

**EFFECTO DE LA HOMOCISTEÍNA EN LA LISIS DE FIBRINA: ¿ACCIÓN PROTROMBÓTICA?**

PL 1

Lauricella A., Quintana I., Kordich L., Sasseti, B.

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA. Bs. As.

**Objetivo:** Estudiar los mecanismos involucrados en la acción protrombótica de niveles plasmáticos elevados de homocisteína (Hcy). **Antecedentes:** Se ha descrito que la hiperhomocisteinemia constituye un importante factor de riesgo independiente para la trombosis arterial y venosa. Aún no se han esclarecido los mecanismos fisiológicos involucrados en este proceso, en particular la relación entre Hcy y fibrinolisis. En trabajos previos demostramos que los coágulos obtenidos en presencia de Hcy generan redes de fibrina (RFHcy) más ramificadas y compactas que las redes controles (RFC). **Diseño:** Las RF se obtuvieron a partir de plasmas normales, con trombina 0,05 U/ml y CaCl<sub>2</sub> 33 mM, en presencia de Hcy 0,5 mM o solución salina (Incubación 1 h, 37 °C). Se estudió la lisis de las redes de fibrina mediante dos diseños experimentales diferentes: 1. Estudios cinéticos de la lisis de RFHcy por acción de uroquinasa 50 UI, mediante el registro de la densidad óptica (DO) a 405 nm en función del tiempo. 2. Determinación de la actividad de plasmina (Pm) y activación de plasminógeno (Plg) en presencia de Hcy, por método amidolítico con sustrato cromogénico S-2251. **Resultados:** 1. Tiempo de lisis ½ (50 % de red lisada): RFHcy = 257 ± 36 min.; RF control = 187 ± 6 min.; n = 6; (p = 0,004). 2. Los parámetros cinéticos evaluados (fase lag, pendiente y DO máxima) de la actividad de Pm y de la activación de Plg no mostraron diferencias significativas respecto de los controles. **Conclusiones:** Las redes de fibrina en presencia de Hcy resultaron más difíciles de lisar. La Hcy no modificó la activación de Plg ni la actividad de plasmina. La lisabilidad disminuida de la fibrina estaría relacionada con las características físico-químicas de la red.

**ACORTAMIENTO TELOMÉRICO E INESTABILIDAD CROMOSÓMICA EN MIELOMA MÚLTIPLE (MM) Y GAMOPATÍAS MONOCLONALES DE SIGNIFICADO INCIERTO (MGUS).**

PL 2

Cottliar A<sup>1</sup>, Pedrazzini E<sup>1,4</sup>, Corrado C<sup>2</sup>, Engelberger M<sup>3</sup>, Narbaitz M<sup>3</sup>, Slavutsky I<sup>4</sup>.Deptos de Genética<sup>1</sup>, Oncohematología<sup>2</sup>, Patología<sup>3</sup>, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Fac. Cs. Exactas, UNLP<sup>4</sup>.

Los telómeros son factores esenciales para el mantenimiento de la integridad cromosómica; su acortamiento progresivo refleja una reducción de la capacidad replicativa de la célula. El objetivo de este trabajo fue evaluar la longitud telomérica y la presencia de asociaciones teloméricas (TAs) en células de médula ósea (MO) de pacientes con MM y MGUS. Se estudiaron 31 pacientes con MM: 12 al diagnóstico (D), 11 en recaída (R) y 8 en remisión (RE) y 2 casos con MGUS. La longitud telomérica se evaluó mediante el análisis molecular de los fragmentos de restricción terminal (TRF). Se utilizó ADN de sangre periférica como control normal. En MM se encontró una media de TRF de 5,20±0,35Kb significativamente más corta que la observada en controles (8,50±0,50Kb) (p<0,001). Los valores de TRF al D y en R fueron significativamente más cortos que en RE (p<0,001), momento en que los TRFs fueron similares a los normales. Se observó una correlación positiva entre los valores de TRF y el porcentaje de células plasmáticas en MO (rK = -0,540; p=0,002). Los pacientes con anomalías cromosómicas clonales tuvieron TRFs más cortos (4,01±0,60) que aquellos con cariotipos normales (p<0,05). Los casos con MGUS no difirieron respecto de los controles. Se observó un incremento en el porcentaje de TAs en MM (19,46±1,98) y en MGUS (6,12±1,87) respecto de MO normal (2,00±0,93) (p<0,001). La menor longitud telomérica, el aumento de TAs y la presencia de TRFs más cortos en cariotipos anormales, observado en los pacientes con MM, sustentarían la relación entre acortamiento telomérico e inestabilidad cromosómica, y sugerirían la participación de este mecanismo en el desarrollo y progresión de esta patología.

**RESPUESTA A DDAVP EN NIÑOS CON ENFERMEDAD DE VON WILLEBRAND (VWD) TIPO 1**

PL 3

Bonduel M., Frontróth JP, Hepner M., Sciuccati G., Pieroni G., Feliú Torres A.

Servicio de Hematología/Oncología. Hospital de Pediatría "Prof. Dr. JP Garrahan", Buenos Aires.

DDAVP (1-deamino-8-D-arginina vasopresina) es el tratamiento de elección en pacientes (ptes) con manifestaciones de sangrado y VWD. Se dispone de escasa información en niños. El objetivo fue reportar la respuesta a DDAVP en una serie pediátrica con VWD tipo 1. Setenta pacientes (31M/39F; mediana de edad: 10.9 años, rango:4.3-18.1) diagnosticados con VWD tipo 1 según el criterio del SSC de la ISTH, con una razón de VWF:RCo/VWF:Ag entre 0.8-1.1, fueron incluidos en este estudio desde mayo 1995 hasta mayo 2003. DDAVP (0.3µg/Kg en 50 ml de fisiológica) se infundió e.v. por 15 a 30 min. Las muestras se tomaron en tiempo basal y 30, 60, 120min y 6 hs del comienzo de la infusión. La distribución del número de ptes según su respuesta a DDAVP fue:

Parámetro	Respuesta			
	Buena	Transitoria	Parcial	Ausente
F VIII:C	68	4	—	—
VWF:Ag	67	3	—	—
VWF:RCo	60	10	—	—
T. Sangría	37	25	4	4

La mayoría de los pacientes tuvo la máxima respuesta entre los 30min y 60min. Efectos adversos: eritema facial: 69ptes; cefalea: 4ptes; hipotensión: 2ptes, 5/8 ptes con respuesta parcial o ausente del TS y procedimientos quirúrgicos, tuvieron sangrado posterior que requirió concentrados plaquetarios. Conclusión: Todos los ptes tuvieron respuesta buena o transitoria para FVIII:C, VWF:Ag y VWF:RCo. Evaluar la función plaquetaria se justificaría en los pts con respuesta parcial o ausente al T de sangría. No se observó complicaciones severas relacionadas al uso de DDAVP.

**EXPANSIÓN DE CELULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS (CPH) CD 34 + DE SANGRE PLACENTARIA EN CULTIVOS AUTOLOGOS DE CELULAS ENDOTELIALES DE VENA UMBILICAL (HUVEC).**

PL 4

Etcheberry O, Morales V, Bordone J, Milone J.

ITMO. Instituto de Trasplante de Médula Osea. La Plata.

La ejecución de trasplantes de CPH de la sangre placentaria está limitada por la relación: n° de células colectadas/peso del paciente. Para buscar una solución a este problema se ha planteado la expansión de las células progenitoras.

El objetivo del presente trabajo ha sido analizar la expansión de CPH - CD 34 +, sobre cultivos de células HUVEC.

Luego de colectada la sangre contenida en la vena umbilical y la placenta, se efectuó la separación de las células mononucleadas y la posterior selección de las células CD 34+ mediante método inmunomagnético indirecto (Midi-MACS-Miltenyi). Se efectuó el tratamiento enzimático de la vena umbilical autóloga para obtener cultivos de células HUVEC. Se procesaron 4 muestras.

Las células CD 34 + se cultivaron en medio StemSpam, (StemCells, Inc.) sobre las células HUVEC, a 37°C, con 5 % de CO<sub>2</sub> y 100 % de humedad. Se compararon cultivos efectuados con y sin citoquinas (SCF, FIT3L, Tpo), 100 ng/ml.

El medio fue renovado cada 2 días y se evaluó el grado de expansión celular mediante el recuento de células nucleadas totales (CNT), de células CD 34 por citometría de flujo y de unidades formadoras de colonias (UFC), mixtas (GEMM), granulocito-macrocítica (GM) y eritroide (BFU-E) a los 5, 8 y 14 días; las células iniciadoras de cultivos a largo plazo (LTC-IC) fueron cuantificadas a los 35 días con técnica de dilución límite. Se observó un incremento final de CNT, de células CD 34 +, y de LTC-IC del 23/23/24 %, que aumentó al 61 %, 30 % y 47 % respectivamente en los cultivos con citoquinas.

El cultivo de células CD 34+ de cordón umbilical sobre un estroma de células HUVEC autólogo es apto para generar una expansión de las CPH primitivas, que permita su utilización en el alotrasplante de paciente de mayor peso.

**LEUCEMIAS AGUDAS (LA) PEDIÁTRICAS DE INMUNOFENOTIPO INUSUAL**
**PL 5**

Rossi J, Felice M, Bernasconi A, Gallego M, Scheifer J, Somardizic A, Alfaro E.

*Servicios de Inmunología, Hemato/Oncología y Genética del Hospital de Pediatría Prof J P Garrahan. Buenos Aires*

Las LA son definidas por la expresión de marcadores de superficie/citoplasmáticos asociados a linaje mielóide (My) o linfóide T ó B. De un total de 1269 pacientes tipificados, utilizando un panel adecuado de anticuerpos y aplicando el sistema de score propuesto por el EGIL en 718 casos, hemos determinado 31 casos con fenotipo inusual: 22 LA bifenotípicas (9 B/My, 6 T/My, 7 T/B); 3 Trifenotípicas (T/B/My) y 6 sin marcadores específicos, de las cuales 3 fueron caracterizadas como LA de células dendríticas (LACD) y 3 como LA indiferenciadas. Las 3 LACD recibieron tratamiento para LLA, alcanzando remisión completa (RC). De las 28 restantes, (3 fueron LA secundarias), 11 pacientes recibieron tratamiento de LMA y 17 de LLA: 3 pacientes tuvieron respuesta nula, 2 fallecieron en inducción y 23 alcanzaron RC. De estos, 14 recayeron, 1 murió en RC y sólo 8 siguen en RC. Se detectaron alteraciones del cromosoma 7 (3 casos) y del 11q23 (3 casos). El CD34 fue positivo en 100% de las indiferenciadas y en 90% de las bi/trifenotípicas, (pero ausente en las LACD), por lo que la transformación ocurriría en precursores tempranos. Seis pacientes presentaron cariotipos desfavorables que involucran genes vinculados con la determinación del linaje celular. Destacamos la necesidad de utilizar un panel mínimo indispensable que incluya marcadores específicos T, B y My, a fin de identificar estos casos, en general de mal pronóstico, que probablemente requieran tratamiento diferenciado. Frente a la ausencia de marcadores específicos T, B o My, es trascendente evaluar expresión de antígenos del linaje de células dendríticas.

**INDUCCIÓN DE FENOTIPO PRESENTADOR DE ANTÍGENOS Y APOPTOSIS EN CÉLULAS DE LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA B (LLC-B) INCUBADAS CON OLIGODEOXINUCLEÓTIDOS SINTÉTICOS (ODNS) PYNTTTTGT (IMT504).**
**PL 6**

Dupont J, Fló J, Zorzópulos J, Solimano J, López R, Garay G, Riveros D, Montaner A, Rodríguez J, Fernández J, Elías F, Cacchione R.

*CEMIC, IMMUNOTECH.*

**Introducción:** El sistema inmune no es capaz de reconocer los cambios en células transformadas por mutaciones en la LLC-B. Su incubación con linfocitos autólogos no induce citotoxicidad. Puede deberse a la ausencia de linfocitos T citotóxicos o a la incapacidad de las células de LLC en expresar moléculas coestimuladoras (CD80, CD86), a pesar de tener expresión de HLA clase I y II. El ADN bacteriano y los ODNs que contienen motivos PyNTTTTGT, CpG y otros motivos, pueden activar a los monocitos, las células dendríticas y los linfocitos B. Aparte, algunos ODNs tienen efectos directos sobre las células LLC-B. **Material y métodos:** se incubaron células leucémicas provenientes de 10 pts. con LLC-B con 3 diferentes ODNs: a) IMT504, con motivos PyNTTTTGT b) 2006 con motivos CpG y c) ODN inactivo de control. Previa y posterior a la incubación se efectuaron determinaciones de CD80, CD86, CD40, MHC clase I y II, CD5, CD19 y CD20 por citometría de flujo. Además se determinó (por medio de la detección de fosfatidilserina por la unión a la Anexina V) la capacidad de inducir la apoptosis de las células transformadas, y se estudió la morfología de las células en cultivo. **Resultados:** Se observó el aumento de la expresión de CD80, CD86 y CD40 en las células incubadas con IMT504 y 2006. Además las células LLC-B unieron significativamente mayor cantidad de Anexina V. La morfología de las células en cultivo a largo plazo mostraron características de apoptosis. Los estudios efectuados con los ODN de control no mostraron ninguna de las características descritas. **Conclusión:** La incubación de ODN con motivos PyNTTTTGT (IMT504) y con motivos CpG (2006) induce en las células de LLC-B un fenotipo considerado de células presentadoras de antígenos, y además apoptosis. **Perspectiva:** En otros estudios preclínicos y clínicos los ODNs han demostrado muy baja toxicidad, lo que permitiría efectuar estudios de Fase III en LLC-B.