

Identificación de biomarcadores predictivos de
función inmune deficitaria en receptores de
trasplante de órgano sólido y médula ósea:
Evaluación de factibilidad de terapia celular con
CD45Ra-

Valentina Leguizamón

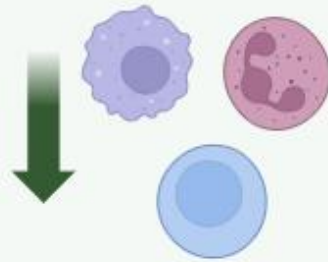
Directores: María Teresa Coiras López
Alejandro Luna de Abia

HIPÓTESIS

La inmunomonitorización de los pacientes trasplantados, junto con el desarrollo de nuevas opciones terapéuticas, permitirá identificar biomarcadores de riesgo y generar herramientas terapéuticas que optimicen el equilibrio entre rechazo e infecciones

Inmunosupresión, infecciones y opciones terapéuticas

Inmunosupresión



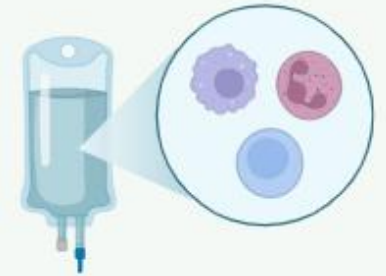
En los pacientes trasplantados, la inmunosupresión es necesaria para prevenir el rechazo del injerto

Infecciones



Las infecciones oportunistas, especialmente las virales como la producida por Citomegalovirus, suponen un problema para este tipo de pacientes

Tratamientos



Los tratamientos actuales, presentan limitaciones y la terapia celular con células de memoria se presenta como alternativa

Objetivos generales

Reclutamiento de participantes en las cohortes: trasplante de órgano sólido (renal, hepático), MO

Caracterizar el contexto inmunitario mediante el análisis fenotípico de subpoblaciones linfocitarias, cuantificación de inmunoglobulinas y complemento, determinación de citocinas plasmáticas y evaluación de la actividad citotóxica

Realizar un seguimiento clínico prospectivo de episodios de infección, rechazo del injerto, modificaciones en la inmunosupresión, reingresos hospitalarios y mortalidad

Monitorizar variables de infección a través de la detección de cargas virales (CMV, VEB, poliomavirus y otros herpesvirus), identificación de infecciones fúngicas, oportunistas y bacterianas graves

Estudiar las variables de compatibilidad del injerto mediante tipaje ABO, Rh y Kell, fenotipo eritrocitario extendido, determinación de HLA de clase I y II, HLA-E y genotipado de receptores KIR

Desarrollar un modelo in vitro de depleción de CD45Ra- para evaluar la viabilidad y la capacidad citotóxica de la subpoblación candidata a terapia celular

Objetivos específicos

Evaluación preliminar de la terapia celular de poblaciones CD45RA-

Optimización de un protocolo para la separación y purificación de células CD45RA⁻ a partir de buffy coats de donantes sanos

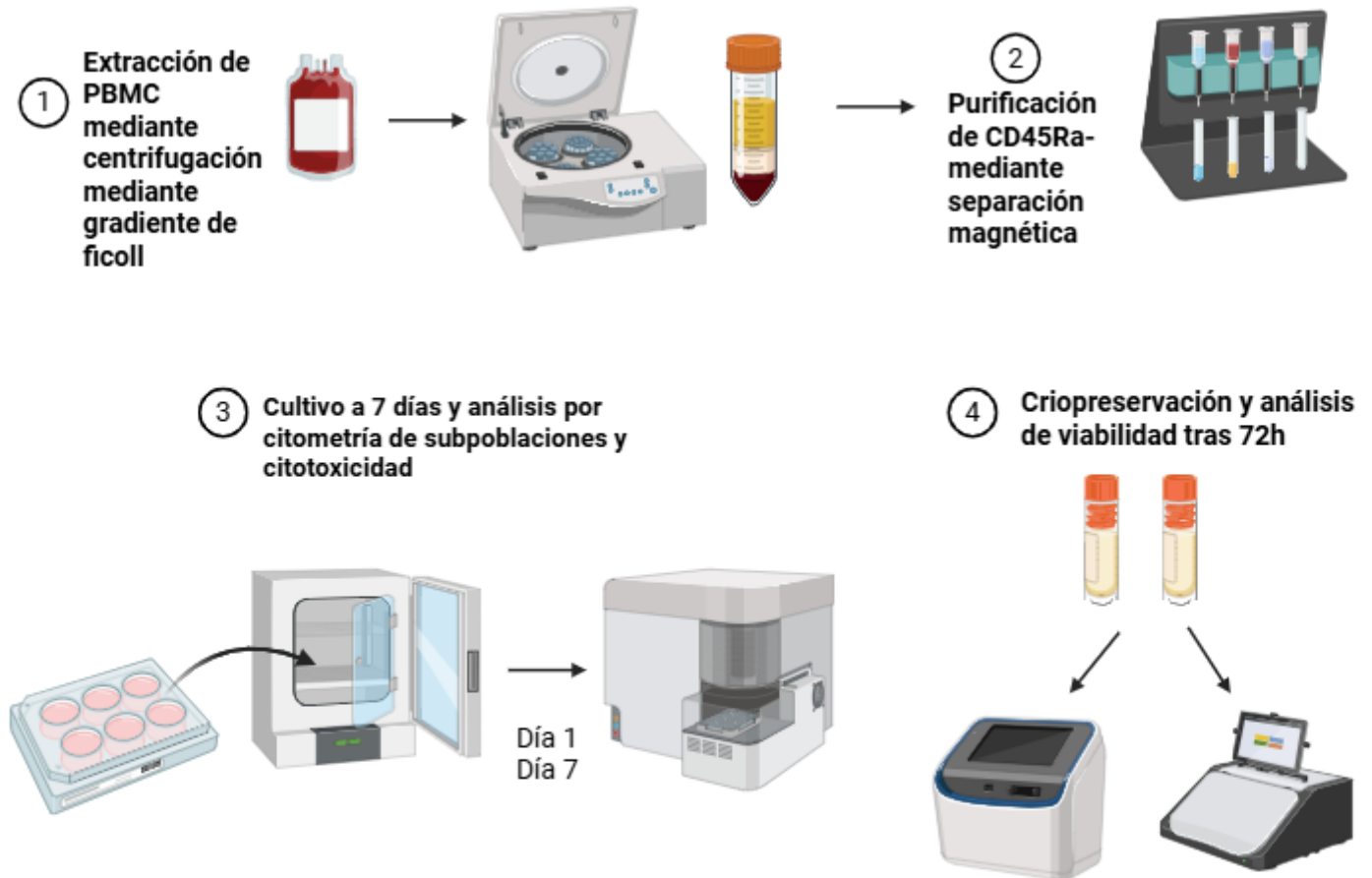
Caracterización de subpoblaciones celulares presentes en condiciones basales y tras 7 días de cultivo en la fracción purificada

Evaluación de la capacidad citotóxica frente a péptidos de CMV en condiciones basales y tras siete días de cultivo en la fracción purificada

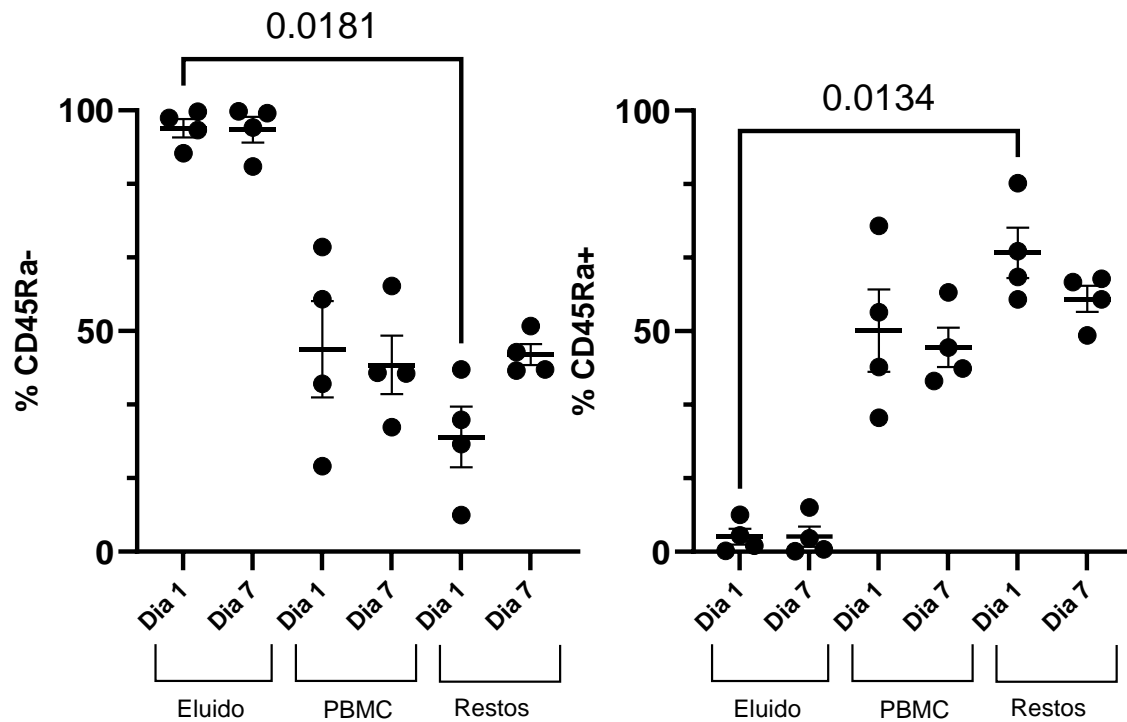
Comparar la viabilidad celular tras criopreservación con dos medios de congelación distintos

Métodos

- **4 buffy coats**
- Medios de congelación con DMSO al 10% (en FBS o suero salino 0,9%)
- Citotoxicidad frente a péptidos de cytomegalovirus (CMV) (PepTivator® CMV pp65 y PepTivator® CMV IE-1)
- **Marcaje:** CD45 (BV510), CD45Ra (BUV661), CD3 (BV510), CD4 (BV615), CD8 (APC-H7), CD19 (BV570), CD14 (PE), CCR7 (BV421), CD107a(PECy7), CD56 (BV737), LIVE/DEAD BLUE, Perforina (BV711), GzB (FITC)



Resultados: eficiencia de la purificación

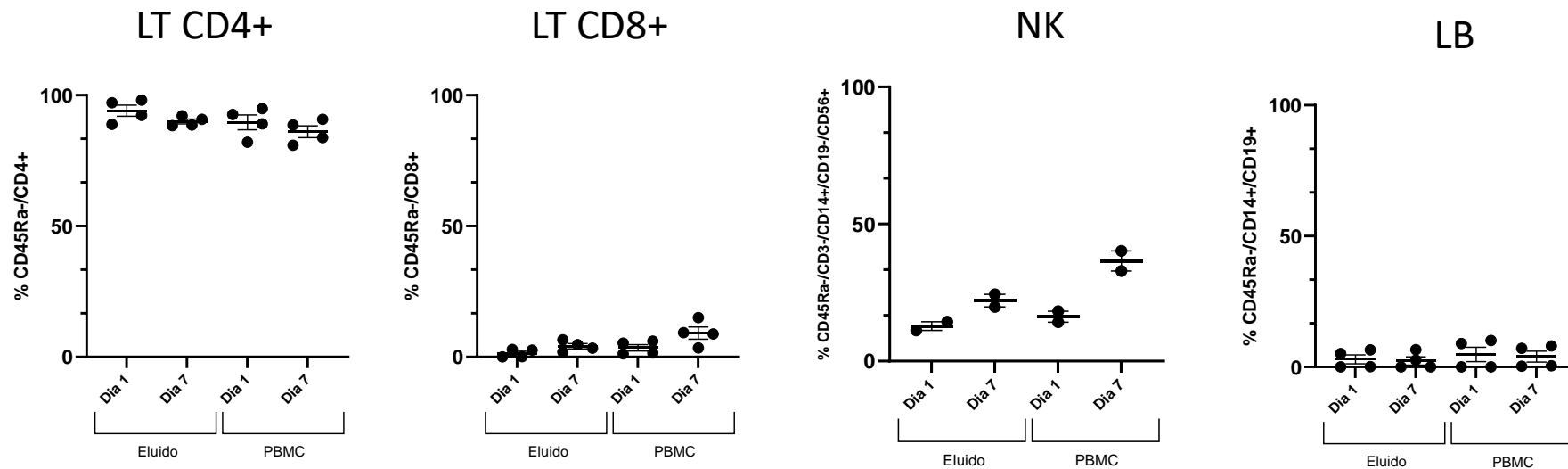


	Porcentaje de purificación
Buffy 1	56%
Buffy 2	65%
Buffy 3	48%
Buffy 4	70%
Media	60%

Conclusiones

- Se obtiene un 60% de PBMCs tras la purificación
- El eluido contiene cerca del 100% de CD45Ra-
- No hay cambios durante los 7 días de cultivo en CD45Ra-
- Un 25% de los restos son CD45Ra- que se han perdido durante la purificación

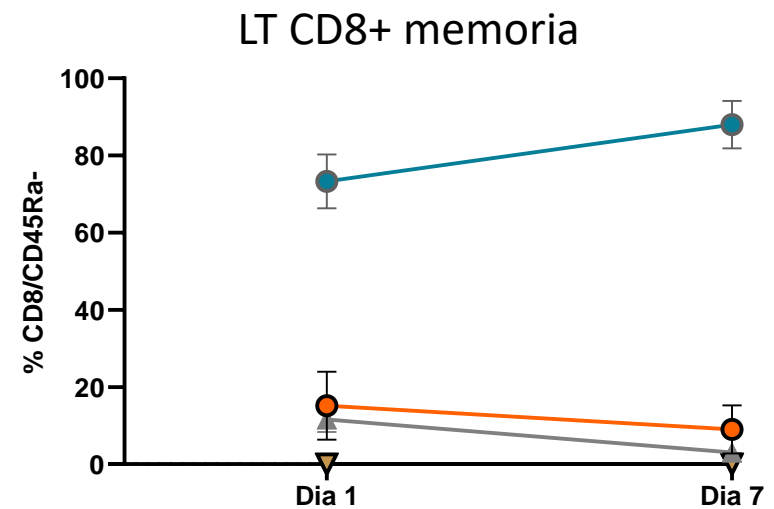
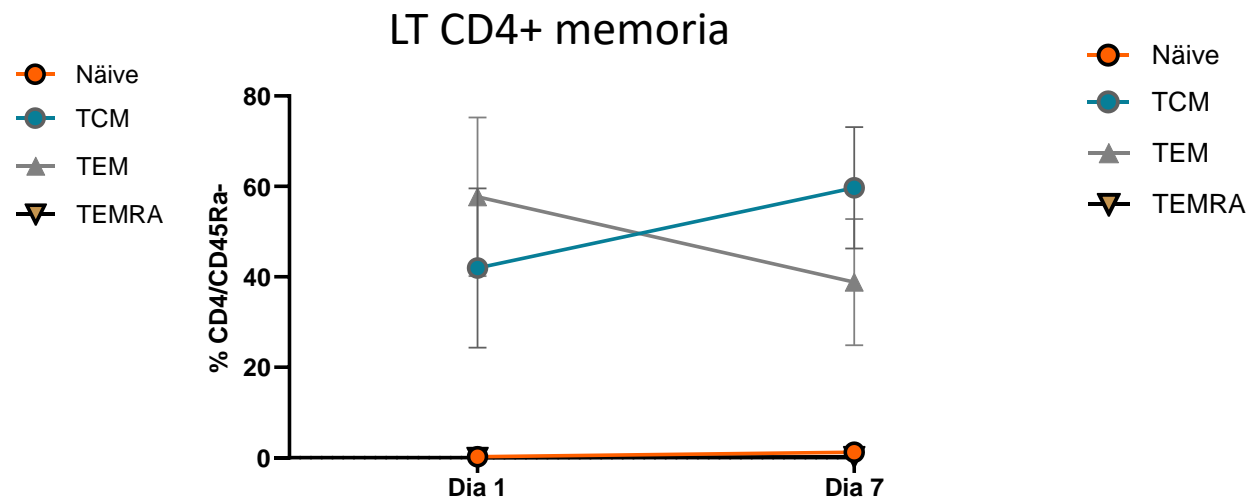
Resultados: caracterización fenotípica de poblaciones en cultivo



Conclusiones:

- No hay cambios en los niveles de subpoblaciones a 7 días
- Ausencia de linfocitos B CD45Ra-
- Obtenemos principalmente LT CD4 tras purificación

Resultados: caracterización fenotípica de poblaciones en cultivo

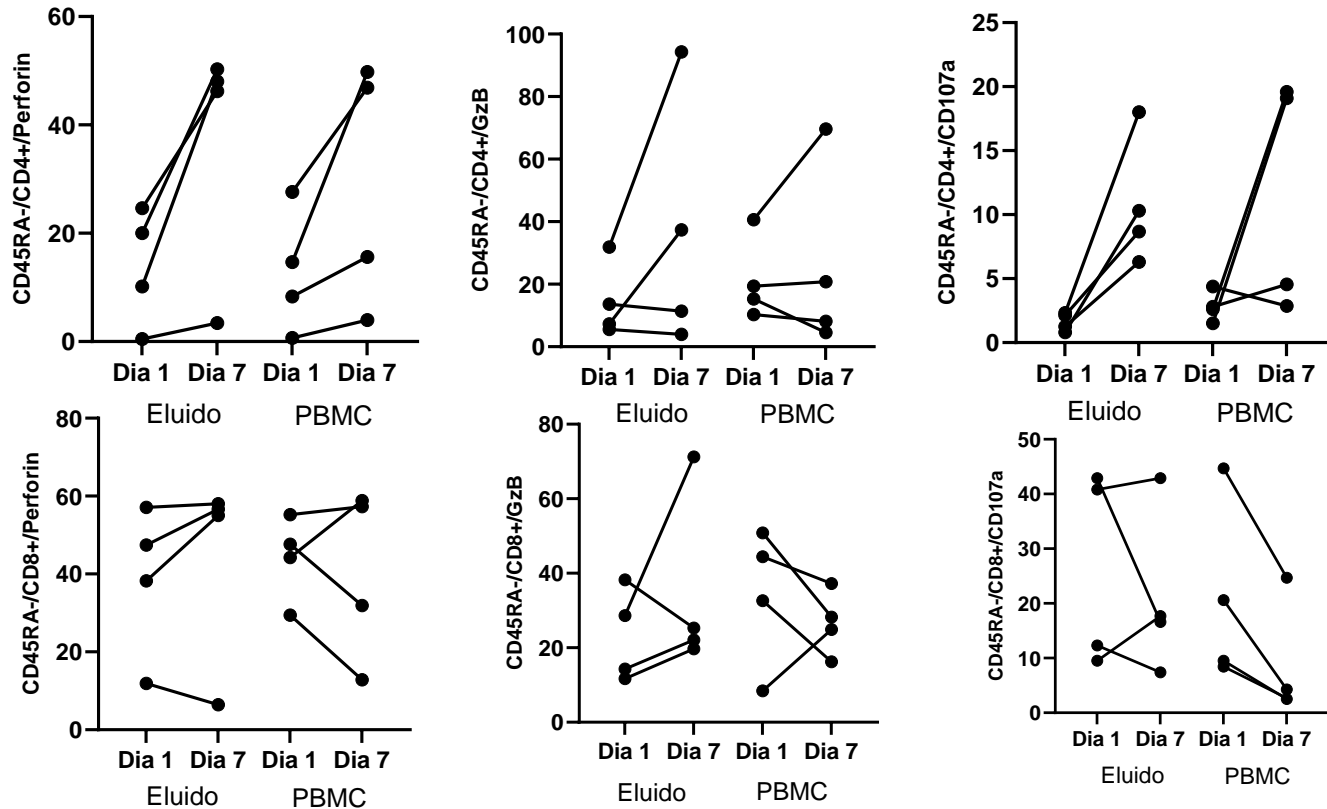


POBLACION	GATING
NAIVE	CCR7+ CD45Ra+
CENTRAL MEMORY (TCM)	CCR7+ CD45Ra-
EFFECTOR MEMORY (TEM)	CCR7- CD45Ra-
TERMINALLY DIFERENCIATED EFFECTOR MEMORY (TEMRA)	CCR7- CD45Ra+

Conclusiones

- Tras la purificación obtenemos en **CD4** principalmente **TCM** y **TEM**
- En **CD8** obtenemos principalmente **TCM** y pocas **TEM**

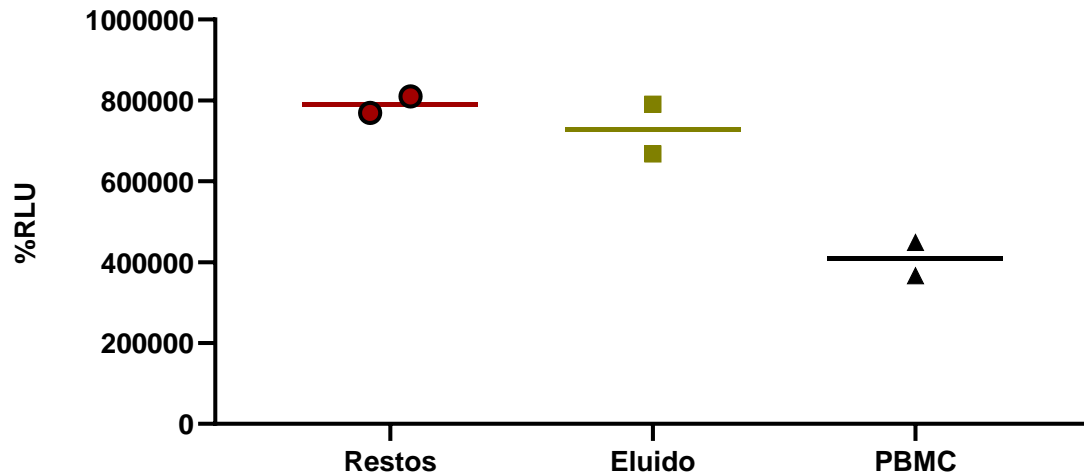
Resultados: respuesta funcional específica frente a péptidos de CMV



Conclusiones:

- Aumento de la respuesta global frente a péptidos tras purificación tras 7 días (especialmente en CD4 TEM)

Resultados: análisis viabilidad tras congelación



*Corregidos con concentración de proteínas

Población	Viabilidad en suero salino	Viabilidad en FBS
PBMC	67,5%	62,5%
CD45Ra+	65,5%	56,5%
CD45Ra-	63%	61%

Conclusiones:

- **No se encuentran diferencias entre los distintos medios de congelación ni entre subpoblaciones**
- **Se obtiene viabilidad similar de entre un 60% y 70%**

Conclusión y perspectivas futuras

Este estudio proporciona datos iniciales sobre viabilidad, pureza y función de las células CD45Ra-, que sirven como punto de partida para investigaciones más amplias

Aumentar el número de donantes (n) para validar resultados

Confirmar la reproducibilidad del protocolo en diferentes muestras

Profundizar el análisis de la función citotóxica tras cultivo y criopreservación

Valorar la aplicabilidad en pacientes trasplantados con infección por CMV

Conclusión y perspectivas futuras

Este proyecto integra la inmunomonitorización, el seguimiento clínico y el desarrollo de estrategias de terapia celular con el objetivo de mejorar los resultados en trasplantes

Continuar el seguimiento prospectivo de las cohortes clínicas

Continuar con la caracterización inmunológica y virológica en pacientes trasplantados

Integrar biomarcadores inmunitarios con variables clínicas e infecciosas