

# Comunicaciones Orales a Premio XIII Congreso del Grupo CAHT



|     |   |
|-----|---|
| AP1 | TROMBOSIS DE SENOS VENOSOS CEREBRALES(TSVC) EN NIÑOS: EXPERIENCIA DE UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE ALTA COMPLEJIDAD                           |
| AP2 | ROL DEL INMUNORECEPTOR TREML1 EN LA ALTERACIÓN PLAQUETARIA DEL DESORDEN PLAQUETARIO FAMILIAR CON PREDISPOSICIÓN A LEUCEMIA (DPF/LMA)      |
| AP3 | NIVELES PLASMÁTICOS Y VARIANTE GENÉTICA 7872C/T DEL FACTOR XI EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA EN UNA COHORTE ARGENTINA  |
| AP4 | PRIMERAS EVIDENCIAS DIRECTAS DE PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE NITROXILO (HNO) EN UN SISTEMA BIOLÓGICO NORMAL Y SU ROL EN LA FUNCIÓN PLAQUETARIA. |
| AP5 | RIESGO DE COMPLICACIONES HEMORRÁGICAS POST BIOPSIA RENAL PERCUTÁNEA   |
| AP6 | MECANISMOS PATOGENÉTICOS DE LA TROMBOCITOPENIA EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO  |

### TROMBOSIS DE SENOS VENOSOS CEREBRALES (TSVC) EN NIÑOS: EXPERIENCIA DE UN HOSPITAL PEDIÁTRICO DE ALTA COMPLEJIDAD.

Sciuccati G, Cervio C, Hepner M, Pieroni G, Diaz L, Candás A, Ramirez R, Annetta E, Frontrouth J, Pepe C, Mininni F, Feliú Torres A, Bonduel M.

Hospital de Pediatría "Prof. Dr. P. Garrahan". CABA, Argentina

**Introducción:** La TSVC es una entidad rara cuya incidencia ha aumentado en los últimos años debido a una mayor sospecha clínica y a la incorporación de nuevas técnicas de neuroimágenes. El diagnóstico precoz y una terapia antitrombótica (TAT) adecuada reduce la morbimortalidad. **Objetivo:** Describir una cohorte pediátrica con TSVC registrada prospectivamente durante 25 años en un centro de la alta complejidad. **Métodos:** Entre mayo/1992 y abril/2017 se incluyeron consecutivamente pacientes >1mes y <18 años con TSVC confirmada por imágenes. Datos epidemiológicos, clínicos, historia familiar de trombosis (HFT), imágenes, estudio de trombofilia (ET), TAT y evolución se registraron en una historia clínica estandarizada. **Resultados:** Se evaluaron 155pacientes (pac), 98varones (63%), edad mediana (rango), 8 años (0.1-18). Incidencia: 3,1/10.000 admisiones hospitalarias. 150pac (97%) presentaron condiciones clínicas asociadas: infecciones de cabeza y cuello (ICC) 64pac (41%), uso de L-asparaginasa (LASA) en leucemia linfoblástica aguda (LLA) 35pac (23%) / linfoma 8pac (5%), otras 49pac (32%). Cinco pac (3%): TSVC espontánea. Manifestaciones clínicas al diagnóstico: cefalea 85pac (49%), convulsiones 52pac (33%), hemiparesia 28pac (18%), otros 59pac (38%). Se detectó HFT en 8pac (5%). Localización: sistema venoso superficial 125pac (81%), profundo 11pac (7%), ambos 19pac (12%); 60pac (39%) presentaron infarto venoso, con transformación hemorrágica: 41/60 (68%). Se realizó ET en 98/155pac (63%), resultados: 5/26pacientes (19%) con ICC: FVL 2 pac, PTG20210A 1pac, FVL y PTG20210A 1pac, deficiencia hereditaria de AT 1pac. Todos los pac tratados con LASA tuvieron deficiencia adquirida de AT, 2 de ellos asociada a FV y 2pac a PTG20210A. En TSVC espontánea: FVL 1pac, deficiencia hereditaria de PC/PTG20210A 1pac. 143pac (92%) recibieron enoxaparina, 83pac (54%) antagonistas de vitamina K y 27 pac se suplementaron con concentrados de AT. Duración de la TAT: mediana (rango), 5meses (1-75). Un pac con enoxaparina tuvo progresión hemorrágica del infarto. Un adolescente con TSVC espontánea y un desorden protrombótico combinado, presentó recurrencia (TEP) bajo tratamiento con heparina, requirió un filtro en VCI. Cuatro pac presentaron trombosis venosa asociada a catéter. Tasa de recurrencia 0.18%pac-año. No se observó mortalidad atribuible a TSVC. Mortalidad atribuible a la enfermedad de base 22pac (14%). Mediana (rango) de seguimiento 2.7años (0.03-16.5). Evolución, 88pac tuvieron control de imágenes observándose recanalización completa y parcial en 49pac (56%) y 31pac (35%), respectivamente. **Conclusiones:** En esta extensa cohorte pediátrica la TSVC espontánea fue infrecuente y las infecciones de cabeza y cuello fueron los factores de riesgo más prevalentes. Se administró TAT en la mayoría de los niños, con tasas de sangrado mayor y de recurrencia inferiores a las reportadas en otras series pediátricas. No se observó mortalidad atribuible a TSVC. La TSVC es una entidad subdiagnosticada. Su detección requiere un alto índice de sospecha para iniciar precozmente la terapia antitrombótica.

### ROL DEL INMUNORECEPTOR TREML1 EN LA ALTERACIÓN PLAQUETARIA DEL DESORDEN PLAQUETARIO FAMILIAR CON PREDISPOSICIÓN A LEUCEMIA (DPF/LMA)

Glembotsky AC<sup>1</sup>, Goette NP<sup>2</sup>, Marin C<sup>1</sup>, Sliwa D<sup>3</sup>, Bluteau D<sup>3</sup>, Marta RF<sup>1</sup>, Raslova H<sup>3</sup>, Heller PG<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM), Consejo Nacional Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Hematología Investigación, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, Departamento de Hematología Investigación, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Institut Gustave Roussy, INSERM, Villejuif, Francia

El DPF/LMA es una trombocitopenia hereditaria causada por mutación de RUNX1, factor de transcripción que regula múltiples genes del linaje megacariocítico. Se caracteriza por trombocitopenia, alteración de la agregación plaquetaria y predisposición leucémica. Previamente identificamos disminución de TREML1 entre otros genes, mediante análisis de arrays de expresión utilizando megacariocitos donde se inhibió RUNX1 (shRUNX1). El TREML1 es un inmunoreceptor que se encuentra en los gránulos  $\alpha$  plaquetarios. Si bien su rol no es claro, se sabe que tiene una función esencial en la agregación plaquetaria, posiblemente mediando la unión a fibrinógeno. En base a esto, nos interesó profundizar acerca del rol del TREML1 en la alteración plaquetaria del DPF/LMA. Para ello, estudiamos 8 pacientes pertenecientes a 2 familias con DPF/LMA. La expresión génica resultó disminuida en el ARNm de megacariocitos (MKs) (n=4) y plaquetas (n=3) de pacientes mediante análisis de arrays de expresión y PCR en tiempo real (P < 0,01), respectivamente. Dado este hallazgo, corroboramos la disminución de TREML1 en el lisado de proteínas plaquetarias por western blot (0,1±0,04 vs. 1,08 ± 0,06 controles) con indemnidad de otras proteínas de los gránulos alfa. La incubación de plaquetas normales con un anticuerpo bloqueante anti-TREML1 inhibió, como está descripto, la agregación, confirmando su participación en la función plaquetaria. Utilizando anticuerpo rabbit anti-TREML1 y Alexa fluor 488 anti-rabbit, se evidenció una disminución de la expresión de TREML1 en los gránulos de los MKs de los pacientes, obtenidos del cultivo de sangre periférica. Dado que se desconoce si TREML1 tiene un rol en la megacariopoyesis, la implicancia funcional de la disminución a nivel de MKs no es clara. La inhibición del RUNX1 en células CD34+ normales mediante ARN de interferencia (sh) anti-RUNX1 indujo disminución del TREML1 por PCR en tiempo real (A), mientras que el rescate con un vector de expresión para RUNX1 resistente a la acción del sh-RUNX1 restauró los niveles de TREML1 (0,63±0,06 (A), 3,06±0,03 (B), respecto a 1 del control MK). Mediante análisis in silico se hallaron sitios consenso para RUNX1 en el promotor TREML1, sugiriendo que éste podría ser un blanco de RUNX1 en el megacariocito, hipótesis que se confirmó por estudios de inmunoprecipitación de cromatina. En conclusión, la disminución de TREML1 en el DPF/LMA podría contribuir, junto con la desregulación de otras moléculas, a la disfunción plaquetaria de este desorden. Este gen puede ahora incluirse entre los blancos moleculares regulados por RUNX1 en el linaje megacariocítico.

AP3

#### NIVELES PLASMÁTICOS Y VARIANTE GENÉTICA 7872C/T DEL FACTOR XI EN PACIENTES CON ENFERMEDAD TROMBOEMBÓLICA VENOSA EN UNA COHORTE ARGENTINA.

Aranda F, Dubosq C, Moiana M, Perés S, Lara V, de Larrañaga G, Ceresetto J.

*Hospital de Infecciosas "Francisco J. Muñiz" y Hospital Británico de Buenos Aires, Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina*

**Introducción:** Niveles plasmáticos elevados de FXI han sido asociados con un mayor incremento de enfermedad tromboembólica venosa (ETV). Otros estudios demostraron que ciertas variantes genéticas del locus del f11 estarían asociadas con un mayor riesgo trombótico. El alelo FXI 7872C, que estaría asociado a un aumento de los niveles de FXI, fue el que evidenció la asociación más fuerte.

**Objetivos:** Evaluar la posible asociación entre la portación de alguno de los dos genotipos de la variante FXI 7872C/T y el aumento del riesgo trombótico. Investigar la correlación entre los niveles plasmáticos del FXI y la portación de las distintas variantes genéticas.

**Población:** 149 pacientes argentinos con ETV mayores de 18 años de edad con diagnóstico de trombosis venosa profunda confirmada por imagen. Se incluyeron pacientes con diferentes factores de riesgo para ETV como cáncer, enfermedades metabólicas, mujeres embarazadas. Grupo control: 146 individuos donantes de sangre entre 20 y 60 años.

**Métodos:** El FXI se determinó por método coagulable en una etapa en un coagulómetro automático de detección óptica realizando tres diluciones. La genotipificación de la variante FXI7872C/T se realizó mediante PCR-RFLP.

**Resultados:** Las frecuencias genotípicas de la variante genética FXI 7872C/T en el grupo con ETV fueron 30,9% C/C, 52,3% C/T y 16,8% T/T, mientras que en el grupo control fueron 22,6% C/C, 54,1% C/T y 23,3% T/T. Ambas distribuciones no mostraron diferencias significativas ( $p > 0,05$ ), ni aún bajo los distintos modelos de dominancia alélica. Los valores plasmáticos del FXI resultaron ser leve pero significativamente mayores ( $p = 0,029$ ; Test de Mann-Whitney) en los portadores del genotipo FXI 7872 C/C (Mediana=108,2% [96,3-126,2]) respecto de los portadores de los otros dos genotipos (Mediana=102,5% [87,3-115,8]).

**Conclusiones:** Las frecuencias alélicas de la variante FXI7872C/T, reportadas por primera vez en población argentina, son similares a las observadas en población europea. Los portadores del genotipo FXI 7872 C/C tendrían niveles plasmáticos significativa, aunque levemente, mayores de FXI, tal como fue descripto en otros estudios. Con respecto a la posible implicancia del alelo FXI 7872 C en el aumento del riesgo trombótico, sólo encontramos una tendencia de mayor frecuencia de portadores del genotipo C/C en pacientes con ETV pero las diferencias respecto del grupo control no fueron significativas en este grupo de pacientes. Sin embargo, dada la naturaleza multifactorial de la ETV, no podemos descartar que si esté involucrado en el aumento del riesgo trombótico en asociación con otros factores.

AP4

#### PRIMERAS EVIDENCIAS DIRECTAS DE PRODUCCIÓN ENDÓGENA DE NITROXILO (HNO) EN UN SISTEMA BIOLÓGICO NORMAL Y SU ROL EN LA FUNCIÓN PLAQUETARIA.

Maccaferro MC, Suarez Freire SB, Suarez S, Martí MA, Ivani PC, Schattner MA, Pozner RG.

*Instituto de Medicina Experimental (IMEX), Academia Nacional de Medicina-CONICET, C.A.B.A. Argentina.*

*Depto. de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires, C.A.B.A. Argentina.*

Dada la alta incidencia de enfermedades cardiovasculares y el rol de las plaquetas en las mismas, la inhibición plaquetaria es foco de numerosas investigaciones. Si bien la aspirina es la droga más conocida y utilizada en estos pacientes para la prevención del infarto, el HNO (una forma reducida del NO) está suscitando un gran interés clínico. Curiosamente, y a pesar de estar estrechamente relacionados, el NO y HNO presentan mecanismos de acción cardiovascular diferentes. Si bien el HNO comparte propiedades vasodilatadoras con el NO, dadores de HNO mostraron efectos beneficiosos que no pudieron ser reproducidos por NO como son el aumento de la contractilidad muscular, aceleración de la relajación ventricular y disminución en la carga cardíaca. Estos datos provienen del uso de drogas liberadoras de HNO, sin embargo, se desconoce si este gasmediador puede ser sintetizado de manera endógena.

Es por ello que evaluamos la producción de HNO en plaquetas (usando plasma rico en plaquetas -PRP-) mediante dos estrategias experimentales: detección de cambios espectrales de una porfirina de Mn(III) y cambios de corriente utilizando un sensor electroquímico selectivo de alta sensibilidad para HNO -basado en una porfirina de Co(II)-, que permite cuantificar HNO en tiempo real. La concentración de HNO fue estimada a partir de una curva de calibración realizada con Sal de Angeli.

Si bien la producción de HNO por plaquetas en reposo fue nula, la estimulación con agonistas clásicos como ADP o TRAP promovió la generación de  $186 \pm 11 \text{ nM}$  y  $103 \pm 16 \text{ nM}$  de HNO, respectivamente. Dado que estos agonistas comparten la generación de TXA<sub>2</sub>, utilizamos ácido araquidónico (AA) como agonista y observamos que produjo  $98 \pm 21 \text{ nM}$  de HNO ( $n=5$ ,  $p < 0,05$ ). Estos resultados fueron corroborados por el método espectrofotométrico.

Con el fin de modular los niveles de HNO, y considerando que las plaquetas sintetizan NO, utilizamos agentes reductores como el ácido ascórbico (Asc) o 2-mercaptoetanol. La producción de HNO en PRP fue significativamente mayor en presencia de Asc ( $394 \pm 49 \text{ nM}$ ,  $241 \pm 44 \text{ nM}$  y  $207 \pm 28 \text{ nM}$ ) o 2-mercaptoetanol ( $423 \pm 41 \text{ nM}$ ,  $280 \pm 45 \text{ nM}$  y  $220 \pm 31 \text{ nM}$ ) utilizando ADP, TRAP o AA como agonistas, respectivamente.

Además, se observó que todos los parámetros de activación plaquetaria evaluados como agregación por turbidimetría, activación de la integrina  $\alpha \text{IIb}\beta_3$ , y externalización de P-selectina (citofluorimetría) fueron significativamente inhibidos por ambos reductores de manera concentración-dependiente.

Estos datos no solo constituyen la primera evidencia de producción de HNO por un sistema biológico en condiciones normales, sino que además sugieren un rol modulador negativo de este gasmediador en plaquetas.

## RIESGO DE COMPLICACIONES HEMORRÁGICAS POST BIOPSIA RENAL PERCUTÁNEA.

Privitera V, Lopez M, Bratti G, Barrera L, Barzallo M, Basquiera A., Chuliber F, Mezzaroba D, Penchasky D, Schutz N, Villagra M, Viñuales S, Martinuzzo M, Oyhamburu J, Alberbide J.

*Servicio de Hematología Clínica, servicio de Nefrología, Laboratorio Central del Hospital Italiano de Buenos Aires. Instituto Universitario del Hospital Italiano.*

**Introducción:** La tasa de complicaciones hemorrágicas posterior a biopsia renal percutánea es baja, pero continúan siendo las más graves post procedimiento. La enfermedad renal crónica avanzada, la uremia y la función plaquetaria alterada son factores de riesgo. Predecir qué pacientes tienen mayor riesgo de sangrado es fundamental.

**Objetivos:** Determinar la incidencia de complicaciones hemorrágicas en pacientes sometidos a biopsia renal percutánea en nuestra institución. Identificar factores asociados y evaluar el rol del uso de PFA (Platelet Function Analyzer) como predictor de sangrado.

**Material y métodos:** Estudio descriptivo de cohorte retrospectiva incluyendo todos los pacientes sometidos a biopsia renal percutánea de órgano nativo entre enero/2015 y enero/2016. Pacientes: n=77, edad >18 años. Análisis estadístico: t-test, test de Fisher y análisis multivariado por regresión logística. Software Stata13.

**Resultados:** Pacientes: 57 % mujeres, edad media 54 años, plaquetas >100000/mm<sup>3</sup> y coagulograma en niveles hemostáticos. El 26% de los pacientes presentaron algún tipo de sangrado, el más frecuente hematoma perirrenal (60%). Seis presentaron sangrado mayor (requerimiento de transfusiones y/o reintervención por angiografía). Comparando poblaciones con y sin sangrados, los pacientes con sangrado tuvieron estadísticamente medias de: hematocrito menor (31 vs 35%, p=0,051), creatinina mayor (3,6 vs 1,9 mg/dl, p=0,02), BMI menor (23 vs 26, p=0,002) y tiempos de oclusión (TO) más prolongados con COL/EPI (132 vs 113 segundos, p=0,04). No se encontraron diferencias significativas en edad, sexo, plaquetas, uremia, TP, APTT, TO COL/ADP. Se observó correlación lineal entre TO COL/EPI y COL/ADP con creatinina y clearance de creatinina (CLCr). Mayor prevalencia de TO COL/EPI y COL/ADP prolongados (> rango de referencia) en pacientes con sangrado que sin sangrado sin significación estadística (35 y 30 vs 19,6 y 17,8% respectivamente) Por curva ROC un TO COL/EPI ≥192 segundos tuvo un valor predictivo positivo de 72%. En pacientes con PFA alterados el uso de desmopresina no redujo la tasa de sangrados. En el análisis multivariado conservaron significancia estadística para asociación con sangrados: CLCr <11 mL/min/1.73 m<sup>2</sup> (OR 8,6) y BMI <22 (OR 8,8).

**Conclusiones:** Las complicaciones hemorrágicas post biopsia renal se asociaron con CLCr menor, TO más prolongados con COL/EPI y menor BMI. Se requieren estudios prospectivos para definir el rol de la evaluación de alteraciones de función plaquetaria (PFA) así como las medidas para corregirlas.

## MECANISMOS PATOGENÉTICOS DE LA TROMBOCITOPENIA EN EL LUPUS ERITEMATOSO SISTÉMICO

Baroni Pietto MC<sup>1</sup>, Goette N<sup>2</sup>, Lev P<sup>1</sup>, Glembotski A<sup>1</sup>, Collado V<sup>3</sup>, Pisoni C<sup>4</sup>, Flores G<sup>5</sup>, Gomez R<sup>6</sup>, Gomez G<sup>3</sup>, Heller P<sup>1</sup>, Marta R<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones Médicas (IDIM), Consejo Nacional Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Departamento de Hematología Investigación, Buenos Aires, Argentina. <sup>2</sup>Universidad de Buenos Aires, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, Departamento de Hematología Investigación, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Instituto de Investigaciones Médicas A Lanari, Departamento de Inmunología, Buenos Aires, Argentina. <sup>4</sup>Centro de Educación Médica e Investigación Clínica (CEMIC) "Norberto Quirno", Departamento de Inmunología y Reumatología, Buenos Aires, Argentina. <sup>5</sup>Hospital General de Agudos "Carlos G. Durand", Departamento de Hematología, Buenos Aires, Argentina. <sup>6</sup>Universidad de Buenos Aires, Facultad de Medicina, Hospital de Clínicas José de San Martín, Departamento de Reumatología, Buenos Aires, Argentina.

El Lupus eritematoso sistémico (LES) se caracteriza por la producción de variedad de autoanticuerpos desarrollando trombocitopenia en el 15-20% de los pacientes. Este estudio investiga posibles causas del bajo recuento plaquetario, incluyendo apoptosis de plaquetas y disminución en su producción. Se obtuvieron muestras de sangre de 21 pacientes (P) con LES con y sin trombocitopenia, recuento plaquetario promedio 112.10<sup>3</sup>/uL (2-272.10<sup>3</sup>/uL) y 24 controles (C) normales. Se estudió la apoptosis plaquetaria en 14 pacientes, observando aumento de la expresión de fosfatidilserina (PS, evaluada por unión de anexinaV-FITC por citometría de flujo -CF-) en 5 pacientes, todos con trombocitopenia; aumento de la pérdida del potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ , cambio de fluorescencia del reactivo JC-1 por CF) en 9 pacientes, y aumento del nivel de caspasa 3 activa (metodología FLICA, por CF) en 2 pacientes; encontrándose diferencias a nivel poblacional en  $\Delta\Psi_m$  (test Mann Whitney p<0.01). La apoptosis inducida por A23187 fue normal. No hubo activación plaquetaria basal en LES, evaluado por unión de PAC-1 a GPIIb/IIIa ni por externalización de P-selectina, sugiriendo que la exposición de PS y la pérdida de  $\Delta\Psi_m$  no son consecuencia de activación sino de apoptosis. Los plasmas de LES (n=20) fueron incubados con progenitores hematopoyéticos CD34+ normales (obtenidos de sangre de cordón umbilical) durante 12 días para evaluar su efecto sobre la megacariopoyesis, observándose aumento en el número total de células P=3,5.10<sup>5</sup>(2,7.10<sup>4</sup>-1,9.10<sup>6</sup>), C=1,7.10<sup>5</sup>(8,1.10<sup>4</sup>-3,2.10<sup>5</sup>); número de células CD61+ (marcador de linaje) P=2,4.10<sup>5</sup>(1,3.10<sup>4</sup>-1,4.10<sup>6</sup>), C=1,1.10<sup>5</sup>(5,0.10<sup>4</sup>-2,5.10<sup>5</sup>); número de células CD42b+ (marcador de madurez) P=2,7.10<sup>5</sup>(9,2.10<sup>3</sup>-1,0.10<sup>6</sup>), C=9,3.10<sup>4</sup>(3,5.10<sup>4</sup>-2,2.10<sup>5</sup>) (test Mann Whitney p<0.001), intensidad de fluorescencia media (Gm) de CD61, P=91,5(47,99-113,4), C=74,0(35,97-102,6) (test t p<0.01) y Gm de CD42b P=112,2 (32,0-184,7), C=79,0(46,41-128,3) (test Mann Whitney p<0.05). Adicionalmente, se obtuvieron megacariocitos maduros normales de progenitores CD34+ y se agregó el plasma al día 12 de cultivo para evaluar su efecto sobre la formación de proplaquetas (FPP, trombopoyesis) mediante recuento directo en microscopio el día 15. La FPP estuvo disminuida en presencia del plasma de LES (n=16) 0,47%(0,13-2,00); C (n=14) 0,97%(0,51-2,16) (test Mann-Whitney p<0.05). Nuestros resultados sugieren que la eliminación periférica por apoptosis plaquetaria y la inhibición de la trombopoyesis, podrían contribuir a la trombocitopenia en LES, mientras que el desarrollo megacariocítico, al contrario de estar inhibido se vio incrementado, posiblemente por aumento de citoquinas inflamatorias. Se está analizando la presencia de autoanticuerpos en los plasmas de LES como posibles responsables de los efectos observados.