

# Trabajos a premio

## XII Congreso del Grupo CAHT



- AP1 OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACION DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS PARA SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA.
- AP2 TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTROFILOS (NETs) Y NUCLEOSOMAS CIRCULANES EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)
- AP3 EL POLIMORFISMO CTLA4 p.THR17ALA (c.49A>G) SE ASOCIA CON EL DESARROLLO DE INHIBIDOR EN PACIENTES ARGENTINOS CON HEMOFILIA A SEVERA
- AP4 EVALUACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS EN EL DPF/LMA. ROL DE LA GPIA
- AP5 PRIMER ESTUDIO GENOTIPICO DEL HAPLOTIPO M2 DE LA ANEXINA A5 EN PACIENTES CON PÉRDIDA RECURRENTE DE EMBARAZO, EN POBLACION ARGENTINA
- AP6 EVALUACIÓN DEL SCORE PRETEST CLÍNICO (4T) PARA EL DIAGNÓSTICO DE TROMBOCITOPENIA INDUCIDA POR HEPARINA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

## Plaquetas

AP1

## OPTIMIZACIÓN DE LA PREPARACION DEL PLASMA RICO EN PLAQUETAS PARA SU APLICACIÓN EN MEDICINA REGENERATIVA.

Etulain J<sup>1</sup>, Frechtel G<sup>2</sup>, Schattner M<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Trombosis Experimental, IMEX-CONICET. Academia Nacional de Medicina. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina. <sup>2</sup>Genética y Biología Molecular. Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, UBA. Ciudad Autónoma de Buenos Aires. Argentina.

El plasma rico en plaquetas (PRP) se emplea en medicina regenerativa como fuente de factores proangiogénicos derivados de plaquetas, y se procesa siguiendo protocolos clásicos de coagulación y transfusión de plaquetas. Considerando que dichos protocolos no han sido optimizados para inducir regeneración tisular, el objetivo de este estudio fue optimizar la preparación del PRP evaluando la angiogénesis in vitro e in vivo.

El PRP o las plaquetas libres de plasma (PL) provenientes de donadores sanos se estimularon con CaCl<sub>2</sub> (22mM) (37°C, 30min). Los sobrenadantes se incubaron con HMEC-1 (línea celular endotelial de microvasculatura humana) y se determinó in vitro la proliferación (ensayo PNPP), migración (ensayo de herida) y formación de túbulos (matrigel). Los resultados se expresan en veces del control sin estimular (ANOVA, n=6; \*p<0.05 vs sin estimular; #p<0.05 vs PRP 100%; &p<0.05 vs 37°C; ¥p<0.05 vs sin Crioprecipitado).

Considerando que además de los factores proangiogénicos plaquetarios, el PRP contiene sustancias antiangiogénicas plasmáticas, se comparó la capacidad angiogénica del PRP con las PL. La proliferación endotelial inducida por PL fue mayor a la inducida por PRP (2.4±0.2\*# vs 1.7±0.1\*), y el efecto antiangiogénico del plasma fue revertido diluyendo al PRP con solución fisiológica (50%=2.2±0.2\*#, 25%=2.4±0.2\*#, 12%=2.2±0.2\*#). Si bien el PRP para medicina regenerativa se procesa a 25-37°C, es sabido que la activación plaquetaria aumenta a menor temperatura. En concordancia, la proliferación de HMEC-1 inducida por PRP preincubado a 4°C fue mayor que a 37°C utilizando tanto PRP puro como diluido (PRP100%: 4°C=2.4±0.2\*#, 37°C=1.7±0.1\*. PRP25%: 4°C=3.7±0.3\*#&#, 37°C=2.4±0.2\*#). Este efecto estuvo asociado a una mayor liberación de VEGF plaquetario (factor proangiogénico) (4°C=12±1\*#, 37°C=7.5±0.6\*ng/ml). Asimismo, el suplemento con crioprecipitados fibrilares plasmáticos, matriz provisoria para la regeneración, potenció la proliferación endotelial mediada por PRP preincubado a 4°C y posteriormente diluido con solución fisiológica (4.2±0.2\*#&¥). Resultados similares fueron obtenidos in vitro para la migración y formación de túbulos endoteliales, e in vivo para la angiogénesis sobre membrana corioalantoidea de codorniz. Al igual que lo observado con el PRP proveniente de donadores sanos, las variables de optimización evaluadas en este trabajo también indujeron un aumento significativo de la angiogénesis mediada por PRP de pacientes diabéticos, sugiriendo que estos protocolos también serían potencialmente beneficiosos para terapias regenerativas en estos pacientes.

En conjunto, estos hallazgos indican que la preincubación del PRP a 4°C, posterior dilución y suplemento con crioprecipitados fibrilares plasmáticos sería más eficiente para la utilización de estos biomateriales con fines regenerativos comparado con los protocolos actuales.

## Inflamación y trombosis

AP2

## TRAMPAS EXTRACELULARES DE NEUTRÓFILOS (NETS) Y NUCLEOSOMAS CIRCULANTES EN NEOPLASIAS MIELOPROLIFERATIVAS (NMP)

Marín Oyarzún CP,<sup>1</sup> Carestia A,<sup>2</sup> Lev PR,<sup>1</sup> Glembotsky PR,<sup>1</sup> Castro Ríos M,<sup>3</sup> Moiraghi B,<sup>4</sup> Cortés Guerrieri V,<sup>5</sup> Molinas FC,<sup>1</sup> Marta RF,<sup>1</sup> Schattner M,<sup>2</sup> Heller PG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Hematología Investigación. IDIM A. Lanari. UBA. CONICET. Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Trombosis Experimental. IMEX. CONICET. Buenos Aires. <sup>3</sup>Consultorios Hematológicos. Buenos Aires. <sup>4</sup>Hematología. Hospital Ramos Mejía. Buenos Aires. <sup>5</sup>Hematología Clínica. IDIM A. Lanari. UBA. Buenos Aires

Los mecanismos y factores predictores de trombosis en NMP no están completamente definidos. Las NETs son redes de ADN, histonas y proteínas granulares, liberadas ante estímulos infecciosos o inflamatorios, que promueven la trombosis. En base a la presencia de activación leucocitaria y un microambiente inflamatorio, estudiamos si las NETs contribuyen al estado procoagulante de las NMP. Se incluyeron 66 pacientes, 26 con Trombocitemia Esencial (TE), 15 con Policitemia Vera (PV) y 25 con Mielofibrosis (MF). Si bien se constató activación de neutrófilos (aumento de CD11b) y aumento basal de especies reactivas del oxígeno (EROS) (citometría de flujo), las cuales gatillan NETs, la formación espontánea de NETs no difirió globalmente entre pacientes y controles, 1.5 ± 1.7 vs. 0.95 ± 0.5% (microscopía), encontrándose aumentada en 19% de los pacientes. Hubo una tendencia a menor formación de NETs frente al estímulo inflamatorio TNFα y una reducción significativa en la respuesta al PMA, demostrado por microscopía (37±22.2 vs. 53.8±16.7%, P=0.004) y por fluorimetría del ADN liberado (0.38±0.3 vs. 0.65±0.3 μg/mL, P=0.001). La disminución fue más pronunciada en MF (P=0.01) y se asoció a menor fosforilación de ERK (western blot) y generación de EROS (ambos pasos intermediarios en la NETosis) inducidas por PMA. Este defecto puede reflejar disfunción neutrófila intrínseca o células exhaustas secundario a activación in vivo. Se halló aumento de nucleosomas (ADN/histonas) circulantes (0.25 ± 0.3 vs. 0.08 ± 0.4 μg/mL, P<0.0001, ELISA), leve en TE, moderado en PV y más marcado en MF, particularmente en los de alto riesgo y en los JAK2V617F-positivos. No hubo correlación entre nucleosomas o NETs y trombosis o marcadores de activación endotelial (FVW) y celular (agregados leucocito/plaqueta), sugiriendo que las NETs no serían útiles como predictores de trombosis. Dado que los nucleosomas pueden derivar de NETs o de otras fuentes, medimos complejos histona-MPO, marcador específico de NETs, mediante un ELISA casero. Estos fueron indetectables en la mayoría de los pacientes, sugiriendo que las NETs no son el origen de los nucleosomas, mientras que hubo correlación entre nucleosomas y LDH (r=0.60, P<0.0001), lo que apunta a la lisis celular como una posible fuente. Estos resultados no avalan un rol sustancial de las NETs en la patogenia de la trombosis en NMP, si bien la disponibilidad de métodos estandarizados para medir NETs circulantes contribuiría a definir este tema. Estudios prospectivos permitirán establecer si el aumento de nucleosomas, que se describe por primera vez en NMP, tiene valor pronóstico, considerando su asociación con enfermedad avanzada.

## Alteraciones hemorrágicas congénitas y adquiridas

AP3

EL POLIMORFISMO CTLA4 p.THR17ALA (c.49A>G) SE ASOCIA CON EL DESARROLLO DE INHIBIDOR EN PACIENTES ARGENTINOS CON HEMOFILIA A SEVERA.

Marchione VD<sup>1</sup>, Radic CP<sup>1</sup>, Abelleyro MM<sup>1</sup>, Primiani L<sup>2</sup>, Neme D<sup>2</sup>, Candela M<sup>3</sup>, de Tezanos Pinto M<sup>2,3</sup>, De Brasi CD<sup>1,3</sup>, Rossetti LC<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular de la Hemofilia, IMEX, CONICET-ANM. <sup>2</sup>Fundación de la Hemofilia,

<sup>3</sup>IIHEMA, ANM. Buenos Aires, Argentina.

INTRODUCCIÓN: La hemofilia A (HA), coagulopatía hereditaria caracterizada por una reducida actividad del factor VIII de coagulación (FVIII:C), es causada por mutaciones deletéreas en el F8. La HA es tratada satisfactoriamente mediante la administración intravenosa de FVIII. Sin embargo, un 20-30% de los pacientes con HA-severa (FVIII:C<1IU/dL) desarrollan anticuerpos neutralizantes contra el FVIII exógeno (inhibidor) haciendo ineficaz la terapia de reemplazo. El desarrollo de inhibidor es considerado un rasgo complejo (multifactorial), que involucra factores modificables (ambientales), y no modificables (genéticos), donde el genotipo del F8 es el factor más condicionante, seguido por factores secundarios, más débiles: -historia familiar de inhibidores, grupo étnico-geográfico, HLA (antígeno linfocitario humano) y polimorfismos ligados a genes del sistema inmune: Interleuquina-10 (IL10), factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNFA) y el antígeno-4 del linfocito T citotóxico (CTLA4).

Objetivos: estimar los riesgos de inhibidor asociados a cada genotipo del F8; estudiar la concordancia del estatus de inhibidor entre hermanos vs pares al azar, e investigar factores genéticos secundarios (polimorfismos en IL10, TNFA Y CTLA4) en pacientes Argentinos con HA-severa.

MÉTODOS: La prevalencia de inhibidor (IP) y odds ratio (OR) con intervalos de confianza del 95% (IC95%) se estudió en una población inclusiva de pacientes con HA-severa (n=390, 116 casos, inhibidor[+], y 274 controles, inhibidor[-]). La concordancia de estatus se estudió en 17 pares de hermanos con la inversión del intrón 22 (Inv22). Los estudios de polimorfismos fueron realizados en un estrato de pacientes Inv22[+] (n=140-148) y en una serie comprehensiva con HA-severa (n=213-222).

RESULTADOS: El estudio caso/control permitió clasificar tres grupos de riesgo (alto, medio y bajo) asociado a cada genotipo-F8. El estudio de concordancia entre hermanos mostró un OR(IC95%) de 1.83(0.69-4.85)(p=0.33), indicando casi el doble de chance de coincidencia con el estatus de inhibidor del hermano, aunque no significativo. IL10 c.-1117A>G (rs1800896), TNFA c.-488G>A (rs1800629) y CTLA4 c.-319C>T (rs5742909) mostraron variadas tendencias de riesgo o protectora para inhibidor, con ORs no significativos. CTLA4 c.49A>G p.Thr17Ala (rs231775) mostró un incremento significativo de riesgo de inhibidor asociado a los genotipos [G/\_] con ORs de 1,89(1,04-3,45)(p=0,0398) en HA-severa y 2,61(1,27-5,36)(p=0,0096) en el estrato-Inv22[+].

CONCLUSIONES: Nuestros resultados concuerdan con especulaciones teóricas previas acerca de diferencias regionales en los factores secundarios no modificables. CTLA4 p.Thr17Ala, previamente asociado a baja expresión de CTLA-4 en la superficie de células-T y reportado como predisponente a enfermedades autoinmunes típicas, contribuye a aumentar el riesgo de inhibidor en nuestra población de pacientes con HA-severa.

## Plaquetas

AP4

EVALUACIÓN DE LA MEGACARIOCITOPOYESIS EN EL DPF/LMA. ROL DE LA GPIa.

Glembotsky A<sup>1</sup>, Marta R<sup>1</sup>, Goette N<sup>1</sup>, MarinOyarzún C<sup>1</sup>, Molinas F<sup>1</sup>, Raslova H<sup>2</sup>, Heller P<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio Hematología Investigación. Instituto de Investigaciones Medicas A. Lanari-IDIM, Universidad de Buenos Aires (UBA), Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). Buenos Aires, Argentina.

<sup>2</sup>Institut Gustave Roussy, INSERM, Villeuif, Francia

El desorden plaquetario familiar con predisposición a leucemia(DPF/LMA), es una trombocitopenia hereditariacausada por mutación de RUNX1, factor de transcripción que regula múltiples genesmegacariocíticos. En microarraysde expresión de megacariocitos donde se inhibió RUNX1, identificamos disminución de GPIa (receptor de colágeno). Previamente hallamos disminución de la expresión plaquetaria de GPIa de la respuesta al colágeno en pacientes con DPF/LMA.

Para esclarecer la fisiopatogenia de la trombocitopenia y evaluar la expresión y funcionalidad de GPIa en megacariocitos (MKs), se cultivaroncélulas CD34+ de sangre periférica de pacientesDPF/LMA, y controles. Se evaluó el desarrollo de colonias megacariocíticas, la pureza (CD41+) y maduración (CD41+42+) de los MKs obtenidos, la expresión de GPIa, por citometría de flujo; la adhesión al colágeno y la etapa de formación de proplaquetas.

En medio semisólido a base de colágeno (Megacult) en presencia de citoquinas (TPO, IL6, IL3, FLT3 y SCF), se halló disminución del número y tamaño de las colonias megacariocíticas en los pacientes (n=3) respecto a controles (n=5), 10,5±1,8 vs. 63,8±12,6, respectivamente, p=0,035, test de Mann-Whitney.En cultivo líquido, el % de MKs totales, fue menor en los pacientes (n=2) que en los controles (n=3) 23.4±0.4%vs53,8±12.0%,también la fracción de MKs maduros (CD41+CD42+) resultó 3.4±3.3% vs 16.4±6.5% y hubo ausencia de formación deproplaquetas, confirmando resultados previos.

La expresión de GPIa en los MKs de pacientes(n=2) fue menor que en los controles (n=3), 28.6±16.6%vs 89.7±3.5%. Para evaluar el correlato funcional de esta disminución, se midióla adhesión a matrices de colágeno tipo I monoméricoy fibrilar de los MKs incubados durante 16 hrs y posterior tinción con faloidina TRITC yCD61-FITC, utilizando microscopio de inmunofluorescencia. Hubo menor adhesión tanto sobre conformación fibrilar,13±2.9, como monomérica, 19.9±0.9 % de MK adheridos de pacientes respecto al control establecido como 100%,sugiriendo que la reducción en GPIa altera el comportamiento de megacariocitos sobre este sustrato. La alteración de la interacción MK-colágeno, crítica para prevenir la formación prematura de proplaquetas y plaquetas en el nicho osteoblástico de la médula ósea, puede contribuir a la alteración de la producción plaquetaria del DPF/LMA, que como observamos, involucradistintos estadios de la producción plaquetaria.La GPIadisminuida en megacariocitos y plaquetas sumada al hallazgo de sitios de unión para RUNX1 en el promotor GPIa (ITGA2) mediante análisis in silico sugiere que éste podría ser un blanco de RUNX1 en el megacariocito, evaluado medianteestudios en curso.

**Síndrome antifosfolípidos / trombofilia****AP5****PRIMER ESTUDIO GENOTÍPICO DEL HAPLOTIPO M2 DE LA ANEXINA A5 EN PACIENTES CON PÉRDIDA RECURRENTE DE EMBARAZO, EN POBLACION ARGENTINA.**

Udry S, Aranda F, Perés S, Chamorro J, Lucero A, Lara V, de Larrañaga G y Latino JO.

*Sección de Enfermedades Autoinmunes, Trombofilia y Embarazo, Hospital C. G. Durand y Laboratorio de Hemostasia y Trombosis, Hospital F. J. Muñiz. Buenos Aires, Argentina.*

La pérdida recurrente de embarazo (PRE) es una grave complicación obstétrica que afecta al 1-2% del total de las mujeres en edad reproductiva. Un 50% de las PRE no se asocia a alguna de las etiologías conocidas. La expresión de Anexina 5 (ANXA5), una proteína ubicada en la superficie trofoblástica, juega un papel fundamental en el mantenimiento del embarazo debido a sus funciones inmunomoduladoras y anticoagulantes a nivel de la placenta. Distintos haplotipos genéticos de ANXA5 afectan sus niveles de expresión, entre los que se destaca el haplotipo M2 que genera una menor expresión de ANXA5 y ha sido asociado a PRE y/o complicaciones durante el embarazo. Actualmente, no existen datos del haplotipo M2 de ANXA5 en nuestra población y sus posibles implicancias en el embarazo, por lo que nuestro objetivo fue analizar su posible asociación con PRE y/o complicaciones gestacionales.

Estudiamos las frecuencias de portación del haplotipo M2 de ANXA5 en un grupo de 233 mujeres con PRE sin causa gineco-obstétrica y las comparamos con un grupo control formado por 100 mujeres estrictamente seleccionadas, en etapa post-fértil, que tuvieron dos o más embarazos exitosos y nunca sufrieron alguna complicación obstétrica. No encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en la frecuencia de portadoras del haplotipo M2 de ANXA5 en el grupo de PRE respecto del grupo control (17,0%; 42/233 vs 18,0%; 18/100). Tampoco encontramos diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en sus frecuencias al comparar PRE tempranas y tardías. Sin embargo, encontramos frecuencias significativamente mayores de portadoras del haplotipo M2 en pacientes con restricción del crecimiento intrauterino (RCIU) respecto de aquéllas sin RCIU (36,4%; 12/33 vs 17,9%; 21/117;  $p = 0,024$ ). Por regresión logística binaria, considerando la portación de trombofilia hereditaria y/o adquirida como covariables, encontramos una asociación significativa entre la portación del haplotipo M2 con RCIU en un subgrupo específico de pacientes con antecedentes de pérdidas fetales (Odds Ratio=3,08; IC95%=1,10-8,64;  $p = 0,033$ ). Nuestros resultados sugerirían que la portación materna del haplotipo M2 de ANXA5 no estaría asociada en forma independiente a la predisposición a sufrir PRE. Sin embargo, la menor expresión de ANXA5 debido a la portación de este haplotipo podría cumplir un rol importante en pérdidas posteriores a las 20 semanas de embarazo, probablemente en forma asociada al RCIU. De hecho, la relación entre RCIU y pérdidas fetales ha sido claramente demostrada en estudios previos. Estos resultados cobran mayor relevancia ya que recientemente se conocieron los primeros datos del impacto del tratamiento con heparina en pacientes con PRE portadoras del haplotipo M2.

**Test de laboratorio de Hemostasia y Trombosis****AP6****EVALUACIÓN DEL SCORE PRETEST CLÍNICO (4T) PARA EL DIAGNÓSTICO DE TROMBOCITOPENIA INDUCIDA POR HEPARINA EN LA PRÁCTICA CLÍNICA**Villagra Iurre M<sup>1</sup>, Schutz N<sup>1-3</sup>, Otero V<sup>1-3</sup>, Barrera L<sup>2-3</sup>, López M<sup>2</sup>, Otaso J<sup>2-3</sup>, Oyhaburu J<sup>2-3</sup>, Arbelbide J<sup>1-3</sup>, Martinuzzo M<sup>2-3</sup>.*<sup>1</sup> Sección Hematología Adultos, Servicio de Clínica Médica, Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup> Grupo Bioquímico, Laboratorio Central; Hospital Italiano de Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup> Instituto Universitario Hospital Italiano de Buenos Aires.*

**INTRODUCCIÓN:** La incidencia de trombocitopenia inducida por Heparina (HIT) es 1 al 5 %, 30 a 50% desarrollarán trombosis sintomática (arterial o venosa). El Score 4Ts es utilizado como pretest clínico ante la sospecha de HIT.

**MATERIALES Y MÉTODOS:**

Estudio observacional de corte transversal. Se incluyeron todos los pacientes mayores de 18 años, con una determinación de anticuerpos anti factor plaquetario 4-heparina (APF4/HEP), internados entre enero 2014 y mayo 2016. El dosaje de APF4/HEP se realizó con ensayo inmunoturbidimétrico competitivo (HemosIL HIT Antibodies Instrumentation Laboratory, valor de corte 1,2 U/ml). Se categorizó a los pacientes con el score 4Ts en bajo, moderado y alto riesgo. Se usó estadística descriptiva básica, prueba de  $\chi^2$  o Fisher y test de T o Mann Whitney y curva ROC para desempeño del score 4Ts (Stata13).

**RESULTADOS:** Se incluyeron 119 pacientes: mediana de edad 66 años (rango 18-90), 63 (53%) de sexo masculino, internados por razones clínicas 87 (73%) y quirúrgicas (27%): en áreas críticas 37 (31%), enfermedad oncológica 39 (33%). Se detectó anticoagulante lúpico en 11/84 pacientes estudiados. Se diagnosticó HIT en 17 pacientes. Se observaron diferencias estadísticamente significativas entre grupo HIT y grupo control en mediana de días de exposición a heparina [12 (RIQ 9-19) vs 7 (RIQ 3-13)  $p = 0.01$ ] y número de eventos trombóticos [9 (53%) vs 15 (15%) OR 6,5 (IC95 2-21)  $p = 0.0003$ ]. La mayoría de los pacientes de riesgo moderado o bajo presentaron otras causas de plaquetopenia. En el grupo HIT, 4 pacientes presentaron ACV, 5 TVP y 1 TEP. No hubo ACV en el grupo control. El porcentaje de pacientes con HIT según score 4Ts fue 1/43 [2,33% (IC95 0-12)] para el grupo bajo riesgo, 8/61 [13,11% (IC95 6-24)] para moderado riesgo y 8/15 [53% (IC95 27-79)  $p = 0.000$ ] para alto riesgo. El Valor predictivo positivo del Score intermedio y alto fue 0,21 (IC95 0,12-0,32) y 0,53 (IC95 0,27-0,79). El valor predictivo negativo de un Score bajo fue 0,98 (IC95 0,88-0,99). El AUC de la curva ROC para el 4Ts fue 0,77 (0,65 a 0,90). La sensibilidad y especificidad fue 94% y 41% para un valor de corte de 4Ts de 4 y 47% y 93% para un valor de corte de 6.

**COMENTARIOS:** El Score 4Ts resultó ser un buen predictor clínico pretest de HIT en nuestra casuística; destacando la utilidad de la determinación de anticuerpos en los pacientes con riesgo intermedio y alto.