

1). Dos mutaciones eran recurrentes: *p.Arg445Serfs*17* (N=5) y *p.Pro439Thr* (N=2). Seis ocasionaban DAT tipo I (anti-Xa:45,4±11,7%) con clínica trombotica grave o muy grave; mientras que 3, todas *missense*, generaban DAT tipo II pleiotrópicas (anti-Xa:55,0±11,6%) con aumento de forma latente, uno DAT transitoria y clínica moderada y (*p.Pro439Thr*). En modelo recombinante, las variantes *frameshift+1* que afectaban a la zona Val432-Phe440 causaban deficiencias cualitativas, con leve alteración en la secreción (50-100%), formas no inhibitorias y aumento de los niveles de la AT latente; mientras que las localizadas tras Phe440 causaban deficiencias cuantitativas, con marcada disminución en la secreción (< 30%), y en algunos casos con formación de complejos unidos por puentes disulfuro y efecto dominante negativo (Figura 2). Mediante mutagénesis dirigida, el cambio *p.Leu441Pro* rescató la secreción de la variante *p.Arg445Lysfs*19*, sin evitar su transformación a latente (Figuras 2,3).

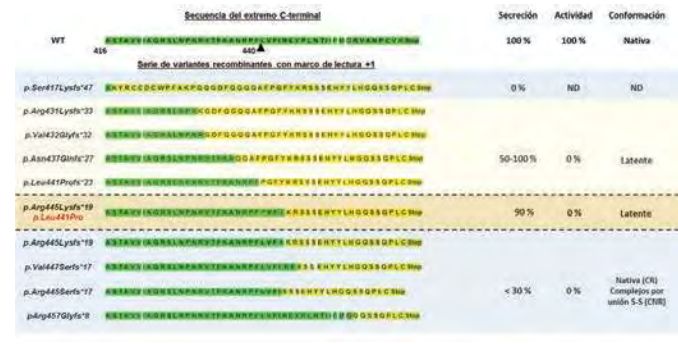


Figura 2. Representación gráfica del estudio en modelo recombinante de las 9 variantes C-terminales de antitrombina frameshift+1 generadas mediante mutagénesis dirigida (HEK-EBNA). Las variantes que afectaban a la zona Val432-Phe440 (triángulo negro) causaban deficiencia cualitativa, con leve alteración en la secreción (50-100%), formas no inhibitorias y aumento de los niveles de la antitrombina latente; mientras que las localizadas tras Phe440 causaban deficiencia cuantitativa, con marcada disminución en la secreción (< 30%), y en algunos casos con formación de complejos unidos por puentes disulfuro y efecto dominante negativo. Mediante mutagénesis dirigida, el cambio *p.Leu441Pro* (en rojo) rescató la secreción de la variante *p.Arg445Lysfs*19*, sin evitar su transformación a latente.

AT: antitrombina. DAT: deficiencia de antitrombina. ND: no determinado. CR: condiciones reductoras. CNR: condiciones no reductoras. S-S: puentes disulfuro. Secuencia verde: secuencia nativa. Secuencia amarilla: secuencia aberrante frameshift+1. Triángulo negro: Pro439_Phe440. Stop: codón de parada.

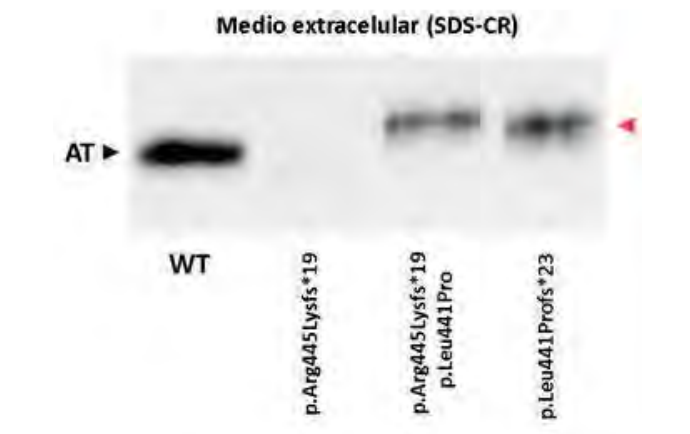


Figura 3. Análisis de la secreción de antitrombina recombinante (western-blot) de variantes C-terminales generados mediante mutagénesis dirigida (HEK-EBNA). Se objetiva que el cambio *p.Leu441Pro* rescató la secreción de la variante *p.Arg445Lysfs*19*, también con transformación a latente (flecha roja), indicando que la Pro441 parece ser clave para el plegamiento y secreción de las variantes frameshift+1.

AT: antitrombina. WT: antitrombina nativa. SDS-CR: condiciones reductoras.

Conclusiones: Las variantes de AT que afectan al extremo C-terminal,

relativamente frecuentes, generan una notable heterogeneidad biológica y clínica, que guarda a su vez una estrecha relación con su localización en la secuencia y estructura de la molécula. Variantes que generan un extremo C-terminal aberrante pueden provocar DAT tipo II pleiotrópicas (con paso a forma latente), cuando están localizadas entre los codones Val432-Phe440, y tipo I (polimerización intracelular), tras la Phe440. Estas variantes además tienen un potencial efecto dominante negativo. Sin embargo, si las variantes con *frameshift+1* se generan antes de Phe440, la prolina que aparece en posición 441 provoca una torsión estructural que permitiría el plegamiento a conformación latente, dando lugar a una variante no inhibitoria que puede ser secretada al plasma. En todos los casos, se objetiva la relevancia conformacional de la región C-terminal de la AT, aplicable posiblemente a otras serpinas.

SP-004

LA INFUSIÓN DE LINFOCITOS EFECTORES AUTÓLOGOS EN COMBINACIÓN CON RITUXIMAB DE MANTENIMIENTO ES SEGURA Y EFICAZ. RESULTADOS DEL ENSAYO CLÍNICO FASE II LFNK

Pena Carbó E¹, García Muñoz R², López Díez de Cerio A¹, Panizo A³, Feliu J², Giraldo P⁴, Rodríguez Calvillo M⁵, Grande C⁶, Olave T⁷, Andrade M⁸, Bandrés E⁹, Núñez J¹⁰, Martínez Calle N¹¹, Inogés S¹, Panizo C¹

¹Hematología, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España; ²Hospital San Pedro, Logroño, España; ³Anatomía Patológica, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, España; ⁴Hematología, Instituto Aragonés de Ciencias de la Salud CIBERER, Zaragoza, España; ⁵Hematología, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, España; ⁶Hematología, Hospital 12 de Octubre, Madrid, España; ⁷Hematología, Hospital Clínico Universitario Lozano Blesa, Zaragoza, España; ⁸Hematología, Hospital Miguel Servet, Zaragoza, España; ⁹Hematología, Complejo Hospitalario de Navarra, Pamplona, España; ¹⁰Servicio de apoyo a la investigación UCEC, Clínica Universidad de Navarra, Pamplona, España; ¹¹Hematology, Nottingham University Hospitals NHS Trust, Nottingham, United Kingdom

Introducción: La combinación de anticuerpos monoclonales anti CD20 con varios regimenes de quimioterapia se considera el tratamiento estándar en pacientes con linfoma folicular (LF). A pesar de los buenos resultados de este tratamiento, un porcentaje importante de los pacientes no se beneficia de esta terapia ensombreciendo de manera considerable su pronóstico. Nuestra hipótesis es que el tratamiento con una suspensión de linfocitos efectores autólogos expandidos ex vivo (células LAK) podría potenciar el efecto biológico del tratamiento con rituximab (R) mediante el incremento de la actividad ADCC. Investigamos la toxicidad y eficacia de dicho tratamiento con un ensayo clínico fase II.

Métodos: Entre 2010 y 2012 se reclutaron 20 pacientes con LF en respuesta tras una primera línea de tratamiento con R-CHOP. El objetivo primario de este ensayo, multicéntrico, prospectivo y de un solo brazo fue evaluar la seguridad y eficacia de la infusión de células LAK (administradas cuatrimestralmente en los ciclos pares de R) en combinación con la pauta estándar de R de mantenimiento bimestral durante 2 años. La producción de células LAK se realizó a partir de células de sangre periférica extraídas en los ciclos impares de R para aislar células mononucleadas y estimularlas y expandirlas en cultivo con interleukina-2 durante 8 semanas. Uno de los objetivos secundarios del ensayo fue la evaluación de los fenotipos celulares y de la potencia biológica de las células LAK midiendo su actividad citotóxica. Este ensayo está registrado en ClinicalTrials.gov con número NCT01329354

Resultados: Se registraron 29 eventos adversos (EA) relacionados con la infusión de las células LAK. Las artralgias y las infecciones fueron los EA más frecuentes con un 24.1% y un 20.6%, respectivamente (Tabla 1). La mayoría de los EA (89.6%) fueron grado 1 y 2. No se produjo ningún EA grave relacionado con la infusión de las células LAK y ningún paciente fue discontinuado. Se registraron 3 EA grado 3 que sucedieron en el mismo paciente. La calidad de vida, evaluada a través de cuestionarios EORTC QLQ-C30, tendió a mejorar a lo largo del estudio. Con una mediana de seguimiento de 59.4 (43.8-71) meses, la supervivencia libre de progresión (SLP) fue del 85% (Figura 1). El estudio biológico del producto celular administrado demostró un aumento significativo de la actividad ADCC en todos los ciclos (Figura 2).

Conclusiones: La infusión de células LAK, en combinación con R de mantenimiento, en pacientes con LF es segura y eficaz en términos de mejoría de la SLP respecto a lo publicado en la literatura. El efecto bio-

lógico se consigue a través del incremento de la actividad ADCC de las células infundidas.

AA	N (%)	
Todos	219 (100)	
Grado 0	141 (64.4)	
Grado 1	46 (21.0)	
Grado 2	25 (11.4)	
Grado 3	5 (2.3)	
desconocido	2 (0.9)	
AA relacionado, n (%)	Todos	Grade ≥ 3
Todos	29 (100)	3 (100)
Diarrea	4 (13.8)	0 (0)
Neutropenia	3 (10.3)	3 (100)
Infección	6 (20.6)	0 (0)
Artralgia	7 (24.1)	0 (0)
Astenia	4 (13.8)	0 (0)
Eritema	1 (3.4)	0 (0)
Ansiedad/Depresión	1 (3.4)	0 (0)
Fiebre	1 (3.4)	0 (0)
Parestesias	1 (3.4)	0 (0)
Anorexia	1 (3.4)	0 (0)
AAG, n (%)	8 (3.7)	
Relacionado, n (%)	Sí	No
Todos	0 (0)	8 (100)
Urosepsis	0 (0)	2 (25.0)
Prostatitis	0 (0)	3 (37.5)
Esterilización femenina	0 (0)	1 (12.5)
IAM	0 (0)	1 (12.5)
Prostatectomía	0 (0)	1 (12.5)

Tabla 1. Eventos adversos (EA) y eventos adversos graves (EAG)

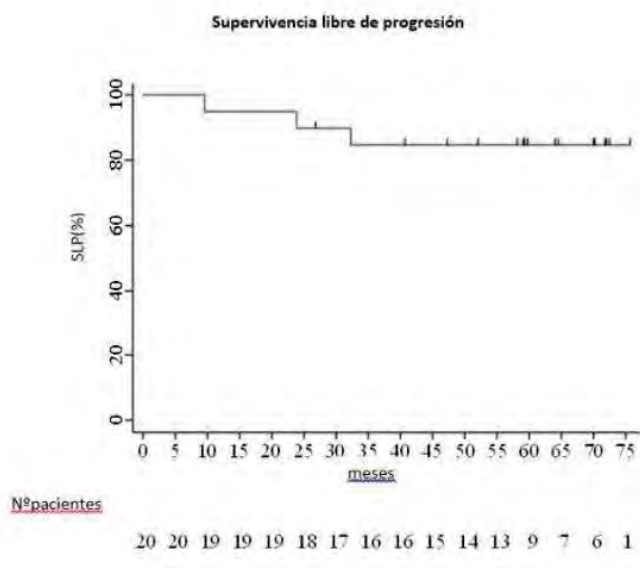


Figura 1.

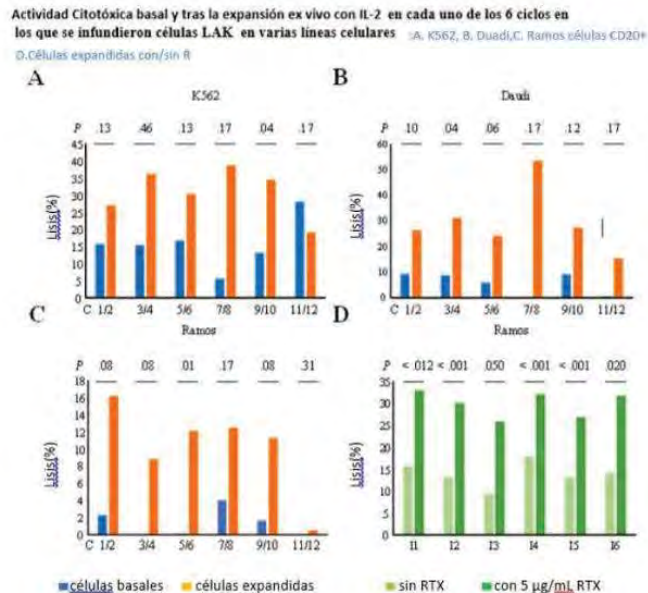


Figura 2.

SP-005

REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN PLAQUETARIA POR MIR-146A COMO NEXO ENTRE INMUNIDAD Y TROMBOSIS

Arroyo Rodríguez AB¹, Águila S¹, Fernández-Pérez MP¹, De los Reyes-García AM², García-Barberá N¹, García-Hernández R¹, Rivera J³, Hernández-Antolín R², Vicente V³, González Conejero R¹, Martínez C¹
¹Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arixaca, Murcia; ²Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arixaca, Murcia.; ³Servicio de Hematología y Oncología Médica, Hospital Universitario Morales Meseguer, Centro Regional de Hemodonación, Universidad de Murcia, IMIB-Arixaca, Murcia. CIBER Enfermedades raras (CIBERER)

Introducción: Las plaquetas, más allá de su papel crítico en la hemostasia primaria, se consideran elementos inmunomoduladores cruciales al vincular procesos inflamatorios y trombóticos. NF-kB es un mediador central de inflamación involucrado en los mecanismos moleculares que conectan inflamación y trombosis. Las vías de señalización de NF-kB participan en la activación plaquetaria inducida por receptores clásicos, como PAR4 y en otros circuitos de retroalimentación secundaria. MiR-146a, que se expresa principalmente en células hematopoyéticas, actúa como un importante freno de reacciones inflamatorias e inmunológicas, bloqueando la vía NF-kB. Nuestro grupo ha identificado previamente que miR-146a se asocia con enfermedad trombo-inflamatoria (sepsis y aterosclerosis) regulando la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NET).

Objetivo: Evaluar el papel de miR-146a en la funcionalidad plaquetaria y su implicación en trombosis.

Material Y Métodos: El estudio se realizó en ratones silvestres (WT) y miR-146a^{-/-} (KO) en los que se evaluó: 1) Sangrado de cola (n=12/grupo); 2) Unión de fibrinógeno (Fg) y expresión de selectina P (SelP) mediante citometría de flujo en sangre total diluida, obtenida del seno retroorbital, que se activó con distintas dosis de agonistas plaquetarios (PAR4, CRP, ADP+U46619 y PMA) (n=7/grupo); 3) Inducción de tromboembolismo pulmonar (TEP) por inyección retroorbital (60µg/kg epinefrina + 0,4mg/kg colágeno) y monitorización del tiempo hasta la muerte (<30min) (n= 27 WT y 30 KO). La obstrucción del pulmón se evaluó inyectando 500µl de azul de Evans 1% en el ventrículo derecho. 4) Inducción de trombosis arterial (TA) con FeCl₃ y monitorización del tiempo de oclusión del flujo sanguíneo carotideo (n= 17 WT y 24 KO). Se cuantificó la formación de NET (DNA e histona 3 citrulinada (H3cit)) en los trombos arteriales por inmunofluorescencia (IF) (n=10/grupo).

Resultados: Los ratones KO presentaron un tiempo y volumen de san-