup>Anatomía Patológica, Hospital Universitario «Marqués de Valdecilla», Santander.

Presentamos el caso de un paciente al que se le realizó un trasplante de hígado con un antecedente de transfusión sanguínea por accidente de tráfico en 1969. En 1988 es diagnosticado de hepatitis por VHC, con hiperesplenismo y linfocitopenia. Poco después una biopsia hepática confirma un hepatoma que se acompaña de serología positiva para CMV. En 1999 se le realiza un trasplante de hígado y se inicia tratamiento inmunosupresor con prograf, coticooides, zovirax y cemidon. En mayo de ese año, experimenta un episodio de hepatitis con concentraciones elevadas de transaminasas y bilirrubina. Se le realiza una nueva biopsia exploratoria no observándose fenómenos de rechazo y si posibles lesiones secundarias a isoniazida. Ante una serología negativa a CMV y VHB, se realiza un estudio para detectar genomas de herpesvirus 6, 7 y 8 en sangre y tejidos procedentes de las biopsias mediante PCR, RT-PCR e hibridación *in situ* (ISH). Sólo se encontró DNA de HHV-8 en los dos tejidos procedentes de las biopsias y mediante ISH se confirmó la presencia de secuencias víricas en las células de Küpffer del hígado extraído y en hepatocitos de la segunda biopsia. Ante tal hallazgo se disminuyó la inmunosupresión farmacológica y se instauró tratamiento con ganciclovir. El paciente se encuentra asintomático hasta que sufre un nuevo episodio de hepatitis previa reinstauración del tratamiento inmunosupresor por temor a un rechazo. Se le realiza en este caso una batería serológica de virus hepatotropos siendo negativos todos excepto el HHV-8. Al final se trata con ganciclovir intravenoso y se le regula el tratamiento inmunosupresor regularizándose los niveles de transaminasas hasta el momento actual. Una última biopsia exploratoria después de este tratamiento confirma por ISH la presencia de secuencia vírica en células de Kupfer. Este trabajo confirma por primera vez en la literatura la asociación de una hepatitis a HHV-8.

**F-0019-12-C. RELACIÓN ENTRE INCOMPATIBILIDAD HLA CON RECHAZO AGUDO Y CRÓNICO, Y CON LA SUPERVIVENCIA DEL ALOINJERTO HEPÁTICO.** M. Muro<sup>1</sup>, R. Moya<sup>1</sup>, L. Marín<sup>1</sup>, M. Miras<sup>2</sup>, A. Minguela<sup>1</sup>, O. Montes<sup>1</sup>, N. Guerra<sup>1</sup>, M. Montes<sup>1</sup>, R. Robles<sup>3</sup>, M. Pérez-López<sup>1</sup>, F. Sánchez-Bueno<sup>3</sup>, J.M. Alemany<sup>1</sup>, A. García<sup>1</sup>, P. Parrilla<sup>3</sup>, R. Álvarez<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Medicina Digestiva y <sup>3</sup>Cirugía. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

La influencia de la compatibilidad HLA con trasplante hepático es materia de controversia. En este estudio, se examinó el efecto de la incompatibilidad HLA con la evolución en una serie de 342 trasplantes hepáticos consecutivos. El tipaje HLA clase I se realizó por métodos CDC y PCR-SSP y el de clase II mediante PCR-SSO y -SSP. Los datos se analizaron utilizando los tests de Fisher y 2, el método de Kaplan-Meier y el test generalizado de Wilcoxon.

Se observó una tendencia de asociación positiva entre una mayor identidad y un frecuencia de rechazo agudo incrementada, tanto en análisis de loci separados como agrupados (aunque no significativa), excepto en el locus DPB1. La identidad en HLA-A se asoció también con un incremento de la frecuencia de rechazo crónico ( $p < 0.01$ ). Asimismo, la incompatibilidad HLA-A también demostró un impacto significativo en supervivencia, comparando 2 vs 1 incompatibilidades (IC) (63% vs 46%;  $p = 0.03$ ), confirmando la observación previa en rechazo. Sin embargo, no había diferencias significativas en el análisis de los loci HLA-B, -DR y -DQ, aunque existía una tendencia hacia una mejor supervivencia del injerto con un mayor número de ICs A+B, DR, DQ, A+DR y B+DR Finalmente, es muy interesante el papel del locus DPB1, ya que la comparación entre la identidad total y la incompatibilidad total o parcial mostró diferencias significativas ( $p = 0.04$ ). La compatibilidad para A+B+DR también demostró un impacto significativo en la supervivencia del injerto, comparando 4 vs 6 ICs (48% vs 63%;  $p = 0.02$ ), 3-4 vs 5-6 ICs ( $p = 0.04$ ), y 0-4 ICs vs 5-6 ICs ( $p = 0.03$ ).

En conclusión, el desenlace del trasplante de hígado no se ve favorecido por un aumento del grado de compatibilidad para antígenos HLA, e incluso la ocurrencia de una menor compatibilidad favorece la supervivencia a largo plazo del aloinjerto hepático.

**F-0019-13-O. RECHAZO AGUDO VASCULAR MEDIADO POR ANTICUERPOS HLA EN UN RECEPTOR RENAL: DISCREPANCIAS ENTRE EL SCREENING POR FLOWPRA Y CDC VS LUMINEX.** M. Muro<sup>1</sup>, S. Llorente<sup>2</sup>, L. Marín<sup>1</sup>, R. Moya<sup>1</sup>, A. Minguela<sup>1</sup>, M. González<sup>2</sup>, L. Gimeno<sup>2</sup>, A. Prieto<sup>3</sup>, J. Alemany<sup>1</sup>, M. López<sup>1</sup>, A. García<sup>1</sup>, R. Álvarez<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Nefrología y <sup>3</sup>Urología. Hospital Virgen Arrixaca, Murcia.

Este trabajo presenta un caso clínico de presensibilización de un paciente, los diferentes métodos para la analizarla, los cuales no alcanzaron una detección correcta y como esto tuvo una relevancia clínica crucial. Una mujer de 45 años se trasplantó aparentemente no sensibilizada frente a antígenos HLA, con un screening por CDC con PRA=0%, sin historia de transfusiones o trasplantes previos. Antes del trasplante, la prueba cruzada (CM) por CDC fue negativa. En el 4º día postrasplante, la paciente presentó signos fuertemente sugestivos de rechazo agudo humoral. El CM con el suero postrasplante por CDC fue positivo y también los screenings CDC y FlowPRA™, detectando además un anticuerpo anti-A2 (el donante tenía A2) en alto título e

IgG. Realizamos también screening FlowPRA en el suero pretrasplante y resultó negativo, confirmando el screening CDC pretrasplante. Puesto que la nueva tecnología luminex era disponible en nuestro laboratorio, testamos el suero pretrasplante encontrando anticuerpos anti-A2 y -B7 en bajo título, los cuales no habían sido detectados por las técnicas CDC y FlowPRA. Por tanto, hicimos el tipaje familiar de la paciente (tuvo 3 hijos y 2 abortos, con su último embarazo hace 17 años). Los hijos tenían incompatibilidades A2 y B7 con su madre y los CMs CDC del suero pretrasplante de la paciente frente a las células T de los hijos fueron negativas mientras que los postrasplante fueron positivas. Por tanto, la sensibilización fue causada por exposición a antígenos HLA paternos, y el problema fue el no detectar prospectivamente estos anticuerpos pretrasplante por los métodos CDC y FlowPRA. Estos anticuerpos se detectaron retrospectivamente por tecnología luminex cuando la paciente ya había perdido el injerto renal. En conclusión, las diferentes metodologías para la detección de la sensibilización HLA podrían tener resultados discrepantes. Por el momento, la tecnología luminex parece ser la más sensible y segura para la detección de anticuerpos.

**F-0019-14-O. EL ESTUDIO DE CD95 EN CÉLULAS DE SP PERMITE DISCRIMINAR ENTRE RECHAZO AGUDO DEL INJERTO HEPÁTICO Y REINFECCIÓN POR HCV O HBV.** A. Minguela<sup>1</sup>, L.A. Marín<sup>1</sup>, R. López-Álvarez<sup>1</sup>, M. Muro<sup>1</sup>, M.R. Moya-Quiles<sup>1</sup>, A.M. García-Alonso<sup>1</sup>, A. Marín-Moreno<sup>1</sup>, M. Miras<sup>2</sup>, P. Ramírez<sup>3</sup>, J. Bermejo<sup>4</sup>, P. Parrilla<sup>2</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Medicina Digestiva, <sup>3</sup>Cirugía General y <sup>4</sup>Anatomía Patológica. Hosp. U. Virgen Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** La cirrosis hepática inducida por virus de la hepatitis C (HCV) y B (HBV) es una de las indicaciones más frecuentes de trasplante de hígado. La reinfección del órgano además parece ser un fenómeno universal en estos pacientes inmunosuprimidos y perjudica su evolución. A nivel clínico y anatomopatológico no siempre es posible diferenciar el rechazo agudo (RA) de la reinfección viral temprana, con el agravante de que la terapia antirrechazo en pacientes con HCV es causa importante de morbi-mortalidad.

**Objetivo.** Establecer un método que permita discriminar la activación celular inducida por RA y la inducida por reactivación de HCV o HBV, mediante el estudio de la expresión de moléculas expresadas en linfocitos de sangre periférica (SP).

**Pacientes y métodos.** En 47 trasplantados, 17 con infecciones pretrasplante de HCV o HBV (9 sufrieron RA) y 30 sin infecciones virales (10 con RA), se estudió por citometría de flujo la expresión de CD95, CD28 y HLA clase-I en células de SP, durante los periodos pre y post-trasplante.

**Resultados.** La intensidad media de fluorescencia (IMF) de CD95 fue significativamente mayor en linfocitos T, B y monocitos en pacientes con RA, especialmente durante la segunda semana post-trasplante. En pacientes preinfectados por HCV o HBV CD95 aumentó su expresión en linfocitos T más tempranamente (primera semana). CD28 y HLA clase-I sólo incrementaron su expresión en los pacientes con RA independientemente de la presencia o no de virus, mientras que CD95 lo hizo fundamentalmente en los pacientes infectados con virus, alcanzando el mayor valor en los pacientes infectados con RA.

**Conclusión.** El aumento temprano de expresión de CD95 en linfocitos T de SP, sin incremento simultáneo de CD28 y HLA clase-I, parece ser un indicador de la reactivación viral en trasplantados hepáticos

preinfectados con HCV o HBV. Esto permite su distinción del verdadero RA que cursa con un aumento casi en exclusiva de CD28 y HLA clase-I.

**F-0019-15-O. ANALISIS DEL POLIMORFISMO CD95 Y CD95L EN LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO HEPÁTICO.** L. Marín<sup>1</sup>, M. Muro<sup>1</sup>, M. Miras<sup>2</sup>, M.R. Moya-Quiles<sup>1</sup>, A.M. García-Alonso<sup>1</sup>, F. Sanchez-Bueno<sup>3</sup>, J. Bermejo<sup>4</sup>, P. Parrilla<sup>3</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Medicina Digestiva, <sup>3</sup>Cirugía y <sup>4</sup>Anatomía Patológica. H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** CD95 y su ligando (CD95L) son moléculas de superficie implicadas en fenómenos de apoptosis jugando un papel relevante en la regulación de la respuesta inmune a antígenos extraños y en la inducción de tolerancia periférica. Se han descrito dos polimorfismos para CD95 en su región 5' (-670 A/G y -1377 G/A) y dos para CD95L (IVS2nt-124 A/G y IVS3nt169 T/delT) en su intrón 2 y 3 respectivamente

**Objetivos.** Evaluar el efecto del polimorfismo de CD95 y CD95L en la evolución del injerto hepático, analizando su papel en la incidencia de rechazo agudo (RA), rechazo crónico (RC) y supervivencia del injerto en un periodo de seguimiento de 10 años.

**Métodos.** Se estudiaron un total de 144 receptores de un primer injerto hepático. El estudio de los polimorfismos de CD95 (-670) y CD95L (IVS2nt-124 e IVS3nt169) se realizaron por técnicas de RFLP. El polimorfismo CD95 (-1377) se realizó por amplificación específica de alelo (ASA).

**Resultados.** El análisis genotípico, alélico y haplotípico del polimorfismo de CD95 en sus dos posiciones no reveló diferencias significativas que afectaran a la incidencia de RA y RC. Sin embargo en el estudio de supervivencia del primer injerto hepático, se observó que los receptores que presentaban el genotipo AA en la posición -670 mostraban una supervivencia (S=40%) y un tiempo medio de supervivencia del injerto (TMS=4.72 años) significativamente (P=0.011) inferior a los pacientes que presentaba el genotipo GA (S=63.1%, TMS=6.82 años). Estas diferencias ya se manifiestan en el primer año de seguimiento. Por el contrario, la posición -1377 no parece tener ningún efecto en la supervivencia de injerto hepático. El análisis de polimorfismo de CD95L a nivel genotípico, alélico y haplotípico, no reveló diferencias en la incidencia de RA y RC y supervivencia.

**Conclusiones:** El genotipo AA en la posición -670 del CD95 parece disminuir la supervivencia del injerto hepático.

**F-0019-16-C. PAPEL DEL POLIMORFISMO DE CD86 +1057 EN LA EVOLUCIÓN DEL INJERTO HEPÁTICO.** L. Marín<sup>1</sup>, M.R. Moya-Quiles<sup>1</sup>, M. Miras<sup>2</sup>, M. Muro<sup>1</sup>, A. Minguela<sup>1</sup>, J. Bermejo<sup>3</sup>, R. Robles<sup>4</sup>, P. Parrilla<sup>4</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Medicina Digestiva, <sup>3</sup>Anatomía Patológica y <sup>4</sup>Cirugía. H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** CD86 es una molécula encargada de dar la señal coestimuladora necesaria para la activación de los linfocitos T, a través de su interacción con la molécula CD28. Recientemente se ha descrito la presencia de un polimorfismo en la región transmembrana (+1057 G/A) que genera un cambio del aminoácido alanina por treonina en el codón 304 (A304T) generando un potencial lugar de fosforilación.

**Objetivos.** Evaluar el efecto del polimorfismo de CD86 +1057 en la evolución del injerto hepático, analizando su papel en la inci-

dencia de rechazo agudo (RA), rechazo crónico (RC) y supervivencia del injerto en un periodo de seguimiento de 10 años.

**Métodos.** El estudio del polimorfismo de CD86 se realizó por secuenciación directa en ambas direcciones, en muestras de DNA extraídas de un total de 205 receptores de un primer injerto hepático.

**Resultados.** El análisis del genotipo CD86 +1057 (G/A) en la incidencia de rechazo agudo reveló la ausencia del genotipo AA en el grupo RA, mientras que en el grupo que no presentaba RA (NRA) se presentaba en un 8.8% de los pacientes (12/136). El análisis estadístico, comparando el genotipo AA frente al resto de genotipos, demostró la existencia de diferencias significativas ( $p=0.010$ ,  $OR=13.4$ ). En el estudio del polimorfismo de CD86 en la incidencia de RC no se observaron diferencias significativas. Sin embargo, al analizar su papel en la supervivencia del injerto se observó que los pacientes con el genotipo AA mostraban un mayor índice de supervivencia ( $S=83.3\%$ ) y un tiempo medio de supervivencia del injerto ( $TMS=8.99$  años) significativamente ( $P=0.049$ ) superior al de los pacientes que presentaba el genotipo GA ( $S=49.3\%$ ,  $TMS=5.85$  años).

**Conclusiones.** El genotipo AA en la posición +1057 de CD86 parece ejercer un papel relevante en la evolución de injerto hepático, ya que disminuye la incidencia de RA y mejora la supervivencia del injerto.

**F-0019-17-O. ANÁLISIS DE LA MOLÉCULA HLA-G EN BIOPSIAS DE MIOCARDIO Y HLA-G SOLUBLE EN INDIVIDUOS TRASPLANTADOS DE CORAZÓN.** J. Luque<sup>1</sup>, J. Marín<sup>1</sup>, J. M. Lozano<sup>1</sup>, A. Cabello<sup>1</sup>, M. J. García<sup>1</sup>, C. A. Ojeda<sup>1</sup>, R. Gonzalez<sup>1</sup>, F. López-Rubio<sup>2</sup>, J.M. Arizón<sup>3</sup>, R. Álvarez<sup>4</sup>, J. Peña<sup>4</sup>. Servicio de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica, <sup>3</sup>Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia<sup>4</sup>.

**Introducción.** Se ha visto que la proteína HLA-G inhibe la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos T al interactuar con receptores inhibidores NK. Nuestro grupo investiga las posibles correlaciones entre los niveles de HLA-G en biopsias de miocardio procedentes de corazones trasplantados y los grados de rechazo que estos presentaron durante el primer año después del trasplante.

**Métodos.** El análisis de la expresión de HLA-G se hizo por inmunohistoquímica usando el anticuerpo monoclonal IgG1 MEM-G/1, el análisis de los niveles de HLA-G soluble en suero fueron realizados por ELISA con el anticuerpo monoclonal 5A6G7.

**Resultados.** Cuando se estudió HLA-G en biopsias de miocardio de corazón trasplantado se encontró que: (i) En la primera semana después del trasplante, los corazones que presentaron uno o varios episodios de rechazo agudo, después de haber sido trasplantados, mostraron bajos niveles de expresión de HLA-G. Mientras que en corazones que no han presentado ningún tipo de rechazo agudo, después de haber sido trasplantados, se observó altos niveles de HLA-G. (ii) Cuando los niveles de expresión de HLA-G en biopsias de corazón trasplantado fueron comparados con el grado de rechazo que éstas presentaban se encontró que los niveles de esta molécula decrecían al aumentar la intensidad del rechazo agudo. Por otra parte, al analizar los niveles de HLA-G soluble se encontraron dos patrones de expresión de ésta molécula, uno que representa al 50% de los pacientes caracterizado por unos niveles estables y bajos de HLA-G soluble, mientras que el otro patrón mostraba un incremento significativo de los niveles de HLA-G soluble en el primer mes, que después vuelve a niveles bajos y estables.

**Conclusión.** Niveles altos de la molécula HLA-G en biopsias de miocardio, procedentes de pacientes de corazón trasplantado, pueden estar asociados con un mejor grado de aceptación del injerto, lo que refuerza la posible función tolerogénica de la molécula HLA-G en trasplantes.

**F-0019-18-C. RECEPTORES DE INJERTOS HEPÁTICOS QUE ALCANZAN TOLERANCIA A MEDIO PLAZO MUESTRAN UNA MODULACIÓN NEGATIVA DE CD80 Y CD86 EN LINFOCITOS EN SP.** M.R. López-Álvarez<sup>1</sup>, M. Miras<sup>2</sup>, L. Marín<sup>1</sup>, I. Marín<sup>1</sup>, N. Guerra<sup>1</sup>, P. Ramírez<sup>3</sup>, A.M. García Alonso<sup>1</sup>, R. Robles<sup>3</sup>, P. Parrilla<sup>3</sup>, A. Minguela<sup>1</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología, <sup>2</sup>Medicina Digestiva, <sup>3</sup>Cirugía General. H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** Estudios previos han revelado aumentos de linfocitos B (CD19+CD80+ y CD19+CD86+) y moléculas coestimuladoras asociadas al rechazo agudo (RA) en el primer mes postrasplante.

**Objetivos.** Estudiar si los cambios en estas poblaciones sirven para predecir la tolerancia inmunológica frente al injerto también a medio y largo plazo.

**Métodos.** El estudio incluye 50 trasplantes y, tras excluir retrasplantes y trasplantes multiorgánicos, el grupo quedó constituido por 43 trasplantes. Los pacientes se clasificaron en 2 grupos: RA y NRA. En total se han analizado por Citometría de flujo los linfocitos B con expresión de CD80 y CD86 en 258 muestras de SP correspondientes a los días 0, 7, 15, 30, 90 y >90 y se han determinado las variaciones respecto al valor pretrasplante ( $t=0$ ). comparando los resultados del grupo NRA con los del RA.

**Resultados.** Las cifras totales pretrasplante de linfocitos CD19, fueron superiores en el grupo NRA. El porcentaje de cambio en el número de linfocitos CD19+CD80+ y CD19+CD86+ y CD19+CD80+ CD86+ de pacientes NRA resultó inferior que el de los RA, y desde el primer mes postrasplante se incrementó paulatinamente hasta superar el tercer mes. Los cambios en CD80 y CD86 mostraban un patrón inverso, con diferencias significativas para esta última molécula ( $P<0.05$ ), la cual permaneció siempre por encima del nivel basal en el grupo RA, con un máximo aumento en la fecha de rechazo, mientras que en el NRA fue inferior al valor basal. La expresión de CD80 también mostraba diferencias, aunque su comportamiento fue más variable.

**Conclusiones.** Tanto las cifras de linfocitos CD19 de las células que expresan o coexpresan CD80 y CD86 como los cambios en la inducción de CD86 en membrana resultan útiles para predecir la buena aceptación o ruptura de tolerancia a corto y medio plazo. Además, la simple determinación del número de linfocitos B, puede ser orientativa sobre la evolución del trasplante.

Financiación: RED-GIT (G03/104), FIS.

**F-0019-19-C. EVALUACION DEL TIPAJE HLA CLASE I MEDIANTE SEROLOGIA Y BIOLOGIA MOLECULAR PCR SSO LUMINEX® Y SU APLICACIÓN EN UN BANCO DE CORDÓN UMBILICAL.** F. Sánchez Gordo, M.T. Martín Béjar, A. Carrasco Hidalgo, M.C. Hernández Lamas, M. Ortiz Pareja, I. Vidales Mancha, I. Prat. Centro de Transfusión Sanguínea y Banco de Tejidos de Málaga.

**Introducción.** La sangre de placenta ha demostrado ser una fuente de progenitores hematopoyéticos adecuada para su uso en el

rescate post-acondicionamiento en el trasplante de médula. Dado el número de muestras y el volumen de éstas, el tipaje HLA por métodos de biología molecular requiere la utilización de un método rápido, económicamente asequible, y de resultados fiables. Una vez validado en nuestro laboratorio, en este trabajo analizamos el tipaje HLA clase I por PCR SSO Luminex® vs. Serología.

**Material y métodos.** Entre enero del 2003 y febrero de 2004 hemos realizado el tipaje HLA de clase I de los loci A y B por serología de 563 muestras procedentes de sangre de cordones umbilicales. Los criterios para asignar un determinado alelo son la reactividad de al menos dos sueros monoclonales no compartidos. En aquellos casos en que sólo disponemos de un suero monoclonal, que la presencia de un alelo pueda estar enmascarando a otro, y en aquellos en que sólo aparece un alelo por loci, realizamos el tipaje de confirmación mediante PCR SSO Luminex®.

**Resultados.** Número de tipajes HLA clase I de cordones HLA por serología: 563, confirmaciones por biología molecular:

Locus HLA-A: 73 (12.9%) Homocigosis serológica: 35 (6.2%) Confirmaciones tipaje: 38(6.7%)

Locus HLA-B: 139 (24.68%) Homocigosis serológica: 37 (6.57%) Confirmaciones tipaje: 102 (18.11%)

Discrepancias entre el tipaje serológico vs. tipaje por biología molecular:

Locus A: 2 casos, (serológico A2,- y A32,- ; SSO: A\*01 \*02 y A\*01 \*32)

Locus B: 4 casos; (B7,- vs. B\*07\*40; B7,- vs. B\*07\*47; B45,- vs. B\*2702\*45AC; B35,- vs. B\*35\*4701)

Es interesante señalar la presencia de 23 casos de B45 serológico, de los cuales 19 (82.6%) fueron por biología molecular B\*45 y 4 (17.4%) se correspondían con B\*5002.

**Conclusiones.** Aunque el tipaje HLA por biología molecular es imprescindible para la confirmación de las reacciones serológicas débiles, así como para asegurar la posible homocigosis, el tipaje serológico sigue siendo una herramienta útil para el tipaje HLA clase-I, permitiendo clarificar determinados casos.

**F-0019-20-O. TRASPLANTE DE ISLOTES PANCREÁTICOS. EXPERIENCIA MÁLAGA. R. Briones, M. González Molina, A. Alonso, N. Fernández, A. Caballero, M. Cabello, M.G. Castro, D. Burgos, A. Navarro, E. Sola. Unidad de Trasplante de Islotes Pancreáticos y Servicio de Cirugía. Hospital Carlos Haya, Málaga.**

**Introducción.** Las modificaciones de la técnica de aislamiento de islotes pancreáticos humanos, así como la introducción de nuevos tratamientos inmunosupresores han permitido que el trasplante de islotes pancreáticos (IP) sea un tratamiento eficaz en pacientes con diabetes mellitus tipo 1 (DM1).

Presentamos la evolución, a tres meses, de dos pacientes trasplantados con islotes pancreáticos humanos.

**Material y métodos.** Dos pacientes de 41 y 36 años con DM1 (péptido C negativo) de 29 y 28 años de duración con episodios de hipoglucemia sin aviso con trasplante de riñón previo de evolución de 5 y 7 años de evolución. Recibieron dos implantes de IP en el hígado, tras canalización de la vena porta por punción percutánea hepática, bajo anestesia local. Tratamiento inmunosupresor: daclizumab, sirolimus, tacrolimus.

**Resultados.** Creatinina plasmática: 0.87 y 1.4 mg/dl. Péptidos C basales postimplante de 2.9 y 1.1 ng/ml. Recibieron 7.809 islotes

equivalente por kg de receptor (IE/kg) y 19.180 IE/kg respectivamente. Dosis de insulina pre-implante de 18 y 28 U/día; post-implante: ocasional (dosis 4-6 U/día) y U/día. No episodios posteriores de hipoglucemia sin aviso. Presión portal post-infusión: < 15 cm de agua. Ninguna complicación, salvo úlceras en mucosa oral en uno de ellos. Estancia hospitalaria: 72 h (un caso) y el resto de 17-20h.

**Conclusiones.** El trasplante de IP tiene baja morbilidad y es efectivo en un grupo seleccionado de pacientes con DM1.

**F-0019-21-O. CRIOGLOBULINEMIA ASOCIADA A INFECCION POR VHC TRAS TRASPLANTE HEPÁTICO (TXH) POR CIRROSIS SECUNDARIA A HEPATOPATIA POR VHC. E. Sarmiento, J.J. Rodríguez-Molina, J. Gil, E. Fernández-Cruz, J. Carbone. Unidad de Inmunología Clínica. Servicio de Inmunología. Hospital Universitario Gregorio Marañón. Madrid.**

**Introducción.** Tras el TXH por cirrosis secundaria a VHC se describe crioglobulinemia que puede ser sintomática. El VHC puede causar además una expansión B con diversidad clonal incluyendo linfomas no Hodgkin.

**Métodos.** Descripción de características clínicas e inmunológicas de un paciente con crioglobulinemia asociada a VHC y expansión de linfocitos B en el período post-TXH por cirrosis VHC, de tórpida evolución y difícil manejo.

**Resultados.** Estudio pre-trasplante hepático disponible: IgG 1060, IgA 158, IgM 671 mg/dl, FR 6930 UI/ml. Post-TXH seguimiento de 3-6 meses: crioglobulinemia mixta monoclonal IgM-kappa con FR; rango del criocrito: 2-9%; carga viral ARN-VHC en criocrito lavado: 4253550 copias/ml, genotipo 1b; expansión de linfocitos B: 10-36%; paraproteinemia IgM-kappa; sin paraproteinuria; FR en suero, en el sobrenadante de criocrito y en criocrito: 3540, 2940 y 3530 UI/ml, respectivamente; rango sérico del complemento: C4 2-4 y C3 28-42 mg/dl; IgG 216-461, IgA 31-81, IgM 89-376 mg/dl; CD4<200/mm3. Por crioglobulinemia e insuficiencia renal recibe tratamiento con plasmaféresis, desarrolla pancitopenia. Post-6 sesiones de plasmaféresis: criocrito 9-2%; FR sérico, en sobrenadante de criocrito y en criocrito: 1180, 1100 y 26 UI/ml; carga viral ARN-VHC en el suero, sobrenadante de criocrito y en el criocrito lavado: 285904, 266002 y 942456 copias/ml, respectivamente (revelan enriquecimiento de VHC en criocrito). Clínica relacionable con crioglobulinemia: insuficiencia renal, derrame pleural, polineuropatía.

**Conclusiones.** El estudio de seguimiento del TXH por VHC debe incluir crioglobulinemia, morbilidad asociada y descartar el desarrollo de linfomas no Hodgkin (desde expansiones de células B monoclonales no malignas). En este caso aunque se demostró el enriquecimiento de VHC en la crioglobulina y sintomatología atribuible no se pudo dar tratamiento antiviral por intensa leucopenia y trombopenia que lo contraindicaban. No se demostró la expresión de un linfoma B.

**F-0019-22-C. SCREENING DE ANTICUERPOS ANTI HLA MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO. M.E. Jiménez, C. Román, S. Cantisán, M. Miró, R. Solana, J. Peña. Departamento de Inmunología Hospital Reina Sofía. Córdoba.**

La determinación de anticuerpos anti HLA es necesaria antes de la realización de trasplantes de órganos. En los últimos años se



han desarrollado nuevos métodos, la introducción de las técnicas de ELISA y la citometría de flujo que facilita su diagnóstico.

El objetivo de nuestro estudio es un análisis comparativo de técnicas de screening de anticuerpos anti HLA clase I y clase II entre las técnicas de ELISA y de citometría de flujo para la detección simultánea de anticuerpos anti HLA clase I y clase II. Ambas técnicas detectan anticuerpos tipo IgG contra antígenos HLA. El uso de la técnica de citometría de flujo para el screening de anticuerpos anti HLA se basa en el uso de microesferas recubiertas con antígenos HLA purificados.

Para el estudio se seleccionó una serie de sueros de pacientes en lista de espera de trasplante renal. Un 61 % de los sueros fueron negativos para la presencia de anticuerpos anti HLA, un 38% presentaron anticuerpos anti HLA.

Si bien los resultados obtenidos utilizando ambas técnicas son comparables, la técnica de citometría es una técnica más sensible, más reproducible, y más fácil de usar en el laboratorio. Asimismo, los antígenos HLA se encuentran distribuidos en grupos cuyas especificidades son conocidas, lo que ayuda a interpretar las especificidades HLA reconocidas por los anticuerpos cuando los sueros positivos son estudiados mediante la técnica LABScreen PRA.

**F-0019-23-O. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI HLA EN PACIENTES POST-TRASPLANTE RENAL MEDIANTE CITOMETRÍA DE FLUJO.** C. Román, S. Cantisán, M. Miró, M.E. Jiménez, R. Solana, J. Peña. *Departamento de Inmunología Hospital Reina Sofía. Córdoba.*

El objetivo de nuestro trabajo consiste en determinar la presencia de anticuerpos anti HLA tras el trasplante y su influencia en la evolución del injerto renal.

Se han recogido los sueros de pacientes sometidos a trasplante de riñón durante el año 2003, de forma secuencial. Los sueros de los pacientes han sido analizados mediante la técnica de analizador de flujo utilizando microesferas marcadas con color recubiertas de antígenos HLA purificados. Se han determinado anticuerpos tipo IgG contra antígenos HLA clase I y clase II.

De los pacientes estudiados, un 6.6% presentaba anticuerpos anti HLA clase I y clase II previos al trasplante, un 2.2% presentaba anticuerpos anti HLA clase I y un 2.2% anticuerpos anti HLA clase II anteriores al trasplante.

Se ha estudiado la posible relación entre la aparición de anticuerpos anti HLA post-trasplante relacionados con el tiraje del donante con la evolución clínica del paciente.

El método de screening y determinación de especificidades utilizando microesferas recubiertas de antígenos HLA purificados es un método sensible y rápido, que nos permite determinar en un primer paso aquellos sueros positivos para la presencia de anticuerpos anti HLA orientando hacia las especificidades debido al uso de gru-

pos de microesferas cuyos antígenos HLA de superficie tienen una distribución conocida; y en un segundo paso conocer las especificidades de esos anticuerpos de una forma más precisa debido al uso de un antígeno único en la superficie de las microesferas.

Los resultados muestran la utilidad clínica de esta determinación, ya que existe una asociación entre la coexistencia de episodios de fracaso renal y la aparición de anticuerpos anti HLA.

**F-0019-24-C. ANÁLISIS DE LA MOLÉCULA HLA-G EN BIOPSIAS DE MIOCARDIO Y HLA-G SOLUBLE EN INDIVIDUOS TRASPLANTADOS DE CORAZÓN.** J. Luque<sup>1</sup>, J. Marín<sup>1</sup>, J. M. Lozano<sup>1</sup>, A. Cabello<sup>1</sup>, M.J. García<sup>1</sup>, C.A. Ojeda<sup>1</sup>, R. Gonzalez<sup>1</sup>, F. López-Rubio<sup>2</sup>, J. M. Arizón<sup>3</sup>, R. Álvarez<sup>4</sup>, J. Peña<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Servicio de Anatomía Patológica. <sup>3</sup>Servicio de Cardiología. Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. <sup>4</sup>Hospital Virgen de la Arrixaca, Murcia.

**Introducción.** Se ha visto que la proteína HLA-G inhibe la citotoxicidad mediada por células NK y linfocitos T al interactuar con receptores inhibidores NK. Nuestro grupo investiga las posibles correlaciones entre los niveles de HLA-G en biopsias de miocardio procedentes de corazones trasplantados y los grados de rechazo que estos presentaron durante el primer año después del trasplante.

**Métodos.** El análisis de la expresión de HLA-G se hizo por inmunohistoquímica usando el anticuerpo monoclonal IgG1 MEM-G/1, el análisis de los niveles de HLA-G soluble en suero fueron realizados por ELISA con el anticuerpo monoclonal 5A6G7.

**Resultados.** Cuando se estudió HLA-G en biopsias de miocardio de corazón trasplantado se encontró que: (i) En la primera semana después del trasplante, los corazones que presentaron uno o varios episodios de rechazo agudo, después de haber sido trasplantados, mostraron bajos niveles de expresión de HLA-G. Mientras que en corazones que no han presentado ningún tipo de rechazo agudo, después de haber sido trasplantados, se observó altos niveles de HLA-G. (ii) Cuando los niveles de expresión de HLA-G en biopsias de corazón trasplantado fueron comparados con el grado de rechazo que éstas presentaban se encontró que los niveles de esta molécula decrecían al aumentar la intensidad del rechazo agudo. Por otra parte, al analizar los niveles de HLA-G soluble se encontraron dos patrones de expresión de ésta molécula, uno que representa al 50% de los pacientes caracterizado por unos niveles estables y bajos de HLA-G soluble, mientras que el otro patrón mostraba un incremento significativo de los niveles de HLA-G soluble en el primer mes, que después vuelve a niveles bajos y estables.

**Conclusión.** Niveles altos de la molécula HLA-G en biopsias de miocardio, procedentes de pacientes de corazón trasplantado, pueden estar asociados con un mejor grado de aceptación del injerto, lo que refuerza la posible función tolerogénica de la molécula HLA-G en trasplantes.

## F-00201. Inmunidad antitumoral I: carcinomas de estirpe epitelial

**Moderadores:** José Luis Subiza Garrido-Lestache (Madrid), Manuel Martín Villa (Madrid)

**F-0020-01-C. IDENTIFICACIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA REGULACIÓN COORDINADA DE LA MAQUINARIA DE PROCESAMIENTO ANTIGÉNICO.** M.S. Martínez-Llamas<sup>1</sup>, E. Jiménez-Medina<sup>1</sup>, L. Paco<sup>1</sup>, I. Algarra<sup>2</sup>, A. García-Lora<sup>1</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología. H.U. Virgen de las Nieves, Granada. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén, Jaén.

Estudios anteriores de nuestro grupo con el sistema tumoral B9, derivado de un fibrosarcoma inducido químicamente con metilcolantreno (GR9), mostraron fenotipos distintos de variantes metastásicas dependiendo del estado inmune del huésped. Así en ratones BALB/c inmunocompetentes las variantes metastásicas presentaban un fenotipo H-2 de clase I (-), mientras que en ratones nude presentaban un fenotipo H-2 de clase I (+). Los estudios moleculares revelaron una baja expresión coordinada de diferentes componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico (APM) en las metástasis H-2 de clase I (-), expresándose normalmente estos componentes del APM en las metástasis H-2 de clase I (+).

Para investigar los genes implicados en la diferente expresión de los componentes del APM hemos construido bibliotecas de sustracción de c-DNA comparando poblaciones de mRNA derivadas de las distintas variantes metastásicas.

Las librerías de sustracción se realizaron comparando los mRNAs de las diferentes metástasis H-2 de clase I (+) (MN4.1 y MN4.5) con las metástasis H-2 de clase I (-) (MP12 y MP5). Los resultados mostraron que cada librería estaba compuesta por varios fragmentos de c-DNA los cuales fueron clonados y secuenciados. Las secuencias obtenidas se compararon en diferentes base de datos de c-DNA (NCBI Blast, Sanger). Resultados preliminares indican que los siguientes genes podrían estar implicados: Qa2 (Q8), AMP Deaminasa 1, interleukin1 receptor accessory protein-like 2 (IL-1 rap12), fibroblast growth factor receptor (Fgfr1), y AFG3-like protein 2.

En conclusión, los resultados muestran que estos genes pueden estar implicados en la regulación coordinada de la maquinaria de procesamiento antigénico.

**F-0020-02-O. METÁSTASIS MHC DE CLASE I POSITIVAS GENERADAS EN RATONES NUDE PROTEGEN CONTRA LA PROGRESIÓN TUMORAL DE METÁSTASIS MHC DE CLASE I NEGATIVAS GENERADAS EN RATONES INMUNOCOMPETENTES.** M.S. Martínez-Llamas, E. Jiménez-Medina, L. Paco, I. Algarra<sup>2</sup>, A. García-Lora<sup>1</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos e Inmunología. H.U. Virgen de las Nieves, Granada. <sup>2</sup>Departamento de Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén, Jaén.

En nuestro laboratorio hemos desarrollado un modelo tumoral constituido por variantes metastásicas derivadas de un fibrosarcoma, que presentan distintos fenotipos MHC de clase I dependiendo del estado inmune del huésped: MHC de clase I (-) en ratones BALB/c inmunocompetentes y MHC de clase I (+) en ratones nude.

Resultados anteriores mostraron que estas metástasis presentaban diferentes patrones de crecimiento e inmunogenicidad: en ratones inmunocompetentes las metástasis H-2 de clase I (+) eran más inmunógenas que las H-2 de clase I (-), siendo finalmente rechazados los tumores. Sin embargo, en ratones nude estas variantes metastásicas perdían esta inmunogenicidad.

Con el fin de investigar si las metástasis MHC de clase I (+) protegían frente a las metástasis MHC de clase I (-), se han realizado ensayos de inmunización *in vivo* a largo plazo. En estos ensayos se inyectaron en ratones inmunocompetentes 10<sup>6</sup> células de las metástasis H-2 de clase I (+), se reimmunizó al mes, para posteriormente inyectar a las dos semanas 10<sup>6</sup> células de las metástasis H-2 de clase I (-). Igualmente se han realizado ensayos de protección *in situ*, inyectando conjuntamente 10<sup>5</sup> células H-2 de clase I (+) con 10<sup>6</sup> células H-2 de clase I (-).

En los ensayos de inmunización a largo plazo, los resultados mostraron una protección del 75-100%, los tumores MHC de clase I negativos crecieron 4-5 mm para posteriormente regresar y ser finalmente rechazados por el animal. En los ensayos de inmunización *in situ*, se observó una protección similar del 50 al 100%. Estos últimos resultados indican que la respuesta inmune generada por los tumores MHC de clase I positivos es bastante potente y rápida en el tiempo.

En conclusión, nuestros resultados muestran que en animales inmunocompetentes las variantes metastásicas obtenidas en ratones nude, con expresión de moléculas de clase I en superficie, protegen contra la progresión de tumores generados por las variantes metastásicas MHC de clase I negativas.

**F-0020-03-O. REACTIVIDAD IgM EN SUEROS DE RATONES INMUNIZADOS CON CÉLULAS DE EHRlich FRENTE A CÁNCER DE COLON HUMANO A10+.** J.I. Tudela<sup>1</sup>, L. Moltó<sup>1</sup>, S. Hernández<sup>2</sup>, J. García-Asenjo<sup>2</sup>, J.L. Subiza<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicios de Inmunología y <sup>2</sup>Anatomía Patológica del Hospital Clínico San Carlos, Madrid.

**Introducción.** A10 es un anticuerpo monoclonal de clase IgM que reconoce un epitopo de tipo carbohidrato (CHO) presente en la membrana de las células del tumor murino de Ehrlich (ET). Además, este anticuerpo reconoce el core-6 glicano de MUC1 en cáncer de colon humano, siendo su expresión factor pronóstico positivo independiente. Datos previos indican que existen anticuerpos naturales de clase IgM, tanto en ratones como en humanos, capaces de reconocer células de ET y tumores de colon humano A10+. En ratones, tras inmunizar con células de ET, se elevan significativamente los niveles de IgM específica frente al CHO de estas células.

**Objetivos.** Valorar si mediante la inmunización con células de ET se obtienen anticuerpos de clase IgM que presenten reactividad frente a tumores de colon humano A10+.

**Métodos.** Hemos analizado la reactividad de los sueros de un grupo de ratones inmunizados con células de ET irradiadas (n=23) frente a CHO reconocidos por A10 (ELISA), así como frente a células tumorales (citometría de flujo) y piezas quirúrgicas derivadas de cáncer de colon humano con diferente grado de expresión del epitopo A10 (inmunofluorescencia).

**Resultados.** En todos los sueros se detecta IgM reactiva frente a los CHO de superficie de las células de ET. También se encuentra frente a células tumorales A10+ (humanas y murinas), pero no frente a células A10-. A su vez, estos sueros son altamente positivos frente a cortes de tumores xenogénicos (línea de colon humano HT29) y frente a cortes de cáncer de colon A10+ (pero no frente a su tejido normal) y negativos frente a especímenes de cáncer de colon que no expresan el epítipo A10. El grado de positividad de los sueros depende de la expresión de este epítipo. La reactividad sobre cortes de HT29 es absorbida por los carbohidratos de las células de ET.

**Conclusión.** Los sueros de los ratones inmunizados con las células de ET presentan IgM reactiva frente a los CHO de superficie de esta línea y frente a los tumores de colon humano A10+.

**F-0020-04-C. REACTIVIDAD DEL ANTICUERPO A10 Y DETECCIÓN DE ANTICUERPOS NATURALES IgM FRENTE A ADENOCARCINOMAS DE PROSTATA HUMANOS.** L. Moltó, J.I. Tudela, J. García-Asenjo, S. Hernández, J.L. Subiza. Servicio de Inmunología, Hospital Clínicos San Carlos, Madrid.

**Introducción.** A10 es un anticuerpo monoclonal de clase IgM que reconoce un epítipo de carbohidrato presente en adenocarcinomas colorectales humanos. Los niveles altos de expresión de este epítipo se correlacionan significativamente con un mayor intervalo libre de enfermedad y de supervivencia global. Se ha postulado que el mejor pronóstico observado en los adenocarcinomas colorectales depende de la presencia de anticuerpos naturales de tipo IgM que reaccionan con el epítipo de carbohidrato A10.

**Objetivos.** En este estudio hemos querido valorar la expresión del epítipo A10 en adenocarcinomas de próstata y la reactividad con anticuerpos naturales de tipo IgM.

**Resultados.** Mediante inmunofluorescencia y por técnicas inmunohistoquímicas sobre cortes de criostato hemos observado que A10 reacciona frente a las líneas de tumor de próstata humano DU145 y PC3, bien crecidas como tumor xenogénico en ratones inmunodeficientes o en cultivos *in vitro*. Por otra parte hemos observado que el grado de reactividad de los anticuerpos de clase IgM en individuos sanos frente a estos tumores de próstata correlaciona significativamente con la reactividad de A10. También hemos observado mediante análisis sobre cortes parafinados que el epítipo A10 está presente en la mayor parte de los especímenes quirúrgicos de adenocarcinomas de próstata humanos pero no entre el tejido sano circundante.

**Conclusión.** Los datos apoyan la existencia del epítipo A10 en adenocarcinomas de próstata humanos así como la existencia de anticuerpos naturales de clase IgM frente a dicho epítipo.

**F-0020-05-O. DENDRITIC CELLS DELIVERED INSIDE HUMAN CARCINOMAS ARE SEQUESTERED BY IL-8.** E. Feijóo<sup>1</sup>, C. Alfaro<sup>1</sup>, G. Mazzolini<sup>1</sup>, P. Serra<sup>2</sup>, I. Peñuelas<sup>2</sup>, A. Arina<sup>1</sup>, E. Huarte<sup>1</sup>, I. Tirapu<sup>1</sup>, B. Palencia<sup>1</sup>, J. Ruiz<sup>1</sup>, B. Sangro<sup>1</sup>, J.A. Richter<sup>2</sup>, J. Prieto<sup>1</sup>, I. Melero<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Division de Hepatología y Terapia Génica y <sup>2</sup>Departamento de Medicina Nuclear, Clínica Universitaria, Fundación para la Investigación Médica Aplicada (FIMA), Navarra.

In the course of a clinical trial consisting in intratumoral injections of Dendritic cells (DC) transfected to produce Interleukin-12

in patients suffering advanced cancer, the use of <sup>111</sup>In-labeled tracing doses of DC permitted the observation that most DC persisted inside tumor tissue instead of migrating out. In a search for factors that could explain this retention, it was found that tumors from patients suffering hepatocellular carcinoma, colorectal or pancreatic cancer, were producing IL-8 and that this chemokine attracted monocyte-derived dendritic cells that express both IL-8 receptors CXCR1 and CXCR2. Accordingly, neutralizing anti-human IL-8 monoclonal antibodies blocked the chemotactic attraction of DC by recombinant IL-8, the serum of the patients and tissue culture supernatants of human colon carcinomas. Interestingly, human DC injected inside human colon cancer xenografted in nude mice were retained inside tumor tissue in a IL-8-dependent fashion, as demonstrated using an IL-8-blocking monoclonal antibody. IL-8 production in malignant tissue and the responsiveness of DC to IL-8 are a likely explanation of the clinical images which suggest the retention of DC inside human malignant lesions. Impairment of DC migration into lymphoid tissue could be involved in cancer immune-evasion and therefore interference with IL-8 functions should be considered therapeutically.

**F-0020-06-O. LA EXPRESIÓN DE B7-1 (CD80) A BAJOS NIVELES SIRVE DE MECANISMO DE ESCAPE A CARCINOMAS DE COLON.** I. Tirapu<sup>1</sup>, M.P. Colombo<sup>2</sup>, M. Zaratiegui<sup>1</sup>, A. Arina<sup>1</sup>, P. Berraondo<sup>1</sup>, P. Fortes<sup>1</sup>, J. Prieto<sup>1</sup>, L. Chen<sup>1</sup>, I. Melero<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro de Investigación Médica Aplicada (CIMA). Universidad de Navarra, Pamplona. <sup>2</sup>Department of Experimental Oncology, Immunotherapy and Gene Therapy Unit, Istituto Nazionale Tumori, Milan (Italia). <sup>3</sup>Department of Immunology, Mayo Clinic, Rochester (USA).

**Introducción.** Se ha observado en repetidas ocasiones que la sobreexpresión de CD80 (B7-1) y CD86 (B7-2) en células tumorales las hace más inmunogénicas y susceptibles de rechazo. Para que se produzca este proceso es necesaria la unión de estas moléculas al CD28 expresado en células T. CD80 puede unirse a otro ligando (CTLA-4) por el que tiene mucha más afinidad que por CD28. Cuando CTLA-4 se une a CD80 transmite una serie de señales que inhiben la activación linfocitaria.

**Objetivos.** Encontrar una explicación a la observación de que varias líneas de cáncer de colon de ratón y de otros orígenes expresan en su membrana una forma no mutada de CD80 a niveles bajos.

**Métodos.** Se han empleado varias líneas de cáncer de colon, melanoma y linfoma de ratón. Se han analizado sus niveles de expresión de CD80 por citometría de flujo, RT-PCR y Northern Blot. Se ha estudiado la tumorigenicidad de estas líneas y de variantes en las que se ha silenciado CD80 mediante siRNAs.

**Resultados.** CD80 es expresado a niveles bajos en una serie de líneas celulares de diversos cánceres de ratón. La secuencia de nucleótidos de la forma expresada y la que aparece en las bases de datos son idénticas. A los niveles en que es expresado en estas células, CD80 es capaz de unirse a la proteína de fusión CTLA-4Ig pero no a CD28Ig. Variantes de estas líneas celulares en las que se ha silenciado CD80 no son capaces de producir tumores en ratones inmunocompetentes pero sí en ratones inmunodeficientes.

**Conclusiones.** La expresión de bajos niveles de CD80 en células tumorales parece ser un mecanismo utilizado por algunos tumores para escaparse del sistema inmunitario.

**F-0020-07-C. ESTUDIO DE LINFOCITOS T DE MUCOSA EN PACIENTES CON CÁNCER GÁSTRICO EN UN MODELO T-HVS.** A. Valeri<sup>1</sup>, N. Aguilera<sup>1</sup>, M. López-Santalla<sup>1</sup>, C. Rodríguez Juan<sup>1</sup>, J.M. Martín Villa<sup>1</sup>, A. Gutiérrez<sup>2</sup>, I. Lasa<sup>2</sup>, M. Javaloyes<sup>2</sup>, J. Granell<sup>2</sup>, M. Pérez Blas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Cirugía General y Digestivo. Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA). Alcalá de Henares. Madrid.

**Introducción.** Considerando las distintas alteraciones descritas en células T de pacientes con cáncer gástrico y la función de vigilancia del sistema inmunológico frente a las transformaciones cancerosas, nos propusimos estudiar la funcionalidad de los linfocitos T infiltrantes de tumor para valorar su capacidad de respuesta antitumoral.

**Objetivos.** Para ello, llevamos a cabo el estudio de las células T de mucosa gástrica de pacientes con adenocarcinoma de estómago, en un modelo de líneas T transformadas con *Herpesvirus saimiri* (HVS).

**Metodología.** Hemos inmortalizado con HVS células T de mucosa gástrica de pacientes, obteniendo 9 líneas T-HVS, de ellas 7 CD4+ y 2 CD8+. Infectado células T de mucosa de intestino delgado de 2 controles obtuvimos 1 línea T-HVS CD4+ y 1 línea T-HVS CD8+. Se ha medido la proliferación de dichas líneas tras estímulo con IL-2, anti-CD3 y anti-CD2.

**Resultados.** Con el método de infección HVS, cabe esperar la ventaja selectiva de las células CD8+. Sin embargo, la elevada proporción de líneas T-HVS CD4+ obtenidas (78%) refleja una singular condición de activación de las células T CD4 de mucosa de los pacientes, como lo indica la mayor expresión de CD25. La respuesta proliferativa *in vitro* vía CD2, CD3, o con IL2 de las células T-HVS de los pacientes es significativamente menor ( $p < 0.01$ ,  $p < 0.01$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) que la de los controles. Las diferencias en la respuesta de las líneas T-HVS de los pacientes no dependen del tipo de cáncer (intestinal o difuso), ni de que los linfocitos T procedan de mucosa de zonas sana, intermedia o tumoral.

**Conclusiones.** Hay un defecto funcional de los linfocitos T de mucosa en los pacientes con cáncer gástrico cuando se activan las vías de CD3 o CD2, no corregible con IL-2 exógena. Las responsables de la menor respuesta proliferativa son las células T-CD4, no las T-CD8.

**F-0020-08-C. CORRELACIÓN ENTRE ALTERACIONES FENOTÍPICAS Y FUNCIONALES DE CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGRE PERIFÉRICA Y PARÁMETROS CLÍNICOS EN PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.** M. López-Santalla<sup>1</sup>, A.P. Valeri Lozano<sup>1</sup>, M. Pérez-Blas<sup>1</sup>, N. Aguilera-Montilla<sup>1</sup>, A. Gutiérrez<sup>2</sup>, J. Martín<sup>2</sup>, J.M. Muguerza<sup>2</sup>, F.J. Granell<sup>2</sup>, J.M. Martín-Villa<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Cirugía General y Digestivo. Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA). Alcalá de Henares. Madrid.

**Introducción.** A pesar de los mecanismos para frenar el avance tumoral, muchos tumores escapan a la respuesta inmunitaria.

**Objetivos.** En el presente trabajo se realiza una evaluación

inmunológica en pacientes con adenocarcinoma gástrico. Los resultados obtenidos se correlacionaron con parámetros clínicos.

**Metodología.** 16 pacientes con adenocarcinoma gástrico fueron clasificados según el sistema de clasificación de la *Japanese Society for Research of Gastric Cancer* atendiendo a curabilidad (a, b y c) y tipo de resección (R0, R1 y R2). Las células mononucleares de los pacientes se estudiaron fenotípicamente y funcionalmente. Para el análisis estadístico, se utilizaron los test robustos de Rust and Fligner (significativo,  $p < 0,05$ ) y de Mee (significativo cuando el valor 0,5 estuviera ausente en el intervalo de confianza).

**Resultados.** Se observaron diferencias significativas en la expresión de CD3, CD28 y CD45 entre pacientes con curabilidad a+b o c y el grupo control.

Los porcentajes de CD4 y CD8 disminuyen significativamente en los pacientes con curabilidad c en relación al grupo control. En la respuesta a CD3 se observan diferencias entre el grupo de pacientes con curabilidad c y resección R1+R2 y el grupo control. El porcentaje de células CD3 y CD45 es menor en R0 y R1+R2 que en el grupo control.

**Conclusiones.** Los pacientes con adenocarcinoma gástrico muestran una peor situación inmunológica. Aquellos pacientes con peor pronóstico (curabilidad C y resección R1 y R2) presentaron una disminución en el número de células CD3, CD4, CD8, CD28, CD45 y en la respuesta a CD3. Disfunciones del sistema inmune se asocian con una mayor agresividad del proceso tumoral.

**F-0020-09-O. ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE CD3z Y EN LA MOVILIZACIÓN DE CALCIO EN LINFOCITOS T INFILTRANTES DE TUMOR, INMORTALIZADOS CON HERPESVIRUS SAIMIRI DERIVADOS DE PACIENTES CON ADENOCARCINOMA GÁSTRICO.** M. López-Santalla<sup>1</sup>, A.P. Valeri Lozano<sup>1</sup>, N. Aguilera-Montilla<sup>1</sup>, M. Pérez-Blas<sup>1</sup>, A. Gutiérrez<sup>2</sup>, I. Lasa<sup>2</sup>, L. García-Sancho<sup>2</sup>, F.J. Granell<sup>2</sup>, J.M. Martín-Villa<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología. Facultad de Medicina. Universidad Complutense de Madrid. Madrid. <sup>2</sup>Servicio de Cirugía General y Digestivo. Hospital Universitario Príncipe de Asturias (HUPA), Alcalá de Henares. Madrid.

**Introducción.** El sistema inmune posee varios mecanismos para frenar el avance tumoral. A pesar de ello muchos tumores escapan a la respuesta inmunitaria, debido, en muchas ocasiones, a defectos en la transducción de señales encontradas en linfocitos T.

**Objetivos.** Estudios *in vitro* de la movilización de calcio y la expresión de la cadena CD3 $\zeta$  del TCR en líneas TIL-HVS (Linfocitos infiltrantes de tumor inmortalizados con un virus linfotrópico, *Herpesvirus saimiri*).

**Metodología.** Se realiza la transformación con HVS de linfocitos T aislados a partir de muestras de mucosa de pacientes con adenocarcinoma gástrico con el fin de obtener líneas celulares T. Tanto el análisis de la expresión de la cadena CD3 $\zeta$  como los estudios de movilización de calcio se realizaron por citometría de flujo, en este último caso utilizando Fluo3-AM y estudiando la concentración de calcio en el citoplasma en respuesta a diferentes estímulos (CD3, crosslinker e ionomicina).

**Resultados.** Las líneas de los pacientes mostraron una menor expresión de la cadena CD3 $\zeta$  (37,4% vs 45,9%) y una defectuosa movilización de calcio en respuesta a CD3.

**Conclusiones.** Los resultados obtenidos revelan que los pacientes con adenocarcinoma gástrico muestran ciertos defectos en la trans-

ducción de señales de las líneas TIL-HVS, lo que facilitaría la posibilidad del tumor de escapar de la respuesta inmunitaria.

**F-0020-10-C. RELACIÓN DE LAS VARIANTES GENOTÍPICAS DE HLA CLASE I Y II CON EL CÁNCER DE MAMA Y SU PRONÓSTICO.** R. Lavado-Valenzuela<sup>1</sup>, M. Benavides<sup>2</sup>, I. Ales<sup>2</sup>, A. Alonso<sup>1</sup>, A. Caballero<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Sección de Oncología Médica. Hospital Carlos Haya, Málaga.

**Introducción.** La mayoría de los estudios de HLA en cáncer de mama han sido confinados a clase I, aunque el importante papel de los «T helper cell» en el inicio, regulación y mantenimiento de la respuesta inmune antitumoral justifican el estudio de clase II. Numerosos estudios en varias poblaciones humanas han investigado si hay alguna asociación entre HLA clase I y II y desarrollo del carcinoma de mama, aunque la mayoría no han encontrado ninguna correlación, salvo estudios aislados. Algunos equipos han encontrado correlaciones de algunos alelos y variables clínicas de las pacientes.

**Objetivo.** Nuestro objetivo es llevar a cabo un estudio en el que se correlacionen los distintos alelos HLA clase I y II y la evolución de las pacientes de cáncer de mama en nuestra área de influencia.

**Material y Método.** Se tiparon las variantes genotípicas de HLA clase I y II en 132 pacientes diagnosticadas de cáncer de mama y 73 controles sanos, pertenecientes a la provincia de Málaga, por el método PCR-SSP. Se recogieron diversos datos clínicos de cada paciente, incluyendo tamaño del tumor, grado histológico, nº de ganglios afectados, presencia de receptores de estrógeno, edad, estado menopáusico y evolución.

**Resultados.** Se encontró una sobre expresión del alelo HLA-B7 en pacientes con respecto a controles ( $p=0.023$ ,  $RR=2.375$ ,  $95\% CI 1.117-5.049$ ). Cuando se consideró la relación entre HLA y factores pronóstico no se encontró asociación.

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren una débil asociación entre el alelo HLA-B7 y susceptibilidad a cáncer de mama en nuestra área de influencia y, por tanto, que este alelo puede estar más asociado a susceptibilidad que a pronóstico de la enfermedad, al contrario de lo que se sugiere en otros estudios.

**F-0020-11-C. AUSENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-CENP-F EN SUEROS DE PACIENTES CON CÁNCER VESICAL.** A. Fernández-Suárez<sup>1</sup>, V. Menéndez López<sup>2</sup>, I. Wichmann Schlipf<sup>1</sup>, M. Encarnación Carrizosa<sup>1</sup>, N. Respalda Salas<sup>1</sup>, J.A. Galán Llopis<sup>2</sup>, A. Núñez Roldán<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología. Hospitales Universitarios Virgen del Rocío. Sevilla. <sup>2</sup>Servicio de Urología. Hospital General Universitario de Elche. Alicante.

**Introducción.** El antígeno CENP-F es una proteína de 330 kD regulada por el ciclo celular. El gen que codifica esta proteína está situado en el cromosoma 1 (q32-41), región implicada en varios tipos de cáncer (pulmón, mama). Los autoanticuerpos anti-CENP-F (Ac.CENP-F) son poco frecuentes en enfermedades autoinmunes, y ocasionalmente aparecen asociados a tumores de origen epitelial. No obstante, en la literatura no existen trabajos que estudien los Ac.CENP-F en el cáncer vesical.

**Objetivos.** Determinar la presencia de Ac.CENP-F en pacientes con neoplasia vesical, así como la distribución de patrones de inmu-

nofluorescencia indirecta (IFI) y correlacionarla con las variables anatomopatológicas estudiadas.

**Métodos.** Se recopilaron 241 sueros a pacientes diagnosticados de cáncer de vejiga tras cistoscopia. Se analizaron las variables estadio, grado, primario/recidiva, papilar/sólido, multifocalidad, tamaño tumoral, adenopatías y metástasis. Además, se incluyó un grupo de 200 controles sanos. Se realizó una técnica convencional de IFI en cada suero sobre sustrato HEp-2 a una titulación inicial de 1/80.

**Resultados.** No se observó ningún patrón compatible con la morfología del CENP-F. Se obtuvo un 49.8% de anticuerpos antinucleares positivos (120/241) en el grupo de pacientes con cáncer, en contraposición al 6.5% (13/200) hallado en el grupo control. Los patrones nucleares detectados en los pacientes con cáncer fueron: moteado fino (84.1%), homogéneo (7.1%), moteado fino y nucleolar (3.5%), moteado grueso (2.7%) y nucleolar (2.7%). A nivel citoplasmático se encontraron 11 sueros con cuerpo intermedio, así como un patrón atípico golgi-like en 7 casos. En cuanto a las variables anatomopatológicas consideradas, el porcentaje de patrones tanto nucleares como citoplasmáticos se incrementaba con el estadio.

**Conclusiones.** El cáncer vesical, a diferencia de otros tumores epiteliales descritos, no induce una mayor frecuencia de Ac.CENP-F que puedan ser detectados mediante IFI.

**F-0020-12-C. LA PERDIDA DE HETEROCIGOSIDAD (LOH), ES UN MECANISMO MUY POCO FRECUENTE DE ALTERACIÓN EN LA EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS HLA EN CARCINOMAS RENALES DE CÉLULAS CLARAS.** I. Maleno<sup>1</sup>, L. Paco<sup>1</sup>, M.A. López Nevot<sup>1</sup>, B. Seliger<sup>2</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto Analisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen Nieves, Granada. <sup>2</sup>Department of Internal Medicine, Johannes Gutenberg University, Mainz, Germany.

La pérdida de expresión de moléculas HLA de clase I es un mecanismo usado por las células tumorales para eludir la vigilancia del sistema inmune, al evitar su reconocimiento por los linfocitos T citotóxicos. Existen múltiples mecanismos moleculares por los que se producen estas alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase. En diferentes tumores epiteliales se ha descrito que la pérdida de heterocigosidad (LOH) en la región 6p21.3 es un mecanismo que con mucha frecuencia va a originar la pérdida de un haplotipo HLA, que oscila entre un 40 a un 50% dependiendo del tumor analizado.

Hemos estudiado la frecuencia de LOH en la región 6p21.3 en 50 tumores renales (45 de tipo células claras y 5 cromóforos), analizando 7 microsatélites.

A los casos que presentaron LOH en 6p21, se les realizó tipaje genómico de baja resolución (SSO) para definir el haplotipo perdido usando el Kit Dynal RELI® HLA-A, B, C, y DR

Hemos encontrado una baja frecuencia de LOH, solo 3 de 45 RCC de células claras analizados (6.6%). Por el contrario, en los RCC de tipo cromóforo, esta frecuencia fue 10 veces mayor, 3 de los 5 casos analizados.

Estos resultados indican que la LOH en 6p21.3 es un mecanismo que con poca frecuencia es origen de alteraciones de las moléculas HLA de clase I en tumores renales de células claras. Además los tumores cromóforos difieren, no solo por un criterio histopatológico, sino también en las alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I. Estos resultados pueden ayudarnos a comprender el diferente comportamiento biológico de estos dos subtipos de carcinomas renales.

**F-0020-13-C. BAJOS NIVELES TRANSCRIPCIONALES DE PROTEÍNAS QUE INTERVIENEN EN LA EXPRESIÓN DE LAS MOLÉCULAS DE CLASE I EN TUMORES TRANSICIONALES DE VEJIGA CON PERDIDA TOTAL DE HLA-ABC.** J.M. Romero<sup>1</sup>, P. Jiménez<sup>2</sup>, J.M. Cózar<sup>2</sup>, T. Cabrera<sup>1</sup>, M. Tallada<sup>2</sup>, S. Pedrinaci<sup>1</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>, F. Ruiz-Cabello<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Análisis Clínicos, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Universidad de Granada, Granada. <sup>2</sup>Servicio de Urología, Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Universidad de Granada, Granada.

La pérdida completa de expresión de moléculas HLA de clase I en tumores es un hecho relativamente frecuente y ha sido relacionado con mecanismos de escape tumoral frente al sistema inmune que reaccionaría contra antígenos tumorales presentados a través de las moléculas HLA de clase I. En un estudio anterior comprobamos un descenso transcripcional de  $\alpha 2$ -microbulina ( $p \leq 0.002$ ) y cadena pesada de HLA de clase I ( $p \leq 0.003$ ) en 11 tumores de vejiga que presentaban ausencia total de expresión de HLA clase I mediante inmunohistoquímica en comparación con 10 tumores que presentaban una expresión completa de sus moléculas HLA de clase I. En el presente estudio hemos comparado los niveles transcripcionales de proteínas pertenecientes a la maquinaria de procesamiento antigénico entre estos dos grupos. Los niveles transcripcionales se midieron mediante PCR cuantitativa a partir de ARN obtenido de nidos tumorales microdisectados y se comparó el nivel transcripcional de LMP-2, LMP-7, TAP-1, TAP-2 y tapasina mediante el cálculo de la razón (número de copias de ARN mensajero de la molécula estudiada) / (número de copias de ARNm de G6PDH). El dividir por el número de copias del gen de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa tiene como finalidad corregir diferencias en la cantidad de ARNm obtenido de cada muestra.

El test de Mann-Wittney puso de manifiesto que existen diferencias transcripcionales estadísticamente significativas entre los dos grupos estudiados (LMP2  $p \leq 0.001$ ; LMP7  $p \leq 0.001$ ; TAP1  $p \leq 0.002$ ; TAP2  $p \leq 0.005$ ; tapasina  $p \leq 0.009$ ). La baja transcripción de estas moléculas combinada a la de  $\alpha 2$ -microglobulina y cadena pesada de HLA de clase I produciría así la falta de expresión de moléculas HLA de clase I en los tumores transicionales de vejiga. Los resultados obtenidos sugieren la existencia de un mecanismo común de regulación coordinada de todos estos elementos.

**F-0020-14-C. INHIBICIÓN DE LA MADURACIÓN FUNCIONAL DE LINFOCITOS CITOTÓXICOS T CD4 EN EL CARCINOMA RENAL METASTÁSICO.** T. Rodríguez, J. Cantón, J.M. Cózar, T. Cabrera, T. Méndez, M. Tallada, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. Servicio de Análisis Clínicos y Urología. Hospital U. Virgen de las Nieves. Granada.

**Introducción.** Entre los múltiples mecanismos por los que las células tumorales escapan al control inmunológico, se encuentran el que los linfocitos infiltrantes parecen adquirir un estado de anergia que dificulta una correcta estimulación inmunológica. La última etapa en la diferenciación de las células T CD8 conlleva la adquisición del potencial citotóxico de estas células debido a la alta expresión de moléculas como granzimas y perforinas. Este desarrollo y diferenciación funcional corre paralela a cambios en la expresión de las moléculas CD27 y CD28 sobre la membrana de las células TCD8 y TCD4. Estas

moléculas son necesarias para una correcta estimulación de los linfocitos, y desaparecen de la membrana en la esta última etapa de diferenciación. Finalmente, ha sido observado en el curso de infecciones crónicas que un fallo en la maduración final de estas células puede estar relacionado con la resistencia y control de la infección.

**Metodología.** Hemos estudiado la expresión de CD45RO, CD27, CD28 en los linfocitos infiltrantes de 37 casos de cáncer renal metastásico y hemos comparado la proporción de células con función-efectora, CD8/CD45RO+/CD28-/CD27-/ y CD4+/CD45RO+/CD27-CD28- con la observada en sangre periférica de los pacientes. Los linfocitos fueron obtenidos sin tratamiento enzimático, tras disgregación mecánica y analizados mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales marcados.

**Resultados.** El porcentaje de células memoria T CD4 y T CD8 con fenotipo CD45RO+/CD27+/CD28+ fue el predominante en los TILs y hubo diferencias significativas con lo encontrado en la sangre periférica de los pacientes. Sin embargo, cabe destacar que mientras la frecuencia de células TCD4+/CD27- se incrementó en los TILs no ocurrió lo mismo para la expresión de CD28, siendo por tanto el fenotipo predominante el de células CD4/CD45RO/CD27-/CD28+. Además este hallazgo fue más evidente en los TILs intratumorales y en menos proporción en los linfocitos infiltrantes de la interfase peritumoral. Paralelamente tampoco se evidenció un aumento significativo de células CD8/CD27-/CD28- en los TILs.

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que en el microambiente tumoral no se produce una total maduración de los linfocitos TCD4 memoria hacia linfocitos T CD4-efectores. Esta insuficiente co-estimulación de los linfocitos T CD4 puede frenar el desarrollo de respuestas funcionales citotóxicas de CTLs en el tumor.

**F-0020-15-O. ANÁLISIS DEL INFILTRADO LINFOCITARIO EN CÁNCER RENAL HUMANO.** R. Méndez, J. Cantón, J.M. Cózar, T. Cabrera, T. Rodríguez, M. Tallada, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. Servicio de Análisis Clínicos y Urología. Hospital U. Virgen de las Nieves. Granada.

**Introducción.** El cáncer renal metastásico se encuentra dentro de los tumores que son susceptibles de una terapia inmunológica. El papel central de la inmunidad celular T en el desarrollo de respuestas citotóxicas es algo ya establecido. Pese a esto, los tumores crecen aún en la presencia de un infiltrado linfocitario importante por lo que parece evidente que este infiltrado inflamatorio no es capaz de montar una eficiente respuesta inmunológica. Muchas son las estrategias que evitan la respuesta inmune por parte de los tumores. Algunas de estas estrategias, consisten en la modificación del microambiente tumoral para impedir una respuesta citotóxica eficiente.

**Objetivos.** Análisis fenotípico de la composición del infiltrado inflamatorio, peritumoral e intratumoral y en sangre periférica en pacientes con cáncer renal y correlación con parámetros clínico patológicos.

**Metodología.** Citometría de flujo utilizando marcadores de células T, B, NK, de quimiocinas, CXCR3, CCR5, CCR4, CD45RO, CD62L, CD25, CD95. Un total de 37 pacientes fueron analizados en paralelo en muestras simultáneas derivadas de la sangre periférica y de la pieza tumoral.

**Resultados.** Hemos encontrado una considerable presencia de células NK en el infiltrado inflamatorio, un predominio de células CD4 con expresión de receptores CXCR3/CCR5/CD45RO y fenotipo memoria. La elevada proporción de células NK contrastó con la observada

en tumores de mama y colon donde la presencia de estas células fue minoritaria. En gran parte de los casos se pudo evidenciar una correlación entre los niveles de células NK en sangre de los pacientes y el grado de infiltración NK. La presencia de éstas células disminuyó significativamente en pacientes con diseminación metastásica. De igual manera hemos observado una disminución de porcentaje de células CD4, con expresión de marcadores CXCR3/CCR5 (potencialmente células TH1) y un aumento progresivo de células CD4/CCR4 y de células inmunoregulatoras CD4/CD25, en pacientes con metástasis. Finalmente no hubo diferencias significativas al comparar el fenotipo de las células infiltrantes en el tumor y de las localizadas en la interfase.

**Conclusiones.** Las células con fenotipo NK son un componente importante del infiltrado inflamatorio en el cáncer renal humano que lo diferencia sustancialmente de otros tipos de cáncer y que deber de ser consecuencia de la liberación de factores quimiotácticos desde el microambiente tumoral. El componente mayoritario T es de células CD4 con fenotipo memoria y expresión de receptores de quimioquinas CXCR3/CCR4. Esta peculiar composición del infiltrado puede explicar la susceptibilidad de algunos pacientes con cáncer renal a terapias inmunológicas que activan células NK y células citotóxicas. Parece existir un cambio progresivo en tumores más avanzados con una mayor presencia de células TCD4/CCR4 (potencialmente TH2) y de células Tr CD4/CD25+, que pueden contribuir a la inhibición de respuestas citotóxicas.

**F-0020-16-O. LOH EN  $\beta$ 2-MICROGLOBULINA EN TUMORES HUMANOS.** *C.M. Cabrera, I. Maleno, L. Paco, T. Cabrera, M.A. López Nevot, F. Garrido. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.*

Es conocida la importancia de las alteraciones en la expresión de antígenos HLA de clase I como mecanismo de escape de los tumores frente al sistema inmune. Estas alteraciones, puestas de manifiesto con el análisis inmunohistológico de diversos tumores, han permitido definir distintos fenotipos, para los que se han postulado distintos mecanismos moleculares de producción, implicándose a las alteraciones en la  $\beta$ 2-m en la producción de la pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I (Fenotipo I).

Hemos analizado mediante el empleo de microsatélites la frecuencia de LOH de  $\beta$ 2-microglobulina, empleando como marcadores el D15S126 (centromérico) y D15S209 (telomérico), en un total de 95 carcinomas de colon y 70 carcinomas de laringe que habían sido previamente estudiados para la expresión de moléculas HLA de clase I.

Los carcinomas de laringe y de colon analizados presentaron un 40% y un 42% de LOH de  $\beta$ 2-m respectivamente. Al relacionar la presencia de LOH en  $\beta$ 2-microglobulina con la expresión de moléculas HLA de clase I, encontramos LOH en  $\beta$ 2-microglobulina en un 40-50% de aquellos tumores que presentaban pérdida de un haplotipo HLA, 25-30% de los que presentaban pérdida de expresión de

un locus HLA, 30-40% de los que presentaban pérdida de un alelo. Encontramos la máxima frecuencia en aquellos casos con fenotipo compuesto, pérdida de un haplotipo más pérdida de un alelo HLA con un 60-66% de pérdidas. En los casos con pérdida total de expresión, encontramos un porcentaje muy desigual en los tumores estudiados, 15% en carcinomas de colon, 50% en carcinomas de laringe. Cabe subrayar la presencia de LOH en  $\beta$ 2-microglobulina en tumores sin alteraciones en la expresión de moléculas HLA de clase I en un 25% de los carcinomas de laringe y un 50% de los tumores de colon.

En los tumores estudiados, no hemos encontrado evidencia de que la LOH de la  $\beta$ 2-microglobulina sea más frecuente en los tumores con pérdida total de expresión de moléculas HLA de clase I.

**F-0020-17-O. PÉRDIDAS DE ALELOS HLA DE CLASE I EN TUMORES HUMANOS.** *I. Maleno, C.M. Cabrera, L. Paco, T. Cabrera, M.A. López Nevot, F. Garrido. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital Universitario Virgen de las Nieves. Granada.*

En el reconocimiento antigénico llevado a cabo por el receptor clonotípico de los LT es de igual relevancia no sólo la naturaleza del péptido presentado sino también el alelo específico HLA de clase I. En un panel de 70 carcinomas de laringe y 95 tumores colorrectales hemos analizado tanto a nivel inmunohistológico (expresión en superficie) como genómico (estudio con microsatélites) la frecuencia de pérdida de alelos del locus HLA-B y HLA-A así como su relevancia.

En el grupo de tumores de laringe, encontramos alelos con una alta frecuencia de pérdidas con un 60-90%, entre los que se encuentran el B44 y el B14. En ambos alelos éste porcentaje de pérdidas se dividen por igual entre genotípicas y fenotípicas (expresión en superficie). En el locus HLA-A los alelos presentaron una baja frecuencia de pérdida de expresión, (14-30%) entre los que se encuentran A24, A3 y A29. En A24 y A3 las cifras de pérdidas genómicas y fenotípicas fueron semejantes. En A29 sin embargo, las pérdidas detectadas corresponden a pérdidas genómicas.

Igualmente, en los tumores de colon encontramos alelos HLA-B, A que pierden la expresión con una alta frecuencia, 50-75%, como B44, B7 y A29. De estos, los alelos HLA-B presentan un porcentaje de pérdidas fenotípicas mucho mayor que el de pérdidas genómicas, al contrario de lo que ocurre con A29. Dentro del locus HLA-A encontramos alelos con baja frecuencia de pérdidas, de entre 14-30%, A2 y A24, en el primero con predominio de pérdidas fenotípicas y el segundo con predominio de pérdidas genómicas.

La frecuencia con la que se pierde de expresión de alelos HLA de clase I es distinta dependiendo del locus y el alelo que se trate, siendo más alta para el locus HLA-B. El mecanismo por el que se producen estas pérdidas es también diferente para cada alelo. Diferencias que podrían ser explicadas tal vez por la capacidad inmunogénica de los péptidos que presentan.

## F-00202. Inmunidad antitumoral II: melanoma y neoplasias hematopoyéticas

*Moderadores:* Ernesto Roldán Santiago (Madrid), José Antonio Brieva Romero (Cádiz)

**F- 0021-01-O. RESISTENCIA A IFN-GAMMA POR ALTERACIONES EN LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN STAT-JAK EN UNA LINEA DE MELANOMA.** R. Méndez, T. Rodríguez, J.M. Romero, J. Cantón, F. Garrido, F. Ruiz-Cabello. Servicio de Análisis Clínicos. H. U. Virgen de las Nieves, Granada.

**Introducción.** Los interferones y otras citocinas intervienen como mecanismo de defensa antitumoral a la vez que incrementan la expresión de moléculas MHC de clase I y II, interviniendo en los procesos de señalización mediante la fosforilación de restos de tirosina de sus receptores, que a su vez fosforilan proteínas tirosinas quinasas de la familia JAK y a activadores transcripcionales de la familia STAT. STAT-1 puede actuar como un gen supresor al inducir un efecto proapoptótico mediado por p53.

**Objetivos.** Estudiar la inducibilidad a IFN-gamma de 66 líneas de melanoma mediante la expresión de moléculas de HLA de clase I.

**Metodología.** Citometría de flujo con anticuerpos monoclonales monomorficos ( $\beta$ 2-microglobulina y HLA-ABC para medir respuesta a interferon). Western blot para estudio de fosforilación de STAT-1/JAK2 con anticuerpos específicos para residuos fosforilados.

**Resultados.** Una única línea de las 66 estudiadas presentó resistencia a la acción del IFN-gamma. La línea presentó ausencia de fosforilación de STAT-1 después del tratamiento con IFN-gamma. Sorprendentemente, la línea experimentó a su vez una caída brusca en los niveles de expresión de STAT-1. Por el contrario STAT-1 fue fosforilado en el residuo Tyr701 tras tratamiento con IFN- $\alpha$  en ausencia de modificación de los niveles de STAT-1 y produjo una inducción de moléculas HLA de clase I a las 48 horas.

**Conclusiones.** La resistencia a la inducibilidad por IFN-gamma puede ejercerse por la regulación negativa de STAT-1 en células de melanoma. A su vez, este efecto puede alterar la susceptibilidad de la línea a agentes inductores de apoptosis.

**F-0021-02-O. ALTA FRECUENCIA DE HOMOLOGICIDAD DE LA REGION HLA EN LINEAS DE MELANOMA COMPATIBLE CON UNA PERDIDA DE HETEROLOGICIDAD.** T. Rodríguez, R. Méndez, F. Ruiz-Cabello, M.A. López Nevot, L. Paco, I. Maleno, G. Pawelec, F. Garrido. Servicio de Análisis Clínicos. Hospital U. Virgen de las Nieves. Granada.

**Introducción.** La transformación maligna de células de melanoma esta frecuentemente asociada con la expresión anormal de los antígenos leucocitarios humanos (HLA). La pérdida o baja regulación de estas moléculas constituye uno de los mecanismos de escape utilizados por una gran variedad de tumores humanos para evadir la respuesta antitumoral mediada por linfocitos T citotóxicos.

**Objetivos.** Análisis genotípico y fenotípico de la región HLA en líneas celulares de melanoma. Un total de 61 líneas de melanoma fueron caracterizadas para la expresión de los genes de HLA de clase I y clase II.

**Resultados.** De todas las células estudiadas un 14,8 % fueron genotípicamente homocigotas para la región HLA. La frecuencia de homocigocidad fue significativamente alta en comparación con el grupo control (1.6%). Para identificar la razón de esta alta frecuencia de homocigocidad de la región HLA, se investigó la presencia de deleciones genéticas mediante el estudio de cinco pares de marcadores de microsatélites. En la mayoría de los casos los marcadores de la región 6p y 6q mostraron un patrón con un único alelo indicando probablemente la pérdida total o parcial de cromosoma 6. Aunque el DNA autólogo normal de los pacientes no pudo ser obtenido ni analizado, la retención de heterocigocidad para alguno de los marcadores de microsatélites sugieren la presencia de deleciones hemizigotas.

**Conclusiones.** Nuestros resultados son compatibles con una alta frecuencia de deleciones hemizigotas, en la región 6p. La pérdida de heterocigocidad del cromosoma 6 puede situarse en el contexto de la existencia de un gen supresor o la consecuencia de un fenómeno de inmunoselección que facilite el escape sobre antígenos inmunodominantes.

**F-0021-03-O. CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA DE MELANOMA ANDO-2.** L. Paco<sup>1</sup>, E.M. Jiménez-Medina<sup>1</sup>, M. Martínez-Llamas<sup>1</sup>, I. Maleno<sup>1</sup>, A. García-Lora<sup>1</sup>, M.A. López-Nevot<sup>1</sup>, P. Coulie<sup>2</sup>, F. Garrido<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Serv. Análisis Clínicos, Hospital Univ. Virgen de las Nieves, Granada. <sup>2</sup>Unite Genetique, Louvain University, Brussels.

En este estudio hemos definido el fenotipo y genotipo HLA de la línea ANDO 2 y su relación con el potencial tumorigénico en ratones nude.

Los linfocitos antólogos de ANDO-2 presentan el genotipo: HLA-A\*0201/3201, HLA-B\*1302/4001, HLA-Cw\*0304/0602, HLA-DRB1\*0101/1501 y HLA-DQB1\*0501/0602. Los estudios de LOH usando un panel de marcadores STRs en la región HLA y la realización de tipaje genómico confirmaron la pérdida del haplotipo: A\*0201, B\*1302, Cw\*0602, DRB1\*0101, DQB1\*0501.

El análisis por citometría de flujo reveló que la expresión de HLA B60(40) era normal, mientras que A 32 y DR 15 tenían una expresión baja. El alelo HLA A\*3201 tras un tiempo en cultivo perdió por completo su expresión que no se pudo recuperar tras inducción con INF- $\gamma$ . El estudio de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico fue normal.

Para determinar el potencial tumorigénico de la línea ANDO-2 inyectamos en ratones nude cinco millones de células. Transcurrido un mes se observó el crecimiento local en el lugar de la inyección de un tumor. El tumor fue extirpado y adaptado a cultivo denominándose ANDO2-NUDE. Esta línea tumoral ANDO2-NUDE no expresa las moléculas de HLA de clase I (A 32, B60(40)) pero sí HLA de clase II (DR 15). Tras inducción con INF- $\gamma$  se recupera la expresión de HLA B60(40) pero no de A 32. Antes de la inducción no se detectó transcripción de ninguno de los componentes de la maquinaria de procesamiento antigénico, que se recuperó por la acción de INF- $\gamma$ .

La línea ANDO-2 durante su proceso de adaptación en cultivo y su crecimiento en ratones nude, ha ido acumulando alteraciones



en la expresión de moléculas HLA. Este modelo es de interés para conocer los genes implicados en el control de la regulación de la maquinaria de procesamiento antigénico y de los genes HLA, y su relación con el proceso oncogénico.

**F-0021-04-O. LOS LINFOCITOS T CD8+ QUE EXPRESAN RECEPTORES NK PRESENTAN UN FENOTIPO ACTIVADO Y ESTÁN INCREMENTADOS EN PACIENTES DE MELANOMA.** J.G. Casado<sup>1</sup>, R. Soto<sup>2</sup>, O. de la Rosa<sup>1</sup>, E. Peralbo<sup>1</sup>, M.C. Muñoz Villanueva<sup>3</sup>, L. Rioja<sup>2</sup>, J. Peña<sup>1</sup>, R. Solana<sup>1</sup>, R. Tarazona<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Departamento de Biología Celular, Fisiología e Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad de Córdoba. <sup>2</sup>Servicio de Cirugía Plástica y <sup>3</sup>Unidad de Investigación, Hospital Universitario Reina Sofía, Córdoba. <sup>4</sup>Área de Inmunología, Departamento de Fisiología, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Cáceres.

Linfocitos T CD8+ expresan receptores asociados a células NK (NKR) que pueden regular su función citotóxica. En este trabajo hemos caracterizado la expresión de varios NKR en sangre periférica de linfocitos T CD8+ de enfermos de melanoma en comparación con donantes sanos. El análisis incluye receptores HLA-I específicos (KIRs, ILT2 y CD94/NKG2) y otros receptores NK como CD57, CD56 y CD16.

Los linfocitos T CD8+ de pacientes de melanoma mostraron una alta variabilidad en la expresión de NKR, así como una expresión incrementada de KIR2DL2/L3/S3, CD57 y CD56. NKG2D está expresado en la mayoría de células T CD8+ tanto en melanoma como en individuos sanos. Además hemos encontrado en estos pacientes una expansión de células T CD8+ CD27- CD28-. Esta subpoblación parece estar totalmente diferenciada al mostrar un fenotipo CD56+, CD244+ y altos niveles de perforina. La expresión de NKR estuvo principalmente restringida a la población de linfocitos T CD8+ CD28-.

Los resultados de este trabajo sugieren que el aumento en la expresión de NKR en células T podría contribuir al resultado final de la respuesta inmune frente al melanoma, estimulando o inhibiendo la activación y diferenciación a células efectoras.

**F-0021-05-O. POLIMORFISMO DEL GEN HLA-E EN PACIENTES CON MELANOMA.** M.R. Moya-Quiles<sup>1</sup>, J.A. Martínez-Escribano<sup>2</sup>, N. Guerra<sup>1</sup>, M. Muro<sup>1</sup>, L. Marín<sup>1</sup>, J.A. Campillo<sup>1</sup>, J.F. Frias<sup>2</sup>, A.M. García-Alonso<sup>1</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Servicio de Dermatología. H.U. Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** HLA-E es una molécula HLA de clase I no clásica que presenta péptidos de la secuencia líder de otras moléculas HLA de clase I no clásicas, y que es reconocida por las células NK. Los genes del sistema HLA influyen en la susceptibilidad a un gran número de patologías, entre ellas algunas neoplasias y se ha demostrado en líneas tumorales que la estabilización de HLA-E en membrana es mayor en líneas que expresan el alelo HLA-E<sup>G</sup>. En este contexto, el estudio del polimorfismo del HLA-E podría ser relevante en melanoma.

**Objetivos.** Evaluar el polimorfismo del HLA-E en pacientes con melanoma y su posible influencia en la susceptibilidad a la enfermedad.

**Métodos.** El tipaje HLA-E se realizó mediante secuenciación directa del exon 2, intron 2 y exon 3 de la secuencia de este gen, en muestras de DNA extraídas de un total de 100 pacientes con melanoma y 100 individuos sanos no relacionados de la misma población utilizados como individuos control, empleando el equipo ABI Prism 377 Sequencer de Applied Biosystems (Foster City, CA).

**Resultados.** El análisis del tipaje HLA-E reveló la presencia de los alelos HLA-E\*0101, HLA-E\*01032 y HLA-E\*01031 con frecuencias de 69%, 61% y 26% en controles y de 74%, 53% y 24% en pacientes con melanoma. Los alelos HLA-E\*0102 y HLA-E\*0104 no se detectaron en ninguno de los individuos tipados.

**Conclusiones.** Nuestros resultados muestran una distribución similar de los alelos HLA-E en pacientes con melanoma y controles y sugieren que el polimorfismo del HLA-E *per se* no juega un papel en la susceptibilidad a esta patología.

**F-0021-06-C. ESTUDIO DEL FENOTIPO CD28 EN LINFOCITOS T ALPHABETA CD8+ QUE EXPRESAN MARCADORES NK Y EN CÉLULAS T GAMMADelta EN PACIENTES CON MELANOMA.** J.A. Campillo<sup>1</sup>, J. Martínez-Escribano<sup>2</sup>, N. Guerra<sup>1</sup>, L. Marín<sup>1</sup>, A. García-Alonso<sup>1</sup>, J. Frias<sup>2</sup>, M.R. Álvarez-López<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Dermatología. Hospital Universitario Virgen de la Arrixaca. Murcia.

**Introducción.** Los linfocitos T TCRab+ que expresan marcadores de células NK y las células T TCRgd+ juegan un papel en la inmunovigilancia tumoral. La activación de ambas poblaciones puede estar mediada por co-estimulación a través de la molécula CD28, cuya expresión en superficie disminuye tras una estimulación antigénica crónica *in vivo*.

**Objetivos.** Estudiar el número de linfocitos T TCRαβ + CD8+ bright que expresan los marcadores NK (CD56, CD57 o CD161) y de células T TCRγδ+ circulantes, en relación con la expresión en superficie de la molécula co-estimuladora CD28, en pacientes con melanoma y en un grupo control. Analizar la expresión de perforina en las poblaciones de interés.

**Métodos.** El estudio de marcadores de superficie e intracitoplasmáticos se ha realizado mediante citometría de flujo en sangre periférica de pacientes con melanoma cutáneo primario y un grupo control.

**Resultados.** Se detectó un aumento no significativo en el número de células T CD8+brightCD57+CD28- en pacientes, sin cambios en el número de células CD56+. En paralelo, se observó un aumento significativo en el número de linfocitos T CD8+brightCD161+CD28- y una disminución significativa de los linfocitos T CD8+brightCD161+ CD28+ en pacientes respecto al grupo control (p<0.05). Además, el análisis de las células T TCRγδ+ reveló un incremento significativo de esta población cuando perdía la expresión de CD28 (p<0.05). Es interesante destacar que un porcentaje elevado de linfocitos T CD8+brightCD161+ y de células T TCRgd+, con fenotipo CD28-, expresaba altos niveles de perforina a diferencia de las células CD28+.

**Conclusiones.** El número de linfocitos T TCRαβ+CD8+brightCD161+ CD28- y de células T TCRγδ+CD28- circulantes está significativamente más elevado en pacientes con melanoma cutáneo primario que en la población control. Células con estas características fenotípicas expresan perforina, lo que sugiere un posible papel de estas subclases celulares en la defensa contra el tumor.

**F-0021-07-O. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-BIOLÓGICAS, INMUNOFENOTÍPICAS, FUNCIONALES Y MOLECULARES DE LAS CÉLULAS NK CD56-/+DÉBIL MONOCLONALES.** M. Lima<sup>1</sup>, J. Almeida<sup>2,3</sup>, A. Garcia Montero<sup>2,3</sup>, M.A. Teixeira<sup>1</sup>, M.L. Queirós<sup>1</sup>, A.H. Santos<sup>1</sup>, A. Balanzategui<sup>3,4</sup>, A. Estevino<sup>1</sup>, M.C. Alguero<sup>2,3</sup>, P. Bárcena<sup>2,3</sup>, S. Fonseca<sup>1</sup>, M.L. Amorim<sup>1</sup>, J.M. Cebada<sup>1</sup>, L. Pinho<sup>1</sup>, M. Gonzalez<sup>2,3,4</sup>, J.F. San Miguel<sup>3,4</sup>, B. Justiça<sup>1</sup>, A. Orfao<sup>2,3</sup>. <sup>1</sup>S<sup>o</sup> Hematología Hosp.Sto Antonio, Porto, Portugal. <sup>2</sup>S<sup>o</sup> Citometría. Univ. Salamanca. <sup>3</sup>CICáncer. Univ. Salamanca. <sup>4</sup>S<sup>o</sup> Hematología. Hosp.Univ. Salamanca.

**Introducción.** En la mayoría de los casos descritos de síndromes linfoproliferativos crónicos de células NK (SLPc-NK) la población celular expandida es CD56<sup>+</sup>, sólo esporádicamente se han descrito casos de linfocitosis NKCD56-/+débil.

**Objetivo.** Estudiar las características clínico-biológicas de pacientes con linfocitosis de células NK grandes granulares CD56-/+débil maduras y analizar las características fenotípicas, funcionales y moleculares de las células expandidas.

**Métodos.** Se incluyeron 26 casos diagnosticados de SLPc-NKCD56-/+débil y como grupos control 15 pacientes con infección vírica aguda, 15 casos con linfocitosis crónica de células NK y 12 individuos sanos. El análisis fenotípico-funcional se realizó sobre muestras de sangre periférica por citometría de flujo, se descartó reordenamiento TCR clonal mediante biología molecular, y en casos seleccionados se hizo estudio de clonalidad mediante el test HUMARA sobre muestras purificadas.

**Resultados.** Los pacientes tenían un curso clínico indolente, aunque con frecuentes citopenias, infecciones y neoplasias asociadas. Las células NKCD56-/+débil se diferenciaban de los controles en que expresaban niveles anormalmente bajos de CD11b, CD7, CD38, CD57 y CD16, y más intensos de CD2, CD11c y CD94 además de la baja expresión o ausencia de CD56; un mayor porcentaje de ellas eran HLA-DR<sup>+</sup>. El análisis de clonalidad mostró un patrón monoclonal del cromosoma X inactivado. Funcionalmente las células expandidas producían IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , sin diferencias con las células NKCD56<sup>+</sup>. En todos los casos se descartó la presencia de reordenamiento clonal del TCR.

**Conclusión.** Los pacientes con expansiones clonales de células NKCD56-/+débil tienen un curso clínico indolente aunque con frecuentes citopenias, infecciones y neoplasias asociadas. Las células clonales muestran un fenotipo aberrante de activación (CD56-/+débil/CD11b-/+débil) y un patrón de producción de citocinas TH1.

Financiación: Proyecto 02/1244(FIS, M de Sanidad y Consumo). PB es becaria de la USAL (Ref: 430).

**F-0021-08-C. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE SUBPOBLACIONES LINFOIDES T DE MÉDULA ÓSEA EN PACIENTES CON GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.** M. Pérez de Andrés<sup>1,2</sup>, M. Martín-Ayuso<sup>1,2</sup>, J. Almeida<sup>1,2</sup>, M.J. Moro<sup>4</sup>, R. Cuello<sup>5</sup>, J.F. San Miguel<sup>2,3</sup>, A. Orfao<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Serv. Citometría. Univ. Salamanca. <sup>2</sup>CICáncer. Univ. Salamanca. <sup>3</sup>Serv. Hematología. Hosp. Univ. Salamanca. <sup>4</sup>Serv. Hematología. Hospital Virgen Blanca (León). <sup>5</sup>Serv. Hematología. Hospital Univ. Valladolid.

**Introducción.** Numerosos estudios han demostrado la existencia de alteraciones en los linfocitos T (LT) de sangre periférica en pacientes con gammapatías monoclonales (GM). Sin embargo, es escasa la información acerca de las posibles alteraciones existentes en los LT del micromedioambiente tumoral, la médula ósea (MO).

**Objetivo.** Analizar comparativamente la distribución y características fenotípicas (incluido el repertorio TCR-V $\beta$ ) y funcionales de los LT de la MO entre donantes sanos y los tres tipos principales de GM.

**Métodos.** Se estudiaron al diagnóstico por citometría de flujo 61 muestras de MO de GM (30 GM de significado incierto -GMSI-, 27 mieloma múltiple-MM- y 4 leucemia de células plasmáticas-LCP-) y 6 muestras de MO normal (MON).

**Resultados.** El porcentaje de LT era significativamente mayor en la MO de pacientes con GMSI y MM respecto a la MON. Por otro lado, la razón CD4/CD8 era discretamente mayor en MM y LCP que en GMSI y MON (p>0.05). Además, en todas las GM se detectó un incremento del porcentaje de LT CD28-, tanto entre los LT CD4+ como CD8+.

El estudio fenotípico de la distribución de las familias TCR-V $\beta$  mostró la presencia de expansiones clonales en un elevado porcentaje de casos en todas las GM (entre el 75% y el 100%), tanto dentro de las subpoblaciones T CD4+ como CD8+. La producción de IFN- $\gamma$  en respuesta a PMA+Io por los LT CD4+ y CD8+ fue mayor en GM respecto a la MON (p<0.05). No se observaron diferencias en la producción de TNF- $\alpha$ , IL-4 e IL-6 entre MON y GM. Además se detectó en los LT CD4+ buena correlación positiva entre: la producción de IFN- $\gamma$  y el porcentaje de LT CD4+ implicados en las expansiones oligoclonales (r<sup>2</sup>=0.534 p=0.0001), la producción de IFN- $\gamma$  y el porcentaje de LTCD4+CD28- (r<sup>2</sup>=0.704 p=0.0001), y el porcentaje de LT CD4+ implicados en las expansiones oligoclonales y el porcentaje de CD28- (r<sup>2</sup>=0.499 p=0.0001).

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que en las GM se reclutarían determinadas poblaciones de LT con capacidad proinflamatoria al micromedioambiente medular. No existen diferencias fenotípicas y funcionales significativas en los LT de MO entre las distintas entidades de GM, lo que podría indicar que este fenómeno se produciría en fases muy precoces de la enfermedad.

**F-0021-09-O. EXPRESIÓN DE MOLÉCULAS DE MEMBRANA IMPLICADAS EN LA RESPUESTA INMUNE EN LAS CÉLULAS PLASMÁTICAS DE PACIENTES CON GAMMAPATÍA MONOCLONAL.** M. Pérez de Andrés<sup>1,2</sup>, M. Martín-Ayuso<sup>1,2</sup>, J. Almeida<sup>1,2</sup>, M.J. Moro<sup>4</sup>, J. Galende<sup>5</sup>, J.F. San Miguel<sup>2,3</sup>, A. Orfao<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Serv. Citometría. Univ. Salamanca. <sup>2</sup>CICáncer. Univ. Salamanca. <sup>3</sup>Serv. Hematología. Hosp. Univ. Salamanca. <sup>4</sup>Serv. Hematología. Hospital Virgen Blanca (León). <sup>5</sup>Serv. Hematología. Hospital del Bierzo (León).

**Introducción.** Se ha demostrado que las células plasmáticas (CP) clonales de las gammapatías monoclonales (GM) son fenotípicamente distintas de las CP normales; sin embargo es escasa la información acerca de las posibles diferencias fenotípicas de las CP entre distintas formas de GM.

**Objetivo.** Analizar comparativamente en las CP la expresión de moléculas implicadas en la interacción con el micromedioambiente de la médula ósea (MO) incluyendo moléculas coestimuladoras (CD40, CD80, CD86), moléculas HLA (HLA-I $\alpha$  y  $\beta$ 2-microglobulina),

de adhesión (CD38, CD56, CD138), receptores de IL-6 (CD126, CD130) y el receptor Fas (CD95).

**Métodos.** el análisis se realizó por citometría de flujo en un total de 61 muestras de MO de GM (31 muestras de GM de significado incierto (GMSI), de mieloma múltiple (MM) y 4 de leucemia de células plasmáticas (LCP) y 5 muestras de MO normal (MON), identificando las CP por su expresión de CD138 y CD38.

**Resultados.** No se observaron diferencias entre las CP normales de MON y de GMSI. Al comparar el fenotipo de las CP normales con el de las CP clonales de GM se observó que la expresión de HLA-I $\alpha$  y  $\beta$ 2-microglobulina era mayor en GMSI y en MM, y menor en LCP respecto a su expresión en MON. Además, en todas las GM los niveles de CD56, CD86 y CD126 estaban claramente incrementados, y los de CD38 disminuidos; la expresión de CD40 era menor en CP clonales de MM y LCP, pero no en GMSI.

**Conclusiones.** Nuestros resultados confirman y amplían observaciones previas acerca de las diferencias inmunofenotípicas entre CP normales y CP clonales de GM y muestran diferencias en la expresión de moléculas presentadoras de antígeno, coestimuladoras y de adhesión en las CP clonales de GM que sugieren la existencia de distintos patrones de relación con el sistema inmune en las distintas formas de GM.

**F-0021-10-C. ANÁLISIS DE LA DISTRIBUCIÓN Y CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y FUNCIONAL DE LAS CÉLULAS DENDRÍTICAS CIRCULANTES EN GAMMAPATÍAS MONOCLONALES.** M. Martín-Ayuso<sup>1,2</sup>, M. Perez de Andrés<sup>1,2</sup>, J. Almeida<sup>1,2</sup>, M.A. García-Marcos<sup>3</sup>, M.I. González-Fraile<sup>4</sup>, M.J. Moro<sup>4</sup>, D. Borrego<sup>5</sup>, G. Martín-Núñez<sup>6</sup>, J.F. San Miguel<sup>3</sup>, A. Orfao<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Citometría. Univ. Salamanca. <sup>2</sup>Centro de Investigación del Cáncer. Salamanca. <sup>3</sup>Servicio de Hematología. Hospital Univ. Salamanca. <sup>4</sup>Servicio de Hematología. Hospital Virgen Blanca. León. <sup>5</sup>Servicio de Hematología. Hospital Univ. Valladolid. <sup>6</sup>Servicio de Hematología. Hospital Virgen del Puerto. Plasencia. Cáceres.

**Introducción.** Numerosos trabajos han demostrado la importancia del microambiente medular en el desarrollo y progresión de las gammapatías monoclonales (GM). Entre los elementos celulares presentes en el ambiente medular, las células inflamatorias desempeñarían un papel especialmente importante al mostrar alteraciones funcionales, de entre las que merece destacar un patrón anormal de secreción de citocinas.

**Objetivo.** Estudiar la distribución, fenotipo y función de las células dendríticas (CDs) circulantes en pacientes con GM.

**Métodos.** Se estudiaron un total de 65 muestras de sangre periférica (SP) obtenidas de pacientes diagnosticados de GM previamente no tratados: 34 correspondían a gammapatías monoclonales de significado incierto (GMSI), 27 a mieloma múltiple (MM) y 4 a leucemias de células plasmáticas (LCP). En paralelo, se analizaron 12 muestras de individuos sanos mayores de 40 años. El análisis se realizó mediante citometría de flujo, empleando técnicas bien estandarizadas.

**Resultados.** El número absoluto de CDs de SP se encontraba disminuido en GMSI, en el rango de la normalidad en MM y aumentado en las LCP en comparación con los sujetos sanos (65±18 CDs/ $\mu$ l en individuos normales frente a 54±32, 64±43 y 237±91 CDs/ $\mu$ l res-

pectivamente);  $p < 0.05$  LCP vs MM y GMSI. Con respecto al fenotipo de CDs circulantes, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al control en los receptores de quimiocinas estudiados (CXCR1, CXCR4 y CCR5) aunque sí se encontraron diferencias con respecto a los sanos en la expresión de CD40L, CD58, CD11b, CD11c, CD16 y CD87. Desde el punto de vista funcional, las CDs circulantes de individuos sanos y con GMSI no producían de forma espontánea las citocinas inflamatorias estudiadas. En cambio, se observó una producción *ex vivo* aumentada de IL6 y TNF $\alpha$  en una proporción variable de MM y LCP. En general, la producción de citocinas por parte de las CDs, tras estimulación *in vitro* con LPS+ IFN $\gamma$ , fue menor que la obtenida en sanos.

**Conclusiones.** El número de CDs circulantes se encuentra disminuido en pacientes con GMSI y MM e incrementado significativamente en las LCP, con respecto al grupo control. Además, presentan un fenotipo y función alterada en los distintos tipos de GM.

**F-0021-11-O. CAMBIOS SECUENCIALES Y ACUMULATIVOS EN APOPTOSIS, ADHESIÓN Y PROLIFERACIÓN SE ASOCIAN A LAS ETAPAS PREMALIGNA / MALIGNA / LEUCÉMICA DEL MIELOMA MÚLTIPLE.** J.A. García-Trujillo, N. Villarrubia, L.M. Villar, A. Bootello, E. Roldán. Servicio de Inmunología. Hospital Ramón y Cajal. Madrid.

**Introducción.** El mieloma múltiple (MM) es un tumor maligno de células plasmáticas (CP) que puede estar precedido por una fase premaligna denominada gammapatía monoclonal de significado incierto (MGUS) y que en un reducido número de casos progresa hacia una forma agresiva de la enfermedad (leucemia de células plasmáticas). Los mecanismos que gobiernan tal progresión son en gran medida desconocidos.

**Objetivos.** Cambios en apoptosis, adhesión y proliferación y su asociación con las diferentes etapas de la enfermedad. Comparación con plasmocitosis reactivas.

**Métodos.** Detección de CP CD38++ en médula ósea o sangre periférica. La población clonal se distinguió de la población normal de CP en MGUS y MM tratados por la expresión de CD56 y/o la ausencia de CD27. La proliferación se determinó como células BrdU+. La apoptosis espontánea o inducida con anticuerpos anti-CD95 se determinó mediante marcaje con Anexina. La unión a fibronectina (FN) se estableció con anticuerpos anti-FN.

**Resultados.** En MGUS, las células clonales mostraban un incremento significativo en la cantidad de Bcl-2 y un descenso de CD95 con respecto a la población de CP normales; funcionalmente, estos hallazgos correlacionaban con una menor apoptosis, tanto espontánea como inducida, en las células clonales. El porcentaje de células en fase S (BrdU+) fue muy similar en ambas poblaciones.

Además de las alteraciones en la apoptosis, la fase maligna (MM) se caracterizó por cambios en la expresión de moléculas de adhesión (CD29 activado y CD106) y en la capacidad de unir FN.

La fase leucémica mostraba, además, un índice proliferativo muy elevado (células BrdU+ > 10%).

Las plasmocitosis reactivas mostraron un perfil diferente: alta capacidad proliferativa, apoptosis espontánea e inducida alta con o sin alteraciones evidentes en las moléculas de adhesión.

**Conclusiones.** Cambios acumulativos en apoptosis, adhesión y proliferación están asociados respectivamente con las fases premaligna, maligna y leucémica de la enfermedad.

**F-0021-12-O. INESTABILIDAD DEL MICROSATÉLITE DEL PROMOTOR DEL GEN DEL CD5 EN LEUCEMIA LINFOIDE CRÓNICA Y LINFOMA DEL MANTO.** G. Pérez-Chacón<sup>1</sup>, B. Contreras<sup>2</sup>, J. Jordá<sup>3</sup>, J.A. Vargas<sup>2</sup>, P. Pérez-Aciego<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Fundación LAIR. <sup>2</sup>Servicio de Medicina Interna I, Hospital Universitario Puerta de Hierro. <sup>3</sup>Hematología, Hospital Clínico San Carlos, Madrid

**Introducción.** Los microsatélites (MS) son repeticiones cortas en tándem de secuencias de ADN localizadas en áreas no codificantes del genoma. En tumores sólidos, como resultado de defectos en la maquinaria de reparación de ADN, pueden aparecer alteraciones en el tamaño de los MS. Dicha inestabilidad no es muy común en enfermedades hematológicas, pero se ha sugerido que, junto con otros cambios citogenéticos, podría estar asociada con la progresión de la leucemia linfocítica crónica (LLC) y el linfoma de célula del manto (LCM). Recientemente se ha señalado la posible utilidad de un MS situado en el promotor del gen del CD5 como marcador de inestabilidad genética en estas dos neoplasias de linfocitos B CD5<sup>+</sup>.

**Objetivo.** Estudio de la inestabilidad del promotor del CD5 en neoplasias de linfocitos B CD5<sup>+</sup>.

**Materiales y métodos.** A partir de ADN de la línea germinal y tumoral de 121 pacientes de LLC-B y 27 pacientes de LCM se amplificó la secuencia del MS situado en el promotor del CD5 mediante PCR. El producto génico se corrió en geles de poliacrilamida al 6% en condiciones desnaturizantes. Como control se analizaron muestras de ADN de 103 individuos sanos.

**Resultados.** No se observó inestabilidad ni pérdida de heterocigosidad en ninguna de las muestras analizadas. Por otra parte, el análisis del número de repeticiones del MS en los tres grupos mostró que el alelo mayoritario era el de 18 repeticiones CA (18CA). Además, se observó que el alelo de 19CA estaba más representado en enfermos de LLC-B que en sanos ( $p = 0,019$ ; OR = 0,512; CI = 0,290-0,904). En LCM el alelo de 17CA estaba menos representado ( $p = 0,025$ ; OR = 2,580; CI = 1,101-6,047) y el de 18CA más representado ( $p = 0,018$ ; OR = 0,475; CI = 0,255-0,886) que en sanos.

**Conclusiones.** A pesar de no observar inestabilidad en el promotor del CD5, encontramos que ciertos alelos del microsatélite situado en esta región están asociados a la leucemia linfocítica crónica y al linfoma de célula del manto.

## F-0022. Inmunoterapia antitumoral

**Moderadores:** Augusto Silva González (Madrid), Ignacio Melero Bermejo (Pamplona)

**F-0022-01-O. PF2: UN NUEVO INMUNOMODULADOR QUE ACTÚA SOBRE LA PROLIFERACIÓN DE LINFOCITOS.** E. Jiménez-Medina, M. Martínez-Llamas, L. Paco, A. García-Lora, F. Garrido. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Servicio de Análisis Clínicos, Granada.

**Introducción.** PF2 es un polisacárido obtenido de un extracto vegetal, *Caléndula Officinalis L. (Asteraceae)*, mediante un nuevo proceso de extracción. En los últimos años, el PF2 ha sido usado en pacientes con cáncer, demostrándose un doble efecto terapéutico: un fuerte efecto antitumoral y una disminución de los efectos secundarios de la quimioterapia.

**Objetivos.** Estudiar el posible mecanismo biológico implicado en la actividad del PF2, centrándonos en el potencial inmunomodulador sobre PBLs y células NK.

**Material y métodos.** Para determinar la inducción de la actividad citotóxica de las células NK, hemos utilizado como células efectoras, las células del bazo de ratones BALB/C tratados con PF2 vía oral, y como células diana la línea celular YAC-1. La cuantificación se realizó a través de un ensayo estándar de citotoxicidad NK de 4 h con <sup>51</sup>Cr. Por otra parte, se llevó a cabo un estudio de proliferación *in vitro* de linfocitos de sangre periférica humana para determinar si el producto tiene actividad mitógena. Los linfocitos se trataron durante 72 horas con diferentes concentraciones de PF2. Como controles positivos se usaron la Concanavalina A o la Fitohemaglutinina. Se midió la proliferación celular mediante la incorporación de BrdU y lectura por ELISA.

**Resultados.** Los ensayos de proliferación con PBLs mostraron un incremento en la proliferación de linfocitos de 2 a 3 veces superior al control y del 10-20% respecto a la Concanavalina A. Por el contra-

rio, en los ensayos de citotoxicidad NK, no se observó por parte del PF2 ninguna acción sobre las células NK obtenidas de bazo de ratones tratados oralmente con este producto.

**Conclusiones.** Es importante destacar el efecto en la proliferación de linfocitos que ejerce el PF2, un producto natural, exento de toxicidad, muy común en la mayor parte del mundo y de bajo coste. De esta manera, el espectro de aplicación de este producto es amplio, pudiéndose aplicar a pacientes oncológicos, o con infecciones bacterianas o virales.

**F-0022-02-C. IDENTIFICACIÓN DE LAS PROTEÍNAS COMPONENTES DE PSK E INTERACCIÓN CON SU RECEPTOR EN LAS CÉLULAS NKL.** E. Jiménez-Medina, M. Martínez-Llamas, L. Paco, A. García-Lora, F. Garrido. Hospital Universitario Virgen de las Nieves, Servicio de Análisis Clínicos, Granada.

**Introducción.** El polisacárido K (PSK), es un polisacárido unido a proteína, obtenido del hongo *Coriolus Versicolor*. PSK lleva utilizándose durante las últimas décadas en Asia en pacientes oncológicos, mostrando un efecto antitumoral mposiblemete debido a su actividad inmunomoduladora. En estudios previos de nuestro grupo, mostramos su actividad sobre la proliferación y actividad citotóxica de la línea celular NKL, así como su acción sobre factores transcripcionales, isoenzimas de la PKC y MAP kinasas.

**Objetivos.** Identificación de los componentes proteicos de la PSK, así como comparación del receptor de membrana utilizado por la PSK e IL-2 para su acción en la línea celular NKL.

**Material y métodos.** Se han realizado marcajes radioactivos *in vitro* de la PSK e IL-2 con <sup>35</sup>S-metionina mediante liofilización. Tam-

bién PSK, previa al marcaje, fue digerida con neuraminidasa. Posteriormente, PSK e IL-2 marcadas fueron incubadas *in vitro* a 37°C durante 2 h con proteínas obtenidas de la línea celular NKL. A continuación, se sometieron las muestras a electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) y fluorografía.

**Resultados.** Se han obtenido dos bandas en el marcaje de IL-2 de un peso molecular de 12 y 32 Kd y dos bandas en el marcaje de PSK de muy alto peso molecular. Después de la digestión de PSK con neuraminidasa, encontramos una banda de bajo peso molecular, de aproximadamente 12 Kd. Tras la incubación *in vitro* de IL-2 marcada con proteínas de las células NKL observamos una nueva banda de unos 50 Kd, mientras que cuando incubamos PSK marcada con estas proteínas apareció una nueva banda de aproximadamente 60 Kd.

**Conclusiones.** Estos resultados nos muestran que PSK está compuesta únicamente por una proteína de 12 Kd y que el receptor de IL-2 y PSK utilizado para su acción sobre células NKL presentan distintos pesos moleculares, indicando que son distintas moléculas.

**F-0022-03-O. REGULACIÓN POR IFN- $\gamma$  DE LA APOPTOSIS MEDIADA POR TRAIL EN CÉLULAS TUMORALES.** C. Ruiz-Ruiz<sup>1,2</sup>, C. Ruiz de Almodóvar<sup>1</sup>, A. Rodríguez<sup>3</sup>, G. Ortiz-Ferrón<sup>1</sup>, J.M. Redondo<sup>3</sup>, A. López-Rivas<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Instituto de Parasitología y Biomedicina, CSIC, Granada. <sup>2</sup>Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Medicina, UGR, Granada. <sup>3</sup>Centro de Biología Molecular Severo Ochoa, UAM, Madrid.

**Introducción.** El ligando de muerte TRAIL es un agente prometedor en terapia antitumoral, ya que induce apoptosis selectivamente en células tumorales y no presenta toxicidad vía sistémica en modelos animales. Además, TRAIL parece mediar la actividad antitumoral de monocitos, células dendríticas y NK. A menudo las células tumorales desarrollan diferentes mecanismos de resistencia frente a la apoptosis mediada por receptores de muerte. El IFN- $\gamma$  es capaz de promover la respuesta antitumoral mediante diversos mecanismos efectores, entre ellos la inducción de proteínas proapoptóticas.

**Objetivos.** Estudiar la sensibilización por IFN- $\gamma$  de células de cáncer de mama a la apoptosis mediada por TRAIL así como el mecanismo responsable de dicha sensibilización.

**Métodos.** La inducción de apoptosis se determinó mediante análisis por citometría de flujo de la expresión de fosfatidilserina en membrana. La activación de caspasas se analizó mediante western-blot. La regulación de la expresión de caspasa-8 se determinó mediante técnicas de northern-blot, EMSA y ensayos de actividad luciferasa.

**Resultados.** El pretratamiento con IFN- $\gamma$  facilita la inducción de apoptosis por TRAIL en células MCF-7 y MDA-MB231 (líneas celulares de cáncer de mama) observándose una clara potenciación de todas las señales intracelulares que se originan tras la unión de TRAIL a sus receptores, incluida la activación de la caspasa-8 apical. El IFN- $\gamma$ , además, induce un incremento en la expresión de caspasa-8 tanto a nivel de proteína como de ARNm. Analizando el promotor del gen de caspasa-8 hemos encontrado un sitio ISRE que juega un papel crítico en el aumento de la actividad transcripcional inducida por IFN- $\gamma$ . Dicho motivo ISRE se une al factor de transcripción IRF-1 inducible por IFN- $\gamma$ .

**Conclusiones.** En células de cáncer de mama el tratamiento con IFN- $\gamma$  aumenta la expresión de caspasa-8, por un mecanismo dependiente de IRF-1, facilitando así la inducción de apoptosis por el ligando de muerte TRAIL.

**F-0022-04-O. MECANISMOS DE APOPTOSIS EN CELULAS DE ADENOCARCINOMA DE ESOFAGO Y COLON.** M. Royo-Cañas\* C. Diestre, B. Sáez-Gutierrez, P. Lasierra, L. Larrad, M.J. Martínez-Lorenzo. Unidad de Inmunología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa de Zaragoza.

**Introducción.** Diversos tumores malignos son resistentes a la apoptosis a través de receptores de muerte y expresión de ligandos como FasL y APO2L/TRAIL. En el caso de algunos tumores, la sobreexpresión de FasL parece correlacionarse con la agresividad del tumor y el mal pronóstico. APO2L/TRAIL, un miembro de la familia del TNF, induce apoptosis en un gran número de tumores, lo que ha estimulado el interés de APO2L como agente terapéutico tumoral.

Aunque algunos autores han descrito que las células de cáncer de colon son capaces de expresar FasL y atacar a las células linfoides que expresan Fas, otros han indicado que FasL no se expresa en la superficie de esos tumores. Esto indicaría que otros factores podrían estar implicados, tales como el balance entre forma unida a membrana y forma soluble o la secreción de ligandos de muerte en la superficie de microvesículas.

**Objetivos.** Analizar las alteraciones en las rutas de apoptosis que se dan en las células de adenocarcinoma de colon y esófago, así como la caracterización de las vías todavía operativas. Estudiar la expresión de FasL y APO2L y el posible papel de APO2L/TRAIL como posible terapia.

**Metodología.** La expresión de Fas, FasL y APO2L/TRAIL se determinó por citometría de flujo utilizando anticuerpos específicos. La muerte celular se cuantificó mediante análisis de la exposición de fosfatidilserina por tinción con anexina V-PE y/o por medida del potencial mitocondrial con la sonda DiOC6. La actividad citotóxica de diferentes inductores apoptóticos así que como de otras drogas en combinación, se midió por el método de Mosmann y azul Trypan.

**Resultados.** Las líneas celulares OE33, HT-29 y HCT-116 expresaron niveles elevados de Fas en membrana (90%) mientras que SW480 y LoVo lo hicieron en menor porcentaje (60%). Sin embargo, estas líneas celulares apenas fueron sensibles a anticuerpos anti-Fas en los estudios de viabilidad realizados (<10%).

El porcentaje de expresión de FasL y APO2L en membrana fue siempre menor de un 5%. Sin embargo, todas las líneas analizadas expresaron FasL y APO2L en el interior celular. La apoptosis inducida por APO2L recombinante fue aproximadamente de un 25% en las células de colon, mientras que las células de esófago fueron más sensibles a dicho inductor (40%).

**Conclusiones.** Los resultados preliminares obtenidos en este trabajo indican que APO2L recombinante podría servir como terapia en la patología de cáncer de colon y mejor aún en cáncer de esófago.

**F-0022-05-O. PURIFICACIÓN DE PROTEÍNAS DE ESTRÉS (HSP) TUMORALES Y OBTENCIÓN DE AcMo ANTI-HSP.** J. Gómez, D. Benítez, J. Milà, R. Vilella. Servei Immunologia, Hospital Clínic Barcelona, IDIBAPS, Universitat Barcelona.

**Introducción.** Las Hsp tumorales podrían ejercer una doble función en la preparación de células dendríticas (DC) autólogas para su utilización en el tratamiento de neoplasias. Por un lado constitui-

rían la señal de alarma y por otro proporcionarían los péptidos tumorales (finger printer) necesarios que les permitiría desarrollar una respuesta específica antitumoral.

**Objetivos.** Purificar por métodos bioquímicos convencionales la Hsp90, Hsp70 y Grp94 y obtener AcMo contra estas Hsp para obtener un método de purificación autólogo, rápido y eficaz mediante cromatografía de afinidad de las Hsp y estudiar su funcionalidad.

**Métodos.** Las Hsp se obtuvieron a partir de una línea de melanoma derivada en nuestro laboratorio. La purificación de la Hsp90, Grp94 y Hsp70 se realizó mediante un gradiente salino en una columna MonoQ 5/5 FPIC. Se efectuaron 3 inmunizaciones con las diferentes Hsp contenidas en las bandas correspondientes a un gel al 8% de PAGE en ratones Balb/c.

**Resultados.** Hemos conseguido purificar la Hsp90 (>95%) y Grp94 (>95%) y enriquecer la Hsp70 (>50%). También hemos obtenido AcMo para: Hsc70, Hsp70, Hsc70/Hsp70, Hsp90 y Grp94. Los estudios preliminares con Hsp90 (purificada por métodos bioquímicos) muestran una capacidad de activación de las células dendríticas inmaduras.

**Conclusiones.** Mediante métodos bioquímicos convencionales se han podido obtener Hsp tumorales en cantidad y calidad suficientes para generar AcMo y para iniciar estudios funcionales encaminados a determinar el papel de estas Hsp en la maduración de las DC y en su inmunogenicidad.

*Financiación: FIS PI020364.*

**F-0022-06-C. GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA COMO FACTORES DIAGNÓSTICO-PRONÓSTICO EN CARCINOMA DE CERVIX UTERINO.** C. Blanco-Arias, B. Pinillos, T. Gallardo, J.A. Hernandez-Marrero, C. Guzman, E. Blasco-Olaetxea. Instituto Investigación y Ciencia -Fuerteventura. Instituto Canario de Investigación del Cáncer ICIC.

Nuestros resultados muestran que la expresión de los antígenos ABH está claramente relacionada con el carácter secretor, siendo positivos en el epitelio exo y endo cervical normal de los individuos secretores y negativo en los no secretores. Es de destacar la positividad del endotelio y de los hematíes como control interno de especificidad. La expresión de antígenos Lewis tanto en el epitelio endocervical como en el exocervical está relacionada con el fenotipo Lewis de los sujetos y está claramente bajo el control del gen secretor. De esta forma, la expresión del antígeno Lewis a está limitada al cérvix de sujetos de fenotipo Lewis (a+ b-) no secretores, mientras que la expresión del antígeno Lewis b está limitada a los tejidos de individuos de fenotipo Lewis (a- b+) secretores.

Así mismo hemos investigado la expresión de estas estructuras antigénicas en biopsias de cervix con diagnóstico histológico con diversos tipos de Displasias y Carcinomas de Cervix. En nuestra serie hemos encontrado una pérdida de expresión de isoantígenos ABH cuando las células exocervicales sufren una transformación neoplásica.

Es de destacar la pérdida de expresión antigénica en el área displásica, mientras que las células mas superficiales que aún maduran correctamente expresan normalmente su isoantígeno, las células mas profundas aparecen negativas.

Cuando estudiamos la presencia de antígenos de grupo sanguíneo en Carcinomas Invasores, observamos como estos son total-

mente negativos. Es de destacar como las glándulas endocervicales que pertenecen a otra estirpe celular continúan expresando su estructura antigénica correspondiente.

Posteriormente hemos estudiado otros marcadores biológicos como la expresión de PCNA y Ki 67; así como la presencia de Papiomavirus Humano sobre los mismos casos, encontrando una excelente correlación

En conclusión nosotros pensamos que el estudio de las alteraciones de los antígenos de grupo sanguíneo en las lesiones malignas y premalignas de Cervix Uterino, junto con otros marcadores, pueden proveer una muy útil información que nos ayude a entender los cambios malignos y nos sirva como potencial marcador de la agresividad de los Carcinomas Humanos.

**F-0022-07-C. DETECCIÓN DE CÉLULAS TUMORALES EN SANGRE COMO MÉTODO PARA MONITORIZAR LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO QUIMIOTERÁPICO EN ENFERMOS DE CANCER DE MAMA.** M.J. Serrano, M. Campos, N. de la Torre, F. Warleta, I. Algarrá, J.J. Gaforio. Dpto. Ciencias de la Salud. Universidad de Jaén.

**Introducción.** La progresión vía sanguínea de células tumorales es la principal causa de aparición de metástasis y muerte en pacientes diagnosticados de cáncer de mama. Recientemente hemos publicado unos resultados que sugieren que la presencia de células tumorales en sangre de estos pacientes es un factor pronóstico. La quimioterapia administrada mejora la supervivencia al disminuir la incidencia de recurrencias. Esto implica que las células tumorales sean sensibles a la quimioterapia administrada e hipotéticamente se debería corresponder con una disminución de células tumorales en la sangre de los pacientes tratados.

**Objetivo.** Estudiar la correlación existente entre la variación de células tumorales circulantes en sangre periférica de pacientes de cáncer de mama en estadio IV con la progresión clínica de los enfermos.

**Métodos.** Estudiamos un total de 23 enfermos en estadio IV a los que se administra tratamiento quimioterápico. La detección de células tumorales circulantes en sangre se realizó mediante centrifugación de la muestra de sangre en doble gradiente de densidad de Ficoll; enriquecimiento de la muestra mediante marcaje inmunomagnético y separación positiva de las células Citoqueratin (CK) positivas (+); citocentrifugación y marcaje inmunocitoquímico para visualizar las células CK+. La detección de células en sangre a cada paciente se realizó con la siguiente pauta: una determinación antes de quimioterapia; otra en el intermedio de la quimioterapia; otra al final de quimioterapia; y posteriormente cada 3 meses. La progresión clínica fue evaluada por los oncólogos utilizando los criterios habituales. El seguimiento de la evolución de los enfermos se realizó durante 2 años.

**Resultados.** De los 23 pacientes estudiados 16 presentan progresión clínica de la enfermedad. En 14 de ellos detectamos células CK+ en sangre y a lo largo de las diferentes determinaciones se ha mantenido igual o incluso ha crecido el número de ellas en la sangre.

**Conclusiones.** Nuestros resultados sugieren que la detección seriada de células tumorales en sangre podría ser útil para monitorizar la eficacia del tratamiento quimioterápico administrado en enfermos de cáncer de mama avanzado.

**F-0022-08-O. DESARROLLO DE scFvs HUMANOS FRENTE AL RECEPTOR 3 DEL FACTOR DE CRECIMIENTO DE FIBROBLASTOS (FGFR3).** J.L. Martínez-Torrecuadrada<sup>1</sup>, G. Cifuentes<sup>1</sup>, J.J. Gómez-Román<sup>2</sup>, P. Saenz<sup>3</sup>, J. González<sup>2</sup>, K. Escuredo<sup>3</sup>, C. Junquera<sup>3</sup>, S. Santa Cruz<sup>3</sup>, L. Simón<sup>3</sup>, A. Martínez<sup>3</sup>, J.F. Val-Bernal<sup>2</sup>, J.I. Casal<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO). Madrid. <sup>2</sup>Dpto Anatomía Patológica, H. U. Marqués de Valdecilla. Santander. <sup>3</sup>Progenika, S.A-Medplant Genetics, S.L. Derio, Vizcaya.

**Introducción.** El carcinoma transicional de vejiga es una de las neoplasias más extendidas en el mundo. La identificación de nuevos marcadores tiene un gran valor para el diagnóstico precoz y el tratamiento de esta enfermedad. En este sentido, hemos detectado que el receptor del factor de crecimiento de fibroblastos 3 (FGFR3) humano se induce en este tipo de carcinomas y sería una diana idónea para desarrollar anticuerpos con valor diagnóstico y terapéutico. Sin embargo, su gran homología con la proteína de ratón ha hecho muy difícil la obtención de anticuerpos monoclonales mediante técnicas clásicas.

**Objetivos.** Desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico y tratamiento contra el cáncer de vejiga basadas en anticuerpos monoclonales humanos producidos a partir de librerías de anticuerpos en fagos (phage display) utilizando FGFR3 como molécula diana.

**Métodos.** La generación de scFvs humanas frente a FGFR3 recombinante se llevó a cabo mediante sucesivas rondas de biopanning en microplacas utilizando las librerías scFv Tomlinson I+J (MRC). A partir de la población de fagos recogidos en los pannings, se seleccionaron clones individuales, analizando su reactividad por ELISA frente a FGFR3 recombinante. La individualidad de cada clon se confirmó por secuenciación. La reactividad de las scFvs seleccionadas frente a FGFR3 se analizó por técnicas histológicas, inmunoblotting y de citometría frente a líneas celulares neoplásicas de vejiga.

**Resultados y conclusiones.** Se obtuvieron 5 scFvs diferentes que reaccionaron específicamente con FGFR3 por ELISA y que se expresan en forma soluble de forma activa. De estos 5, tres scFvs se unieron específicamente a la proteína nativa en ensayos de citometría de flujo con porcentajes de células reconocidas entre el 60% y el 12% para el más débil. La caracterización funcional de todas ellas, la especificidad frente a otros miembros de la familia de receptores como FGFR1, así como el análisis de su actividad anti-proliferativa se encuentra en fase de estudio.

**F-0022-09-O. REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LA FORMA ACTIVADA DE LA INTEGRINA CD29 EN ERITROBLASTOS DE INDIVIDUOS SANOS Y ENFERMOS CON SÍNDROME MIELODISPLÁSICO.** N. Villarrubia, J.A. García-Trujillo, A. Bootello, E. Roldán. *Servicio de Inmunología, Hospital Ramón y Cajal, Madrid.*

**Introducción.** Los eritroblastos de médula ósea (MO) humana expresan la forma activa de CD29, regulada por un factor soluble contenido en el plasma medular, y que desaparece de estas células en enfermos con síndrome mielodisplásico (SMD).

**Objetivos.** 1) detectar cambios en los factores del plasma medular de sujetos sanos y enfermos con SMD; 2) efecto de factores solubles e inhibidores de la señalización celular en la expresión de CD29 activado; y 3) correlación de los niveles de CD29 activado y capacidad de unión a fibronectina (FN).

**Métodos.** Cultivos de células totales o de eritroblastos aislados en presencia o ausencia de plasma medular o diferentes factores. Los niveles de VCAM-1 soluble se determinaron por ELISA. La forma activa de CD29 se detectó con el AcMo HUTS-21. La capacidad de unión a FN se estableció con AcMo anti-FN.

**Resultados.** VCAM-1, activador de CD29, está unido al eritroblasto de MO en individuos sanos. Esta unión está disminuida en eritroblastos de pacientes con SMD, encontrándose niveles semejantes de VCAM-1 soluble en plasma medular de ambos grupos. La incubación de eritroblastos de pacientes con SMD con plasma de MO normales o de Mn2+ no estimula la expresión de CD29. Por otra parte, ni la preincubación del plasma medular con Ac neutralizantes anti-SDF ni de los eritroblastos con Ac anti-CXCR4 disminuyó la expresión CD29 activado. Este hallazgo se corroboró por la falta de efecto de la toxina pertúsica, inhibidor de la señalización de proteínas G, ligadas a CXCR4. La pérdida de CD29 activado en estos enfermos se asoció a una menor capacidad de unir FN.

**Conclusiones.** La regulación negativa de CD29 activado en eritroblastos de SMD no se debe a la ausencia de los factores contenidos en el plasma medular, sino a defectos intrínsecos en la célula eritroide. El factor contenido en el plasma medular no es SDF, ni su efecto parece estar mediado por proteínas G. La pérdida de la forma activa de CD29 en SMD se asocia a una menor capacidad de unión a FN.

**F-0022-10-O. GENERACIÓN IN VITRO DE LINFOCITOS ANTI-LEUCÉMICOS PARA TERAPIA CELULAR ADOPTIVA EN LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC-B).** P. Prieto<sup>1</sup>, M. Sánchez<sup>1</sup>, E. Reyes<sup>1</sup>, D. Díaz<sup>1</sup>, H. Barcenilla, E. Perucha<sup>1</sup>, A.B. Mallo<sup>1</sup>, J. Monserrat<sup>1</sup>, H. Bañas<sup>1,2</sup>, J. García-Suárez<sup>1,2</sup>, C. Burgaleta<sup>1,2</sup>, A. Prieto<sup>1</sup>, M. ÁlvarezMon<sup>1,2</sup>. <sup>1</sup>Unidad mixta CSIC-Dpto. de Medicina, U.A.H. <sup>2</sup>Hospital Universitario Príncipe de Asturias

Estudios recientes han demostrado la eficacia clínica de la terapia con linfocitos T activados *in vitro* en pacientes con tumores. El crecimiento homeostático en los pacientes linfodeplecionados permite a las células T antileucémicas infundidas crecer *in vivo* vigorosamente y dominar el repertorio inmune de los pacientes tratados.

**Objetivo.** Desarrollar nuevos métodos de ruptura de tolerancia inmune frente a células leucémicas y comparar su eficacia en la generación de células T efectoras antileucémicas.

**Material y métodos.** Desarrollamos procedimientos para la ruptura de tolerancia basados en la combinación de estimulación policlonal con estimulación específica con células B leucémicas autólogas. Las células B leucémicas se activaron mediante la combinación de anticuerpos monoclonales anti- $\mu$  y anti-CD40. Estas células leucémicas activadas se añadieron estímulos policlonales para células T: anticuerpos anti-CD3 o micropartículas cubiertas de anti-CD3 y anti-CD28. Para caracterizar los linfocitos T efectores expandidos se empleó citometría de flujo de cuatro colores: enumeración de células expandidas, expresión en superficie de marcadores de activación, producción de citocinas y estudio de la actividad citotóxica específica contra células de LLC-B autólogas.

**Resultados.** Hemos optimizado las condiciones de aumento de expresión de los ligandos coestimuladores de células T: CD80 y CD86. Usando las células leucémicas activadas se estimularon células T autólogas que fueron posteriormente estimuladas y expandidas clo-

nalmente con partículas recubiertas de anti-CD3 y anti-CD28. Se estudió la producción de citocinas tras estimulación con células leucémicas autólogas fijadas con glutaraldehído y se realizaron colcultivos con células B autólogas.

**Conclusión.** La generación *in vitro* de células T antileucémicas tiene un gran potencial para desarrollar nuevas herramientas en la terapia celular contra la más común de las leucemias.

**F-0022-11-O. ESTUDIOS PRELIMINARES DE LINFOCITOS T QUIMERICOS ANTI CEA (IgCEA) PARA TRATAMIENTO ANTITUMORAL.** R.M. Gonzalo-Daganzo<sup>1</sup>, P.C. Emtage<sup>2</sup>, D. Clarke<sup>2</sup>, M. Palmer<sup>2</sup>, R. Junghans<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. <sup>2</sup>Dept. Haematology/Oncology, Beth Israel Deaconess Medical Center, Harvard Medical School, Boston, EE.UU.

**Introducción.** La inmunoterapia adquirida explora la capacidad de diseñar linfocitos T para expresar bien citoquinas, bien receptores quiméricos para antígenos tumorales y poder lograr unos linfocitos T más potentes y más específicos. En nuestro laboratorio se habían construido unas células T quimera con un TCR capaz de reconocer un receptor específico de membrana y transducir una señal de activación. El fragmento variable (sFv) del anticuerpo anti CEA se fusionó a la cadena zeta ( $\zeta$ ) del TCR (IgCEA). Este anticuerpo reconoce el antígeno carcinoembriónico (CEA), un antígeno tumoral expresa-

do en el 95% de los tumores de colon y el 50% de los de pulmón y de mama. Uno de los mayores inconvenientes es que una vez activadas vía TCR (activación vía señal 1), se desencadena un proceso apoptótico. Además, se ha comprobado que son incapaces de secretar suficiente IL-2, ni de proliferar *in vivo* y por tanto incapaces de realizar su función antitumoral de forma efectiva.

**Objetivos.** Con el fin de intentar resolver estos problemas, hemos diseñado unos linfocitos T de segunda generación que tienen fusionada la fracción intracelular de la molécula CD28 (que aporta la señal de activación 2), además del receptor quimérico anti CEA en la cadena zeta del TCR. En este trabajo nos proponemos caracterizar funcional y biológicamente estos linfocitos.

**Métodos.** Se estudió la expresión del nuevo receptor (IgCEA/CD28) en la superficie de células T por FACS y *western blotting*. Además se realizaron diferentes ensayos de citotoxicidad con dianas tumorales que expresan CEA (MIPCEA). Por último, evaluamos la capacidad de producción de citoquinas IL-2 e IFN- $\gamma$  y su capacidad proliferativa comparándolas con los linfocitos T de primera generación.

También, iniciamos estudios *in vivo* del tráfico de estos linfocitos en un modelo tumoral en ratones nude empleando el fluorocromógeno DiD.

**Resultados:** Estas células de segunda generación («IgCEA/CD28 T cells») son capaces de: expresar el receptor quimérico en superficie; secretar altos niveles de IL-2 e IFN- $\gamma$ ; de proliferar y evitar el proceso apoptótico y finalmente de lisar específicamente células tumorales MIPCEA.

## F-0023. Estrategias inmunoterapéuticas, vacunas

**Moderadores:** África González Fernández (Vigo), Eduardo Martínez Naves (Madrid)

**F-0023-01-O. INMUNOFERÓN® MODULA LA PRODUCCIÓN DE CITOQUINAS INFLAMATORIAS Y MEJORA LA ARTRITIS POR COLÁGENO TIPO II EN UN MODELO MURINO.** J. González-Rojas<sup>1</sup>, D. Sancho<sup>2</sup>, J.L. Alonso-Lebrero<sup>3</sup>, R. Merino<sup>1</sup>, S. González<sup>2</sup>, J.P. Pivel<sup>4</sup>, F. Sánchez-Madrid<sup>2</sup>, J. Merino<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Dpto de Biología Molecular, Universidad de Cantabria. <sup>2</sup>S. Inmunología, Hospital La Princesa, Madrid. <sup>3</sup>Dpto de I+D, Industrial Farmacéutica Cantabria, Saetabis Bio Consulting, Valencia

La inmunización de ratones susceptibles DBA/1 con colágeno de tipo II (CII) emulsionado en CFA provoca una artritis crónica erosiva, clínicamente similar a la artritis reumatoide. En estudios previos habíamos observado un efecto terapéutico sobre el desarrollo de artritis de Inmuniferón®, un glicoconjugado (GC) compuesto por un polisacárido de la pared celular de *Candida Utilis* (Ps) y una proteína de reserva de las semillas maduras no germinadas de *Ricinus communis* (Pr).

Con objeto de estudiar con mayor detalle la evolución clínica y los mecanismos patogénicos implicados en el efecto beneficioso de Inmuniferón®, grupos de ratones DBA/1 inmunizados con CII fueron tratados con el GC en proporción Ps:Pr de 5:1, en administración diaria por vía oral, a dosis 6 mg/kg durante 4 semanas, a partir del 8º día postinmunización. Como control se usaron ratones inmunizados con CII a los que se administró solución salina o ciclofosfamida (40 mg/kg/semana, vía ip, durante 4 semanas).

La inflamación articular se evaluó radiológicamente y mediante una escala clínica de 0 a 3 (0: normal; 1: enrojecimiento e inflamación en dedos; 2: deformidad de carpo o tarso; 3: anquilosis). A las 6 semanas se evaluó la expresión de diversas citocinas, mediante RT-PCR cuantitativa, en las pequeñas articulaciones de las 4 patas.

Los resultados confirmaron estudios previos en los que Inmuniferón® logró mejorar significativamente la severidad de la artritis. Además, se observó una disminución significativa en la expresión de mRNA de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  en las articulaciones de los ratones tratados con Inmuniferón® o ciclofosfamida, en comparación con los animales inmunizados no tratados.

En conclusión, el tratamiento con Inmuniferón®, tiene un efecto beneficioso sobre el desarrollo de artritis autoinmune que, al menos, está relacionado con la inhibición de la expresión local de citocinas proinflamatorias.

**F-0023-02-C. TACROLIMUS (FK506) TÓPICO EN EL TRATAMIENTO DEL SÍNDROME HIPERIgE.** L.F. Pereira<sup>1</sup>, C. Domínguez Noche<sup>2</sup>, G. Pereira<sup>1</sup>, C. Cámara<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología, Hospital San Pedro de Alcántara. Cáceres. <sup>2</sup>Sección de Alergia, Hospital Virgen del Puerto. Plasencia.

**Introducción.** Tacrolimus es un inmunosupresor de la familia de los macrólidos que actúa inhibiendo la calcineurina. En contraste con la Ciclosporina A penetra en la piel y ha demostrado su efi-



cacia en la dermatitis atópica (D.A) reduciendo en un 85% el índice de severidad (Scorad). Su absorción sistémica es mínima y no produce las lesiones locales asociadas a corticoides. En algunos casos severos de Síndrome HiperIgE (HIES) se ha utilizado Ciclosporina A con buenos resultados aunque se desconocen los efectos adversos a largo plazo. No se ha comunicado el uso hasta ahora de Tacrolimus.

**Caso.** Presentamos el caso de una mujer de 34 años con HIES familiar, con Eccema severo, córtico-dependiente y atrofia cutánea secundaria (incluida cara). Asma, rinosinusitis, otitis y abscesos cutáneos de repetición. Una neumonía y un empiema pleural. Se instauró tratamiento hace 3 años con Ig-IV. Desde entonces no aparecen infecciones graves, sin embargo empeora la dermatitis con brotes frecuentes que requieren corticoides orales. Presenta importante eritema, con prurito intenso que incluso impide el sueño, con lesiones de rascado y escoriaciones y un stries permanente. Se constata una linfopenia severa (CD4=142/ $\mu$ L) que obliga a interrumpir el TT<sup>9</sup> corticoide. Nos planteamos TT<sup>9</sup> con inmunosupresores sistémicos (Ciclosporina A) aunque optamos ensayar con tacrolimus tópico 0,1% ante los buenos resultados en D. A y su seguridad.

**Resultados.** A las pocas horas de la aplicación mejora el eritema y en pocos días mejoría evidente del picor y lesiones de rascado, pasando en una semana de un Scorad de 10,6 a 3,2. Sin embargo al día siguiente del inicio del tratamiento presentó una pequeña lesión herpética en el labio inferior (coincidiendo con un catarro leve) y una exco-riación en frente que más adelante presentó zonas de impétigo que curó con fucidine pomada. Se mantuvo el tratamiento durante 3 semanas, pero al interrumpirlo reaparece el eccema, obligando a mantener el tratamiento hasta la fecha. Las variables inmunológicas no han variado a lo largo de un año (CD4, eosinófilos, IgE). No se detecta FK 506 en sangre.

**Conclusiones.** Tacrolimus pomada puede ser útil en el eccema severo en el HIES, aunque es necesario un seguimiento estrecho del paciente. Se plantea cambiar a Pimecrolimus por su menor permeabilidad y posible mayor seguridad en tratamientos a largo plazo.

**F-0023-03-O. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN ANTIGENICA DE CÉLULAS MADRE MESENQUIMALES (CMM) PORCINAS. ESTUDIO DE SU DIFERENCIACIÓN A CARDIOMIOCITOS IN VITRO.** I. Moscoso, E. López, I. Santamarina, P. Filgueira, M.J. Sánchez, R. Domínguez-Perles, G. peñuelas-Rivas, J.I. Barbosa, N. Domenech. Unidad de Investigación CHU Juan Canalejo, A Coruña. Unidad de Investigación en Trasplantes, Departamento de Cirugía, Hospital Universitario «Virgen de la Arrixaca», Murcia

**Introducción.** Las células madre mesenquimales (CMM) de la médula ósea tienen la capacidad de diferenciarse en diversas estirpes celulares que incluyen, entre otras, el hueso, cartílago, adipocitos, tendón y músculo cardíaco. El cerdo, por su similitud con la especie humana, puede constituir un modelo experimental adecuado para definir el potencial terapéutico de estas células.

**Objetivo.** Nuestro objetivo fue aislar y caracterizar antigénicamente las CMM porcinas, y estudiar su diferenciación a miocardiocitos *in vitro* para su posible uso de regeneración cardíaca en un modelo *in vivo* de infarto de miocardio.

**Métodos.** Las CMM porcinas se obtuvieron a partir de aspirados medulares de fémur o costilla de cerdos. Las células adherentes, tras 4 semanas en cultivo, se caracterizaron fenotípicamente

mediante citometría de flujo con anticuerpos monoclonales. Además, las CMM se immortalizaron con el plásmido pRNS-1 para conseguir una línea estable de crecimiento continuo (PBMC-2). Para su diferenciación a cardiomiocitos, tanto las CMM primarias como la línea obtenida se trataron 24 horas con 5-azacytidina 10mM y se determinó su fenotipo por inmunohistoquímica.

**Resultados.** Las CMM porcinas obtenidas presentaron el siguiente fenotipo: CD45, CD14, CD31, CD11b negativas, y CD90 (59.8%), CD29 (85.5%), CD44 (47.7%), SLA I (47.1%) y CD46 (75.1%) positivas, marcadores descritos para las CMM humanas. La línea celular PBMC-2 presentó patrones similares de reactividad con el panel de anticuerpos utilizados. Tras la estimulación con 5-azacytidina, tanto de los cultivos primarios como con la línea PBMC-2, obtuvimos un porcentaje variable de células con características de cardiomiocitos siendo positivas para a-actina, troponina-T, desmina y Conexina -43.

**Conclusión.** La obtención, caracterización, immortalización y diferenciación de las CMM porcinas puede ser una útil herramienta para el desarrollo de modelos de terapia celular *in vivo* utilizando como modelo biomédico el cerdo.

**F-0023-04-O. EL TRATAMIENTO CON SECUENCIAS INMUNOESTIMULADORAS DE ADN REDUCE LA HIPERREACTIVIDAD BRONQUIAL Y EL FENOTIPO ALÉRGICO.** L. Conejero Hall<sup>1,2</sup>, M.L. Baeza<sup>1</sup>, Y. Higaki<sup>1,2</sup>, M. Rubio<sup>1</sup>, I. Varela<sup>2</sup>, J.M. Zubeldia<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Alergología. Hospital General Universitario Gregorio Marañón. Madrid. <sup>2</sup>Instituto de Investigaciones Biomédicas Alberto Sols (CSIC-UAM). Madrid.

**Introducción.** Existe un aumento en la prevalencia tanto del asma bronquial como de otras enfermedades alérgicas. El objetivo de un tratamiento realmente eficaz de estas patologías debería estar dirigido a revertir el fenotipo alérgico Th<sub>2</sub>. Estudios previos han demostrado que las secuencias de ADN que contienen motivos CpG (ISS) actúan induciendo una respuesta inmune Th<sup>1</sup>, en detrimento de una Th<sub>2</sub>, característica de las enfermedades alérgicas.

**Objetivo.** Estudiar si la administración de ISS con proteínas del polen de olivo (olea) es capaz de disminuir la inflamación y la hiperreactividad bronquial en un modelo murino de asma alérgico a olea.

**Métodos.** Se creó un modelo de asma bronquial por sensibilización a polen de olivo en ratones Balb/c. Se establecieron diferentes grupos de tratamiento: olea, olea con ISS o suero salino. Se les realizaron pruebas de función pulmonar (pletismografía) y tras el sacrificio, se estudió el grado de infiltración celular y la producción de moco en la vía aérea pulmonar. Por último, se cultivaron los esplenocitos para cuantificar mediante ELISA la producción de citoquinas en los sobrenadantes tras estímulo específico.

**Resultados.** Observamos una disminución en la obstrucción de la vía aérea, en respuesta a la inhalación de metacolina, en el grupo de ratones que fueron tratados con ISS/olea, así como una menor producción de moco e infiltración celular en el parénquima pulmonar. Asimismo, detectamos una disminución en la producción de IL-4 e IL-5 en los ratones tratados con ISS/olea respecto a los otros grupos.

**Conclusiones.** La co-administración de ISS y olea a ratones sensibilizados a las proteínas del polen de olivo disminuye la hiperreactividad bronquial, el grado de infiltración celular pulmonar, la producción de moco y favorece un cambio en el patrón de citoquinas Th<sub>2</sub>.

**F-0023-05-C. LA ENTEROTOXINA TERMOLÁBIL DE E. COLI (LT) INDUCE APOPTOSIS EN LINFOCITOS DEPENDIENTE DE GLUCOCORTICOIDES. E. Tamayo, R. Marquina, J. González-Rojas, R. Merino, J. Merino. Dpto. de Biología Molecular, Universidad de Cantabria, Santander.**

La administración de antígenos proteicos en superficies mucosas induce tolerancia sistémica a los mismos. Este fenómeno dificulta el empleo de vacunas por vía de mucosas, estrategia atractiva *a priori* para potenciar selectivamente la respuesta inmune en la puerta de entrada de la mayoría de los patógenos. Este efecto tolerogénico se evita administrando determinados «adyuvantes orales», como LT o la toxina del cólera (CT), junto al antígeno vacunal. No obstante, se desconocen los mecanismos implicados en la acción de estos adyuvantes. Experimentos preliminares mostraron que LT induce apoptosis en linfocitos T y B, especialmente en las poblaciones inmaduras. En base a estos resultados se investigaron los mecanismos implicados en la apoptosis de los linfocitos y si este fenómeno era determinante en el desarrollo de la adyuvancia.

La apoptosis inducida por LT en linfocitos no utiliza las vías de membrana de Fas o TNF, pero encuentra resistencia en células que hiperexpresan Bcl-2. El hallazgo de niveles elevados de corticosterona en la sangre de los animales inyectados con LT sugirió que el efecto podría ser dependiente de glucocorticoides. Esta hipótesis se confirmó comprobándose que, tanto la extirpación quirúrgica de las suprarrenales como la administración Mifepristone, un inhibidor selectivo de corticosterona, evitan la mortalidad de los linfocitos T y B inmaduros.

La apoptosis inducida en linfocitos no parece estar implicada en el efecto adyuvante de LT, ya que la inoculación nasal de OVA junto a LT en ratones transgénicos de Bcl-2 en linfocitos, resistentes al efecto apoptogénico de LT, indujo el mismo tipo de respuesta humoral que en ratones no transgénicos. Además, la administración de LTK63, mutante atóxica pero inmunogénica de LT, no induce apoptosis de linfocitos.

Estos datos indican que la apoptosis inducida por LT en linfocitos es dependiente de glucocorticoides y no es directamente responsable del efecto adyuvante de la toxina.

**F-0023-06-C. OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE UNA LÍNEA INMORTALIZADA DE CÉLULAS EPITELIALES DEL TÚBULO PROXIMAL RENAL USANDO VECTORES RETROVIRALES CON TELOMERASA. J. Suela, Y. Campos-Martín, B. Gozalbo López, M. Gómez-del Moral, E. Martínez Naves. Unidad de Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense de Madrid.**

**Introducción.** Las CEPTRs (células epiteliales del túbulo proximal renal) son capaces de producir factores de complemento, citoquinas y quimiocinas. Se cree que también pueden actuar como células presentadoras de antígeno y que juegan un importante papel en procesos inflamatorios renales, como el rechazo de trasplante, nefritis autoinmune, etc. Las CEPTRs son muy utilizadas en estudios *in vitro*, disponiendo de cultivos primarios, con limitaciones obvias.

**Objetivos.** Obtener una línea inmortal de CEPTRs mediante la transducción del gen de la telomerasa en células de cultivo primario.

**Metodología.** A partir de una nefrectomía se obtuvieron CEPTRs de cultivo primario. Se realizó un ciclo de infección con el sobrenadante de la línea empaquetadora PT-67 (portadora del retrovirus pBABE-hTERT) y se seleccionaron las células infectadas con puromicina.

**Resultados.** Para descartar un posible origen fibroblástico, se comprobó el patrón de expresión del factor de coagulación VIII. Las inmortalizadas presentan un patrón negativo similar a las CEPTRs. Como control positivo se usaron fibroblastos humanos adultos. Para corroborar la presencia de telomerasa, se realizó una RT-PCR en busca de la expresión de hTERT. Las CEPTRs no expresaban RNA de hTERT, mientras que las inmortalizadas sí. La línea inmortalizada mantenía sus marcadores fenotípicos básicos respecto a las CEPTRs primarias: BerEP4 positivas (marcador epitelial) y CB-43 positivas (marcador de la bomba de sodio-calcio, propio de las CEPTRs). Por último, se comprobó la longevidad del cultivo durante 7 meses de división continua, superando las 150 divisiones celulares sin observar descenso de crecimiento. El cultivo primario no supera las 80 divisiones.

**Conclusión:** se ha obtenido una línea de CEPTRs inmortalizada con telomerasa que mantiene las características morfológicas y fenotípicas de las células primarias.

**F-0023-07-C. TOWARD GENE THERAPY FOR HUMAN CD3 DEFICIENCIES. J.M. Martín-Fernández<sup>1</sup>, A. Pacheco-Castro<sup>1</sup>, R. Millán<sup>1</sup>, O. Sana<sup>2</sup>, L. Allende<sup>3</sup>, J. R. Regueiro<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Inmunología, Facultad de Medicina, Universidad Complutense, Madrid. <sup>2</sup>Hacettepe University Children's Hospital, Ankara, Turkey. <sup>3</sup>Inmunología, Hospital 12 de Octubre, Madrid.**

Gene transfer into mature T lymphocytes has been proposed as a therapeutic option, particularly for cancer and acquired immunodeficiency syndrome, but also for congenital T cell disorders. By using human CD3 deficiency as a model system, we show that the phenotypic and biochemical dysfunctions of the mutant TCR-CD3 complex are indeed corrected by gene transfer, but apparently at the cost of self-reactivity. These results provide proof of principle toward gene therapy for human CD3 deficiencies, but also suggest that careful analysis of genetically modified mature T lymphocytes should be performed to search for calibration disorders before they are used for clinical trials.

**F-0023-08-O. INMUNOFERÓN® INDUCE LA MADURACIÓN DE CÉLULAS DENDRÍTICAS HUMANAS. P. Majano<sup>1</sup>, J.L. Alonso-Lebrero<sup>2</sup>, P. Roda-Navarro<sup>1</sup>, J.P. Pivel<sup>3</sup>, S. González<sup>2</sup>, M. López-Cabrera<sup>1</sup>, R. Moreno-Otero<sup>4</sup>. <sup>1</sup>Unidades de Biología Molecular y <sup>4</sup>Hepatología, Hospital Universitario de la Princesa. Universidad Autónoma de Madrid, <sup>2</sup>Departamento de I+D Industrial Farmacéutica Cantabria S.A., Madrid, <sup>3</sup>Saetabis Bio Consulting, Valencia.**

**Antecedentes.** Las células dendríticas juegan un papel determinante de la iniciación y regulación de la respuesta inmune. En particular, la maduración de las células dendríticas es básica para la inducción de una respuesta inmune antígeno específica por parte de linfocitos T y en el desarrollo de vacunas. Inmunoferon® es un fármaco cuyo principio activo está formado por la asociación no covalente de un polisacárido aislado de *Candida utilis* y una proteína de la semilla de *Ricinus communis* y es capaz de modular distintos aspectos de la respuesta inmune.

**Objetivo.** En el presente trabajo hemos investigado los efectos de Inmunoferon® sobre la maduración de células dendríticas derivadas de monocitos humanos incubados con factor estimulante del crecimiento de granulocitos y macrófagos (GM-CSF) e Interleuquina-4 (IL-4).

**Resultados.** Inmunoferon® induce la expresión de los marcadores de maduración HLA-DR, CD80, CD86 y CD83 como se comprobó por citometría de flujo. A su vez, ensayos de protección a la digestión debida a ribonucleasas demostraron que dicho fármaco modifica la expresión de distintos ARN mensajeros de quimioquinas y receptores de quimioquinas. Asimismo por ELISA se cuantificaron un aumento en los niveles de las citoquinas IL-10 e IL-12. Además, mediante ensayos de fluorescencia indirecta comprobamos que Inmunoferon® bloquea la incorporación de partículas (FITC-dextrano) por parte de células dendríticas y provoca la activación del factor de transcripción NF-κB (translocación nuclear de RelA/p65). Adicionalmente, experimentos de Western blot determinaron que Inmunoferon® induce la degradación de la proteína inhibidora de NF-κB (IκB-alfa).

**Conclusión.** Estos resultados muestran que Inmunoferon® es capaz de inducir la adquisición de un fenotipo maduro en células dendríticas humanas y sugieren que podría utilizarse simultáneamente en procesos de vacunación y otros protocolos que requieran la maduración de células dendríticas.

**F-0023-09-O. SALICILATOS INHIBEN LA RESPUESTA CELULAR A LA IL-4.** M. Perez-Gonzalez, J. Zamorano. U. de Investigación, H. San Pedro de Alcántara. Cáceres.

La IL-4 es una citoquina con amplio efecto de actividades biológicas. Sus efectos están mediados a través de la activación de intermediarios celulares. Entre éstos destaca el factor de transcripción STAT6 que participa en la regulación génica y el sustrato del receptor de la insulina (IRS) que regula la protección de la apoptosis. En un estudio reciente hemos demostrado que el tratamiento con salicilatos inhibe la activación de STAT6 inducida por las IL-4 e IL-13. En este estudio investigamos el efecto de los salicilatos en la activación de otras rutas intracelulares incluyendo IRS y Shc. Así, el tratamiento de líneas celulares de origen linfocitoide con salicilato de sodio previene la activación de IRS2 por la IL-4. Igualmente, los salicilatos previenen la activación de IRS1 por IL-4 en líneas celulares de colon en la misma extensión que STAT6. Esta inhibición de las proteínas IRS se correlaciona con la inhibición de la capacidad de la IL-4 para prevenir la apoptosis. De la misma manera, los salicilatos también previenen la activación de Shc por la IL-4 en estas líneas celulares. Otros salicilatos como la aspirina y la sulfasalazina mostraron un similar efecto inhibidor. Dado que nuestros resultados indican que el efecto inhibidor de los salicilatos está mediado a través de la quinasa Src, estos datos indican que la activación de esta quinasa es también necesaria para la activación de IRS1/2 y Shc por la IL-4.

Este trabajo está financiado por el Fondo de Investigación Sanitaria. FIS 01/0157, FIS 99/3082 y la Junta de Extremadura 2PR01C015. M. Perez-Gonzalez es becario de la Fundación Fernando Valhondo Calaff.

**F-0023-10-O. EFECTO DEL INFLIXIMAB (Ifx) IN VITRO EN LA SÍNTESIS DE CITOCINAS.** P. Sabina<sup>1</sup>, S. Ramiro<sup>1</sup>, M.E. Miranda<sup>2</sup>, A. Balsa<sup>2</sup>, E. Martín-Mola<sup>2</sup>, G. Fontán<sup>1</sup>, D. Pascual-Salcedo<sup>1</sup>. Servicios de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Reumatología. Hospital Universitario La Paz. Madrid

El Ifx es un anticuerpo monoclonal anti-TNF que se une al TNF soluble y al transmembrana. El Ifx es ampliamente utilizado para el tratamiento de diversas enfermedades inflamatorias, entre ellas artritis reumatoide y enfermedad de Crohn. Aunque su eficacia clínica está demostrada, el mecanismo de actuación es todavía objeto de estudio.

**Objetivo.** Investigar el mecanismo de acción *in vitro* del Ifx.

**Métodos.** Se estimularon células mononucleares de sangre periférica (PBMC) de 9 controles con LPS (10-1000 ng/ml) o TNF (10-20ng/ml) y se añadieron dosis crecientes de Ifx (0 a 500 mg/ml) a los cultivos. Se estudió el efecto del fármaco mediante: A) Evaluación por citometría, sobre células CD14+, de la expresión intracelular de TNF e IL-6 y B) Cuantificación por RT-PCR cuantitativa en tiempo real de la expresión del mRNA de TNF, IL-6 e IL-1. La posible aparición de apoptosis se analizó por citometría, con Anexina-V y 7AAD. La secreción de IL6 e IL1 se cuantificó por ELISA.

**Resultados:** En los cultivos estimulados con LPS, el número de células que expresaron TNF intracitoplásmico disminuyó de manera dosis-dependiente en presencia de Ifx, sin embargo, el número de células con IL6 intracitoplásmica no se modificó. Para excluir la posible interferencia del Ifx en la detección de TNF intracelular, se cuantificó el mRNA del TNF y de dos citocinas inducidas por él (IL-6 e IL-1). En presencia de LPS e Ifx el mRNA de TNF disminuye hasta un 80% sobre los niveles sin Ifx. Cuando los cultivos se estimularon con TNF se produjo un aumento de los niveles de mRNA de TNF, IL-6 e IL-1, que también disminuyó de manera dosis-dependiente en presencia de Ifx, llegándose a anular el estímulo. El Ifx también disminuyó la secreción de IL6 e IL1 estimulada por TNF. En ninguna condición hubo apoptosis de los PBMC estimulados.

**Conclusiones:** El Ifx inhibe la propia regulación autocrina del TNF. Inhibe además el efecto inductor del TNF sobre otras citocinas. Este efecto es independiente de mecanismos apoptóticos.

Financiado por Schering-Plough.

**F-0023-11-O. EFECTO TERAPEUTICO DE INTERFERÓN-β EN ENCEFALOMIELITIS ALÉRGICA EXPERIMENTAL.** F.M. Martín-Saavedra<sup>1</sup>, N. Flores<sup>1</sup>, C. Eguiluz<sup>1</sup>, B. Dorado<sup>1</sup>, C. Puert2, J.A. García-Merino<sup>2</sup>, C. Durán<sup>1</sup>, S. Ballester<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Unidad de Regulación Génica, CNM, Instituto de Salud Carlos III, Majadahonda, Madrid. <sup>2</sup>Unidad de Neuroinmunología, Hospital Puerta de Hierro de Madrid.

La encefalomielitis alérgica experimental (EAE) es una enfermedad inflamatoria del sistema nervioso central (SNC) y sirve como modelo animal de la esclerosis múltiple humana (EM). Se considera que tiene un origen autoinmune y que está mediada por células del subtipo 1 de linfocitos T cooperadores (Th1), caracterizadas por la secreción de citoquinas como interleuquina 2 (IL2) e interferón γ (IFNγ) entre otras. Aunque en la actualidad no existe un tratamiento eficaz para EM, interferón β (IFNβ) es una de las terapias que se está utilizando en los últimos años dado que su administración ha mostrado algunos efectos beneficiosos. Sin embargo, los mecanismos moleculares por los que tienen lugar dichos efectos no han sido determinados. Hemos utilizado el modelo de EAE en ratones SJL mediado por antígeno (proteína básica de mielina) para: i) valorar clínica e histológicamente el efecto terapéutico de IFNβ y ii) analizar posibles efectos sobre la inducción de factores nucleares significativos en la activación y diferenciación del linfocito Th. Hemos comprobado que IFNβ atenúa los síntomas de EAE y, mediante tinciones hematoxilina-eosina, hemos cuantificado la frecuencia de infiltrados perivasculares en SNC, la cual disminuye considerablemente en animales tratados. Por otra parte, mediante ensayos de western blot y de cambios de movilidad electroforética (EMSA), hemos comprobado que el tratamiento de EAE con IFNβ disminuyó el nivel de activación de NFκB y de la fosforilación de su inhibidor IκBα en células de nódulos linfáticos.

También hemos observado en las mismas células que el tratamiento con IFN $\beta$  aumentó el nivel de fosforilación de Stat6 y la unión de este factor al elemento P1 del promotor de interleuquina 4.

**F-0023-12-C. SECRECIÓN DE NIVELES TERAPÉUTICOS DE ANTICUERPOS BIESPECÍFICOS RECOMBINANTES CON ESPECIFICIDAD FRENTE AL CD3 Y FRENTE AL ANTÍGENO CARCINOEMBRIÓNARIO POR MONOCITOS HUMANOS PRIMARIOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE.** M. Compte<sup>1</sup>, B. Blanco<sup>1</sup>, F. Serrano<sup>2</sup>, A. Bernad<sup>2</sup>, L. Álvarez-Vallina<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, H. U. Clínica Puerta de Hierro. Madrid. <sup>2</sup>Departamento de Inmunología y Oncología, Centro Nacional de Biotecnología. Madrid.

Los anticuerpos (Ac) biespecíficos (AcBis) comenzaron a usarse en terapia antitumoral en clínica humana hace más de una década y han demostrado su potencial terapéutico en diferentes ensayos clínicos. Los progresos en el campo de la ingeniería de anticuerpos han permitido la obtención de AcBis de segunda generación, basados en fragmentos recombinantes, menos inmunogénicos y con mayor capacidad de penetración tisular. Nuestro grupo ha demostrado que líneas celulares humanas de origen hematopoyético modificadas genéticamente secretan AcBis recombinantes con formato *diabody* y especificidad frente a la cadena  $\epsilon$  del complejo TCR/CD3 y frente al antígeno carcinoembrionario (CEA) humano. La aplicación terapéutica de este protocolo requiere definir el tipo de célula productora de *diabody* y desarrollar un sistema de transferencia génica para modificar *ex vivo* células humanas primarias. Con este objetivo, hemos generado el vector lentiviral bicistrónico, *pdAb-GFP*, que se obtuvo clonando la construcción  $V_H$ MFE- $V_k$ OKT3-IRES- $V_H$ OKT3- $V_k$ MFE en el vector *prRL.IRES.EGFP*. Los stocks virales se obtuvieron mediante ultracentrifugación a partir de sobrenadante (SN) de cultivo de células 293T cotransfectadas con los vectores *pdAb-GFP*, *pMDLg/pRRE* (gag-pol), *pRSVrev* (rev), así como el vector de expresión de la proteína VSV-G (*pMD.G*). Los monocitos humanos se aislaron a partir de PBMCs de donantes sanos empleando un sistema de selección negativa basado en la tecnología MACS. Las células recuperadas (>95% CD14+) se cultivaron en medio suplementado con 25 ng/ml de M-CSF y se infectaron con el SN viral concentrado. Más del 90% de los monocitos humanos se mantuvieron viables durante periodos de tiempo prolongados, expresaron de forma estable niveles altos de GFP y secretaron cantidades apreciables de *diabody*  $\alpha$ CEA/ $\alpha$ CD3 con actividad antitumoral.

**F-0023-13-C. EFECTO DEL TRATAMIENTO CON bFGF SOBRE LA EXPRESIÓN DE TNF- $\alpha$ , EN SUERO Y EN LA CAPACIDAD PROLIFERATIVA DE LINFOCITOS T DE PACIENTES CON ALZHEIMER.** M.L. Pita<sup>1</sup>, G. Zaitseva<sup>1</sup>, M. Aceves<sup>2</sup>, J. Sánchez<sup>2</sup>, L. Uribe<sup>2</sup>, O. De la Rosa<sup>3</sup>, R. Solana<sup>3</sup>. <sup>1</sup>Laboratorio de Inmunobiología, Dpto. de Biología Celular y Molecular, CUCBA, Universidad de Guadalajara, México. <sup>2</sup>Laboratorio Neurotrofom S. A. De C.V., México. <sup>3</sup>Dpto. de Biología Celular, Fisiología e Inmunología. Sección Inmunología, Hospital Universitario «Reina Sofía», Córdoba.

**Introducción.** La enfermedad de Alzheimer (EA) es un proceso neurodegenerativo y progresivo. La incidencia de la enfermedad

aumenta con la edad, pero no hay pruebas de que su origen esté en el proceso de envejecimiento. Las placas seniles constituidas por la proteína beta-amiloide en pacientes con EA, representan un estímulo crónico para los astrocitos y las células microgliales. Por otra parte se ha descrito que el bFGF es un factor de crecimiento, con funciones angiogénicas, cardioprotectoras y neurotróficas.

**Objetivo.** Evaluar el posible efecto inmunomodulador del bFGF (*basic fibroblast growth factor*) sobre los niveles de TNF- $\alpha$  en suero, así como el efecto sobre la capacidad proliferativa *in vitro* de linfocitos T de pacientes con EA antes y después del tratamiento comparado con controles sanos sin tratamiento.

**Metodología.** A los pacientes con EA (n=10; edad: 56-81 años) se les administró vía sublingual 5 mg/ml de bFGF disuelto en solución salina, 3 veces a la semana, durante 6 semanas. La proliferación de linfocitos T *in vitro* se determinó mediante el ensayo de incorporación de timidina tritiada tras la estimulación con PHA (10 mg/ml) durante 72 horas. La concentración de TNF- $\alpha$  en suero se determinó mediante el ensayo ELISA.

**Resultados y conclusión.** La proliferación de los linfocitos T estimulados *in vitro* con PHA, expresada en índices de estimulación (IE), de los pacientes con EA sin tratamiento fue menor (IE = 4.6  $\pm$  2.9), que la de los controles sanos (IE = 7.3  $\pm$  2.5) sin tratamiento. Tras la administración del bFGF a los pacientes con EA esta proliferación de los linfocitos T se incrementó hasta alcanzar los valores de los controles sanos (IE = 7.5  $\pm$  2.3). Por otro lado, la concentración en suero de TNF- $\alpha$  en pacientes con EA disminuyó tras el tratamiento con bFGF. Por lo anterior se puede decir que el bFGF es posible que también tenga un efecto inmunomodulador.

**F-0023-14-O. UNA NUEVA POBLACIÓN DE PROGENITORES HEPÁTICOS EMBRIONARIOS ( $\zeta$ CÉLULAS TRONCO?) C-KIT<sup>dull</sup>CD45-TER119-, CAPAZ DE ESTABLECERSE Y MADURAR EN ORGANOIDES HEPÁTICOS FETALES.** I. Cortegano, D. Melero, B. de Andrés, P. Gonzalo, P. Muñoz-Pacheco, B. Lobo, L.S. Aroeira, M.L. Gaspar, MAR Marcos. Instituto de Salud Carlos III. Unidad de Inmunobiología.

**Introducción.** Durante el desarrollo embrionario del hígado del ratón, emergen poblaciones de células tronco hepatoepiteliales que evolucionan en estrecho contacto con células progenitoras hematopoiéticas. Ambos compartimentos interactúan a través de interacciones celulares específicas y de la producción de ligandos solubles, como HGF, OSM o VEGF. Hemos descrito una población de progenitores c-Kit<sup>dull</sup>CD45-TER119- que aparece en el hígado fetal de ratón a día 11 de gestación y que es capaz de diferenciarse a hepatocitos y células biliares.

**Objetivos.** 1. Análisis de los potenciales de la población c-Kit<sup>dull</sup>CD45-TER119-. 2. Estudio de su capacidad en la reconstitución del sistema hepático, utilizando un nuevo modelo organotípico de hígado fetal (FLOC).

**Metodología.** Citometría de flujo utilizando marcadores fenotípicos para caracterizar y purificar la población. FLOC utilizando explantes de 2-3mm de hígado a día 12 de gestación tratados con 5-deoxiguanosina. Estos organoides depletados de células proliferantes, se cocultivan con los progenitores c-Kit<sup>dull</sup>CD45-TER119- purificados de ratones singénicos GFP+ y se analiza a diferentes tiempos la expresión de proteínas específicas por técnicas de inmunofluorescencia y microscopía confocal. Para el análisis de los cultivos se utilizó la

detección de marcadores hepáticos (albúmina, citoqueratina-19) y de antígenos de proliferación (ki-67).

**Resultados.** La población c-Kit<sup>duall</sup>CD45-TER119- incluye *ex vivo* la mayor fracción de genes hepatoespecíficos presentes en el órgano, así como diferentes integrinas, c-Met y otros receptores de membrana. Una vez establecida en cultivo, se diferencia a células madre de estirpe hepática durante extensos períodos de tiempo. En cocultivos con explantes de hígado fetal, es capaz de regenerar poblaciones maduras y funcionales de hepatocitos y colangiocitos, una característica típica de células tronco somáticas.

**Conclusión.** En el hígado embrionario de 11 días de gestación en ratón, hemos caracterizado una población de células progenitoras hepáticas con potencial regenerativo típico de células tronco. A partir de estas células doble positivas para albúmina y citoqueratina 19 se generan células maduras tipo hepatocitos (albumina+) y tipo célula biliar (CK19+).

**F-0023-15-C. ANÁLISIS DE LA RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR INDUCIDA TRAS VACUNACIÓN IDIOTÍPICA EN PACIENTES AFECTOS DE LINFOMA FOLICULAR EN RECAIDA.** S. Inogés, A. López Díaz de Cerio, M. Rodríguez-Calvillo, N. Zabalegui, F. Pastor, J. Merino, A. Sánchez-Ibarrola, J. Merino, M. Bendandi. Area de Terapia Celular. Clínica Universitaria de Navarra. Fundación para la Investigación Médica Aplicada. Universidad de Navarra. Pamplona.

**Introducción.** El linfoma folicular (LF) se caracteriza por permanecer incurable a pesar de responder a los tratamientos habituales de quimioterapia, debido a la inevitable re-expansión de células tumo-

rales residuales tras el tratamiento. La inmunoterapia activa mediante vacunas paciente-específicas se basa en el hecho de que las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras de la inmunoglobulina tumoral expresada en la membrana de las células tumorales poseen determinantes antigénicos (idiotopos, y en conjunto idiotipo) que debido a su clonalidad, permiten emplearlos como antígenos tumor-específicos con el fin de inducir una respuesta inmune. En nuestro centro se está aplicando esta estrategia a pacientes afectos de LF en recaída.

**Objetivos.** Analizar la respuesta inmune humoral y celular inducida en pacientes tras las sucesivas vacunaciones.

**Material y Métodos.** El protocolo de vacunación empleado consta de cuatro vacunaciones mensuales y la quinta a modo de recuerdo a los dos meses de la última. La vacuna se compone del idiotipo, generado mediante técnicas de fusión celular a partir de células tumorales del paciente y purificado mediante cromatografía de afinidad, conjugado con KLH y administrado con GM-CSF como adyuvante. De manera previa a recibir las vacunaciones, se extrae sistemáticamente sangre a los pacientes con el fin de analizar la respuesta humoral y celular con las técnicas que se detallan a continuación: Respuesta Humoral: Test de ELISA anti-idiotipo y anti-KLH. Respuesta Celular: Proliferación mediante la incorporación de timidina tritiada, determinación de IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$  mediante ELISA, ensayos de citotoxicidad mediante liberación de <sup>51</sup>Cr y ELISPOT para determinación de células productoras de IFN $\gamma$ .

**Resultados.** Hasta la fecha se han incluido en nuestro estudio un total de 27 pacientes afectos de LF, de los que 9 ya han completado el calendario vacunal y en los que se ha analizado la respuesta inmune inducida. Se presentarán los resultados obtenidos.

*Este proyecto ha sido financiado por el acuerdo entre FIMA y la UTE proyecto CIMA.*

## F-0024. Aspectos genéticos y funcionales en patologías diversas

**Moderadores:** Cándido Juárez Rubio (Barcelona), Juan Ignacio Arostegui Gorospe (Barcelona)

**F-0024-01-C. ANALISIS DE LAS MUTACIONES DEL GEN HFE EN UN GRUPO DE PACIENTES CON ENFERMEDAD DE ALZHEIMER DE ORIGEN VASCO.** N. Olivares<sup>1</sup>, M.D. de Juan, J.Ruiz<sup>2</sup>, R. Sáez<sup>1</sup>, E Cuadrado<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología Laboratorio Unificado. Hospital Donostia. San Sebastián. <sup>2</sup>Servicio de Neurología. Hospital de Mendara. Guipuzcoa.

**Introducción.** La enfermedad de Alzheimer es la enfermedad neurodegenerativa más prevalente. Varias líneas de evidencia sugieren que un exceso de depósitos de hierro en el cerebro podría contribuir, entre otros factores, al desarrollo de la enfermedad. Entre los diferentes loci genéticos implicados en el metabolismo del hierro el gen HFE, situado en el cromosoma 6 y asociado a sobrecarga de hierro en la hemocromatosis hereditaria se ha postulado como un posible candidato.

**Objetivos.** Analizar las frecuencias de las 3 principales mutaciones del gen HFE: C282Y, H63D y S65C en un grupo de 139 pacientes diagnosticados de enfermedad de Alzheimer esporádica. Un grupo

de 116 individuos sanos sin hallazgos de demencia constituye el grupo control.

**Métodos.** Determinación de las mutaciones mediante PCR a tiempo real; análisis mediante curvas de melting y detección con sondas de hibridación en un equipo LightCycler (Roche)

**Resultados.** No encontramos incrementos significativos de las frecuencias alélicas de las diferentes mutaciones en el grupo total de enfermos frente al grupo control; pero si analizamos los diferentes subgrupos podemos observar: un aumento de la frecuencia del alelo H63D en el grupo con una edad de debut menor de 65 años frente al grupo que debuta con más de 65 años (  $p=0.04$ ) así como un mayor porcentaje de individuos con genotipos mutados en el grupo con debut anticipado de la enfermedad. Por otra parte, si agrupamos los pacientes por su origen poblacional, en el grupo de origen vasco (n=90) encontramos incrementos de la frecuencia del alelo C282Y y del genotipo C282Y heterocigoto, aunque no alcanzan significación estadística.

**Conclusiones.** Estos resultados preliminares se suman a los escasos y discordantes, existentes en la literatura, y sugieren que la

mutación H63D en presencia de otros factores genético-ambientales podría contribuir a la anticipación de la edad de la enfermedad. Por otra parte la ampliación del estudio del gen HFE en poblaciones genéticamente homogéneas como la vasca puede contribuir a clarificar su implicación.

**F-0024-02-O. ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE CITOQUINAS EN EL PLASMA RICO EN PLAQUETAS DE USO CLÍNICO EN TÉCNICAS DE REGENERACIÓN TISULAR.** C. Sáez-Torres, J. Calvo, A. Gayà. Banco de Tejidos. Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears. Palma.

**Introducción.** El plasma rico en plaquetas (PRP) es un concentrado de plaquetas de origen autólogo utilizado en cirugía maxilofacial, odontología, traumatología y cirugía plástica como adyuvante en técnicas quirúrgicas de regeneración de tejidos. La actividad biológica de este concentrado de plaquetas reside en el aporte de citoquinas y factores de crecimiento en el foco de lesión, destinados a acelerar el proceso de reparación tisular. A pesar de que la eficacia clínica del PRP está bien documentada, los mecanismos biológicos implicados en este proceso no se encuentran bien definidos.

**Objetivos.** Estudiar la presencia así como la cinética de producción de citoquinas proinflamatorias en el plasma rico en plaquetas.

**Métodos.** Se procesó sangre de una serie de donantes voluntarios con el fin de obtener plasma rico en plaquetas. Una parte de este concentrado de plaquetas fue sometido a un proceso previo de congelación/descongelación sucesiva con el fin de romper las membranas celulares. En ambos casos se procedió a la activación con cloruro cálcico de una alícuota de los concentrados para la obtención del gel de plaquetas. Las muestras fueron conservadas a 37°C y la determinación de los niveles de citoquinas se realizó en el sobrenadante de cada una de ellas a diferentes tiempos: 10 minutos, 1 día, 3 días y 5 días. Se analizó cuantitativamente el nivel de IL6, IL8, TNF- $\alpha$ , IL12, IL1 $\beta$ , IL10 mediante citometría de flujo (CBA Human Inflammation kit. Becton Dickinson).

**Resultados.** Las citoquinas detectadas de forma mayoritaria en las muestras analizadas fueron IL6 e IL8. Los resultados del análisis de las otras citoquinas mostraron niveles muy inferiores de IL1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL10 siendo indetectable la presencia de IL12.

La cantidad de citoquinas aumenta de forma significativa a partir de las 24 horas de obtención del PRP y alcanza niveles máximos a los 3 y 5 días. La aparición de citoquinas es dependiente de la formación del gel de plaquetas tras la adición de cloruro cálcico ya que en el PRP sin activar únicamente se observa una escasa producción de IL8.

La fragmentación de las células de los concentrados muestra un patrón de citoquinas que no sigue la cinética descrita y que se mantiene de forma prácticamente inalterada en niveles mínimos, que no aumentan con la formación del coágulo. Estos datos apoyan la hipótesis de que la producción de estos factores se produce a partir de las células viables contenidas en el gel de plaquetas y no se trata únicamente de la liberación de los depósitos intracelulares.

**Conclusión.** Los resultados de este análisis demuestran que la aplicación del PRP en forma de gel de concentrado de plaquetas conlleva la producción de citoquinas proinflamatorias en el lugar de la lesión. Queda por determinar el papel específico que desempeña cada una de las citoquinas en los procesos de regeneración de los diferentes tejidos.

\*Este trabajo ha sido financiado por una beca de la Conselleria de Salut i Consum de les Illes Balears.

**F-0024-03-O. DIFERENCIAS FUNCIONALES DEL SISTEMA INMUNE ENTRE POBLACIÓN JOVEN FUMADORA Y NO FUMADORA: ANÁLISIS DE LA PRODUCCIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXIGENO (ROS) Y DEL NITRÓGENO (NOS) POR CITOMETRÍA DE FLUJO.** G. Pereira<sup>1</sup>, L.F. Pereira<sup>1</sup>, J.A. Riesco<sup>2</sup>, C. Cámara<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Sección de Inmunología. <sup>2</sup>Sección de Neumología. Hospital San Pedro de Alcántara. Cáceres.

Los leucocitos polimorfonucleares (PMN) utilizan como mecanismo de eliminación de patógenos la producción de ROS, esto los convierte en una diana adecuada para valorar efectos del tabaco en el sistema inmune, el estímulo oxidante crónico más habitual en nuestro medio. La citometría de flujo (CF) es una nueva herramienta para la valoración de producción de ROS mediante el uso de distintos fluorocromos que emiten fluorescencia específicas en contacto con distintas especies de ROS. La CF permite además de cuantificar individualmente un número muy elevado de células, realizar experimentos cinéticos, hecho importante dada la gran labilidad de estas especies. Paralelamente se valoró la producción de NOS, complementando el análisis del nivel red-ox. El óxido nítrico puede actuar sólo o unirse al anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) para formar el potente oxidante anión peroxinitrito (ONOO<sup>-</sup>), el mayor agente citotóxico producido durante la inflamación.

Se seleccionó una población joven comparando fumadores sin patología respiratoria reseñable (n = 20) con respecto a sanos (n = 19).

Se utilizaron H2DCFH y HE para medir los niveles de peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y de O<sub>2</sub><sup>-</sup> respectivamente. Para valorar la producción de NO se usó DAF-FM. Se utilizó sangre fresca heparinizada que previamente marcada con CD45-PC5 para no realizar lisis que alteraran la integridad de membrana. Se valoró la producción basal y la inducida ante un estímulo oxidante (PMA), a tiempos cortos y a las 24 horas. Se utilizaron controles (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, SIN-1) e inhibidores (NaN<sub>3</sub>, L-NAME) para delimitar la especificidad de los fluorocromos. Adquisición en un citómetro EPICS XL (Coulter). Análisis de los datos por SPSS.

Los resultados obtenidos mostraron una incapacidad de los PMN del grupo de fumadores para producir peróxido de hidrógeno tanto basalmente como de forma inducida por PMA. También tienen una producción basal de anión superóxido inferior al grupo control, pero con mayor capacidad de producirlo ante el estímulo de PMA.

**F-0024-04-C. LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DE INTERLEUCINA-18 E INTERFERÓN GAMMA NO ESTÁN RELACIONADOS CON LA APARICIÓN, SEVERIDAD O COMPLICACIONES TROMBÓTICAS DE LA ENFERMEDAD CORONARIA ARTERIAL.** J. Calvo<sup>1</sup>, M. Sierra<sup>1</sup>, A. Merino<sup>2</sup>, I Segura<sup>2</sup>, C. Imizcoz<sup>2</sup>, A. Berenguel<sup>2</sup>, E. Alegría<sup>2</sup>, A. Gaya<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Banco de Tejidos. Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears. <sup>2</sup>Instituto Cardiológico. Clínica Rotger. Palma de Mallorca.

**Introducción.** Las concentraciones sanguíneas de Interleucina-18 (IL-18) e interferón gamma (IFNG) están relacionadas con el desarrollo, extensión y complicaciones de la enfermedad coronaria arterial (ECA). Además, la elevación de los niveles de IL-18 puede aumentar la producción de IFNG.

**Objetivo.** Determinar si los polimorfismos genéticos de los genes que codifican ambas proteínas y afectan su expresión están relacionados con la ECA, ya sea de forma individual o combinada.

**Métodos.** Se analizaron 215 pacientes sometidos a un procedimiento de cateterización, determinándose la presencia de ECA angiográfica y su extensión a 1, 2 ó 3 vasos, así como los factores de riesgo cardiológicos y la presentación clínica. Los polimorfismos genéticos IL-18 (-137 G/C) e IFNG (intron 1 CA repeat), fueron realizados por PCR-RFLP y PCR y análisis de fragmentos, respectivamente.

**Resultados.** La presencia de factores de riesgo coronarios (incluyendo la proteína C reactiva elevada) resultó mayor en pacientes con ECA angiográfica. Aunque los genotipos de IL-18 GG, GC y CC, no estaban distribuidos de forma idéntica entre pacientes con (49%, 39% y 11%) y sin (61%, 35% y 4%) ECA angiográfica, las diferencias no alcanzaban la significación estadística. Tampoco existía relación con la severidad de la enfermedad o la presentación clínica. De forma similar, la distribución de alelos del gen IFNG era parecida en ambos grupos. Cuando ambos genotipos se analizaron en combinación los resultados tampoco mostraron significación estadística en relación con la ECA.

**Conclusiones.** Los polimorfismos genéticos de IL-18 e IFNG o la combinación de sus genotipos no esta relacionada con la aparición, severidad o complicaciones clínicas de la ECA de forma estadísticamente significativa.

*Estudio realizado gracias a una beca de la Fundación Mapfre-Medicina*

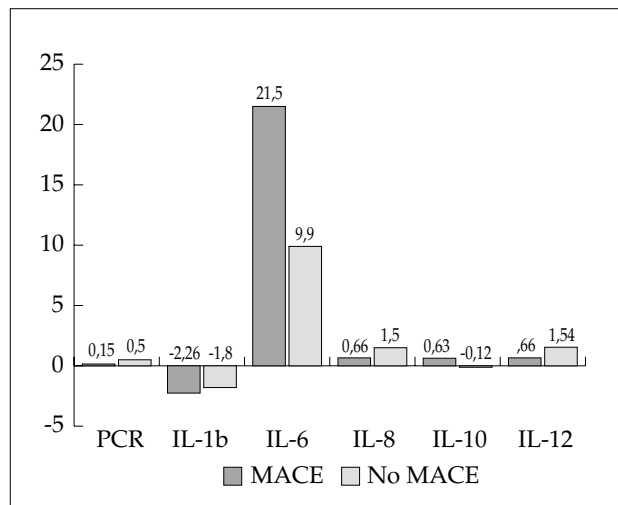
**F-0024-05-O. EL AUMENTO DE INTERLEUCINA-6 PERO NO DE PROTEÍNA C REACTIVA TRAS ANGIOPLASTIA CORONARIA ESTÁ ASOCIADO CON UNA PEOR EVOLUCIÓN A MEDIO PLAZO.** A. Gayà<sup>1</sup>, J. Calvo<sup>1</sup>, I Segura<sup>2</sup>, C. Imízcoz<sup>2</sup>, A. Berenguel<sup>2</sup>, E. Alegría<sup>2</sup>, A. Merino<sup>2</sup>. <sup>1</sup>Banco de Tejidos. Fundació Banc de Sang i Teixits de les Illes Balears. <sup>2</sup>Instituto Cardiológico. Clínica Rotger. Palma de Mallorca.

**Introducción.** Las concentraciones séricas elevadas de proteína C reactiva y de IL6 se asocian con un mayor riesgo de padecer patología coronaria. Los inhibidores plaquetarios de GP IIb-IIIa reducen tanto la IL6 como la proteína C reactiva (CRP) tras angioplastia coronaria (AC).

**Objetivo.** Analizar si la reducción inducida por fármacos de IL6 y proteína C reactiva pueden mejorar la evolución a medio plazo.

**Métodos.** Se analizaron 29 pacientes que fueron sometidos a AC. Se excluyeron pacientes con procesos inflamatorios o enfermedades neoplásicas o metabólicas, así como los que presentaban elevación de CK/MB post-angioplastia. Los marcadores de inflamación estudiados fueron: CRP, IL-6, IL-1β, IL-8, IL-10, IL-12 y TNF-α. Las muestras de sangre se obtuvieron pre-angioplastia y 24 y 48 horas tras el procedimiento. En 16 pacientes se inició una perfusión de eptifibatide inmediatamente tras la AC y se mantuvo 24 horas. Los otros 13 pacientes recibieron la terapia antitrombótica habitual.

**Resultados.** De todos los marcadores de inflamación estudiados sólo CRP y IL-6 aumentaron tras la AC. Aunque tanto el aumento de CRP como de IL-6 quedó reducido por el tratamiento con GP IIb-IIIa, no se observó ningún efecto del fármaco en los procesos coronarios (MACE) durante el primer año. De forma interesante, el aumento medio de IL6 tras AC en todos los pacientes (tratados y no tratados) fue, a diferencia del aumento de CRP, mayor en el grupo de pacientes que presentaron procesos coronarios adversos en el primer año. Los resultados se muestran en la figura.



**Conclusiones.** Un tratamiento anti-trombótico corto de 24 horas bloquea los niveles de CRP y en menor medida de IL6 tras AC, pero no afecta a la evolución a medio plazo. Además, sólo el aumento de IL6 fue mayor en pacientes con procesos adversos coronarios independientemente de que fueran tratados o no. Un tratamiento dirigido específicamente a reducir los niveles de IL6 tras angioplastia podría mejorar el pronóstico de los pacientes a medio plazo.

**F-0024-06-O. LOS POLIMORFISMOS C677T Y A298C DEL GEN METILENTETRAHIDROFOLATO REDUCTASA (MTHFR) PREDISPONE AL DESARROLLO DE ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL (AAA).** E. Ocaña<sup>1</sup>, J.C. Bohórquez<sup>2</sup>, J.A. Brieva<sup>1</sup>, A. Nieto<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología y <sup>2</sup>Cirugía Vascul\*. H.U. Puerta del Mar. Cádiz

**Introducción.** Concentraciones elevadas de homocisteína constituye un factor de riesgo para padecer enfermedades vasculares, como aterosclerosis y trombosis. Los pacientes con AAA tienen niveles aumentados de homocisteína la cual puede interaccionar con la pared aórtica induciendo elastólisis y perturbación endotelial, lo que podría relacionarse con algunas de los aspectos histológicos más característicos de los AAA que son disminución del espesor de la capa media, fragmentación de la red de elastina y presencia de infiltrados inflamatorios. Entre otros factores, mutaciones en el gen que codifica el enzima MTHFR como C677T y A1298C juegan un papel importante en la hiperhomocisteinemia.

**Objetivos.** Estudiar la prevalencia de los genotipos C677T y A1298C MTHFR en pacientes con AAA y la correlación con distintos parámetros clínicos.

**Materiales y métodos.** Estudiamos 85 pacientes diagnosticados de AAA y sometidos a cirugía reparadora electiva y 90 controles. El análisis de los polimorfismos se realizó mediante PCR-RFLP. Para el análisis estadístico de los resultados utilizamos el test X2 o test exacto de Fisher y ANOVA.

**Resultados.** No se apreciaron diferencias significativas en la prevalencia del polimorfismo C677T en pacientes y controles, siendo la frecuencia del alelo 677T de un 40.5% en pacientes y 37.3% en controles. En cuanto al polimorfismo A1298C encontramos que la frecuencia del alelo 1298C es significativamente mayor en pacientes que

en controles, 37.6% vs 27.2% ,  $p < 0.03$ , O.R 1.61 (95%CI 1- 2.60). Sin embargo cuando analizamos el efecto combinado de los dos polimorfismos observamos que la presencia de los alelos 677T 1298C es mayor en pacientes, 37.5% vs 20%,  $p < 0.001$ , O.R=2.94 (95%CI 1.43-6.0). No se observaron diferencias significativas en cuanto a diversos parámetros clínicos.

**Conclusiones.** Los alelos 677T y 1298C de la MTHFR predisponen conjuntamente al desarrollo de AAA y no parecen influir en las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

**F-0024-07-C. ANÁLISIS DEL POLIMORFISMO LEU7PRO DEL NEUROPEPTIDO Y (NPY) EN ANEURISMA DE AORTA ABDOMINAL (AAA).** E. Ocaña<sup>1</sup>, J.C. Bohórquez<sup>2</sup>, J.A. Brieva<sup>1</sup>, A. Nieto<sup>1</sup>. Servicio de <sup>1</sup>Inmunología y <sup>2</sup>Cirugía Vascular. Hospital Universitario Puerta del Mar. Cádiz.

**Introducción.** El NPY es una molécula que desempeña funciones sobre el control de la obesidad y el sistema cardiovascular. Actúa sobre el endotelio vascular activando la angiogénesis y sobre las células del sistema inmune modulando la liberación de citoquinas. Estas acciones ponen de manifiesto que el NPY puede actuar sobre el sistema inmune, sistema nervioso simpático y sistema vascular en diversas situaciones fisiopatológicas como la HTA y aterosclerosis. Algunos de los factores de riesgo asociados a los AAA son la HTA, dislipemias, tabaco y la aterosclerosis. Histológicamente los AAA se caracterizan por la presencia de un infiltrado inflamatorio que puede intervenir en la etiopatogenia de la enfermedad. Uno de los polimorfismos del NPY, Leu7Pro, ha sido asociado con niveles altos de colesterol y con engrosamiento de las capas íntima-media de la carótida.

**Objetivos.** Estudiar la frecuencia del polimorfismo 7del NPY en pacientes de AAA y la correlación con distintas manifestaciones clínicas.

**Métodos.** Analizamos 67 pacientes y 76 controles. Recogimos distintos parámetros clínicos. El polimorfismo Leu7Pro se determinó mediante PCR-RFLP. Para el análisis estadístico utilizamos los test de X<sup>2</sup> y ANOVA.

**Resultados.** La frecuencia del alelo 7Pro en pacientes fue de 5.9% frente a un 3.9% en controles, no detectándose diferencias significativas entre ambos. Al analizar los parámetros clínicos encontramos que la presencia del alelo 7 Pro se correlaciona con una mayor calcificación de la pared arterial ( $p < 0.04$ ), mayor infiltración de la pared ( $p < 0.04$ ) y ausencia de sintomatología en los pacientes ( $p < 0.04$ )

**Conclusión.** No parece existir ninguna relación entre los polimorfismos Leu7Pro del NPY con la susceptibilidad a padecer AAA. Sin embargo, la presencia del alelo 7Pro puede condicionar las manifestaciones clínicas de la enfermedad.

**F-0024-08-C. EXPRESIÓN DE ANTÍGENOS MICA Y MICB EN CÉLULAS EPITELIALES DE MUCOSA BUCAL Y RESPUESTA IN VITRO DE LINFOCITOS T FRENTE A FOSFOANTÍGENOS NO PEPTÍDICOS Y MICA RECOMBINANTE EN ENFERMEDAD DE BEHÇET.** F. Pujalte, A. Etxagibel, I. Muñoz, C. Crespi, A. Cambra, M.R. Julià, L. Pallarés, N. Matamoros. Servicio Inmunología Hospital Son Dureta. Palma de Mallorca.

La enfermedad de Behçet se caracteriza por episodios recurrentes de aftas orogenitales, vasculitis sistémica y trombosis venosa.

Su causa es aún desconocida, pero se ha implicado a los linfocitos T  $\gamma\delta$  en las lesiones cutáneas, oculares y bucales de estos pacientes.

La subpoblación V $\delta$ 1+ se ha descrito predominante en epitelio gingival. A nivel intestinal sus principales ligandos activadores son las moléculas MICA y MICB, pero a nivel de mucosa bucal no se conocen bien.

En el presente trabajo estudiamos la expresión de antígenos MICA y MICB en células epiteliales de mucosa bucal en pacientes de Behçet y la comparamos con la de un grupo control con aftas recurrentes y con individuos sanos.

Paralelamente determinamos la respuesta *in vitro* de células T de sangre periférica frente a estímulos específicos de linfocitos T  $\gamma\delta$  (fosfoantígenos no peptídicos y MICA recombinante). Para ello:

- Se analizan células epiteliales obtenidas de saliva de 10 individuos con enfermedad de Behçet, 10 individuos sanos y 10 afectados de aftas de repetición, por citometría de flujo de 4 colores, utilizando Ac.Mo: anti-MICA, anti-MICA+MICB y anti-citoqueratina .
- Se estimulan, durante 8 días, células mononucleadas de sangre periférica con isopentenil pirofosfato, MICA recombinante y fitohemaglutinina y se evalúa la proliferación de T $\alpha\beta$  y T $\gamma\delta$  por marcaje con carboxifluoresceína, y la expresión de NKG2D, CD25, CD45RO, V $\delta$ 2, V $\delta$ 1 y V $\delta$ 9 (por citometría de flujo).

Los resultados preliminares demuestran un aumento significativo de expresión de MICA en células epiteliales de mucosa bucal de los pacientes con enfermedad de Behçet y un incremento en el porcentaje de linfocitos T  $\gamma\delta$  de sangre periférica.

Se discuten las implicaciones en la etiopatogenia de la enfermedad de Behçet.

Financiación: FIS 03/1057

**F-0024-09-C. ESTRÉS OXIDATIVO Y DISFUNCIÓN ENDOTELIAL EN PACIENTES DE HEMODIÁLISIS QUE RECIBEN DIFERENTES DOSIS DE HIERRO SACAROSA INTRAVENOSO. EFECTO DE ADMINISTRACIÓN DE N-ACETILCISTEINA (NAC).** A. Echeverría-Balda<sup>1</sup>, N. García-Fernández<sup>2</sup>, J. Merino<sup>1</sup>, C. Moreno<sup>1</sup>, N. Ramírez<sup>1</sup>, F. Pastor<sup>1</sup>, A. Sánchez-Ibarrola<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología de la Clínica Universitaria de Navarra y <sup>2</sup>Servicio de Nefrología de la Clínica Universitaria de Navarra.

**Introducción.** Los suplementos de hierro intravenoso (Fe iv) en los pacientes de hemodiálisis son necesarios para conseguir una adecuada respuesta a la eritropoyetina (EPO) y alcanzar el nivel de hemoglobina recomendado (> 11g/dl). Las preparaciones de Fe iv son componentes altamente reactivos que pueden determinar un daño endotelial. Diferencias en cuanto a seguridad, tolerancia y toxicidad de distintas preparaciones de hierro han sido descritas. Entre ellas, el hierro sacarosa presenta un buen perfil de tolerancia, pero estudios *in vitro* han descrito también cierta toxicidad celular. La toxicidad *in vivo* y su relación con dosis administradas de este preparado de hierro no han sido estudiados.

**Objetivos.** Analizar el efecto de la administración de hierro sacarosa iv en pacientes en hemodiálisis crónica sobre el estrés oxidativo y la disfunción endotelial. Estudiar si el fraccionamiento de la dosis y/o administración previa al hierro de N-acetilcisteina (NAC), antioxidante conocido, atenúa dichos efectos.

**Métodos.** Se han incluido 17 pacientes (9 mujeres y 8 hombres) en programa regular de hemodiálisis durante al menos 3 meses



con pauta de 3 sesiones/semana y usando membrana de polisulfona. Media de edad: 59,4 años (SD:15,3). Todos estaban con dosis de Fe sacarosa iv (100 mg / 2 semanas). El estudio se ha realizado el día de la administración de hierro (100 ó 50 mg en 100 ml de salino), con o sin infusión i.v. de NAC previa (2 g en 50 ml de Dextrosa 5% en 15 min.), durante la segunda hora de hemodiálisis (sesión de mitad de semana) y durante una sesión en la que se administró sólo salino como control. Las muestras sanguíneas han sido tomadas: antes de administrar el hierro (100 ó 50 mg y con o sin infusión previa de NAC), a los 60 y 240 minutos de su inicio. Hemos determinado la actividad respiratoria oxidativa (Burst Test) y Factor Von Willebrand (vWF). La actividad respiratoria oxidativa ó Burst test (Becton Dickinson) presente en sangre heparinizada se ha determinado cuantificando el porcentaje de células fagocíticas que producen reactivos oxidantes y analizando la conversión de DHR 123 en R 123 y su actividad enzimática (cantidad de R 123 por células) por citometría de flujo (FACS-Calibur). La cuantificación del vWF se ha realizado mediante ELISA (LIA TEST).

**Resultados.** Los resultados preliminares se muestran en la siguiente tabla. La actividad respiratoria aumenta en los cuatro grupos de tratamiento con respecto al placebo. El aumento a los 60 min (en %) resulta mayor en Fe100 (38,4%) que en Fe 50 (17,9%) y Fe 100 + NAC (25,6%) . Respecto al vWF no hay diferencias entre tratamientos incluyendo el grupo placebo y sólo se observa un incremento durante la diálisis con independencia del tipo de tratamiento.

**Conclusiones.** El tratamiento con Fe sacarosa iv parece determinar más actividad oxidativa que el grupo placebo. Dosis de 50 mg de ó 100mg + NAC podría inducir menos actividad oxidativa que 100 mg de Hierro sacarosa intravenoso. No está clara la influencia de esta dosis con respecto al daño endotelial. Resultados concluyentes se obtendrán al concluir el estudio en al menos 32 pacientes y realizar el análisis estadístico.

	Placebo	Fe 50	Fe 50 +NAC	Fe 100	Fe100 + NAC
<b>Actividad respiratoria (IMF)</b>					
Basal	574,7 (139,4)	571,1 (138,5)	534,1 (129,5)	519,3 (125,9)	496,4 (120,4)
60 min	580,9 (140,9)	673,4 (163,3)	672,5 (163,1)	718,9 (174,4)	623,7 (151,3)
240 min	532,4 (129,1)	595,6 (137,7)	567,7 (137,7)	578,1 (140,2)	558,6 (135,5)
<b>VWF (UI/mL)</b>					
Basal	1,70 (0,0041)	1,36 (0,0033)	1,55 (0,0038)	1,39 (0,0034)	1,60 (0,0039)
60 min	1,76 (0,0043)	1,72 (0,0042)	1,64 (0,0040)	1,61 (0,0039)	1,76 (0,0043)
240 min	2,13 (0,0052)	1,80 (0,0044)	1,67 (0,0041)	1,98 (0,0048)	2,13 (0,0052)

*Los datos se expresan como media y error típico de la media*

**F-0024-10-O. ESTUDIO DE LA MUTACIÓN IVS2+4T>C DEL GEN HFE EN LA POBLACIÓN ESPAÑOLA. A. Pacho, E. Romo, E. Mancebo, L. González, P. Morales. Inmunología. Hospital 12 de Octubre. Madrid.**

**Introducción.** Se ha demostrado que el gen HFE, localizado en el cromosoma 6 y telomérico al sistema HLA, está mutado en la mayor parte de los pacientes con HH. De las 17 mutaciones descritas hasta el momento en este gen según la HGMD, sólo tres de ellas (H63D, S65C y C282Y) se estudian rutinariamente para el diagnóstico de la enfermedad; las otras, bien se han encontrado en un solo individuo, o no se ha estudiado su frecuencia. Una de estas mutaciones (IVS2+4T>C) es

una mutación de splicing cuya frecuencia alélica es elevada en un estudio realizado en 13 pacientes caucásicos de Sudáfrica. Se hace necesario un estudio más profundo con la finalidad de determinar si esta mutación es realmente productora de enfermedad o no.

Por otra parte, ya se han realizado estudios para determinar los haplotipos HLA ancestrales en los que se generaron las tres mutaciones HFE principales; sería interesante estudiar el ligamiento a HLA de esta mutación para ver su posible origen étnico y su antigüedad.

**Objetivos.** 1) Comprobar si IVS2+4T>C es una mutación productora de hemocromatosis comparando su frecuencia en población sana y enferma. 2.)Estudiar el desequilibrio de ligamiento entre IVS2+4T>C y HLA.

**Materiales y métodos.** Se estudiaron 82 individuos sanos como control y 60 individuos sospechosos de hemocromatosis y portadores de H63D ó C282Y. Todos los individuos estudiados fueron tipados para HLA y determinado el genotipo IVS2+4 mediante PCR/RFLP.

**Resultados.** 1) No se observó diferencias significativas entre las frecuencias del alelo mutado entre los controles y los dos grupos de hemocromatósicos. 2) En el grupo de sanos han aparecido 10 individuos homocigotos para el alelo mutado. 3) No se ha observado ningún haplotipo HLA asociado al alelo mutado.

**Conclusiones.** 1) La variante genética IVS2+4T>C no es una mutación productora de hemocromatosis. 2) Este polimorfismo debe ser más antiguo que las mutaciones H63D y C282Y puesto que no se ha encontrado ningún haplotipo HLA asociado.

**F-0024-11-C. ESTUDIO DEL PROMOTOR DEL GEN MEFV EN POBLACIÓN ESPAÑOLA AFECTA DE FIEBRE MEDITERRANEA FAMILIAR. V. Mas, A. Aldea, J.I. Arostegui, J. Rius, S. Plaza, M. Masó, J. Vives, J. Yagüe. Servei d'Immunologia, Hospital Clínic. Barcelona**

**Introducción.** Los síndromes hereditarios de fiebre periódica (SHFP) se caracterizan por la recurrencia de episodios autolimitados de fiebre e inflamación de serosas, sin causa infecciosa y autoinmune aparente. La fiebre mediterránea familiar (FMF) es la más frecuente de los SHFP. El gen responsable se denomina MEFV y presenta un patrón de herencia autosómico recesivo. En un estudio anterior pudimos observar que el 53% de los pacientes españoles de FMF eran portadores de 1 (36,4%) o 2 (16,4%) mutaciones en el gen MEFV respectivamente.

**Objetivos.** Analizar la región reguladora del MEFV situada en 5' del gen, con el objetivo de detectar posibles mutaciones que justificasen la enfermedad en aquellos pacientes con una o ninguna mutación para el gen MEFV.

**Métodos.** Se estudiaron 32 pacientes y 58 controles sanos. Se generó un amplímero mediante PCR desde la posición +200 respecto al inicio de transcripción hasta la posición -1300. Posteriormente éste se secuenció bidireccionalmente

**Resultados.** Se detectaron 2 cambios en las posiciones -938 (T>C) y -923 (G>A) respecto al inicio de transcripción, ambos situados en una secuencia Alu. La frecuencia alélica en la posición -938 era del 64% C y 36% T en los pacientes y de 69% C y 31% T en la población control respectivamente. La variante -923 se detectó en todos los miembros afectados de una familia con un síndrome inflamatorio severo y asociado a la mutación dominante H478Y, no detectándose ni en los individuos sanos de dicha familia ni en la población control (58 individuos).

**Conclusiones:** No hemos encontrado mutaciones en la región 5' del gen MEFV, que expliquen la enfermedad en pacientes con una

o ninguna mutación para este gen. Según los resultados obtenidos, la variante -938 corresponde a un polimorfismo. La variante -923 parece restringida a una familia en la que segrega con la enfermedad y con la mutación H478Y, siendo necesario realizar estudios para esclarecer su relación con la enfermedad.

Financiación: Beca-003110-MARATÓ TV3.

**F-0024-12-O. NUEVO MÉTODO PARA LA DETECCIÓN DE LAS MUTACIONES MÁS FRECUENTES EN EL SÍNDROME DE HIPER IgD.** S. Barroso<sup>1</sup>, A.J. Álvarez<sup>2</sup>, A. Sánchez-Moreno<sup>2</sup>, C. Casas<sup>3</sup>, M.D. Mendoza<sup>4</sup>, C. Guzmán<sup>1</sup>, J.M. Lara<sup>1</sup>, A. Núñez-Roldán<sup>1</sup>, B. Sánchez<sup>1</sup>. <sup>1</sup>Servicio de Inmunología, <sup>2</sup>Unidad de Nefrología Pediátrica, <sup>3</sup>Unidad de Alergia Pediátrica, <sup>4</sup>Unidad de Serología, Hospital Universitario Virgen del Rocío, Sevilla.

El síndrome de hiperinmunoglobulinemia D (HIDS) forma parte de los síndromes de fiebre periódica hereditarios. La herencia es autosómica recesiva. Los pacientes sufren episodios febriles recurrentes, sin causa infecciosa aparente, durante los que se produce una respuesta de fase aguda con leucocitosis, niveles altos de PCR y SAA y activación de la red de citoquinas. Aunque se puede describir como una enfermedad benigna por no tener potencialmente complicaciones letales, mientras el paciente permanece sin diagnosticar se ve sometido a pruebas invasivas y tratamientos inadecuados.

Este síndrome se ha asociado con mutaciones en el gen MVK, que provoca una reducción de la actividad de la enzima mevalonato quinasa. Esta enzima participa en la ruta metabólica del colesterol convirtiendo el mevalonato en 5-fosfomevalonato. Se han descrito 25 mutaciones, las más frecuentes son I268T y V377I. La mayoría de los pacientes son heterocigotos compuestos.

Hemos secuenciado los exones del gen MVK con mayor frecuencia de mutación en dos familias en las que algún miembro presentó los síntomas característicos del HIDS. En ambos hemos encontrado las mutaciones de cambio de sentido I268T y V377I. Los pacientes son heterocigotos para ambas mutaciones, por lo que su actividad mevalonato quinasa se encontraría disminuida.

Hemos diseñado un método que, mediante amplificación por PCR, digestión y posterior análisis de fragmentos de restricción, nos permite detectar las mutaciones I268T y V377I sin necesidad de recurrir a la secuenciación, por lo que resulta más rápido y asequible. De esta forma hemos estudiado a los familiares de nuestros pacientes para informar sobre posibles portadores o enfermos.

**F-0024-13-O. LOS RECEPTORES DE QUIMIOQUINAS MEDIAN MIGRACIÓN, PROLIFERACIÓN Y PRODUCCIÓN DE METALOPROTEASAS EN SINOVIOCIOS TIPO FIBROBLASTOS DE ARTRITIS REUMATOIDE.** M.V. Gómez Gaviro, R. García de Vicuña, M.J. Domínguez-Luis, M.K. Pec, I. González Álvarez, J.M. Álvaro Gracia, F. Díaz-González. Servicio de Reumatología, Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid.

La relevancia de las quimioquinas en la artritis reumatoide se ha centrado principalmente en las propiedades quimotácticas de los leucocitos, pero es aún poco conocida su expresión y función en sinoviocitos. Para explorar la repercusión del sistema de las quimioquinas

en la destrucción del tejido en la artritis reumatoide mediada por sinoviocitos, hemos estudiado la expresión de receptores de quimioquinas y su función en la migración, proliferación y producción de metaloproteinasas en sinoviocitos tipo fibroblasto de pacientes con artritis reumatoide. Los sinoviocitos tipo fibroblasto expresan constitutivamente los receptores CCR2, CCR5, CXCR3 y CXCR4 tanto en superficie celular como a nivel mRNA, mientras que no expresan CCR3 y CCR6.

En sinoviocitos tipo fibroblasto estimulados con MCP-1 (monocyte chemotactic protein-1), con SDF-1 (stromal cell-derived factor 1 alpha) y con IP-10 (interferon inducible protein 10) se observaron importantes movimientos de calcio intracitosólico. El estímulo con MCP-1, SDF-1, IP-10 y MIG (monokine induced by interferon) indujeron la migración y proliferación de los sinoviocitos tipo fibroblasto. Estas quimioquinas, además de RANTES, produjeron un aumento de la actividad colagenasa y gelatinasa en los sobrenadantes de los sinoviocitos tipo fibroblasto en cultivo, de una forma dosis y tiempo dependiente. Curiosamente el aumento de la actividad metaloproteasa mediada por quimioquinas fue disminuido por la presencia de anti-IL-1b, pero no por anticuerpos bloqueantes anti-TNF-b. Estos datos demuestran un papel directo del sistema de las quimioquinas en el daño de la articulación que caracteriza la artritis reumatoide y destaca la importancia de las quimioquinas y sus receptores como dianas terapéuticas de esta enfermedad.

**F-0024-14-O. INHIBICIÓN DE INTERACCIONES ENTRE CITO-CINAS Y GLICOSAMINOGLICANOS: UNA ESTRATEGIA ANTI-INFLAMATORIA.** R. Fernández-Botrán, J. Cripps, F.A. Crespo. Departamento de Patología y Medicina de Laboratorio, Universidad de Louisville, Louisville, U.S.A.

Los glicosaminoglicanos (GAGs) constituyen un grupo de heteropolisacáridos aniónicos localizados principalmente en las membranas basales y la matriz extracelular de distintos tejidos. Entre sus funciones está la de interactuar con quimioquinas y ciertas citocinas proinflamatorias, como el IFN $\gamma$ , promoviendo la acumulación local de estos mediadores. Las citocinas y quimioquinas así fijadas al tejido, inducen el reclutamiento y activación de leucocitos, contribuyendo al proceso inflamatorio. Basándose en la importancia de dicho proceso, nuestros estudios investigaron la hipótesis de que la inhibición de interacciones entre citocinas y GAGs podría resultar en la atenuación de procesos inflamatorios en animales experimentales. Inicialmente, la capacidad inhibitoria de un octapéptido derivado de la secuencia C-terminal del IFN $\gamma$  (responsable de la unión con heparina y otros GAGs) sobre interacciones de varias citocinas/quimioquinas con GAGs fue establecida en ensayos *in vitro*. Posteriormente, sus efectos antiinflamatorios y/o inmunomoduladores fueron investigados en modelos de trasplante alogénico de piel en ratas y de inflamación peritoneal inducida por Concanavalina A o tioglicolato en ratones. En el primer modelo, la administración del péptido resultó en una prolongación significativa del tiempo de rechazo de los trasplantes, mientras que en el segundo resultó en disminuciones estadísticamente significativas del reclutamiento de leucocitos en la cavidad peritoneal y de las concentraciones de TNF $\alpha$ , IL-1b y proteína total en el lavado peritoneal. En conjunto, estos resultados sugieren que la inhibición de las interacciones entre citocinas y GAGs ofrecen una potencial estrategia anti-inflamatoria.

# Índice de Autores

---

## A

Abarrategui C. 103  
Abián J. 124, 73  
Aceves M. 164  
Adreani P. 112  
Aguilar F. 117  
Aguilar Reina J. 95, 96  
Aguilera García I. 138  
Aguilera Montilla N. 127, 148  
Aguilera N. 148  
Alarcón B. 75, 76  
Alba A. 126  
Albarracín Castillo A. 112  
Albarracín MA. 135  
Alcamí J. 110  
Alcina A. 121  
Aldea A. 169  
Aldea AI. 99  
Alegria E. 166, 167  
Alemany JM. 141  
Ales I. 149  
Alfaro C. 147  
Algarra I. 146, 158  
Alguero MC. 154  
Almeida J. 111, 154, 155  
Almeida M. 111  
Alonso A. 96, 144, 149  
Alonso Arias R. 84  
Alonso C. 114  
Alonso Lebrero JL. 82, 160, 162  
Alonso MA. 74  
Alonso R. 128  
Alós LI. 110  
Álvarez A. 102  
Álvarez AJ. 170  
Álvarez Cermeño JC. 133  
Álvarez de Mon M. 132  
Álvarez Doforno R. 134  
Álvarez Domin C. 93  
Álvarez I. 124  
Álvarez López MR. 142, 143, 153  
Álvarez Mon M. 94, 95, 159  
Álvarez Mon-Soto M. 76, 91  
Álvarez R. 116, 141, 143, 145  
Álvarez S. 105  
Álvarez Santana MC. 98  
Álvarez Vallina L. 164  
Álvaro Gracia JM. 170  
Alves H. 140  
Allende L. 162  
Allende LM. 100, 102  
Allende Martínez L. 105  
Amado JA. 119  
Amenabar J. 138  
Amorim ML. 154  
Ampudia R. 126  
Andrés A. 104  
Andrés B. 85, 90  
Andrews E. 84  
Anel A. 127  
Arias CF. 124  
Arias M. 87, 125

Arina A. 147  
Arizón JM. 143, 145  
Armengol MP. 87  
Arnaiz Villena A. 79, 80, 81  
Aroeira LS. 164  
Arostegui JI. 99, 169  
Arraiza MF. 92  
Arrieta A. 103, 121, 129, 138  
Atencia R. 138  
Ausín F. 120, 134  
Ayesta A. 121, 129  
Azkárte M. 103, 138

## B

Baeza ML. 114, 161  
Balanzategui A. 154  
Balomenos D. 124  
Balsa A. 163  
Ballester S. 71, 163  
Ballesteros A. 124  
Ballesteros C. 110  
Bañas H. 159  
Barbadillo C. 132  
Barbosa JI. 161  
Bárcena P. 154  
Barcenilla H. 76, 91, 94, 95, 159  
Barreiro P. 110  
Barretina J. 107  
Barroso N. 95, 96, 170  
Batista A. 74  
Bedoya C. 80  
Bellón JM. 105, 106  
Bellón T. 113  
Benahmed D. 112  
Benavides M. 149  
Bendandi M. 165  
Bengoechea JA. 92  
Benítez D. 157  
Benito JM. 109, 110  
Berenguel A. 166, 167  
Bermejo J. 142  
Bermejo Martín JF. 94  
Bernad A. 164  
Bernales I. 71  
Bernardos A. 138  
Bernuth H. 98  
Berraondo P. 147  
Bertran JM. 102  
Blanca M. 113  
Blanco Arias C. 158  
Blanco B. 164  
Blanco Gelaz MA. 77, 109  
Blanco O. 79, 89  
Blanco R. 134, 135  
Blanch A. 104  
Blasco-Olaetxea E. 158  
Blundell M. 97  
Bofill M. 76  
Bohórquez JC. 167, 168  
Bootello A. 104, 133, 138, 155, 159  
Borràs FE. 125  
Borrego D. 155

Bouza E. 140  
Bragado R. 72  
Bravo MJ. 96  
Brieva JA. 85, 86, 122, 126, 133, 167, 168  
Briones R. 144  
Buelta L. 87  
Burgaleta C. 159  
Burgos D. 144

## C

Caballero A. 96, 97, 144, 149  
Caballero MT. 104  
Cabañas C. 83  
Cabello A. 110, 143, 145  
Cabello M. 144  
Cabello MA. 111  
Cabeza R. 134  
Cabrera CM. 151  
Cabrera T. 150, 151  
Cabrero E. 105, 106  
Calvo J. 166, 167  
Calvo M. 74  
Calvo P. 101  
Calleja Antolín S. 105, 121  
Callejas-Rubio JL. 129  
Callejo D. 104  
Camacho A. 110, 111  
Camacho Lovillo M. 97  
Cámara C. 160, 166  
Cámara Hijón C. 114  
Cambra A. 101, 168  
Caminal L. 99  
Caminero J. 96  
Campillo JA. 153  
Campos Caro A. 85, 86  
Campos J. 104, 138  
Campos M. 158  
Campos MA. 92  
Campos Martín Y. 84, 88, 90, 162  
Campos MI. 96  
Cantisán S. 114, 116, 144, 145  
Cantón J. 121, 150, 152  
Cañellas M. 102  
Caragol I. 102  
Carbone J. 89, 99, 109, 131, 140, 144  
Cárdaba B. 114, 115  
Cárdenes Bilbao M. 96  
Cárdenes MP. 98  
Caro P. 112  
Carrascal M. 73, 124  
Carrasco Hidalgo A. 143  
Carrasco Marín E. 93, 119  
Carrascosa AL. 75  
Carrera T. 120  
Carrillo J. 126  
Carrizosa ME. 149  
Casado JG. 79, 90, 91, 153  
Casal JI. 159  
Casamitjana N. 78  
Casanova JL. 98  
Casas C. 170  
Casas ML. 130

- Cassis B. 127  
 Castañer JL. 104, 138  
 Castellano G. 127  
 Castro Henriques A. 140  
 Castro MG. 144  
 Castro MJ. 80, 81  
 Castro P. 118  
 Castro Panete MJ. 121  
 Caubín J. 118  
 Cava F. 130  
 Cebada JM. 154  
 Cela E. 101  
 Centeno A. 140  
 Cerro Vadillo E. 93  
 Céspedes S. 84  
 Cifuentes G. 159  
 Citores MJ. 123  
 Civantos E. 114, 115  
 Clarke D. 160  
 Clemente J. 100, 102, 105  
 Climent N. 83, 110  
 Clotet B. 76, 107  
 Colino E. 98  
 Colmenero JD. 96  
 Colobrán R. 78, 112  
 Colombo MP. 147  
 Compte M. 164  
 Concha EG. 78  
 Conejero Hall L. 161  
 Contreras B. 156  
 Cordero M. 111  
 Correro F. 122  
 Cortegano I. 85, 90, 164  
 Costa M. 123  
 Coulie P. 79, 152  
 Cózar JM. 150  
 Crespi C. 168  
 Crespo del Pozo J. 115, 116, 134-136  
 Crespo E. 121  
 Crespo FA. 170  
 Criado Pizarro R. 136  
 Cripps J. 170  
 Cuadrado E. 108, 165  
 Cuello R. 154  
 Chen L. 147
- D**  
 de Andrés B. 164  
 de José MI. 106  
 de Juan MD. 108, 165  
 de la Calle H. 119  
 de la Concha EG. 118, 119  
 de la Rosa O. 89, 91, 153, 164  
 de la Sen ML. 137  
 de la Torre N. 158  
 de Vicente E. 138  
 del Cerro Vadillo E. 119  
 del Pozo V. 115  
 del Rey Cerros MJ. 100, 105  
 Delgado C. 127  
 Delgado Cerviño E. 134  
 Detková D. 102
- Díaz D. 76, 91, 94, 95, 159  
 Díaz González F. 170  
 Díaz Muñoz L. 107  
 Díaz Román T. 140  
 Díaz Rubio M. 119  
 Díaz Uriarte R. 71  
 Diéguez MA. 99  
 Diestre C. 126, 127, 157  
 Díez MA. 87  
 Doménech N. 140, 161  
 Domínguez Acosta A. 96, 98  
 Domínguez Luis MJ. 170  
 Domínguez Noche C. 160  
 Domínguez O. 126  
 Domínguez Perles R. 72, 161  
 Dorado B. 71, 163  
 Durán C. 163
- E**  
 Echániz P. 108  
 Echeverría-Balda A. 168  
 Eguiluz C. 163  
 Elzen R. 81  
 Emtage PC. 160  
 Encarnación Carrizosa M. 95, 136  
 Enrich C. 74  
 Erausquin C. 123  
 Escalona M. 131, 132  
 Escribese M. 128  
 Escuredo K. 159  
 Español T. 102  
 Esparza J. 103  
 Espiño M. 133  
 Esté JA. 107  
 Esteche A. 131, 132  
 Estefanía E. 77, 88  
 Estevinho A. 154  
 Etxagibel A. 100, 168
- F**  
 Faner R. 78  
 Fariñas-Álvarez C. 93, 94  
 Farnós M. 73, 74  
 Fedetz M. 121  
 Feijóo E. 147  
 Fernández Arquero M. 78, 118, 119  
 Fernández Botrán R. 170  
 Fernández C. 86  
 Fernández Cruz E. 89, 99, 101, 109, 131, 132, 140, 144  
 Fernández E. 75  
 Fernández Franco L. 119  
 Fernández MA. 125  
 Fernández Mastache E. 86  
 Fernández Morera JL. 117  
 Fernández N. 144  
 Fernández P. 120  
 Fernández Peñas P. 82  
 Fernández Pereira L. 114  
 Fernández Prieto L. 93, 119  
 Fernández Suárez A. 136, 149
- Fernández Tagarro M. 129  
 Fernández Yáñez J. 140  
 Ferreira A. 78, 101  
 Ferrer J. 92  
 Ferrer JM. 97  
 Figueredo MA. 133  
 Filgueira P. 161  
 Flores J. 124  
 Flores N. 163  
 Flores R. 93  
 Foncubierta E. 85, 86  
 Fonseca S. 154  
 Fontán Casariego G. 78, 101, 103, 104, 134, 163  
 Fontanellas A. 81  
 Fortes P. 147  
 Franco E. 117  
 Franco R. 83  
 Franco-López E. 138  
 Frecha C. 97, 98  
 Fresno M. 75, 83, 105  
 Frias JF. 153  
 Fuente H. 83
- G**  
 Gaforio JJ. 158  
 Galán I. 105, 106  
 Galán J. 71  
 Galán Llopis JA. 149  
 Galende J. 154  
 Galiani MD. 111  
 Gallardo S. 115  
 Gallardo T. 158  
 Gallart T. 83, 110  
 Gamboa P. 104  
 García A. 141  
 García Alonso AM. 142, 143, 153  
 García Aranaga I. 71, 87, 124  
 García Asenjo J. 146, 147  
 García Astudillo LA. 112, 115, 135  
 García Bermejo L. 128  
 García Berrocal B. 129, 130  
 García de Vicuña R. 170  
 García de Vinuesa A. 90, 128, 130  
 García Díez A. 82  
 García F. 83, 110  
 García Fernández N. 168  
 García JM. 103  
 García Laorden MI. 96-98, 123  
 García López MA. 82  
 García Lora A. 79, 146, 146, 152, 156  
 García Marcos MA. 155  
 García Martín A. 93, 94  
 García Merino JA. 163  
 García MJ. 110, 143, 145  
 García Montero A. 154  
 García Moreno MJ. 111  
 García Olivares E. 79, 89  
 García Pacheco JM. 79  
 García Rodríguez MC. 78, 101  
 García S. 126  
 García Saavedra AD. 96, 97, 98, 123  
 García Sancho L. 148

- García Segovia A. 101, 107  
 García Suárez J. 159  
 García Trujillo JA. 104, 155, 159  
 Garrido F. 79, 146, 149-152, 156  
 Gaspar ML. 75, 90, 164  
 Gatell JM. 83, 110  
 Gayà A. 166, 167  
 Gayoso I. 89  
 Giangaspro E. 105  
 Gil C. 110  
 Gil J. 89, 99, 101, 109, 144  
 Gimeno L. 141  
 Gimferrer I. 73, 74  
 Gómez Casado E. 79  
 Gómez del Moral M. 84, 88, 162  
 Gómez García C. 116  
 Gómez Gaviro MV. 170  
 Gómez I. 112, 128, 157  
 Gómez Lozano N. 77, 88  
 Gómez M. 139  
 Gómez Rial J. 100  
 Gómez Román JJ. 93, 141, 159  
 Góngora R. 85  
 Gonzalbo López B. 84  
 González A. 84  
 González Álvarez I. 170  
 González Buitrago JM. 130  
 González C. 129, 130  
 González Escribano MF. 95, 96, 117, 138  
 González Fernández A. 86  
 González Fraile MI. 155  
 González García M. 116  
 González Hevilla M. 81  
 González Hombrado E. 121  
 González J. 125, 159  
 González L. 169  
 González Lahoz J. 110  
 González Lamuño D. 120  
 González M. 141, 154  
 González MI. 102, 106  
 González Molina M. 144  
 González Novo A. 78  
 González Porqué P. 133  
 González R. 90, 110, 143, 145  
 González RA. 116  
 González Rivera M. 106  
 González Rojas J. 160, 162  
 González Rubio C. 103  
 González S. 77, 82, 109, 117, 160, 162  
 González Tarrío JM. 134  
 Gonzalo P. 85, 90, 164  
 Gonzalo-Daganzo RM. 160  
 Gozalbo López B. 88, 162  
 Granell FJ. 148  
 Granell R. 139  
 Granja AG. 75  
 Gual García L. 78  
 Guerra N. 116, 141, 143, 153  
 Guibelalde M. 102  
 Gurbindo Gutiérrez MD. 105, 106  
 Gutiérrez A. 148  
 Gutiérrez C. 118, 128
- Gutiérrez Martín C. 84  
 Guzmán C. 158, 170
- H**  
 Halfpenny I. 88  
 Hausmann B. 72  
 Hera A. 76, 91  
 Hernández Lamas MC. 143  
 Hernández M. 102  
 Hernández Marrero JA. 158  
 Hernández S. 146, 147  
 Higaki Y. 161  
 Hornero Cimiano C. 93, 119  
 Huarte E. 147  
 Hurtado C. 75
- I**  
 Ibáñez A. 73  
 Iglesias-Alzuetta J. 101  
 Imizcoz C. 166, 167  
 Infante A. 71, 124  
 Inogés S. 165  
 Íñiguez MA. 105  
 Iribarren JA. 108
- J**  
 Jaraquemada D. 123, 124  
 Jarque D. 139  
 Javaloyes M. 148  
 Jiménez A. 78  
 Jiménez Alonso J. 117  
 Jiménez J. 78  
 Jiménez JL. 97  
 Jiménez M. 114  
 Jiménez ME. 144, 145  
 Jiménez Medina EM. 79, 146, 152, 156  
 Jiménez P. 150  
 Jordá J. 156  
 José MI. 105  
 Joven Ibáñez BE. 121  
 Juan M. 78, 87  
 Julià MR. 168  
 Junghans R. 160  
 Junquera C. 159  
 Justiça B. 154
- K**  
 Kimatrai M. 79, 89  
 Kindelán JM. 110, 111  
 Koeleman BPC. 120  
 Krawczyk M. 78
- L**  
 Lahoz C. 114, 115, 117  
 Lamana A. 83  
 Lara JM. 170  
 Laresgoiti U. 71  
 Larrad L. 126, 127, 157  
 Lasa I. 148  
 Lasiera P. 126, 127, 157  
 Lavado-Valenzuela R. 149  
 Lejeune M. 110
- León Leal JA. 97  
 Leyva Cobián F. 93, 94, 119, 112, 120, 141  
 Lillo R. 101  
 Lima M. 154  
 Linares M. 133  
 Lindroth K. 86  
 Lobo B. 85, 164  
 Lopes da Silva S. 102  
 López Aldeguez J. 112  
 López Álvarez MR. 142, 143  
 López C. 132  
 López Cabrera M. 162  
 López de Rego J. 93  
 López Díaz de Cerio A. 165  
 López E. 114, 115, 161  
 López Escribano H. 134, 135  
 López Hoyos M. 87, 112, 115, 116, 120, 124, 125, 134-136  
 López Larrea C. 77, 109, 109, 117  
 López Longo FJ. 131, 132  
 López M. 110, 141  
 López Nevot MA. 79, 149, 151, 152  
 López P. 118  
 López Rivas A. 157  
 López Rubio F. 143, 145  
 López S. 96  
 López Santalla M. 127, 148  
 López Sañudo S. 132  
 López Serrano MC. 104  
 López Trascasa M. 103, 104  
 López Vázquez A. 77, 09, 117  
 Losada Fernández I. 123  
 Lowy E. 79, 81  
 Loza E. 133  
 Lozano F. 73, 74  
 Lozano JM. 110, 111, 143, 145  
 Lozano S. 110  
 Lucio J. 128  
 Luengo S. 81  
 Luque J. 110, 111, 143, 145  
 Luzuriaga C. 119  
 Llanes E. 114, 115  
 Llano A. 107  
 Lima JM. 137  
 Llompart CM. 92  
 Lorente S. 141
- M**  
 Madrid A. 101  
 Magariño I. 136  
 Magariño R. 136  
 Majano P. 162  
 Maleno I. 149, 151, 152  
 Malumbres M. 71  
 Mallo AB. 132, 159  
 Mampaso F. 128  
 Mancebo E. 81, 169  
 Mancebo Sierra E. 105, 121  
 Manzanares J. 100  
 Manzano ML. 127  
 Máñez R. 140  
 Marco FM. 115

- Marcos A. 97  
 Marcos MAR. 85, 90, 164  
 Marín Alcaraz MJ. 121  
 Marín I. 143  
 Marín J. 110, 111, 143, 145  
 Marín L. 116, 141, 142, 143, 153  
 Marín LA. 142  
 Marín Moreno A. 142  
 Marín Vidalled MJ. 87  
 Marquina R. 87, 125, 162  
 Martí M. 123  
 Martín Ayuso M. 154, 155  
 Martín Béjar MT. 143  
 Martín C. 133  
 Martín Caballero J. 124  
 Martín Donaire T. 123  
 Martín F. 89, 97, 98  
 Martín Fernández JM. 162  
 Martín Fontelos P. 105  
 Martín J. 96, 117, 120, 148  
 Martín L. 122  
 Martín MA. 101  
 Martín Mola E. 163  
 Martín N. 85  
 Martín Núñez G. 155  
 Martín Saavedra FM. 71, 163  
 Martín Villa JM. 79, 80, 81, 127, 148  
 Martínez A. 78, 118, 119, 159  
 Martínez Borra J. 77, 109, 117  
 Martínez Escribano JA. 153  
 Martínez Laso J. 79, 80, 81  
 Martínez Lorenzo J. 126, 127, 157  
 Martínez Llamas MS. 79, 146, 152, 156,  
 Martínez Naves E. 84, 88, 90, 162  
 Martínez P. 110  
 Martínez Taboada V. 134, 135  
 Martínez Torrecuadrada JL. 159  
 Martínez-A C. 124  
 Maruri N. 103, 121, 129, 138  
 Mas V. 169  
 Mas-Fontao A. 118  
 Mas-Fontao A. 119  
 Masjuan J. 133  
 Masó M. 169  
 Matamoros N. 100, 101, 168  
 Matesanz F. 121  
 Mazzolini G. 147  
 Melero D. 85, 90, 164  
 Melero I. 147  
 Mellado MJ. 106  
 Mencía A. 127  
 Méndez R. 150, 152  
 Méndez T. 150  
 Mendoza JL. 119  
 Mendoza MD. 170  
 Menéndez López V. 149  
 Mercader JM. 123  
 Merino A. 166, 167  
 Merino J. 87, 125, 160, 165, 168  
 Merino R. 87, 125, 160, 162  
 Micheloud D. 89, 99, 131  
 Middleton D. 88  
 Miguelsanz MA. 137  
 Milà J. 100, 157  
 Millán J. 74  
 Millán R. 162  
 Minguela A. 141, 142, 143  
 Miña-Blanco A. 109  
 Mir A. 112  
 Miranda ME. 163  
 Mirapeix E. 130  
 Miras M. 141, 142, 143  
 Miró JM. 83, 110  
 Miró M. 114, 116, 144, 145  
 Mittelbrunn M. 74, 82, 83  
 Molina A. 128  
 Molina IJ. 97, 98  
 Moltó L. 146, 147  
 Monserrat J. 94, 95, 159  
 Monteiro MS. 140  
 Montes Cano MA. 9596  
 Montes M. 116, 141  
 Montes O. 116, 141  
 Montoro J. 139  
 Montoya F. 80  
 Montserrat J. 76, 91  
 Morales P. 81, 169  
 Mora-López F. 85, 86  
 Morel E. 113  
 Moreno A. 98  
 Moreno C. 168  
 Moreno-Otero R. 162  
 Moret A. 139  
 Moriyón I. 92  
 Moro MJ. 154, 155  
 Moscardó F. 139  
 Moscoso I. 140, 161  
 Moscoso J. 79-81  
 Moscoso N. 80  
 Moya R. 116, 141  
 Moya-Quiles MR. 142, 153  
 Mozo L. 118  
 Mugüerza JM. 148  
 Muixí L. 124  
 Muñoz C. 84, 137  
 Muñoz Fernández MA. 94, 97, 105-107  
 Muñoz Fernández P. 129  
 Muñoz Fernández R. 79, 89  
 Muñoz I. 168  
 Muñoz P. 72, 85, 132, 140  
 Muñoz Pacheco P. 90, 164  
 Muñoz Robles J. 100  
 Muñoz Saa I. 101  
 Muñoz Villanueva MC. 153  
 Muro M. 116, 141, 142, 153
- N**  
 Naranjo M. 125  
 Navajo JA. 129  
 Navaratnam N. 83  
 Navarro A. 144  
 Navarro C. 116  
 Navarro J. 109  
 Navarro MC. 72
- Navarro ML. 106  
 Navarro MN. 75, 76  
 Navarro Pelayo F. 129  
 Navarro Raya MC. 129  
 Negreira S. 105  
 Nieto A. 122, 167, 168  
 Nieto N. 102  
 Niñez Roldán A. 117  
 Njobvu PD. 109  
 Nogal ML. 75  
 Núñez Roldán A. 95, 96, 117, 136, 138, 149, 170  
 Nusspaumer G. 75
- O**  
 Ocaña E. 167, 168  
 Ocaña S. 130  
 Ocejo Vinyals G. 93, 141  
 Ojeda CA. 111, 143, 145  
 Oliva H. 83  
 Olivares N. 108, 165  
 Oliveira G. 140  
 Oliver Miñarro D. 105, 121  
 Oliveros E. 102  
 Oñate A. 84  
 Orfao A. 76, 91, 111, 154, 155  
 Ortega C. 90, 128, 130  
 Ortega D. 140  
 Ortega E. 120  
 Ortego-Centeno N. 129  
 Ortiz Pareja M. 143  
 Ortiz-Ferrón G. 157  
 Osorio E. 140
- P**  
 Pablo Pivel J. 82  
 Pablo R. 77, 88, 94, 95  
 Pablos P. 100, 102  
 Paco L. 79, 146, 149, 151, 152, 156  
 Pacheco R. 83  
 Pacheco-Castro A. 162  
 Pacho A. 169  
 Pacho de Lucas MA. 121  
 Padilla O. 73  
 Pagán J. 116  
 Palacios J. 79  
 Palencia B. 147  
 Palma A. 90, 128, 130  
 Palmer E. 72  
 Palmer M. 160  
 Palomino P. 115  
 Palomo J. 140  
 Palou E. 78  
 Pallarés L. 168  
 Pardi R. 83  
 Pareja F. 138  
 Parrilla P. 72, 141, 142, 143  
 Pascasio JM. 138  
 Pascual M. 120  
 Pascual-Salcedo D. 163  
 Pastor F. 165, 168  
 Pastor X. 126

- Paule P. 100  
Pavón-Castillero EJ. 72, 129  
Pawelec G. 152  
Paz Artal E. 100, 105  
Paz Artal L. 121  
Pec MK. 170  
Pedrinaci S. 121, 150  
Pena MJ. 96  
Pena RR. 104  
Peña J. 79, 90, 110, 111, 114, 116, 143-145, 153  
Peña Macarro C. 93  
Peña Salmón M. 87, 124, 134-136  
Peñuelas I. 147  
Peñuelas Rivas G. 72, 161  
Peralbo E. 89-91, 153  
Pereira A. 110  
Pereira G. 160, 166  
Pereira LF. 160, 166  
Pérez A. 105  
Pérez Aciego P. 123, 156  
Pérez Blas M. 79-81, 127, 148  
Pérez Castellano MT. 100, 101  
Pérez Chacón G. 156  
Pérez de Andrés M. 154, 155  
Pérez de Diego R. 101  
Pérez González M. 73, 162  
Pérez Gutiérrez C. 92  
Pérez López M. 141  
Peris M. 112  
Perucha E. 132, 159  
Pinho L. 154  
Pinillos B. 158  
Piñero A. 122  
Pita ML. 89, 164  
Pivel JP. 160, 162  
Plana M. 110  
Planas R. 126  
Planelles D. 139  
Plaza A. 132  
Plaza S. 99, 169  
Ponce IM. 103  
Ponce MA. 97  
Pons J. 92, 100, 101  
Porcel Carreño SL. 114  
Portero F. 88  
Pozo V. 114  
Prada A. 103, 121, 129, 138  
Prado Zamora MC. 118, 133  
Prat I. 143  
Prieto A. 76, 91, 94, 95, 141, 159  
Prieto J. 147  
Prieto P. 76, 91, 132, 159  
Pruñonosa J. 115  
Puel A. 98  
Puert C. 163  
Puertas MC. 126  
Puig N. 139  
Pujalte F. 101, 168  
Pujol Borrell JM. 112  
Pujol Borrell R. 87, 125, 126  
Pujol R. 78  
Pulgar M. 75  
Pumarola T. 110
- Q**  
Queirós ML. 154  
Quereda C. 104  
Quijano Y. 138  
Quiralte J. 115
- R**  
Ramírez M. 89  
Ramírez N. 168  
Ramírez Romero P. 72, 142, 143  
Ramiro S. 163  
Ramos E. 99  
Ramos JT. 100, 102, 105, 106  
Ramos MÁ. 125  
Raya-Álvarez E. 129  
Reales E. 85, 86  
Redondo C. 138  
Redondo JM. 157  
Regueiro JR. 76, 162  
Regueiro V. 92  
Reith W. 78  
Reneses Cesteros S. 136  
Resino S. 105-107  
Respaldiza Salas N. 136, 149  
Revilla Y. 75  
Reyes E. 94, 95, 132, 159  
Ribera A. 78  
Richter JA. 147  
Riesco JA. 166  
Riñón M. 103, 121, 129, 138  
Río González ML. 72  
Rioja L. 153  
Rius J. 99, 169  
Rivas MD. 73  
Rivas V. 86  
Rivero A. 110, 111  
Rivers R. 84  
Robles R. 141-143  
Roche O. 104  
Roda-Navarro P. 162  
Rodríguez A. 132, 157  
Rodríguez Barbosa JJ. 72  
Rodríguez Bayona B. 126, 133  
Rodríguez C. 126, 133  
Rodríguez Calvillo M. 165  
Rodríguez de Castro F. 97  
Rodríguez de Córdoba S. 103  
Rodríguez Gallego JC. 96-98, 123  
Rodríguez Juan C. 127, 148  
Rodríguez Lozano C. 123  
Rodríguez M. 139  
Rodríguez Mahou M. 131, 132  
Rodríguez Molina JJ. 99, 131, 140, 144  
Rodríguez R. 115, 130, 139  
Rodríguez Reynoso MF. 116  
Rodríguez Rodero S. 117  
Rodríguez Saínez C. 101, 109  
Rodríguez T. 150, 152  
Rodríguez Trabado A. 114  
Rodríguez Valverde V. 134, 135  
Rodríguez Zapata M. 94, 95  
Rojo R. 81  
Roldán E. 100, 133, 155, 159  
Román C. 90, 114, 116, 128, 130, 144, 145  
Román V. 90  
Romero Gómez M. 96  
Romero JM. 121, 150, 152  
Romero M. 95  
Romero P. 90, 116, 128, 130  
Romo EM. 81, 102, 169  
Rosa O. 90  
Rosado S. 123  
Roselló S. 73  
Rossi NE. 76  
Roustán G. 88  
Roy G. 138  
Royo Cañas M. 126, 157  
Royo M. 127  
Rúa-Figueroa I. 123  
Rubio I. 85  
Rubio M. 104, 161  
Rudilla F. 123  
Rueda B. 120  
Rueda E. 81  
Ruiz A. 110  
Ruiz Cabello F. 121, 150, 152  
Ruiz Contreras J. 100, 102  
Ruiz de Alegría Puig C. 116, 120, 134, 135  
Ruiz de Almodóvar C. 157  
Ruiz del Valle V. 81  
Ruiz Hernández R. 76  
Ruiz J. 147, 165  
Ruiz Ruiz C. 157  
Ruiz Tíscar JL. 131, 132  
Rupérez P. 124
- S**  
Sabina P. 163  
Saboya MA. 104  
Sádaba MC. 133  
Sáenz P. 159  
Sáez Gutiérrez B. 126, 127, 157  
Sáez R. 108, 165  
Sáez Torres C. 166  
Sáinz Rey LM. 112  
Sáiz N. 115  
Salamanca RE. 81  
Salas ML. 75  
Salcedo Moreno C. 134  
Salgado P. 84  
San Miguel JF. 154, 155  
San Segundo D. 115, 135  
San Segundo F. 136  
Sanal O. 162  
Sánchez B. 170  
Sánchez Bueno F. 141, 142  
Sánchez C. 94, 95  
Sánchez Corral P. 103  
Sánchez E. 117  
Sánchez F. 127  
Sánchez Gordo F. 143

- Sánchez Ibarrola A. 165, 168  
 Sánchez J. 164  
 Sánchez L. 83, 104, 138  
 Sánchez M. 78, 159  
 Sánchez MA. 76, 91  
 Sánchez Madrid F. 74, 82, 83, 128, 160  
 Sánchez MJ. 161  
 Sánchez Moreno A. 170  
 Sánchez Pérez M. 85  
 Sánchez Ramón S. 131, 132  
 Sánchez Román J. 117  
 Sánchez Sabaté E. 113  
 Sánchez Valdepeñas C. 75  
 Sánchez Velasco P. 93, 94, 119, 120, 141  
 Sancho D. 128, 160  
 Sancho J. 72  
 Sancho López J. 129  
 Sandoval C. 72  
 Sangro B. 147  
 Santa Cruz S. 159  
 Santamaría B. 131, 132  
 Santamaría M. 90, 97, 110, 111, 116, 128, 130  
 Santamarina I. 140, 161  
 Santiago Álvarez JL. 98, 119, 133  
 Santiago EI. 98  
 Santiago T. 115  
 Santiuste I. 125  
 Santos AH. 154  
 Santos E. 75  
 Santos-Argumedo L. 72  
 Sanz GF. 139  
 Sarmiento E. 89, 99, 131, 132, 140, 144  
 Sarrias MR. 73, 74  
 Sastre B. 114, 115  
 Sastre N. 104  
 Schamel WWA. 76  
 Seguín Q. 78  
 Segura I. 166, 167  
 Seliger B. 149  
 Sempere JM. 115, 137  
 Seoane C. 114, 115  
 Seoane Reula ME. 97, 106  
 Sepúlveda S. 77  
 Sepúlveda S. 88  
 Serra C. 73  
 Serra P. 147  
 Serranía MJ. 105, 107  
 Serrano F. 164  
 Serrano M. 124  
 Serrano MJ. 158  
 Serrano Vela JI. 79, 80, 81  
 Setién Baranda F. 84  
 Setién F. 73
- Sierra JM. 73, 166  
 Siles N. 80  
 Silvera C. 80  
 Simón L. 159  
 Sola E. 144  
 Solana R. 89-91, 110, 111, 114, 144, 145, 153, 164  
 Solé-Violán J. 97  
 Solís R. 77, 88  
 Solves P. 139  
 Soriano V. 110  
 Soro PG. 85, 90  
 Soto R. 153  
 Srivastava GK. 97  
 Suárez A. 118, 128  
 Suárez Álvarez B. 77, 109  
 Subiza JL. 146, 147  
 Suela Rubio J. 84, 88, 162  
 Súañer L. 139
- T**  
 Talavan T. 129, 130  
 Tallada M. 150  
 Tamayo E. 125, 162  
 Tapia B. 113  
 Tarazona R. 89-91, 153  
 Taxonera C. 119  
 Teixeira JF. 140  
 Teixeira MA. 154  
 Teixeira E. 72  
 Tejedor R. 82  
 Thome M. 72  
 Thrasher AJ. 97  
 Tirado I. 79, 89  
 Tirapu I. 147  
 Toribio ML. 75, 76  
 Torío A. 116  
 Torres A. 136  
 Torres B. 95, 96, 117  
 Torres PS. 76  
 Toscano MG. 97, 98  
 Tricas L. 99  
 Tubella LIM. 115  
 Tudela JI. 146, 147  
 Tuñón A. 117
- U**  
 Urban S. 102  
 Urcelay E. 78, 118, 119  
 Uribe L. 164  
 Urrea R. 131, 132  
 Urrutia I. 104  
 Ursa A. 82
- V**  
 Val Bernal JF. 93, 141, 159  
 Valdivia A. 133  
 Valeri Lozano AP. 127, 148  
 Valero V. 94, 95  
 Vaquero M. 88  
 Varela I. 161  
 Varela Peña P. 105  
 Vargas Alarcón G. 79  
 Vargas JA. 123, 156  
 Velilla J. 126  
 Verdaguer J. 126  
 Vicente-Manzanares M. 83  
 Vidal E. 110, 111  
 Vidales Mancha I. 143  
 Vidaller A. 102  
 Vila del Sol V. 83  
 Vila E. 139  
 Vila J. 73  
 Vila V. 75  
 Vilches C. 77, 88  
 Vilella R. 157  
 Villar LM. 133, 155  
 Villarrubia N. 155, 159  
 Villegas J. 87  
 Villena A. 80  
 Viñas O. 130  
 Vitoria JC. 121, 129  
 Vives J. 73, 74, 99, 169  
 Vives-Pi M. 126
- W**  
 Warleta F. 158  
 Wichmann Schlipf I. 136, 149  
 Williams F. 88
- Y**  
 Yagüe J. 99, 169  
 Yaquob A. 112
- Z**  
 Zabalegui N. 165  
 Zaitseva G. 164  
 Zamora J. 79-81  
 Zamorano J. 73, 163  
 Zapata DA. 76  
 Zapico MS. 99  
 Zaratiegui M. 147  
 Zea A. 132  
 Zubeldia JM. 114, 161  
 Zubiaga A. 71, 87, 124  
 Zubiaur Marcos M. 72, 129