

GEN MDR1 Y RESISTENCIA AL IMATINIB EN CÉLULAS K562.	PL01
Lardo M ¹ ;Lazarowski A ¹ , Cuello MT ² ; Gargallo P ² ; Bianchini M ² , Larripa I ² ¹ Dpto. Bioq.Clinica, FFyB-UBA; ² IIHema. Acad. Nac. Medicina. Bs.As	
<p>El tratamiento de la Leucemia Mieloide Crónica (LMC) con IMATINIB (STI571) puede fracasar por mutaciones en el dominio tirosina quinasa del gen BCR-ABL. Otros mecanismos de refractariedad pueden deberse a los genes de resistencia múltiple a drogas (MDR). Objetivo: Investigar en la línea celular K562 (derivada de LMC) resistente al STI571, la expresión del gen MDR1 y los efectos de etidio por inhibición con ciclosporina (Cy). Métodos: Las células fueron cultivadas en medio RPMI-1640 con 10% de suero fetal bovino. El RNA total aislado se retro-transcribió a c-DNA, el cual fue utilizado para la amplificación de los genes BCR-ABL y MDR1 con primers es-pecíficos. El gen G6PDH se utilizó como control de cali-dad del RNA. Los cultivos celulares fueron enfrentados por 24hs con STI571 (2uM), Cy (3,0ug/ml), STI571+Cy y cultivos controles. La apoptosis fue evaluada con coloración de naranja de acridina/bromuro de etidio por microscopía de fluorescencia. Resultados: Los productos de las PCRs indicaron alta expresión de BCR/ABL y MDR1 en la línea K-562 Las células tratadas con STI571+Cy duplicaron los porcentajes de células apoptóticas res-pecto de los cultivos tratados solo con STI571 o Cy. Conclusión: La presencia del gen MDR1 en las células K562 jugaría un rol adicional en la resistencia al trata-miento con STI571, por lo tanto la administración de Cy permitiría facilitar la acción del STI571, induciendo mayor % de apoptosis de las células Ph+. Estos estudios son de importancia pues permitirían vencer la refractariedad, optimizando los tratamientos en casos con amplificación génica y expresión del gen MDR1.</p>	

NIVELES SÉRICOS DEL FACTOR DE CRECIMIENTO SEMEJANTE A LA INSULINA TIPO I (IGF-I) COMO POSIBLE MARCADOR DE LA EVOLUCIÓN DE PACIENTES CON LEUCEMIA LINFÁTICA CRÓNICA (LLC).	PL02
Schillaci, R; Becu-Villalobos D; Galeano, A; Sapia S; Bezares RF <i>Instituto de Biología y Medicina Experimental, CONICET y Policlínico Bancario, Buenos Aires.</i>	
<p>El curso clínico de los pacientes (P) con LLC es muy variable: algunos se mantienen estables por largo tiempo sin terapia mientras que otros progresan rápidamente y mueren a los pocos años del diagnóstico reflejando la heterogeneidad de la enfermedad. Nosotros hemos demostrado que los P con LLC tienen niveles elevados de IGF-I circulante y que este factor puede actuar de forma autocrina/paracrina en la supervivencia de las células leucémicas (Br.J. Haematol. 2005;130:58). El objetivo del presente trabajo fue determinar el posible valor predictivo del IGF-I sérico sobre el curso de la LLC. Para ello determinamos los niveles de IGF-I en suero de 26 P con LLC y 17 controles por RIA. Los P fueron clasificados en estables (16 P) y progresivos (10 P) siendo los niveles de IGF-I de 294 ± 25 y 229 ± 92 ng/ml respectivamente. El valor de los controles fue de 170 ± 12 ng/ml. En un seguimiento de 4 años 8 P fallecieron: 4 progresivos y 4 estables. Dentro de los estables se observó claramente dos grupos: uno con niveles elevados de IGF-I (382 ± 27 ng/ml; n=9) y otro con niveles normales (208 ± 13 ng/ml; n=7, p<0.0001). En el grupo con IGF-I elevado se encuentran los 4 P fallecidos, 2 bajo tratamiento y 3 sin tratamiento, mientras que en el grupo con IGF-I normal ningún paciente requirió tratamiento alguno y los P mantienen su condición de estables. Cabe aclarar que la determinación de IGF-I se realizó en los pacientes estables sin tratamiento o en 3 de ellos con un intervalo de 24.3 ± 5.2 meses (rango 14-30 meses) al tratamiento. Estos resultados sugieren que el IGF-I sérico podría ser utilizado como marcador pronóstico en P con LLC diagnosticados como estables.</p>	

MUTACIÓN JAK2V617F EN PLAQUETAS DE PACIENTES CON TROMBOCITEMIA ESENCIAL.	PL03
Lev P, Heller P, Salim J, Kornblith L, Goette N, Chazarreta D, Glembotsky A, Vassallu P, Marta R, Molinas F. <i>Hematología Investigación, IDIM A. Lanari, FM, UBA, Bs As.</i>	
<p>Recientemente, se reportó la mutación en el gen <i>JAK2</i> (<i>JAKV617F</i>) en síndromes mieloproliferativos, 65-97% en Policitemia Vera (PV), 23-57% Trombocitemia Esencial (TE), 35-57% en Mielofibrosis con Metaplasia Mieloide (MMM). Esta mutación induce la activación constitutiva del <i>JAK2</i>, tirosina kinasa asociada a receptores de citoquinas, confiriendo una ventaja proliferativa. Se postula que esta alteración tiene relevancia patogénica. Con el objeto de evaluar si la frecuencia de esta mutación en TE es diferente en plaquetas que lo reportado en granulocitos, dado que la serie megacariocítica es la predominantemente involucrada, estudiamos plaquetas de 38 pacientes con TE, 3 con MMM y 2 con PV, diagnosticados según PVSG; 10 hombres, edad media 39.5, 32 fueron estudiados al diagnóstico, 11 durante el tratamiento con anagrelide o hidroxiurea. Mediante RT-PCR, se amplificó el gen <i>JAK2</i> y se digirió con la enzima de restricción <i>BsaXI</i>, cuyo sitio de reconocimiento es eliminado por la mutación. Se efectuó también PCR alelo específica con primer interno complementario al alelo mutado. En el 50% (19/38) de los pacientes con TE y en los 2 con PV se detectó la mutación por ambas técnicas, 2 son homocigotas. Los resultados no se modificaron durante el tratamiento (n=11). Dos de los pacientes positivos evolucionaron a PV. El nivel de hemoglobina y la frecuencia de fenómenos trombóticos y/o de obstrucción de microcirculación fue mayor en el grupo con la mutación respecto al no mutado (p=0.005 y p=0.003, respectivamente). Demostramos por primera vez la presencia de la mutación en RNA de plaquetas en TE. La frecuencia de este hallazgo en plaquetas no resultó superior a lo reportado previamente en granulocitos con técnicas comprobables.</p>	

PREVALENCIA DE ANTICUERPOS NEUTRALIZANTES Y NO NEUTRALIZANTES EN PERSONAS CON HEMOFILIA EN ARGENTINA.	PL04
Primiani L*, Nakatsuno M**, Candela, M*, Grupo Argentino de Estudio de Inhibidores (GADEI) <i>*Fundación de la Hemofilia. Buenos Aires. ** Novo Nordisk Pharma Argentina</i>	
<p>Introducción: El desarrollo de Inhibidores (Inh) es una de las complicaciones del tratamiento de personas con hemofilia A (HA) y hemofilia B (HB). Los Inh o anticuerpos neutralizantes (Ac Ntr) neutralizan la función coagulante del FVIII/IX. Se conoce la existencia de Ac anti FVIII no neutralizantes (Ac no Ntr) con posible influencia en la vida media del FVIII transfundido. Objetivos: Determinar la prevalencia de Ac Ntr y no Ntr en la población con hemofilia en Argentina. Material y métodos: La detección de Ac anti FVIII se realizó por método de ELISA (GTI Factor VIII inhibitor assay). Los métodos Bethesda y modificación de Nijmegen se emplearon para la cuantificación de Ac Ntr en aquellas muestras de HA ELISA (+) y en todas las muestras de HB. Se estudiaron 593 muestras: HA 510 (sev 397, mod 84, leve 29), HB 83 (sev 51, mod 28, leve 4). Resultados: 105/510 muestras de HA presentaron un test de ELISA (+). 84/105 presentaron título de Ac Ntr por método Bethesda entre 0.6 y 8200 UB/ml. 21/105 presentaron Ac no Ntr. 5/21 tenían antecedentes personales o familiares de Ac Ntr o presentaron respuesta inadecuada post administración de concentrados. 2/83 muestras de HB presentaron Ac Ntr de FIX. Conclusiones: La prevalencia de Inh ó Ac Ntr en la población estudiada es de 16.5 % en HA y 2.4 % en HB, datos similares a los reportados en la literatura mundial. Se demostró la presencia de Ac anti FVIII no Ntr en el 4.1 % de los pacientes con HA, los cuales se evaluarán con mayor frecuencia dado el alto riesgo de desarrollar Ac Ntr en el futuro.</p>	

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR EN LLA PEDIÁTRICA EN UNA INSTITUCIÓN HOSPITALARIA.

PL05

Alonso C, Denninghoff V, Gallego M, Alfaro E, Rossi J, Felice M. Hospital Nacional de Pediatría «J.P. Garrahan», Buenos Aires. Beca Carrillo-Oñativia 2004. CONAPRIS. Ministerio de Salud de la Nación

Si bien los rearrreglos moleculares y alteraciones citogenéticas se encuentran entre los factores pronósticos de mayor relevancia en LLA pediátrica, en Argentina el acceso a estas determinaciones a nivel hospitalario se encuentra limitado. Las alteraciones genéticas más frecuentes en esta patología son TEL-AML1 (25-30%), E2A-PBX1 (5-8%), BCR-ABL (5-8%) y MLL-AF4 (3-5%). La detección de estos rearrreglos por RT-PCR presenta una muy alta sensibilidad siendo especialmente importante en el caso de TEL-AML1 y en las translocaciones crípticas sólo detectables por técnicas moleculares (PCR ó FISH). Entre Dic-02 y Mar-05 ingresaron en el Hospital de Pediatría Garrahan 119 pacientes (M: 62/F:57) con LLA menores de 15 años. La distribución de fenotipos fue: 63 B-Común, 37 Pre-B, 11 T, 4 Bifenotípicas, 4 Early-B. El estudio citogenético convencional (CC) se realizó en 88 pacientes. La búsqueda por RT-PCR de los 4 rearrreglos mencionados se realizó en 93 pacientes (78%). El ARN de células mononucleares al momento del diagnóstico fue retrotranscripto a ADNc utilizando hexámeros al azar, y luego se realizaron las PCR correspondientes a dichos rearrreglos utilizando *primers* descriptos en el protocolo BIOMED-1. Los resultados fueron los siguientes: TEL-AML1: 8 (8,6%); E2A-PBX1: 3 (3,2%); MLL-AF4: 7 (7,5%); BCR-ABL: 2 (2,2%); negativo para los 4 rearrreglos: 73 (78,5%). El estudio molecular confirmó la caracterización del CC en 5 casos y la amplió en 13 casos más: 8 TEL-AML1, 1 E2A-PBX1, 3 MLL-AF4 y 1 BCR-ABL. El diagnóstico molecular de LLA aumenta la sensibilidad de detección de anomalías y contribuye a una mejor caracterización de las leucemias. Su incorporación y estandarización a nivel público es fundamental para optimizar la estratificación del paciente de acuerdo a su grupo de riesgo con la consiguiente adecuación del tratamiento.

INESTABILIDAD GENÓMICA DE CÉLULAS DE MÉDULA ÓSEA EN MIELOMA MÚLTIPLE.

PL06

Pedrazzini E¹, Cottliar A¹, Corrado C¹, del Rey J², Miro R², Slavutsky I¹. Academia Nacional de Medicina¹, Buenos Aires; Fac. Medicina², Univ. Autónoma de Barcelona.

La asincronía de replicación (AR) implica la pérdida temporal del control de la replicación, pudiendo determinar el silenciamiento de genes supresores de tumor. En este estudio se evaluó por FISH el patrón de replicación del gen RB1 en células interfásicas de médula ósea de pacientes con mieloma múltiple (MM) y gamapatías monoclonales de significado incierto (MGUS). Se efectuó análisis citogenético e hibridación genómica comparada (CGH). Se estudiaron 29 pacientes con MM (12 varones; edad media 58 años), 16 con alteraciones genómicas (AG) y 13 sin anomalías (SA), 3 MGUS y 5 controles (C). Las AG fueron: monosomía 13q14 (9 casos) y alteraciones cromosómicas: del(6q), t(2;3), cariotipo complejo, +7, +10, +12, o desbalances genómicos (CGH): ganancias 1q, 7q y pérdidas 13q, Xp (7 casos). El análisis de AR permite detectar células SD con un alelo replicado y el otro no. Los pacientes con MM portadores de AG mostraron un porcentaje significativamente mayor de células SD (24.7±1.1) a los hallados en aquellos SA (14.7±1.1) ($p < 4 \times 10^{-5}$), MGUS (15.3±0.4) y C (12.5±1.2) ($p < 3 \times 10^{-5}$); resaltándose la diferencia entre los casos de MM con y sin alteraciones. Nuestros resultados sugieren que la AR del gen RB1 sería un marcador sensible para evaluar inestabilidad genómica en ausencia de células en división, que podría ser de importancia clínica en pacientes con MM.

TROMBOPOYETINA Y SU RECEPTOR C-MPL EN TROMBOCITOPENIAS HEREDITARIAS Y ADQUIRIDAS.

PL07

Heller P, Glembotsky A, Marta R, Molinas F. Hematología Investigación, IDIM A. Lanari, FM, UBA, Bs As.

Las Trombocitopenias Hereditarias (TH) son entidades heterogéneas caracterizadas por defectos en la producción de plaquetas, cuya patogenia no ha sido completamente dilucidada. Para investigar si la alteración en la vía de la Trombopoyetina (TPO) y su receptor c-mpl intervienen en la patogenia de las TH, evaluamos los niveles de TPO y la expresión de c-mpl en esta entidad. Se estudiaron 16 pacientes de 7 familias, 3 trombocitopenia ligada al X; 2 desorden MYH9; 4 desorden plaquetario familiar con predisposición a LMA; 5 macrotrombocitopenia autonómica dominante (AD); 2 trombocitopenia AD. Se estudiaron además 9 pacientes con PTI. Los niveles plasmáticos de TPO por ELISA fueron significativamente superiores en TH y PTI respecto a los controles, 99.2 (0-332.6) pg/ml en TH, 67.7 (15-263.8) pg/ml en PTI y 3.2 (0-32.1) pg/ml en controles, $p < 0.0001$. Por citometría de flujo con anticuerpo anti c-mpl, la expresión de c-mpl en la superficie de plaquetas fue menor en TH, 1.36 ± 0.34 vs controles, 1.70 ± 0.27 , $p = 0.01$. El contenido plaquetario total de c-mpl por Western Blot fue inferior a 60% en 10/15 pacientes con TH, siendo menor a 30% en 5 de ellos, mientras que se hallaron valores normales a aumentados en PTI. Estos valores fueron menores en TH que en PTI, 56.3 ± 38 vs $137.4 \pm 49\%$, $p = 0.0002$. No hubo correlación significativa entre la expresión de c-mpl y los niveles de TPO ni el recuento de plaquetas. Si bien la expresión de c-mpl fue menor en TH, hubo heterogeneidad entre las distintas familias. En algunos casos la disminución del c-mpl hallada podría contribuir a la patogenia de las TH. El defecto en el c-mpl observado en TH diferentes a la Trombocitopenia Amegacariocítica Congénita sugiere que este hallazgo no es específico de esta última entidad.