

pediátricos trasplantados de hígado y seguidos en el laboratorio. 2) Detección de autoanticuerpos raros e inusuales en triple tejido y HEp-2. 3) Identificación de los antígenos reconocidos por los autoanticuerpos.

Materiales y métodos. En este estudio se han incluido 96 pacientes pediátricos trasplantados de hígado y con un tiempo postrasplante igual o mayor de 12 meses. Se detectaron Autoanticuerpos no órgano-específicos: anticuerpos antinucleares (ANA), anti músculo liso (AML), antimitocondriales (AMA) y antimicrosomales de hígado y riñón (LKM), anti citosol hepático tipo 1 (LC1) por inmunofluorescencia indirecta (IFI) sobre portas de triple tejido de rata y células HEp-2 humanas (Euroimmun) considerándose positivo los títulos > 1/80. Para la identificación de los antígenos se empleó un Inmunoblot (IMB) sobre extracto de hígado humano donante y un dot-blot perfil hepático de proteínas purificadas ó recombinantes (Liver dot De-TEC).

Resultados. 1) De los 96 pacientes se detectaron 14 ANA positivos (14,6%), 2 con patrón homogéneo, 9 con patrón moteado y 3 con patrón nucleolar, todos a título medio-bajo excepto un caso que presentó títulos elevados. En tres pacientes se detectaron AML (3,1%) todos a títulos elevados. Un paciente con AMA (1%) a título elevado. Un paciente con Ac anti LKM (1%) a título elevado. Un paciente con LC1 (1%). 2) Dentro de los patrones inusuales específicos de hígado, se encuentra la tinción de canalículos biliares y sinusoides hepáticos. Sobre células HEp-2 destaca la presencia de un patrón citoplásmico granular y citoesqueleto. 3) Los antígenos identificados reconocidos por los autoanticuerpos en HEp-2 fueron midbody, NuMa y fibrilarina. Los AML reconocieron F-actina. Los AMA reconocieron la deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada. La especificidad del Ac anti LKM fue el citocromo P450-IID6. Los Ac anti citosol hepático reconocieron a la proteína formiminotransferasa ciclodeaminasa (LC1). La identificación del antígeno reconocido por los Ac anti canalículos biliares fue la proteína BSEP que se expresa exclusivamente en hígado.

Conclusión. En nuestra serie aparecen con poca frecuencia autoanticuerpos no órgano-específicos a título elevado después del trasplante hepático pediátrico.

De los autoanticuerpos raros e inusuales específicos del tejido hepático, hemos identificado el antígeno de la mayoría de los anticuerpos anti canalículos biliares como la proteína BESEP.

Es importante, en el seguimiento de los pacientes post-trasplante hepático, la detección de anticuerpos, la determinación de su especificidad antigénica y el estudio de la relación de los parámetros clínicos con los resultados del laboratorio.

P-018

ANÁLISIS DE LAS ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE CITOQUINAS Y DE FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO. S. García-Rodríguez¹, E. Zumaquero-Martínez¹, E.J. Pavón-Castillero¹, P. Navarro-Cuesta¹, S. Arias-Santiago², J.L. Callejas-Rubio³, N. Ortego-Centeno³, J. Sanchó-López², M. Zubiaur-Marcos¹. ¹Instituto Parasitología y Biomedicina López-Neyra, CSIC, ARMILLA. ²Servicio de Dermatología. Hospital Clínico Universitario San Cecilio, Granada. ³Unidad de Enfermedades Autoinmunes Sistémicas, Hospital Clínico San Cecilio, Granada.

Objetivo. En la patogénesis del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) están implicados factores genéticos y ambientales que tienen como consecuencia alteraciones en la regulación del sistema inmune. Se han evaluado las alteraciones en los niveles plasmáticos y de expresión de

un panel de citoquinas (pro-inflamatorias y anti-inflamatorias), así como de los factores de transcripción que determinan la selección de linaje de células T en células mononucleares de sangre periférica (PBMCs) de pacientes con LES respecto a controles sanos.

Material y métodos. Se determinó la concentración plasmática de 10 citoquinas: IL-1beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IFN-gamma y TNF-alfa en 56 pacientes con LES (SLEDAI 0-20) y 49 controles sanos mediante Bio-Plex precision pro assay (Bio-rad). En un subgrupo de 13 pacientes (SLEDAI 0-4) y 5 controles sanos se analizó en PBMCs la expresión génica relativa a controles sanos, mediante PCR cuantitativa a tiempo real de IL-1 beta, IL-2, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p70), IFN-gamma y TNF-alfa y de los factores de transcripción: T-bet (Th1), GATA3 (Th2), Foxp3 (Treg) y ROR-gamma-t (Th17); así como la expresión de los genes que codifican para las proteínas cinasas implicadas en señalización y supervivencia celular: MAPK1 y AKT1.

Resultados. Los pacientes con LES presentaron niveles plasmáticos significativamente elevados de las 10 citoquinas testadas. IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, e IL-13 eran las que mostraban un mayor incremento en relación a los controles sanos. En el subgrupo de 13 pacientes esta aumentada la expresión génica respecto a los controles sanos de IL-2, IL-6, IL-10, IL-12 e IFN-gamma estos aumentos son paralelos a sus niveles plasmáticos.

Se observó que la ratio T-bet (Th1)/GATA3 (Th2) esta aumentada en todos los pacientes de LES analizados con respecto a controles sanos, no se observó correlación con el SLEDAI. Se observa una correlación entre los niveles de expresión de T-bet con ROR-gamma-t (Th17) (Spearman $r=0.8956$, $p<0,0001$); así como entre la expresión de IL-6 y ROR-gamma-t ($r=0.6264$, $p<0,0220$). 3) 7 de los 13 pacientes de LES que presentan aumentos en la expresión de T-bet, presentan igualmente aumentos en la expresión de Foxp3 (Treg), ROR-gamma-t(Th17), MAPK1 y AKT1.

Conclusiones. Los pacientes con LES presentan niveles plasmáticos aumentados de citoquinas proinflamatorias (IL-6), Th0 (IL-2) y Th2 (IL-5, IL-10 e IL-13), confirmándose dicha desregulación a nivel de expresión de los genes que codifican para algunas de estas citoquinas. Esta situación proinflamatoria se confirma con el aumento del balance T-bet (Th1)/GATA3 (Th2) y de la expresión ROR-gamma-t (Th17).

P-019

ANÁLISIS DE LA EXPRESIÓN DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EN EL SUERO DE RATONES C57BL/6 SILVESTRES RESPECTO A RATONES C57BL/6 DEFICIENTES PARA CD38 EN UN MODELO DE ARTRITIS REUMATOIDE. A. Rosal-Vela¹, J. Postigo², S. García-Rodríguez¹, E. Zumaquero¹, M.V. Longobardo¹, A. Lario¹, P. Navarro¹, R. Merino³, J. Merino², M. Zubiaur¹, J. Sanchó¹. ¹Instituto de Parasitología y Biomedicina "López-Neyra", CSIC, Armilla, Spain. ²Facultad de Medicina, Universidad de Cantabria, Santander. ³Instituto de Biomedicina y Biotecnología de Cantabria, CSIC.

El suero es una herramienta de diagnóstico muy válida y fuente de información acerca del estado fisiológico del individuo. El estudio de la expresión diferencial de proteínas séricas puede ser útil en la búsqueda de biomarcadores específicos de enfermedad. La técnica de Proteomimer® permite reducir el rango dinámico del proteoma sérico disminuyendo la concentración de las proteínas mayoritarias y aumentando la de las menos abundantes, consiguiéndose una mayor diversidad de especies proteicas.

Objetivo. Análisis proteómico del suero mediante expresión diferencial 2-D-DIGE para el diagnóstico molecular de la artritis por inmu-

nización con colágeno de tipo II, modelo animal de artritis reumatoide, empleando ratones silvestres (wt) y ratones deficientes en CD38 (CD38ko). Los ratones CD38ko presentan diversas deficiencias en la respuesta inmunológica antígeno-específica, de ahí su interés en estudio de la artritis reumatoide como patología autoinmune.

Materiales y métodos. Utilización del kit Proteominer Protein Enrichment (BioRad) de pequeña capacidad con el suero de los ratones wt o CD38ko afectados por la enfermedad; precipitación de la muestra mediante 2-D Cleanup Kit (BioRad) y resuspensión en buffer compatible con marcaje DIGE. El diseño experimental de DIGE comprende el marcaje alternativo de las muestras wt y CD38ko con el Cy3 y Cy5; un pool de todas las muestras se marca con Cy2 como estándar interno. Se mantuvo la proporción de 500 μ g proteína/400pmol CyDye recomendada. Sistema Protein IEF Cell (BioRad) para la 1ª dimensión y sistema Criterion (BioRad) para la 2ª. La digitalización de los geles se realizó mediante Typhoon Imager 9400 (GE Healthcare) y el análisis de las imágenes mediante el software DeCyder 6.0 (GE Healthcare). Identificación de proteínas por espectrometría de masas (MS-MALDI-TOF). Validación por Western-blot.

Resultados. Tras el análisis de los geles 2-D, se detectaron aproximadamente unas 300 manchas proteicas presentando 30 de ellas diferencias de expresión notables entre wt y CD38ko. De estas últimas, el 30% presentan una variación en la expresión $\leq -1,5$ veces y el 70% de $\geq 1,5$ veces.

Conclusiones. La utilización del Proteominer® en combinación con el análisis diferencial de proteínas (sistema DIGE), la identificación de las proteínas por MS-MALDI-TOF y la posterior validación por técnicas alternativas nos ha permitido detectar proteínas relativamente poco abundantes cuya expresión varía significativamente en ratones deficientes en CD38 respecto a ratones silvestres en el contexto de la artritis reumatoide experimental. Estudios posteriores irán dirigidos hacia tejidos linfoides como ganglios o bazo.

P-020

EL DESCENSO DE LA SUBPOBLACIÓN DE LINFOCITOS B CD27IGMIGD EN PACIENTES CON LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO SE ASOCIA A LA PRODUCCIÓN DE AUTO-ANTICUERPOS. B. Rodríguez-Bayona¹, A. Ramos-Amaya¹, J.J. Pérez Venegas², C. Rodríguez¹, J.A. Brieva¹. ¹Hospital Universitario Puerta del Mar, Cádiz. ²Hospital de Jerez, Cádiz.

Objetivos. El lupus eritematoso sistémico (LES) es una enfermedad autoinmune caracterizada por la hiperreactividad de las células B y la producción de gran variedad de auto-anticuerpos (Ac). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio han puesto de manifiesto, entre otras alteraciones, una reducción significativa de la subpoblación de linfocitos B CD27IgM IgD en la sangre de pacientes con LES, alteración que es más acusada en pacientes en fase de actividad clínica, pero que incluso se observa en la mayoría de los pacientes en fase de remisión clínica. El objetivo del presente estudio consistió en valorar la relación existente entre las alteraciones en la distribución de las subpoblaciones B circulantes observadas y el estado de autoinmunidad sistémica, reflejado por la presencia de auto-Ac séricos.

Materiales y métodos. El estudio de subpoblaciones B se realizó en un grupo de 69 pacientes con LES reclutados consecutivamente y en 31 controles sanos. El marcaje combinado con CD19, CD27 e IgD por citometría de flujo permite diferenciar 5 subpoblaciones linfoides B: linfocitos B *naïve* (CD19+CD27-IgD+), linfocitos B CD27 IgM

IgD (CD19+CD27+IgD+), de memoria *switched* (SW) (CD19+CD27+IgD-), de memoria doble-negativa (DN) (CD19+CD27-IgD-) y células plasmáticas (CP) (CD19+CD27++IgD-). En pacientes con LES se determinó la presencia de ANA, Ac anti-ENA y anti-ADNdc.

Resultados. En el grupo de pacientes con LES se observó un aumento de las subpoblaciones de linfocitos B de memoria DN y de CP, y una disminución de la subpoblación B CD27 IgM IgD. Además, la disminución de la subpoblación CD27IgMIGD estaba en relación con la detección de elevados niveles de auto-Ac séricos (ANA, anti-DNAdc y anti-ENA) mientras que el aumento de CP y de linfocitos B de memoria DN se asociaba exclusivamente a la presencia de Ac anti-ADNdc.

Conclusiones. El grado de disminución de la subpoblación de linfocitos B CD27 IgM IgD está ligado a un estado general de autoinmunidad, asociándose a la producción de gran variedad de auto-Ac, mientras que el aumento de CP y de linfocitos de memoria DN se relaciona específicamente con la producción de Ac anti-ADNdc. Estos hallazgos sugieren un posible papel de los linfocitos B CD27 IgM IgD en la patogénesis del LES.

P-021

SV.¿UN NUEVO ANTIGENO TUMORAL IMPLICADO EN UN SÍNDROME PARANEOPLÁSICO? M.T. Ciudad García, M. Agustí, M.V. Rubiales, C. Gelpí. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau. Unidad docente Universidad Autónoma de Barcelona, Córdoba.

Muchas enfermedades paraneoplásicas del sistema nervioso central son inmunomediadas. La presencia de autoanticuerpos antineuronales en suero y líquido cefalorraquídeo de estos pacientes es la principal evidencia que lo confirma. Estos anticuerpos reaccionan con proteínas neuronales que a su vez están expresadas en las células del tumor. Por tanto, su caracterización es la base para un test rápido, útil y diagnóstico, de forma que se pueda asociar una sintomatología a un tipo de neoplasia que aún no se haya conseguido detectar físicamente.

El objetivo de este trabajo es el estudio de una nueva especificidad de anticuerpo antineuronal presente en el suero de una paciente con síndrome paraneoplásico asociado a carcinoma de ovario.

Material y métodos. En el análisis de anticuerpos antineuronales empleamos test comerciales con proteínas recombinantes; inmunofluorescencia indirecta sobre cortes de tejidos y sobre células en cultivo; inmunoblot con extractos de cerebro y cerebelo de rata fetal, de carcinoma de ovario y de cerebro humano.

Resultados. Mediante inmunofluorescencia indirecta estos anticuerpos reconocen un antígeno nuclear en cortes de cerebro y cerebelo de cobaya, en cerebro humano y en las líneas de carcinoma de ovario humano, UV-20 y UVH1. No reconocen otras líneas celulares de carcinoma de pulmón, laringe y cervix. Tampoco se detecta fluorescencia en tejidos de hígado, riñón, estomago y timo de rata y riñón humano, ni en neutrófilos humanos de sangre periférica. Mediante inmunoblotting el suero de esta paciente reconoce dos proteínas de aproximadamente 90 y 45 kDa de peso molecular tanto en extractos de cerebro y cerebelo de rata fetal como en extractos de las líneas de carcinoma de ovario mencionadas. No muestra reactividad con extractos de otras líneas celulares.

Conclusiones. Presentamos una nueva especificidad de anticuerpos antineuronales asociados a un síndrome paraneoplásico, que puede ser útil en la investigación y diagnóstico de estas enfermedades.