

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Universidad de Buenos Aires
Departamento de Ciencias Biológicas*



*“Análisis Molecular de Regiones teloméricas en Neoplasias
Linfoideas”*

*Tesis presentada para optar al título de Doctora de la
Universidad de Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas*

Lic. Alejandra Silvina Haydeé Cottliar

Directora: Dra Irma R. Slavutsky

Departamento de Genética

Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R. Castex”

Academia Nacional de Medicina

Buenos Aires, 2005.

“Análisis Molecular de Regiones teloméricas en Neoplasias Linfoides”

Los telómeros son estructuras esenciales para el mantenimiento de la integridad cromosómica y la capacidad replicativa de la célula. La reducción de la longitud telomérica está asociada con cambios genómicos relacionados al proceso tumoral. En este trabajo se efectuó la caracterización molecular de la longitud telomérica mediante el estudio de los fragmentos de restricción terminal (TRFs), en Mieloma Múltiple (MM), Linfoma no-Hodgkin (LNH) y Enfermedad Celíaca (EC), patología con predisposición al desarrollo de linfomas malignos. En MM se observó una disminución de la longitud telomérica respecto de controles, detectándose una correlación negativa con el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea y asociación con cariotipos anormales, postulándose a los TRFs como marcadores tumorales. En LNH se observó acortamiento telomérico en linfomas foliculares y B difusos a células grandes, indicando su participación en la progresión tumoral y sustentando diferentes mecanismos patogénicos para estas patologías. En EC se apreció una disminución de la longitud telomérica tejido-específica en biopsias intestinales, sugiriendo un rol relevante de este parámetro en la predisposición al desarrollo neoplásico de esta entidad. Los hallazgos de este estudio sustentan la asociación entre acortamiento telomérico e incremento de la inestabilidad cromosómica, factores que combinados con la desregulación de la proliferación celular podrían promover el desarrollo y la progresión neoplásica.

Palabras claves: Telómeros, longitud telomérica, asociaciones teloméricas, mieloma múltiple, enfermedad celíaca, linfoma folicular, linfoma B difuso a células grandes

“Molecular analysis of telomeric regions in lymphoid malignancies”

Telomeres are essential structures critical for maintaining chromosomal integrity and stability and cell surveillance. Telomere shortening is associated to genomic changes related to carcinogenesis. In this work we studied telomere length by analyzing terminal restriction fragments (TRF) in multiple myeloma (MM), non-Hodgkin lymphoma (NHL) and celiac disease (CD), pathology prone to lymphoma development. In MM, we observed telomere reduction respect to controls. A strong correlation of telomere length values with bone marrow plasma cell infiltration and an association with abnormal karyotypes were found, suggesting TRFs as tumor markers. In NHL, telomere shortening was observed in follicular and diffuse large B-cell lymphoma, indicating the participation of telomere shortening in tumor progression and supporting the existence of diverse pathogenic mechanisms involved in the origin of these different lymphoma subtypes. In CD, TRF analysis showed a tissue-specific significant telomere shortening in small intestinal biopsies, determining an important role of telomere length in cancer predisposition observed in this disorder. Our findings support the association between telomere shortening and an increased chromosome instability, both factors combined with cell proliferation disregulation would promote the cancer development and neoplastic progression.

Key words: telomeres; telomere shortening, telomeric association; multiple myeloma; follicular lymphoma; diffuse large B cell lymphoma; celiac disease

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer mediante estas líneas a todos los que de alguna manera contribuyeron a que este trabajo se haga realidad, ya sea por brindarme un apoyo directo para la investigación, como a nivel humano. Por eso MUCHAS GRACIAS:

Al Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex" de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires, por brindarme los recursos y equipos necesarios para lograr la realización de este trabajo.

A las Autoridades de la Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires por todo lo recibido y permitir la realización del trabajo en ese lugar.

A la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires por todo lo recibido durante los años de carrera y Cursos de Postgrado, por las enseñanzas, tanto en lo informativo como en lo formativo que me brindó.

Al Dr Alberto Kornblihtt, mi consejero de estudios, quien siempre con óptima predisposición ayudó a asesorarme en los cursos y presentaciones, además de ser un excelente profesor que hizo desde el principio (en el año 1992) gustar la Biología Molecular a todos los alumnos que se asomaban a la Carrera de Biología.

A la Sra Ana Andrea Bondia quien muy cordialmente resuelve todos los problemas administrativos que se le presentan a los alumnos, además de reconocer a cada uno por su nombre y apellido y estar siempre con una sonrisa.

Al Dr Emilio Roldán, al Laboratorio Gador y a la Fundación Gador; asimismo, al Dr Eduardo Gurfinkel quienes ayudaron enormemente a que este trabajo pueda culminarse.

A las Dras Claudia Corrado y María Inés Engelberger del Departamento de Oncohematología de la Academia Nacional de Medicina quienes efectuaron los diagnósticos y seguimientos de los pacientes con MM y LNH.

A la Dra Marina Narbaitz del Departamento de Patología de la Academia Nacional de Medicina quien, junto a su equipo efectuó los diagnósticos histopatológicos de los pacientes oncohematológicos y además, me acompañó en la concreción de trabajos de investigación en conjunto, siempre con palabras de aliento, buena voluntad y una sonrisa.

A los Gastroenterólogos Juan Carlos Gómez, Adriana Crivelli y Martín Viola del Hospital de Agudos Gral San Martín de La Plata y a la Bioq Marta Palumbo del Hospital Sor María Ludovica de La Plata, quienes realizaron los diagnósticos de los pacientes celíacos, sin su colaboración y muestras dispensadas, buena disposición y ayuda no hubiera sido posible la realización del capítulo de Enfermedad Celíaca.

A la Dra. Irma Rosa Slavutsky quien siempre me acompañó, brindándome su consejo, experiencia y estímulo constantemente en el trabajo, así como su comprensión y apoyo.

A la Dra. Irene Larripa por sus valiosos consejos, por generar discusiones enriquecedoras y por su paciencia.

Al Dr Carlos De Brasi quien con mucha dedicación y paciencia me ayudó en mis primeros pasos en la Biología Molecular y por su aliento e interés constantes en el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Isabel Giere quien con mucha paciencia allá por el año 1996 me enseñara los primeros pasos en el arduo aprendizaje de la Citogenética.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética, Susana Acevedo, Marcela González Cid, María Teresa Cuello, Ariela Fundia, Roxana Cerretini, Liliana Rossetti, Patricia Gargallo, Pamela Radic, Lorena Vázquez, Estela Pedrazzini, Liliana Guingold, Ana Burgos, Silvia Barresi, Carolina Belli, Ma Fernanda Noriega, Marcelo de Campos Nebel, Christian Chena, Luciano Vellón y Jorge Austin con quienes compartí casi todo el tiempo de estos años y a pesar de ser muchos, con paciencia, comprensión, ayuda mutua y siempre con una sonrisa, se puede lograr un ámbito donde es agradable trabajar.

A mis Amigos, por lo recibido y por todos los momentos compartidos, por acompañarme, por el estímulo y los buenos consejos recibidos y fundamentalmente por estar siempre.

A mi Familia, por todo el apoyo y aliento, por los lindos momentos compartidos y el cariño brindados.

A mis Padres, por apoyarme siempre, por creer en todas mis acciones y por lo hermoso que fue compartir la vida con ellos todos los días. Por las largas charlas compartidas, por escucharme, ayudarme y alentarme a seguir adelante. Por todo lo que durante tantos años con amor supieron darme para poder llegar al día de hoy.

A Carlos, el nuevo integrante de mi familia, por estar siempre junto a mí, por las largas charlas compartidas, por alentarme y ayudarme siempre, por comprenderme y por brindarme la seguridad de saber que siempre puedo contar con él.

A mis Amores:

A la memoria de mi Papá, Mauricio Cottliar, que me acompaña siempre...

A mi Mamá, quien siempre me alentó en el estudio, así como en la vida...

A mis Amigos que realmente están en las buenas y en las malas...

A Carlos, con quien felizmente día a día comparto la vida y que hace de mí una persona feliz....

Indice

INDICE

1. INTRODUCCIÓN

Telómeros.....	1
Acortamiento telomérico.....	4
Acortamiento telomérico e inestabilidad cromosómica.....	5
Telómeros y Neoplasias.....	8
Mieloma Múltiple.....	10
Estudios citogenéticos y moleculares.....	12
Gamopatías monoclonales de significado incierto (MGUS)	13
Enfermedad Celíaca.....	15
Enfermedad Celíaca y neoplasias.....	18
Linfoma no-Hodgkin.....	19
Linfoma Folicular.....	21
Linfoma B difuso a células grandes.....	23
1. OBJETIVOS	26
2. MATERIALES Y METODOS	27
3.1. Poblaciones estudiadas.....	27
3.2. Técnicas utilizadas.....	28
3.2.1. Extracción y purificación de ADN.....	28
3.2.2. Técnica de TRF.....	29
3.2.3. Validación del método de TRF.....	33
3.3. Cultivo de médula ósea.....	34
3.4. Técnicas citogenéticas.....	35
3.4.1. Bando G.....	35
3.4.2. Análisis cromosómico y de asociaciones teloméricas (TAs).....	37
3.5. Análisis estadístico.....	38

3.	MIELOMA MULTIPLE	39
	Pacientes.....	39
	Resultados.....	39
	4.2.1. Análisis de longitud telomérica.....	39
	4.2.1.1. Análisis de TRF acorde al momento de la enfermedad.....	42
	4.2.1.2. TRF y porcentaje de infiltración de la MO.....	43
	4.2.1.3. TRF y rearrreglos genómicos.....	45
	4.2.2. Análisis de TAS.....	46
4.3	Discusión.....	47
4.	ENFERMEDAD CELIACA	52
	Pacientes.....	52
	Resultados.....	54
	Discusión.....	56
5.	LINFOMA NO-HODGKIN	59
	Pacientes.....	59
	Resultados.....	60
	6.2.1. Análisis de longitud telomérica en pacientes con linfoma folicular y linfoma B difuso a células grandes secundario a linfoma folicular.....	60
	6.2.2. Análisis de longitud telomérica en pacientes con linfoma B difuso a células grandes <i>de novo</i>	64
	Discusión.....	66
6.	CONCLUSIONES	72
7.	BIBLIOGRAFÍA	74
8.	ABREVIATURAS	92

1. Introducción

1. INTRODUCCION

1.1. Telómeros

Los telómeros son estructuras especializadas ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos, constituidas por secuencias de ADN no codificante altamente conservadas, en forma de hexanucleótidos (TTAGGG)_n repetidas en tandem y proteínas asociadas (Figura 1). En humanos, cada extremo cromosómico contiene aproximadamente 1000 a 2000 repeticiones teloméricas. Estas regiones permiten la completa replicación de los extremos 5' del ADN cromosómico sin pérdida de secuencias internas y de los genes que estas secuencias pudieran contener. Cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la integridad y estabilidad cromosómica, posicionan a los cromosomas dentro del núcleo para la replicación, permitiéndoles una correcta segregación en mitosis e impiden las fusiones terminales con otros cromosomas, constituyendo un factor crítico en la supervivencia celular. Además, protegen al ADN codificante de la acción enzimática y la degradación, contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad genómica (Blackburn, 1991). Asimismo, median importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear (Walker y Col., 1991), pudiendo además ejercer efectos sobre la transcripción de genes de regiones subtelo méricas (Gottschling y Col., 1990) e interactuar con los mecanismos regulatorios del ciclo celular (Holt y Col., 1996), y su acortamiento progresivo refleja una reducción en la capacidad replicativa de la célula, llevándola a la senescencia (Bacchetti, 1996).

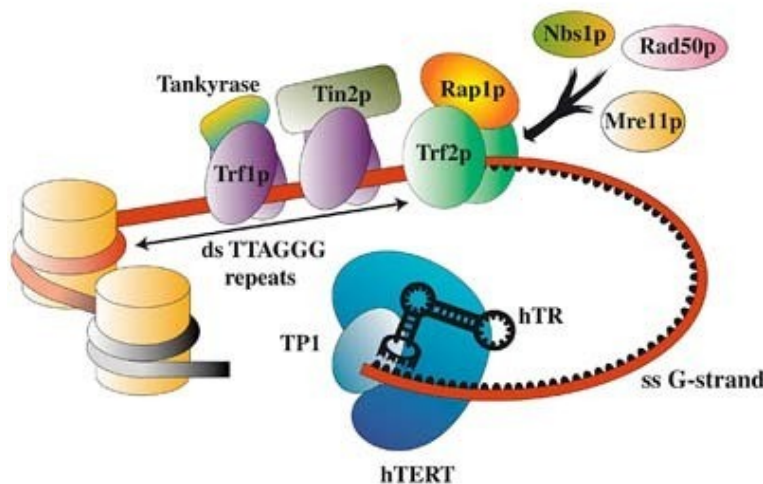


Figura 1: Estructura molecular de los telómeros y sus proteínas asociadas (Leeper y Col., 2003)

Asimismo, se sabe que la presencia de telómeros funcionales es importante para una propagación estable de los cromosomas durante el ciclo celular. Normalmente, en células en G₁ y G₂ los telómeros se asocian entre sí, orientándose hacia la periferia del núcleo, debiendo activarse un mecanismo específico para resolver dichas asociaciones al progresar hacia la mitosis. Cuando los telómeros llegan a ser críticamente cortos, su separación durante la mitosis no se produciría adecuadamente, llevando a la formación de fusiones teloméricas e inestabilidad cromosómica (Counter y Col., 1992; Slijepcevic y Bryant, 1998).

Fuera de la región mayoritaria de doble cadena de los telómeros, en la cadena rica en G se encuentra el extremo 3' formado por varios cientos de pares de bases simple cadena, que forman una estructura terminal denominada 3' *overhang* (proyección 3'). Esta proyección, se pliega sobre sí misma por invasión de la región 3' terminal simple cadena dentro de la región de ADN telomérico dúplex, formando así una estructura en bucle denominada *t-loop* (Griffith y Col., 1999), que preserva a los extremos teloméricos de la fusión terminal y los eventos consecuentes, como inestabilidad cromosómica, senescencia replicativa y muerte celular (Figura 2).

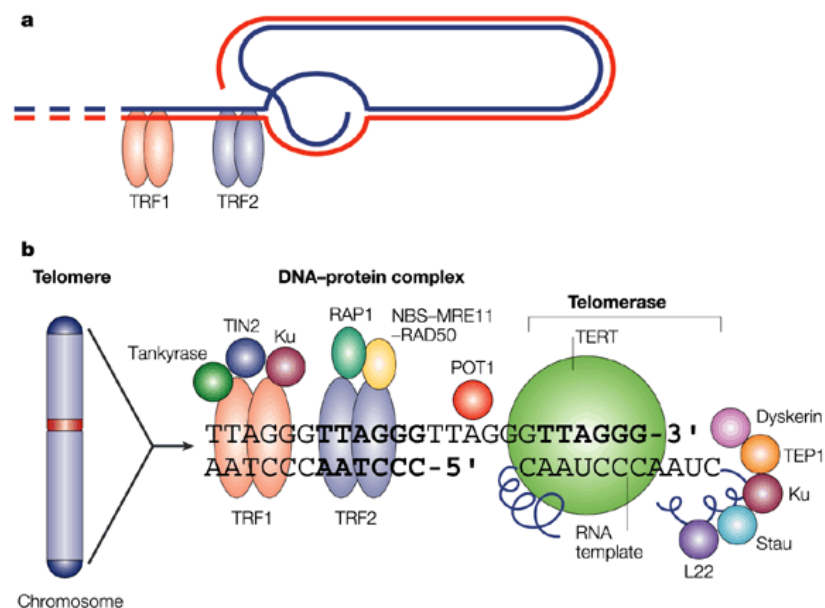


Figura 2: a) Estructura del t-loop formado en los extremos cromosómicos; b) Ubicación espacial de la telomerasa, así como de las otras proteínas de unión al ADN telomérico (Hodes, 2002)

Las proteínas de unión al ADN telomérico son importantes para mantener la estabilidad de los telómeros y regular la longitud de los mismos. Las proteínas TRF1 y TRF2 se unen a las secuencias teloméricas, cada una como homodímeros preformados. Ambas presentan una arquitectura similar, con sus dominios de unión al ADN formando unidades estructurales independientes. A pesar de las similitudes, estas proteínas tienen distintas funciones: TRF1 es un regulador negativo de la longitud telomérica, previniendo la elongación de los telómeros una vez que llegan a un tamaño crítico y su sobreexpresión determina el acortamiento telomérico (van Steensel y de Lange, 1997). Por su parte, TRF2 si bien está también implicada en la regulación de la longitud telomérica, parece ser importante para estabilizar los extremos cromosómicos (de Lange, 2002). Tiene la habilidad de remodelar el ADN telomérico por asociación con el extremo 3' libre, induciendo la conformación del *t-loop* (Stansel y Col., 2001) y evitando las fusiones terminales. Recientemente se estableció que TRF1 y TRF2 son subunidades de un complejo de unión a telómeros mayor (telosoma) que también contiene POT1, PTP, RAP1 y TIN2. Consistentemente con este modelo del complejo telosoma multi-proteico, se vio que liberando TRF1 de los telómeros por expresión de tankirasa, se redujo el reclutamiento de TIN2 y TRF2, sugiriendo que el mantenimiento telomérico dependería de este complejo de múltiples subunidades (Liu y Col., 2004).

La vigilancia al daño del ADN en células humanas puede activar sucesivamente los sistemas de reparación, los puntos de control (*checkpoints*) del ciclo celular y la apoptosis, en respuesta a menos de 4 roturas de doble cadena por genoma (Bakkenist y Kastan, 2003). Este sistema de vigilancia, muestra una tolerancia a la presencia de telómeros cortos, los cuales a expensas de la unión de TRF2, no son reconocidos como rotura de doble cadena por la maquinaria de replicación; de este modo los telómeros moderadamente acortados no son reparados. Este proceso, ocurre antes de la asociación de ATM (*Ataxia Telangiectasia Mutated*) con las roturas de doble cadena y de la activación del sistema de respuesta al daño dependiente de esta vía de señalización (Broadshaw y Col., 2005). Otras proteínas se unen indirectamente a los telómeros, vía TRF1 y TRF2 mediante interacciones proteína-proteína y juntas actúan regulando la homeostasis de los telómeros (Collins y Mitchell, 2002). Los telómeros críticamente acortados en células humanas senescentes, no tienen la capacidad de unirse a TRF2 para

ejercer esa protección, induciéndose así la senescencia replicativa (Karlseder y Col., 2002).

1.1.1. Acortamiento telomérico

En los últimos años se ha generado un interés considerable en torno al rol de los telómeros en los complejos mecanismos de envejecimiento y carcinogénesis. En individuos normales se observó una disminución de la longitud telomérica con el avance de la edad, que va desde aproximadamente 15000 pb en células germinales y recién nacidos, 10000 pb en adultos jóvenes y 5000-7000 pb en células de ancianos (Harley y Col., 1990). La integridad y funcionalidad de los telómeros son factores críticos en la vida de las células humanas, considerándose que se requiere un mínimo de longitud telomérica para mantener su función. Durante la síntesis de ADN se produce una replicación incompleta en la cadena que se sintetiza en forma discontinua, generando pérdidas progresivas de 25 a 200 pares de bases de secuencias teloméricas con cada ronda de replicación del ADN, durante las sucesivas divisiones celulares, lo que determina el acortamiento telomérico (Hastie y Col., 1990; Mondello y Col, 1999; Goyns y Lavery, 2000).

Hayflick y Moorhead (1961) sugirieron que la mayoría de las células normales están programadas para un número dado de divisiones celulares y que no pueden dividirse indefinidamente. Esta teoría fue expandida por Harley (1991) en su “hipótesis telomérica del envejecimiento”, en la cual postulaba que una pérdida telomérica suficiente en uno o más cromosomas en células somáticas normales actúa como un “reloj molecular” que gatilla la senescencia celular. Esto se vio apoyado por experimentos que mostraron que la regulación positiva de la actividad de telomerasa- enzima que participa en la regulación de la longitud telomérica- en fibroblastos humanos prevenía la erosión telomérica, llevando a estas células a la inmortalización (Bodnar y Col., 1998).

Respecto de la senescencia, se conoce que las células humanas presentan dos barreras biológicas para extender su vida, una durante la fase M_1 en la que se produce la senescencia replicativa o estadio 1 de mortalidad, cuya función es la de inhibir la

inmortalización celular y la otra durante M₂, etapa denominada crisis, en la que las células que llegaron a esa instancia, suelen entrar en apoptosis. Aquellas que eluden la muerte en el estadio de crisis y además poseen rearrreglos cromosómicos, llegan a inmortalizarse. Estas células expresan telomerasa y estabilizan sus telómeros, proliferando indefinidamente. Al mismo tiempo, muestran longitud telomérica constantes, aneuploidías y translocaciones no recíprocas, sugiriendo que en el período de crisis los telómeros pierden su habilidad de protección del material genético.

Estudios recientes indican que la longitud de los telómeros varía considerablemente entre los diferentes cromosomas, siendo el brazo corto del cromosoma 17 el que presenta el menor número de repeticiones teloméricas (Martens y Col., 1998; Elwood, 2004). Simultáneamente, se ha demostrado (Huffman y Col., 2000) que el acortamiento telomérico es proporcional al tamaño del extremo 3' libre, es decir, las células con extremos más largos, pierden más repeticiones teloméricas que aquellas con longitudes más cortas, considerándose actualmente que el estado del complejo telomérico sería un indicador importante e informativo de envejecimiento y viabilidad celular. De esta forma, los extremos rotos de los cromosomas que no poseen telómeros tienden a sufrir recombinación, generando fusiones con otras regiones terminales dañadas.

1.1.2. Acortamiento telomérico e inestabilidad cromosómica

Estudios previos han demostrado que el acortamiento telomérico está asociado a una senescencia replicativa y a la presencia de inestabilidad cromosómica (Counter y Col., 1992, Riboni y Col., 1997), mecanismos que contribuyen directamente a la aparición de las anomalías cromosómicas usualmente observadas en diversos tipos de cáncer. De hecho, se ha detectado una reducción telomérica en diferentes neoplasias hematológicas (Shay y Col., 1996; Boulwood y Col., 1997; Bechter y Col., 1998; Engelhardt y Col., 2000; Remes y Col., 2000) y tumores sólidos, así como en líneas celulares (Kim y Col., 1994).

Esta reducción de la longitud de los telómeros llevaría a la formación de asociaciones teloméricas (TAs), que son consideradas como un primer evento en la

generación de los rearrreglos cromosómicos específicos observados en células tumorales (Slijepcevic y Bryant, 1998). Estas anomalías citogenéticas ocurrirían como resultado de ciclos de ruptura y fusión que involucran las regiones intercentroméricas de los cromosomas dicéntricos, los que presentarían segregaciones defectuosas durante la mitosis, llevando a desbalances de material genético e inestabilidad genómica (Riboni y Col., 1997; Sawyer y Col., 1998), y aumentarían la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genéticos de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico (Kim y Col., 1994; Shay y Col., 1996; Riboni y Col., 1997).

Si bien los mecanismos que producen las TAs son aún desconocidos, podrían estar asociados a fallas en la actividad de la enzima telomerasa, una ribonucleoproteína con actividad de transcriptasa reversa específica de telómeros, que permitiría mantener la longitud telomérica en equilibrio, de modo que la célula pueda seguir proliferando (Greider y Col., 1996). Asimismo, se ha demostrado una correlación positiva entre la presencia de anomalías cromosómicas y el acortamiento telomérico (Höglund y Col., 2003), habiéndose detectado que aquellos cromosomas con telómeros críticamente acortados se encontraban preferentemente involucrados en rearrreglos estructurales en neoplasias (Gisselsson y Col., 2002). Además, estudios con células de ratones deficientes de telomerasa han evidenciado la relación existente entre la pérdida de repeticiones teloméricas y la consecuente predisposición a fusiones terminales (Blasco y Col., 1997).

Este proceso de acortamiento puede ser compensado por una síntesis telomérica *de novo* por parte de la telomerasa (Greider y Blackburn, 1985; Nugent y Lundblad, 1998). En humanos la actividad de esta enzima está presente durante el desarrollo embrionario, pero es reprimida en la mayoría de los tejidos somáticos adultos, excepto en células germinales, células stem y en la mayoría de las células tumorales *in vivo* o inmortalizadas *in vitro*, mostrando bajos niveles en algunos tejidos con capacidad de auto renovación. Esto sugeriría que tanto la telomerasa como el mantenimiento telomérico son requeridos para una proliferación celular ilimitada y para la tumorigénesis (Counter y Col., 1992; Bacchetti, 1996).

Actualmente, se considera que hay dos caminos principales para que una célula tumoral pueda adquirir actividad de telomerasa. Uno es el de “reactivación” de la actividad enzimática a través de un proceso inducido por un acortamiento telomérico crítico en una célula telomerasa negativa, que ha sufrido un evento de transformación, situación observada en los tumores sólidos. El otro es mediante un mecanismo de “inducción y retención” de la capacidad de expresar actividad de telomerasa por parte de una célula normal competente telomerasa-positiva, como las células progenitoras de la médula ósea y los linfocitos, que adquirirían un fenotipo neoplásico (Norrback y Col., 1996). Este último camino es el que tendría lugar en el caso de las neoplasias linfoides, teniendo en cuenta la actividad de telomerasa y el alargamiento telomérico detectado durante el proceso de maduración de las células B en el centro germinal (Norrback y Col., 2001). Existe también un mecanismo alternativo, basado en la presencia de mutaciones o deleciones en alguno de los genes que participan en el control del equilibrio entre la elongación por la telomerasa y el acortamiento telomérico. Esto ocurre como consecuencia de recombinación homóloga entre telómeros, donde las secuencias son copiadas de un telómero a otro por hibridación complementaria, llevando al mantenimiento de la longitud telomérica y la extensión de la sobrevivencia celular sin activación de la telomerasa (Reddel y Col., 1997). Muy recientemente se ha detectado en el cromosoma 5 un gen que posiblemente funcione como represor de la telomerasa, sugiriendo que la pérdida de este cromosoma o parte del mismo conteniendo al gen puede ser responsable de su reactivación (Kugoh y Col., 2003). Además, se ha propuesto otro modelo basado en el mantenimiento de la función telomérica como factor determinante en el mecanismo de activación de la telomerasa (Blackburn, 2000).

A nivel del ciclo celular, se detectó actividad de telomerasa en las fases G_1 , S y G_2 , observándose una represión al entrar las células a G_0 debido, entre otras causas, a la carencia de factores de crecimiento, inhibición por contacto de la división celular o inducción de la senescencia por reversión en una línea celular inmortalizada o por diferenciación (Holt y Col., 1996).

El rol de la telomerasa en la inmortalización ha sido confirmado a través de hallazgos de expresión ectópica en células normales, las cuales mostraron una extensión de su vida (Bodnar y Col., 1998; Yang y Col., 1999). No obstante, habría evidencias que la telomerasa funciona como una enzima reparadora del ADN y antiapoptótica, además de su rol en el mantenimiento telomérico (Counter y Col., 1995; Ohyashiki y Col., 1997; Engelhardt y Martens, 1998; Wu y Col., 2003).

Estudios recientes han demostrado que la inhibición de la actividad de telomerasa puede llevar directamente a acortamiento telomérico y daño celular, o indirectamente, por bloqueo de la sobrevivencia mediada por telomerasa, aumentar el daño celular generado por otros factores (Counter y Col., 1995; Ohyashiki y Col., 1997; Engelhardt y Martens, 1998; Wu y Col., 2003). El tiempo transcurrido desde la administración de inhibidores de la actividad de telomerasa hasta evidenciarse algún tipo de respuesta estaría acorde a la farmacodinámica de la inhibición de la telomerasa y a la naturaleza acumulativa del acortamiento telomérico generada por divisiones celulares progresivas o por eventos que dañen los telómeros, como pueden ser las señales apoptóticas (Hodes, 2001, Mergny y Col., 2002).

En tumores dependientes de telomerasa se vio que un acortamiento telomérico simultáneo con la inhibición de la actividad de telomerasa, podría generar una citotoxicidad sinérgica y selectiva hacia el tumor. Para ello se utilizó la droga paclitaxel que genera erosión telomérica conjuntamente con la inhibición de la telomerasa a través de un hTR antisentido o AZT, observándose un aumento de la actividad antitumoral del paclitaxel. Este abordaje contra el acortamiento telomérico y la actividad de telomerasa mostró una especificidad para este tipo de tumores, en células telomerasa positivas, tanto *in vitro* como *in vivo* (Mo y Col., 2003). Por otro lado, se sabe que la 'upregulation' o reexpresión de la telomerasa puede resultar en la restauración de la estabilidad cromosómica que llevaría a una proliferación celular continua. De esta forma, la inhibición de la función de telomerasa podría constituir una nueva estrategia como terapia antineoplásica y de quimioprevención.

1.1.3. Telómeros y neoplasias

Diferentes reportes mostraron asociación entre la presencia de TAs y el acortamiento telomérico en diferentes tumores sólidos y líneas celulares (Schwartz y Col., 1989; Holzmann y Col., 1993; Saltman y Col., 1993), así como correlación entre la reducción telomérica y el aumento de los niveles de telomerasa en leucemias y preleucemias (Yamada y Col., 1993; Kim y Col., 1994; Counter y Col., 1995). Asimismo, se ha observado una evolución clonal de las fusiones teloméricas en diferentes neoplasias (Howell y Col., 1993; Richkind y Col., 1994; Sawyer y Col., 1996; 1998), alteraciones que darían origen a una evolución cariotípica, pudiendo constituir lesiones precursoras para otras anomalías estructurales tales como translocaciones inestables, dicéntricos o anillos (Sawyer y Col., 1998).

Los estudios realizados en neoplasias hematológicas mostraron un aumento de TAs, con la presencia de TAs clonales en leucemia linfocítica crónica y leucemia prolinfocítica (Howell y Col., 1993; Crossen y Col., 1993), detectándose además disminución de la longitud telomérica y aumento de la actividad de telomerasa en estadios avanzados de diferentes neoplasias hematológicas (Counter y Col., 1995; Shay y Col., 1996). En leucemias agudas se observó una importante reducción de la longitud telomérica al momento del diagnóstico, con valores normales en la remisión completa (Ohyashiki y Col., 1997). En leucemia mieloide aguda, se ha demostrado que la actividad de telomerasa es inhibida durante el proceso de diferenciación celular y que los pacientes con aumento de la actividad de telomerasa presentan anomalías citogenéticas de mal pronóstico (Zhang y Col., 1996). Un comportamiento similar se detectó en pacientes con síndromes mielodisplásicos, observándose además que la presencia de telómeros cortos al diagnóstico estaría asociada con enfermedad más agresiva (Ohyashiki y Col., 1994, Rigolin y Col., 2004) y con la progresión a leucemia mieloide aguda (Sieglova y Col., 2004). Por otra parte, en leucemia mieloide crónica se observó un incremento de la actividad de telomerasa durante la fase blástica (Counter y Col., 1995), así como una reducción de la expresión de los componentes de la misma en fase crónica, generando una disrupción de la homeostasis de los telómeros que podría influir en la progresión de la enfermedad (Drummond y Col., 2005). Asimismo en leucemia T de adultos se estableció a ambos parámetros, longitud telomérica y actividad de telomerasa, como factores pronósticos (Kubuki y Col., 2005).

En tumores sólidos se han detectado variaciones de la longitud telomérica con predominio del acortamiento telomérico, así como la presencia de actividad de telomerasa en la mayoría de las neoplasias estudiadas (Smith y Yeh, 1992; Butler y Col., 1996; Engelhardt y Col., 1997; Cottliar y Slavutsky, 2001; Suzuki y Col., 2002; Biroccio y Leonetti, 2004; Angele y Col., 2004; Boldrini y Col., 2004; Meeker y Col., 2004). Sin embargo, en tumores testiculares de células germinales, se observó un alargamiento de telómeros, sugiriendo un alto potencial proliferativo (Nowak, 1997). Además, se detectó la expresión de actividad de telomerasa en neoplasias de células germinales, en contraste con teratomas maduros, donde se la vio reprimida. Dicha actividad podría contribuir a una

capacidad proliferativa limitada de los teratomas maduros, sustentando la existencia de una relación inversa entre la actividad de telomerasa y el estadio de diferenciación en los tumores de células germinales (Albanell y Col., 1999). Asimismo, la ausencia de telomerasa y de telómeros acortados mostró efectos mínimos en la carcinogénesis de piel y de páncreas (Argilla y Col., 2004). Esto sugiere que, si bien en la mayoría de los tumores se observó reducción telomérica, existen casos donde esto no ocurre.

Por otra parte, en carcinoma hepatocelular se observó un acortamiento progresivo de telómeros y actividad de telomerasa, concluyendo que la expresión de telomerasa puede ser un marcador útil para la detección temprana de la progresión de cáncer hepático (Miura y Col., 1997), mientras que en carcinoma renal no presentó valor pronóstico (Sugimura y Col., 1999), indicando la importancia de realizar estos estudios en las diferentes patologías a fin de detectar su posible valor como marcador tumoral, tendiente a plantear algún tipo de terapia específica para pacientes que posean este tipo de anomalías.

En el presente trabajo estudiamos en forma específica las modificaciones de la longitud telomérica en pacientes con mieloma múltiple y diferentes subtipos histológicos de linfomas no Hodgkin (LNH). Asimismo se estudiaron pacientes con enfermedad celíaca, patología con predisposición al desarrollo neoplásico, particularmente LNH.

1.2. MIELOMA MÚLTIPLE

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia clonal a células B caracterizada por una infiltración atípica de células plasmáticas en la médula ósea y la secreción de una proteína monoclonal del tipo de las inmunoglobulinas (Ig) conocida como componente M, en suero y/u orina. Dichas células plasmáticas se agrupan en grandes focos o nódulos, constituyendo un efecto de “masa” que generaría un microambiente de retroalimentación para el mieloma (Bartl y Col., 1982; Grogan y Col., 2001). Además, como características clínicas típicas de esta patología, se describen la presencia de lesiones osteolíticas, asociadas a un metabolismo óseo desacoplado: fracturas, dolor óseo, anemias e inmunosupresión, debida a la pérdida de la función de las células stem hematopoyéticas normales.

Se postula que el MM se originaría a partir de un proceso de transformación neoplásica de múltiples pasos que conduce a la acumulación progresiva de eventos genéticos que favorecerían la proliferación y expansión clonal. Su inicio sigue la “hipótesis de los dos eventos” con un estímulo antigénico inicial que lleva al surgimiento de nuevos clones benignos seguido de un segundo paso o evento mutagénico que causa la transformación maligna (Hallek y Col., 1998).

La edad media de los pacientes al diagnóstico es de 68 años en hombres y 70 en mujeres y la relación hombres:mujeres es 1:1. La médula ósea presenta un compromiso generalizado que involucra las áreas de hematopoiesis más activas: vértebras, costillas, cráneo, pelvis, fémur, clavícula y escápula. El componente M se encuentra como un pico en la región gamma de las proteínas del suero y suele observarse en concentraciones mayores a 3 g/dl de IgG y mayores a 2 g/dl de IgA. Además, existe otro tipo de MM no secretor, en el cual las células plasmáticas sintetizan pero no secretan moléculas de Ig.

Respecto de la etiología del MM, se observaron riesgos incrementados (3-4 veces) de desarrollar MM en personas expuestas a diversos agentes químicos, así como en sobrevivientes de las bombas atómicas de Nagasaki e Hiroshima (Linnet y Col., 1987).

Los pacientes con MM presentan rangos de supervivencia muy amplios, de pocos meses a 15 años (Shaughnessy, 2004). En cuanto a los factores de mal pronóstico al momento del diagnóstico, se consideran de importancia: el estadio clínico, la presencia de insuficiencia renal, la concentración de hemoglobina, el calcio sérico, la presencia de lesiones osteolíticas, la concentración del componente M y la β_2 microglobulina (β_2M). Asimismo, la estimación del grado de reemplazo de la médula ósea por células plasmáticas, puede tener valor pronóstico así como las anomalías genéticas tales como deleciones de 13q14 y 17p13 (Desikan y Col., 2000).

Con referencia al inmunofenotipo, el MM suele expresar un único tipo de Ig citoplasmática y no de superficie. La Ig mayoritaria es IgG o IgA y raramente IgD, IgE o IgM. En el 85% de los casos, se producen ambos tipos de cadenas, liviana y pesada y en el 15% sólo se expresa la cadena liviana, constituyendo este último otro tipo de MM. La mayoría de los casos carecen de los antígenos pan-B CD19 y CD20, mientras que

expresan CD38 y CD79a. Asimismo, las células plasmáticas del MM expresan CD56/58 y están desprovistas de CD19, contrariamente a lo que ocurre en células plasmáticas normales. En la mayoría de los casos se encontró expresión de CD138, que podría ser importante para el anclaje de las células plasmáticas en la médula ósea (Ridley y Col., 1993). Los estudios moleculares de los genes de Ig revelan la presencia de rearrreglos monoclonales, habiéndose observado una alta frecuencia de mutaciones somáticas en los genes IgV_H, lo que es consistente con una derivación post- centro germinal (Harris, 2001).

La sobrevida y proliferación de las células del MM resultan muy dependientes del microambiente que las sustenta. La presencia de IL-6 les permite mantener su crecimiento, protegiéndolas de los efectos apoptóticos de corticosteroides. Asimismo, en la patogénesis del MM es importante la angiogénesis, siendo el VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) uno de los factores endógenos que la promueven. Inhibir dicho proceso tendría implicancias pronósticas y terapéuticas de importancia, siendo la talidomida uno de los agentes antiangiogénicos utilizados que, previo al trasplante autólogo, ofrece buenas respuestas clínicas en la tercera parte de los pacientes, actuando además en forma sinérgica con la quimioterapia y los corticoides (Cavo y Col., 2004).

1.2.1. Estudios citogenéticos y citomoleculares

El análisis cromosómico en MM, se ve bastante limitado por el bajo índice de proliferación *in vitro* de las células plasmáticas. Sin embargo, el uso de cultivos estimulados y la hibridización *in situ* con fluorescencia (FISH) han permitido aumentar el número de casos informativos. Los estudios citogenéticos permitieron detectar la presencia de anomalías cromosómicas numéricas y estructurales en el 20-60% de los casos, con una media de 30-40% (Durie, 1992; Calasanz y Col., 1997; Gutiérrez y Col., 2000) y en el 60-70% de los pacientes con enfermedad avanzada, observándose correlación de la presencia de aberraciones cromosómicas con la progresión de la enfermedad (Lai y Col., 1995). Se encontraron ganancias en los cromosomas 3, 5, 7, 9, 11, 15, 19 y 21 y pérdidas en: 8, 13, 14, 16 y X (Debes-Marun y Col., 2003). Entre las pérdidas, la monosomía 13 o la delección de 13q14 es el hallazgo más común, presente en

el 15-40% de los casos al diagnóstico (Konigsberg y Col., 2000; Fonseca y Col., 2001). Jacobson y colaboradores (2003), analizaron la relación entre los cambios de ploidía y la expresión génica, detectando una expresión diferencial en 25% de los genes estudiados. En los cromosomas 12, 13, 14, 16 y 22 el 90% de los genes estaban regulados negativamente, mientras que los genes de los cromosomas 5, 15 y 21 estaban positivamente regulados, encontrándose ésto asociado a una mala evolución clínica (Shaughnessy y Col., 2003; Jacobson y Col., 2003).

A nivel de citogenética molecular se detectó un 40 % de pacientes con translocaciones que involucraban el gen de la cadena pesada de las inmunoglobulinas, en el locus 14q32 (Kuehl y Bergsagel, 2002). Recientes trabajos establecieron que la presencia de hiperdiploidías y de t(11;14)(q13;q32) estaba asociada con buen pronóstico; mientras que la ausencia de hiperdiploidías, la presencia de otras translocaciones distintas a t(11;14) y la monosomía o delección del cromosoma 13, son indicadores de mal pronóstico (Smadja y Col., 2001; Fonseca y Col., 2004), resultando la detección de las anomalías del cromosoma 13 por FISH el factor pronóstico adverso de mayor poder (Desikan y Col., 2000; Facon y Col., 2001).

Si bien la técnica de FISH detecta más rearrreglos que el análisis cariotípico (45-50% contra 15%), la citogenética logra definir un subgrupo de pacientes con un pronóstico aún más adverso, dado que la detección de alguna anomalía cromosómica probablemente corresponde a un comportamiento más agresivo del tumor y podría correlacionarse con una mayor actividad proliferativa, también evaluada por el índice de células plasmáticas (Shaughnessy y Col., 2003).

1.2.2. Gamopatías Monoclonales de Significado Incierto (MGUS)

El MM suele estar precedido por un estado premaligno, denominado MGUS, caracterizado por la expansión de una proteína monoclonal en suero u orina sin otra característica clínica de MM. La prevalencia de MGUS es de 1% en mayores de 50 años y de 3% en mayores de 70 años. A nivel clínico, los pacientes con MGUS tienen un curso benigno, con un seguimiento de 25 años, existiendo una probabilidad actuarial del 30% de desarrollar una neoplasia de células plasmáticas (Kyle y Col., 2002). Este riesgo de transformación maligna no está relacionado con el tipo de componente M. El tiempo medio desde la aparición de la proteína M hasta el diagnóstico de MM u otro desorden linfoproliferativo es de alrededor de 10 años, por lo que estos pacientes deben controlarse continuamente para evaluar evidencias de progresión de la enfermedad (Kyle, 1993). Las células plasmáticas en MGUS son muy similares a las células plasmáticas normales, sin nucléolos y con idéntico inmunofenotipo.

El análisis citogenético y citomolecular mostró similitud en las translocaciones que presentan MGUS y MM, con frecuencias menores en el primero, sugiriendo que estas anomalías representarían eventos tempranos en ambas patologías, con importancia a nivel patogénico (Fonseca y Col., 2002).

Un estudio de los perfiles de expresión génica por *microarrays* sobre ARN de células plasmáticas aisladas de controles y pacientes con MM al diagnóstico y MGUS, permitió identificar clusteres de genes que discriminaban entre células plasmáticas normales y neoplásicas, y que podrían estar involucradas en el desarrollo del MM (Zhan y Col., 2002). Análisis posteriores, no mostraron disparidad entre ambos tipos de pacientes, indicando que las modificaciones en el microambiente de la médula ósea y las fallas a nivel del sistema inmune, se sumarían a los cambios genéticos presentes en las células tumorales, para contribuir al pasaje de una condición benigna de las células plasmáticas, como es el MGUS, al MM (Shaughnessy, 2004).

Aún no existen parámetros que permitan identificar aquellos pacientes que podrían progresar a MM ni la manera de retrasar o prevenir esta progresión. Es por ello

que resulta fundamental una mejor comprensión de los mecanismos patogénicos a nivel molecular de estas condiciones a fin de desarrollar abordajes de diagnóstico, tratamiento y prevención adecuados.

1.3. ENFERMEDAD CELIACA

La enfermedad celíaca (EC) es una patología multifactorial caracterizada por la lesión de la mucosa del intestino delgado en respuesta a la ingestión del gluten contenido en el trigo, la cebada y el centeno en individuos genéticamente susceptibles (OMIM, 2002). Estas proteínas almacenadas en los granos ejercen un efecto patogénico sobre la mucosa del intestino delgado que genera una respuesta inmune inapropiada mediada por células T que produce daño tisular y éste, a su vez genera más daño que se auto-perpetúa por la continua presencia de gluten.

Bajo condiciones fisiológicas, el epitelio intestinal, conteniendo sus *tight junctions* (uniones estrechas entre células) intactas, sirve como barrera contra el pasaje de macromoléculas tales como el gluten. Mientras que la salubridad impera, una cantidad inmunológicamente significativa de antígenos cruzan dicha barrera. De éstos, más del 90% lo hace a través de la vía transcelular y, por posterior degradación lisosomal, convierte a las proteínas en pequeños péptidos no inmunogénicos. La porción remanente de estos péptidos es transportada como una proteína intacta, dando una respuesta inmune específica del antígeno. Este fenómeno, se da utilizando el paso paracelular que involucra una sutil regulación de las uniones intercelulares, llevando a una tolerancia antigénica. Cuando la integridad de las *tight junctions* se ve afectada, como en la EC, puede desarrollarse una respuesta inmune a antígenos ambientales como el gluten. La regulación positiva de la zonulina, un péptido intestinal que participa en la regulación de dichas *tight junctions*, generaría una permeabilidad intestinal aumentada, típica de la fase temprana de esta patología (Fasano y Col., 2000) y puede ser responsable también de un incremento en la incidencia de los desórdenes autoinmunes reportados en pacientes con EC no tratada (Ventura y Col., 1999).

En individuos susceptibles, dicha hiperreactividad al gluten mediada por células T da como resultado la lesión de la superficie mucosa de absorción del intestino delgado que, con el tiempo, conduce a un estado de malabsorción severa que afecta todos los nutrientes. Sin embargo, tanto las alteraciones clínicas como las histológicas son generalmente reversibles mediante una dieta libre de estas proteínas insolubles. Estudios recientes han establecido que la fracción tóxica del gluten de trigo responsable de la inmunogenicidad es un oligopéptido común a varios glútenes (Vader y Col, 2002). Esto plantea la posibilidad de fabricar productos de trigo que sólo sean deficientes en esta toxina y que por lo tanto sean inocuos para los pacientes con EC.

El diagnóstico definitivo de EC requiere la demostración de las lesiones típicas del intestino delgado y evidencias posteriores de su resolución histológica o clínica debido a la adopción de una dieta libre de gluten. Esta enfermedad comienza en el duodeno y se extiende distalmente en los casos más severos. Las alteraciones histológicas consisten en una disminución de la altura de las vellosidades y una hiperplasia compensadora de las criptas, produciendo un efecto neto de pérdida de superficie de absorción y la presencia de infiltrado mononuclear en la mucosa. Las alteraciones tempranas incluyen un aumento del número de linfocitos intraepiteliales, lo cual, acompañado de una mejoría post-dieta libre de gluten mediante una nueva biopsia y/o disminución de los niveles de anticuerpos séricos permitiría un diagnóstico certero de la patología.

El aplanamiento de la mucosa está acompañado de una infiltración de linfocitos CD4 y de células plasmáticas secretoras de IgA en la lámina propia, y de un aumento de la cantidad total de linfocitos dentro del epitelio. Estos linfocitos intraepiteliales son en su mayoría células T CD8 capaces de secretar citoquinas. En la EC existe un aumento en la población de las células T que expresan el receptor gamma-delta, poco frecuente, y de enterocitos que presentan evidencias de activación inmune debido a un aumento de la expresión de los antígenos de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Muchas de estas alteraciones, e incluso el aplastamiento de la mucosa, han sido encontradas en familiares de pacientes con EC. Aún no se ha establecido la incidencia de esta EC “latente”, sin embargo, la detección de pacientes asintomáticos posiblemente tenga implicancias en la prevención de los cuadros asociados con esta enfermedad.

Un indicador muy específico de EC es la presencia de anticuerpos IgA anti-endomisio (una estructura de músculo liso del tejido conectivo) habiéndose identificado una transglutaminasa tisular como un autoantígeno que estaría jugando un rol de importancia en la patogénesis de esta enfermedad (Dieterich y Col., 1997).

Además, la EC está estrechamente asociada con ciertos haplotipos de MHC, en particular HLA-B8, -DR3, -DR7, -DQ2 y con heterocigosis para HLA-DR5/-DR7. En diferentes poblaciones, entre el 80 y el 100% de los pacientes con EC tienen alguno de estos haplotipos. No se conoce bien el mecanismo por el cual un determinado haplotipo confiere hiperreactividad al gluten, pero se presume que podría haber alguna relación con la capacidad de presentación del antígeno del gluten al sistema inmune, de forma tal que estimulara una respuesta crónica de las células T sin inducción de tolerancia.

Desde el punto de vista epidemiológico, la EC ha mostrado interesantes cambios en la última década del siglo XX. Aplicando los tests más modernos de detección serológica en población general, se encontró que este desorden es más común de lo que se creía, afectando a una entre 120 y 300 personas tanto en Europa (Fasano y Catassi, 2001) como en Estados Unidos (Maki y Col., 2003). Por otra parte, son muy pocos los datos en América Latina. Un estudio efectuado en Brasil en dadores de sangre encontró una prevalencia de 1 en 681 individuos, no obstante, dicho análisis no refleja la diversidad étnica, por lo que sus resultados no pudieron proyectarse a la población general (Gandolfi y Col., 2000). En nuestro país, un estudio reciente, representativo de la población, mostró una alta prevalencia de la enfermedad (1:167), con datos similares a Europa (lugar de donde proviene mayoritariamente nuestra población), siendo su frecuencia el doble en mujeres (1:124) que en hombres (1:251) (Gómez y Col., 2001).

A nivel genético, se ha descripto para EC la presencia de un gen telomérico a la región HLA de clase I en 6p21.3 que probablemente esté involucrado en su patogénesis (Lie y Col., 1999), y una región cromosómica en 15q11-q13 que estaría implicada como factor de susceptibilidad en esta patología (Woolley y Col., 2002). Recientemente se ha detectado la asociación de esta patología con un haplotipo común del gen CTLA4, ubicado en 2q33, que presenta un importante rol en la regulación de la respuesta inmune mediada por linfocitos T (Hunt y Col., 2005).

Si bien las variaciones de HLA explican la mayor parte de la epidemiología de la EC, también pueden ser importantes los factores ambientales. Entre ellos, se pueden incluir la introducción del gluten demasiado tempranamente en la dieta del lactante y la exposición a un virus entérico que puede inducir la producción de anticuerpos que dan reacción cruzada con el gluten (Moss y Holt, 1998).

1.3.1. Enfermedad celíaca y neoplasias

Existen varias enfermedades asociadas con la EC, algunas potencialmente graves. Una de las complicaciones más importantes a considerar es el desarrollo de neoplasias, particularmente linfomas malignos y carcinomas gastrointestinales (Swinson y Col., 1983; Corrao y Col., 2001; Askling y Col., 2002; Catassi y Col., 2002; West y Col., 2004). Globalmente, la incidencia de tumores malignos en EC (11-15%) no resulta muy diferente de la observada en la población general. No obstante, cuando se analiza en forma específica, se observa un marcado aumento en el riesgo a desarrollar adenocarcinoma de intestino delgado, patología infrecuente en la población general (Moss y Holt, 1998) y en la que recientemente se ha podido demostrar la secuencia adenoma-carcinoma (Rampertab y Col., 2003). Asimismo, los carcinomas de esófago y faringe son también ligeramente más frecuentes en estos pacientes (Moss y Holt, 1998).

El linfoma también muestra una frecuencia aumentada respecto de la población general (2-3 veces) (Cellier y Col., 2000; Catassi y Col., 2002), constituyendo dos tercios de todas las neoplasias que presentan los celíacos (Corrao y Col., 2001). Un estudio reciente efectuado en Canadá muestra una incidencia de linfomas malignos de 8,4% en EC (Freeman, 2004), valor similar al obtenido en estudios realizados en Europa (Askling y Col., 2002; Catáis y Col., 2002; West y Col., 2004). Este incremento es debido fundamentalmente a una mayor incidencia de linfomas de células T del intestino delgado (Cellier y Col., 2000), entre los cuales el linfoma T tipo enteropatía presenta una clara asociación con esta enfermedad. Más aún, una proporción de pacientes tiene EC refractaria en un período previo al diagnóstico de la enteropatía T. A nivel genético, esta entidad presenta pérdida de heterocigosidad en 9p21, lo que podría tener un rol de importancia en el desarrollo de esta neoplasia (Obermann y Col., 2004). Estos linfomas constituyen la

complicación más frecuente a largo plazo de la EC, siendo considerados su principal causa de muerte (Sonet y Col., 2004).

Dado que algunos estudios sugieren que el cumplimiento de la dieta libre de gluten disminuye la incidencia de linfomas, es conveniente aconsejar este tipo de dieta a todos los pacientes, aún cuando no presenten síntomas. De hecho, la EC no tratada, puede progresar a un estado debilitante crónico e incluso a la muerte por desnutrición o al desarrollo de una neoplasia intestinal, mientras que, la EC tratada tiene una expectativa de vida normal.

En un encuentro reciente del American College of Gastroenterology se estableció que esta enfermedad se presenta mayoritariamente en forma asintomática, por lo que es más fácil de reconocer su presencia por rastreo en la población general (Rampertab, 2004). Si bien actualmente no existe ninguna medida preventiva para la EC, en algunas partes del mundo se ha observado una disminución en la incidencia de la misma como consecuencia de la modificación temprana de la dieta de los lactantes, retrasando el comienzo de la alimentación con gluten. El diagnóstico precoz realizado en poblaciones de alto riesgo para identificar a los pacientes con EC latente también puede ser eficaz si se observa que estas modificaciones de la dieta previenen su desarrollo y/o sus complicaciones posteriores.

Por otro lado, estudios previos de nuestro grupo en esta patología han detectado un aumento de la actividad transcripcional del ADN ribosomal (Slavutsky y Col., 1992) así como un incremento de la inestabilidad cromosómica (Fundia y Col., 1994; 1996). En este último aspecto, se observó un aumento de la presencia de aberraciones cromosómicas asociadas con puntos de ruptura específicos del genoma, como sitios frágiles y puntos de ruptura relacionados a cáncer, correspondiendo el 75% de los mismos a los rearrreglos característicos de LNH. Estos resultados sugerirían que dicha inestabilidad genómica estaría asociada a la predisposición a desarrollar neoplasias observada en EC y estimulan nuestro interés en efectuar el análisis de TRF en estos pacientes.

1.4. LINFOMA NO-HODGKIN (LNH)

Los LNH constituyen un grupo heterogéneo de tumores originados en el tejido linfoide, diferenciables por su histología, comportamiento biológico, curso clínico y

respuesta terapéutica. Son tumores que resultan de la expansión clonal de células B o T transformadas en diversos puntos de sus vías de diferenciación. Aproximadamente un 85% corresponde al fenotipo B y el 15% restante al fenotipo T y *natural killer* (NK). En la mayoría de los casos estos tumores se desarrollan en los nódulos linfáticos, pero ocasionalmente se encuentran en otros órganos donde las células linfáticas son abundantes como bazo, médula ósea, hígado, piel y tracto digestivo.

Recientes datos muestran un incremento en la incidencia de estos linfomas a nivel mundial, particularmente en los subtipos histológicos más agresivos (Parkin y Col., 1997, Vose y Col., 2002). Existen diferentes factores que han contribuido a este incremento, entre los que se destacan el desarrollo de LNH en pacientes con Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida, seguida en mucho menor proporción, por las inmunodeficiencias congénitas, diferentes agentes infecciosos como HTLV-I y II (Human T-cell lymphotropic virus type I y II), virus Epstein-Barr, *Helicobacter pylori*, Hepatitis C, susceptibilidad genética, herbicidas, fertilizantes y características de la dieta.

En la actualidad, la expansión de los estudios inmunofenotípicos y el desarrollo de las técnicas moleculares, ha permitido efectuar una evaluación más certera de las neoplasias linfoides. La clasificación REAL (Revised European-American Lymphoma; Harris y Col., 1994), propuesta sobre estas bases, hizo factible la identificación de los diferentes subtipos histológicos de linfomas originados en células B y T. La misma define cuatro áreas para cada entidad: morfología, inmunofenotipo, genética y características clínicas, mostrando una nueva concepción en el estudio de esta patología. Desde 1999 se conoce una nueva clasificación denominada WHO (World Health Organization) (Harris y Col., 1999), basada en los principios del grupo REAL, que divide a estas neoplasias según sean originadas en células B, T y NK. Si bien ambas clasificaciones tienen muchas similitudes, en la WHO se redefinen entidades que estaban previamente descritas como provisionales.

Dentro de todos los subtipos histológicos de LNH en el presente trabajo nos dedicaremos en forma específica a los linfomas foliculares y los B difusos a células grandes.

1.4.1. LINFOMA FOLICULAR (LF)

El LF es una neoplasia indolente caracterizada por la proliferación de células B provenientes del centro folicular del nódulo linfático, que representa el 22% del total de los LNH (Anon, 1997). Es la forma más común de los LNH del adulto (35-40% de los casos), siendo su incidencia más alta en USA y Europa, que en Asia (Anderson y Col., 1998; Biagi y Seymour, 2002). La edad media de presentación es de 59 años; es observado muy raramente en individuos menores de 20 años y afecta en mayor proporción a mujeres que a hombres (1,7:1) (Anon, 1997). La mayoría de los pacientes presentan enfermedad diseminada al momento del diagnóstico, incluyendo compromiso en nódulos linfáticos centrales, periféricos y bazo (estadio clínico III/IV) encontrándose involucrada la médula ósea en el 40% de los casos, siendo la sobrevida media global de 5 a 11 años (Houldsworth y Col., 1996; Jaffe y Col., 2001). Un 33% de los pacientes al diagnóstico se encuentran en los estadios I o II y, a pesar de presentar enfermedad diseminada, no muestran síntomas, sólo aumento del tamaño de los nódulos linfáticos.

La mayoría de los casos tiene un patrón predominantemente folicular. Este es descrito como folicular cuando aparece en más del 75% del ganglio, como folicular y difuso cuando el área folicular corresponde al 25-75% y mínimamente folicular cuando abarca menos del 25%. Con frecuencia, los folículos neoplásicos están poco definidos y acompañados de áreas difusas, a menudo con esclerosis. Presentan un aspecto polimórfico, alternando células de pequeño tamaño con contorno nuclear irregular (centrocitos) y células de gran tamaño (centroblastos), que pueden disponerse en grupos más o menos cohesivos que reflejan la arquitectura nodular. En general, predomina el centrocito típico y los centroblastos están presentes pero en mucho menor proporción, siendo muy raros los casos que consisten enteramente de centroblastos grandes o pequeños (Nathwani y Col., 2001).

En el 25-35% de los casos se observa progresión a linfoma B difuso de células grandes de alto grado de malignidad (Gallagher y Col., 1986; Jaffe y Col., 2001), evidenciada por la aparición de un patrón de crecimiento difuso y aumento de la población de células grandes. El tiempo medio desde el diagnóstico hasta la transformación es de 4 a 6 años (Magrath, 1997), después de lo cual la enfermedad progresa rápidamente,

observándose una supervivencia media menor a 2 años (Boddie y Col., 1982; Magrath, 1997; Jaffe y Col., 2001).

El LF ha sido dividido en grados teniendo en cuenta el número absoluto de centroblastos en 10 folículos neoplásicos, expresado por campo microscópico de 40x (hpf, high-power field of 0,159 mm²) (Mann y Berard, 1983; Metter y Col., 1985; Nathwani y Col., 1986). De este modo los grados 1, 2 y 3, presentan 0-5; 6-15 y más de 15 centroblastos por campo, respectivamente. A su vez, los últimos pueden subdividirse en 3a con más de 15 centroblastos/campo y aún con centrocitos presentes y 3b, en los que se observan sólo masas de centroblastos. El grado histológico se correlaciona con el pronóstico, siendo los grados 1 y 2 indolentes y usualmente no curables, mientras que el grado 3 es más agresivo y potencialmente curable con terapia similar al LBDCG (Nathwani y Col., 2001).

En cuanto al perfil inmunofenotípico, las células tumorales suelen ser: CD19+, CD20+, CD79a+ (antígenos asociados a la expresión de células B), FMC7+, CD79b+, CD10+, CD5-, CD23+/-, CD25 y CD11c variable, CD103-, IgS+ (IgM+/-, IgD>IgG>IgA), CD43- (Jaffe y Col., 2001).

Además, en la mayoría de los casos (casi en el 100% de los LF de grados 1 y 2, y en el 75% de grado 3) se encuentra expresión de la proteína Bcl-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Lai y Col., 1998). Esta proteína resulta útil para distinguir folículos neoplásicos de reactivos, en tanto que no permite diferenciar el LF de otros tipos de linfomas de bajo grado. Asimismo, se ha observado expresión de la proteína nuclear Bcl-6 (Cattoretti y Col., 1995, Pittaluga y Col., 1996).

El LF se encuentra genotípicamente asociado a la t(14;18)(q32;q21) (70-95% de los casos), que involucra la yuxtaposición del proto-oncogen BCL-2 (18q21) con una de las regiones J_H de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (14q32), originando la desregulación y sobreexpresión de dicho gen debido a la presencia del *enhancer* del gen IgH, ubicado a 370 Kb de la región promotora del gen BCL-2 (Tsujimoto y Col., 1984; Cleary y Sklar, 1985). Esta translocación ocurriría en un estadio temprano del desarrollo de células B, durante el reordenamiento de los genes de inmunoglobulinas.

La proteína Bcl-2 en condiciones normales es expresada por células B y T que no están ciclando, no detectándose en células del centro germinal, timocitos corticales ni monocitos (Lai y Col., 1998). Esta proteína de membrana se localiza en la cara citosólica del entorno nuclear, del retículo endoplásmico y en la membrana mitocondrial externa. Su expresión depende del estado de maduración de las células B, observándose positividad en la mayoría de los linfocitos pro-B y B 'naive', disminuyendo su expresión en el estadio de célula pre-B y estando ausente en linfocitos B de memoria y en células B diferenciadas. La sobreexpresión de la proteína Bcl-2 se encontró asociada a ventajas proliferativas de las células B, por inhibición de la apoptosis en ausencia de factores de crecimiento (Nuñez y Col., 1990). Su función es bloquear la apoptosis y su sobreexpresión es considerada un factor importante relacionado a resistencia a drogas y falta de respuesta a la quimioterapia (Oltvai y Col., 1993; Cory, 1995; Reed, 1995; Reed y Col., 1996). Otra de las funciones de Bcl-2 es aumentar la mutagénesis y la carcinogénesis atenuando o impidiendo la reparación del ADN frente a un daño (Saintigny y Col., 2001; Youn y Col., 2005).

Además, se ha detectado la presencia de t(14;18) en población normal con una alta prevalencia (Bell y Col., 1995; Janz y Col., 2003). Algunos de estos estudios hallaron una correlación positiva con la edad, el hábito de fumar y con la exposición a la luz solar. Estos datos sugerirían que los rearrreglos del gen BCL-2 y su sobreexpresión, son necesarios pero no suficientes para inducir neoplasia y que, la participación de otros oncogenes y genes supresores de tumor, serían eventos genéticos adicionales necesarios para la linfomagénesis. De esta manera, la desregulación del gen BCL-2 y la inhibición de la apoptosis serían eventos tempranos en LF, que permiten la persistencia de células B dentro del centro germinal. Estas células adquieren anomalías genéticas secundarias, necesarias para eludir los efectos inhibitorios del gen BCL-2 sobre el ciclo celular y poder alcanzar el fenotipo neoplásico (Willis y Dyer, 2000).

1.4.2. LINFOMA B DIFUSO A CELULAS GRANDES (LBDCG)

El LBDCG es una neoplasia agresiva de células B maduras, clínicamente heterogénea, que representa aproximadamente del 30-40% de los LNH del adulto y corresponde al 31% del total de los LNH (Jaffe y Col., 2001). Si bien en las últimas clasificaciones (Harris, 1997) estos tumores se encuentran categorizados como una única

entidad, hay consenso que ellos constituyen un grupo diverso de neoplasias con características clínicas y genéticas heterogéneas (Alizadeh y Col., 2000).

Afecta generalmente a individuos de la sexta-séptima década de la vida, aunque su rango es amplio, y pueden también ser vistos en población pediátrica (Anon, 1997; Armitage y Weisenburger, 1998). Son más comunes en varones que en mujeres, siendo su etiología aún desconocida. Sin embargo, una inmunodeficiencia de base puede constituir un factor de riesgo. Usualmente se originan *de novo* (primarios), pero pueden representar la progresión o transformación de linfomas menos agresivos o de bajo grado (secundarios). En las últimas décadas se ha ido incrementando su incidencia, independientemente de la presencia del virus HIV como factor de riesgo.

Los pacientes pueden presentar enfermedad nodal o extranodal, observándose esta última en el 40% de los casos (Harris y Col., 1994). El sitio extranodal más común es el tracto gastrointestinal, siendo rara la presentación primaria en médula ósea o sangre periférica. Los pacientes muestran un rápido crecimiento de la masa tumoral con adenopatías indolentes (cervical o supraclavicular) y el 25% de los mismos presentan enfermedad sistémica asociada a un estadio avanzado de la enfermedad (Anon, 1997; Armitage y Weisenburger, 1998; Gatter y Warnke, 2001).

En cuanto a su histopatología, se presenta con un patrón difuso, con destrucción de la arquitectura nodal normal. Citológicamente, presenta células transformadas de gran tamaño con núcleo equivalente o mayor al de un macrófago normal, de contorno nuclear regular o irregular, cromatina laxa con uno o más nucléolos prominentes, con alta actividad mitótica. Su citoplasma es usualmente abundante y moderadamente basófilo. El tejido perinodal suele estar infiltrado. En sitios extranodales, este linfoma forma una masa tumoral, con presencia o no de fibrosis. Desde un punto de vista citológico presenta diferentes variantes morfológicas, difíciles de distinguir: centroblástico, inmunoblástico, rico en células T y anaplásico, siendo la primera la más común.

Los LBDCG presentan el siguiente perfil inmunofenotípico: CD19+, CD20+, CD22+, FMC7+, CD79b+, CD10, CD5, CD25, y CD11c variables, CD103 (-), IgS+/-, CD45+/-, IgC-/+ (Jaffe y Col., 2001). El 30-50% de los mismos expresan Bcl-2; una muy

alta proporción de casos muestra la expresión nuclear de Bcl-6, en tanto que sólo una minoría de estos linfomas muestra la expresión de p53, usualmente asociada con mutaciones de dicho gen. La fracción proliferativa detectada con tinción para Ki-67, suele ser alta (>40%), pudiendo ser mayor al 90% en algunos casos (Gatter y Warnke, 2001).

Estos linfomas son agresivos pero potencialmente curables con múltiples agentes quimioterápicos. El alto índice proliferativo, la expresión de Bcl-2 y la sobreexpresión de p53 son indicadores de pronóstico adverso. Por el contrario, la sobreexpresión del gen BCL-6 ha sido relacionada con mejor pronóstico. Asimismo, se observó que los pacientes con LBDCG originados en células B del centro germinal tienen una sobrevida significativamente más prolongada que aquellos cuyos linfomas presentaban el fenotipo de células B activadas (Armitage y Weisenburger, 1998; Alizadeh y Col., 2000; Gatter y Warnke, 2001).

Desde un punto de vista genético, la mayoría de los casos presentan rearrreglos en los genes de las cadenas liviana y pesada de las inmunoglobulinas, mostrando mutaciones somáticas en las regiones variables de los mismos. Las anomalías cromosómicas más frecuentes de este subtipo histológico son los rearrreglos estructurales a nivel de 3q27, donde se ubica el protooncogen BCL-6, observada en alrededor del 40% de los casos y la translocación del gen BCL-2, t(14;18), detectada en el 15-30% de los pacientes (Chaganti y Col., 2000; Huang y Col., 2002), mientras que el rearrreglo del gen MYC no es común. La infección de células neoplásicas con el virus de Epstein-Barr es más frecuente en casos asociados a una inmunodeficiencia de base.

2. Objetivos

2. OBJETIVOS

Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, el objetivo general de este trabajo de investigación está centrado en la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en el proceso de desarrollo tumoral, con especial énfasis en neoplasias linfoides B y patologías con predisposición al desarrollo neoplásico. Sus objetivos específicos son:

1. Efectuar la caracterización molecular de la longitud telomérica en neoplasias a células B maduras, Mieloma Múltiple (MM) y Linfoma no-Hodgkin, y Enfermedad Celíaca (EC), patología con predisposición al desarrollo de linfomas malignos, mediante el estudio de los fragmentos de restricción terminal (TRFs).
2. Correlacionar el análisis de TRF en células de médula ósea de pacientes con MM y gamopatías monoclonales de significado incierto con parámetros citogenéticos y clínicos de estas entidades.
3. Estudiar la longitud telomérica en muestras de sangre periférica y biopsias de mucosa de intestino delgado de pacientes con EC y de individuos controles y establecer su asociación con la inestabilidad genómica y la predisposición al desarrollo neoplásico que presenta esta patología.
4. Evaluar las regiones teloméricas en linfomas foliculares y B difusos a células grandes y establecer su correlación con rearrreglos moleculares característicos de estas patologías.
5. Analizar la participación de las modificaciones de la longitud telomérica en el desarrollo y progresión neoplásica de las patologías estudiadas.

3. Materiales y Métodos

3. MATERIALES Y METODOS

3.1. POBLACIONES ESTUDIADAS

En el desarrollo de este trabajo se estudiaron 104 individuos, de los cuales 84 fueron pacientes con neoplasias hematológicas: 31 con diagnóstico de MM, 3 de MGUS y 50 con LNH, y 20 pacientes con diagnóstico de EC. Simultáneamente, se evaluaron 12 individuos sanos que constituyeron la población control. En la Tabla 1 se detalla la distribución por edad y sexo de los pacientes estudiados.

Grupo	Número de individuos	Edad media (rango)	Sexo	
			F	M
MM	31	64 (42-78)	17	14
MGUS	3	61	1	2
LNH	50	46 (22-77)	21	29
EC	20	36 (21-69)	16	4

MM: mieloma múltiple; MGUS: gamopatía monoclonales de significado incierto; LNH: linfoma no-Hodgkin; EC: enfermedad celíaca

Las muestras de los pacientes con neoplasias hematológicas fueron obtenidas por el médico hematólogo, previa conformidad y consentimiento informado de los pacientes. Las mismas fueron derivadas de los Departamentos de Oncohematología y Clínica Hematológica del Instituto de Investigaciones Hematológicas *Mariano R. Castex* de la Academia Nacional de Medicina (IIHema-ANM) de Buenos Aires. El diagnóstico histopatológico estuvo a cargo de la División Patología del mismo Instituto. Las muestras de los pacientes con EC fueron derivadas de la Unidad de Soporte Nutricional y Enfermedad Malabsortiva, *Hospital Interzonal General de Agudos "General San Martín"* de La Plata, con la conformidad y el consentimiento informado de los pacientes. Asimismo, los estudios efectuados en este trabajo forman parte de un proyecto de investigación evaluado y aceptado por el Comité de Ética del Instituto.

Se consideró control a todo individuo sano y normal, sin enfermedad aparente ni malformación congénita detectable y que no estuviese medicado al momento del estudio. Los controles de sangre periférica fueron donadores voluntarios provenientes del Servicio de

Hemoterapia del IIHema, los de médula ósea fueron individuos sanos derivados para cultivo de médula ósea y finalmente las biopsias normales correspondieron a personas con presunción serológica de padecer EC pero cuyas biopsias resultaron histológicamente normales.

3.2 TECNICAS UTILIZADAS

3. 2. 1. Extracción y purificación de ADN

Procedimiento

La sangre periférica y/o médula ósea anticoagulada con etilen-diamin-tetra acetato de sodio (EDTA) al 5% se centrifuga durante 10 minutos a 300 g, descartándose el plasma. El remanente se homogeniza por inversión con un volumen de buffer de lisis de glóbulos rojos (RCLB) (Tris/HCl 10 mM pH 8, NaCl 10 mM, MgCl₂ 5 mM), centrifugado 10 min a 300 g. El *pellet* se lava 3-4 veces en 7 ml de RCLB hasta obtener un sobrenadante límpido y un precipitado blancuzco. La muestra es luego homogeneizada en Tris/HCl 10 mM pH 7.8, 5 mM EDTA, 0,5 % dodecil sulfato de sodio (SDS) y digerida con proteinasa K (200 µg/ml) durante una noche a 37° C o, alternativamente, 3 horas a 62° C.

Extracción de ADN con el método de fenol / cloroformo

Se extrae la fase acuosa con un volumen de fenol (saturado en Tris/HCl 0,5 M, pH 8), seguida de otra en un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (IAC) (25:24:1) y una extracción final en un volumen de IAC (Sambrook, 1989). El ADN de alto peso molecular se precipita con 1/10 volúmenes de NaCl 3mM y 1,5 volúmenes de alcohol etílico absoluto (100%).

La concentración del ADN obtenido se estima por espectrofotometría UV (Spectronic 21) a 260 y 280 nm, considerando $1 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \text{ µg ADN doble cadena/ml}$. La estimación de pureza de ácidos nucleicos relativa a proteínas se realiza mediante la relación $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ y se considera adecuada cuando supera el valor de 1,5. La calidad del ADN

en términos de peso molecular se estima mediante electroforesis en minigeles de agarosa al 1% y teñidos con bromuro de etidio (EtBr) 0,25 µg/ml.

3.2.2. Técnica de TRF (Terminal Restriction Fragments)

Materiales y reactivos

- Enzimas de restricción *Hinfl* y *RsaI*.
 - Agarosa
 - Bromuro de Etidio 0,25 µg/ml
 - TBE 1 x: tris/borato 89 mM, EDTA 1 mM
 - Buffer de siembra 6X: 30% glicerol, 0,25% azul de bromofenol (BBF) y 0,25% xilencianol (XXC) en agua deionizada.
 - Membranas de nylon (ZetaProbe GT, Bio-Rad)
1. HCl 0,25N
- NaOH 0,4M
 - Tris/HCl 0,5 M, NaCl 1,5M
 - Solución salina citrato de sodio (SSC) (1X: 150mM cloruro de sodio y 15mM citrato de sodio).
 - Solución de pre-hibridación: 5xSSC, 5xDenhardt (Ficoll 0,5 g, polivinilpirrolidona 0,5g y seroalbúmina bovina, BSA 0,5 g), 0,5% SDS, Na₂HPO₄ 0,1M, 20% v/v de formamida deionizada, 3% BLOTTO (Bovine Lactato Transfer Technique Optimizer).
 - Oligonucleótido (TTAGGG)₇ 5 pmoles/µl (15 picomoles por membrana).
 - [³²P] dATP 150 µCi por cada membrana a hibridar.
 - Columnas Sephadex G-50.

Procedimiento

Digestión de ADN genómico con enzimas de restricción

Para el análisis por *Southern blot* se extrajo ADN genómico de células de médula ósea, sangre periférica o biopsias, efectuándose doble digestión de 10 µg de ADN genómico de cada muestra o control en el buffer de restricción recomendado por el fabricante con las enzimas de restricción *Hinfl* y *RsaI* -ambas cortan fuera del motivo de las repeticiones teloméricas- a 37°C durante una noche. Para *RsaI* y *Hinfl*, juntas, se emplea una digestión en 1x buffer C (Promega) (10 mM Tris-HCl pH 7.9, 50 mM NaCl, 10mM MgCl₂ y 1 mM de ditioneitol, DTT), utilizándose una actividad específica de 5U de cada enzima por µg de ADN, es decir 10 µg de ADN se incuban con 50U de cada enzima. Ambas se agregan en un único pulso al comienzo de la reacción y se incuban a 37° C durante 16-20 hs.

Electroforesis y transferencia (*Southern blot*)

Una alícuota de 1 µl de los digestos de restricción son sometidos a electroforesis en minigeles de agarosa al 1% para verificar digestión completa. Luego se los separa analíticamente mediante electroforesis en geles de agarosa (11 x 14 cm y 15 x 22 cm) al 0,8%, EtBr 0,25 µg/ml preparados en buffer 0,5xTBE (TBE 1 x: Tris/Borato 89 mM, EDTA 1 mM) corridos a 2-5 V/cm, durante 20-24 hs a 35V y a temperatura ambiente. El buffer de siembra 6x contiene 30% de glicerol, 0,25% de azul de bromofenol y 0,25% de xilencianol en agua deionizada. Junto a las muestras se siembra el bacteriófago lambda digerido con la enzima de restricción *HindIII* (λ /*HindIII*) como marcador de peso molecular. Los geles se visualizan sobre transiluminador UV de 300 nm.

Luego de la electroforesis se realiza la transferencia del ADN a una membrana de nylon como soporte sólido (ZetaProbe GT, Bio-Rad) en condiciones de alta fuerza iónica (Sambrook, 1989). Para ello, previamente se incuban los geles 15 min en HCl 0,25N (depuración), se los desnaturaliza 30 min en solución alcalina de NaOH 0,4M (con cambio de solución a los 15 min), se los neutraliza 40 min en Tris/HCl 0,5 M, NaCl 1,5 M (con cambio de solución a los 20 min) y se lavan en 2xSSC (1,5 M cloruro de sodio y 0,15 M citrato de sodio). Las transferencias se realizan por capilaridad en 10xSSC durante una noche, como fue descripto por Southern (1975). Al día siguiente las membranas se lavan en 2xSSC y

el ADN transferido se fija covalentemente (*crosslinking*) por exposición a luz UV (300 nm) durante 10 minutos seguido de horneado a 80° C durante 2 horas.

Preparación de la sonda para *Southern blot*

Los oligonucleótidos para ser usados como sondas son sometidos a marcación isotópica por el método de *5' end-labelling*. Una alícuota de 15 pmol de la sonda telomérica (TTAGGG)₇ es marcada a través de la reacción de *5' end-labelling*, en un volumen final de 25µl conteniendo 150 µCi de [γ^{32} P] dATP (3.000 Ci/mmol) en buffer kinasa (70mM Tris-HCl (pH 7.6), 100mM MgCl₂ y 5 mM DTT) durante 45 min a 37°C con 5 unidades de la enzima T4 polinucleótido kinasa. La sonda se aísla por cromatografía de exclusión molecular en columnas *Sephadex* G-50 y se la obtiene en la fracción eluída con el volumen muerto de las Nick columns o bien, del eluído de las Spun columns (ProbeQuant G-50 micro columns), reservándose para la posterior hibridación de las membranas.

Hibridación con sondas radioactivas

Se colocan las membranas en solución de pre-hibridación: 5xSSC, 5xDenhardt (Ficoll 0,5 g, polivinilpirrolidona 0,5 g y BSA 0,5 g), 0,5% SDS, Na₂HPO₄ 0,1M, 20% v/v de formamida deionizada y 0,3% BLOTTO (Johnson, 1984), 1x BLOTTO: 5% leche en polvo descremada (0% grasa) disuelto en agua, durante 4-5 hs a 42° C en estufa de hibridación (Techne). Esta última modificación que se puede utilizar para favorecer hibridaciones de secuencias repetitivas en el genoma, se agregó para mejorar la eliminación del 'background' de las membranas. Finalmente, se incorpora la sonda obtenida sobre la solución de pre-hibridación, incubando las membranas a 42° C durante una noche.

Luego, se realizan secuencialmente lavados: a temperatura ambiente, 15 min en 2xSSC/ 1% SDS a 50°C, 30 min en 1xSSC/ 0,1% SDS y, si aún hubiera excesiva marca en los bordes de la membrana, un tercer o más lavados en la última solución a 55-60°C. Las membranas hibridadas y lavadas son expuestas a películas radiográficas (CURIX ORTHO ST-G2, AGFA) en chasis de 25 x 30 cm entre pantallas intensificadoras, a -70° C durante 3-10 días. Las placas autorradiográficas son reveladas, fijadas, lavadas y secadas en procesador automático.

Interpretación de resultados

El estudio de la longitud telomérica por *Southern blot*, a través del análisis de TRF usando la sonda correspondiente a las repeticiones teloméricas (TTAGGG)₇ y las enzimas de restricción *RsaI* y *HinfI*, se basa en el principio que estas enzimas no cortan dentro del core de las repeticiones teloméricas, pero por ser de corte muy frecuente, lo hacen en regiones muy cercanas al comienzo de las mismas, generando la liberación de fragmentos representativos de las longitudes de los telómeros. Este procedimiento permite ver la presencia de señal de hibridación en forma de chorreado, correspondiente a todas las poblaciones de telómeros de distintas longitudes de un determinado tejido o tipo celular (Figura 3). Las placas se evalúan mediante análisis densitométrico de cada calle respecto del marcador de peso molecular λ /*HindIII* con el 'software' Image Master 1D Prime (Pharmacia-Biotech). La media de longitud telomérica de cada muestra es evaluada en el rango de 2-23 Kb y calculada considerando los picos observados.

Se considera pico de TRF de cada tejido analizado a la mayor intensidad de banda detectada por densitometría dentro de ese chorreado, correspondiendo ese peso molecular a la región donde se localiza la mayor cantidad de telómeros. Se observan picos teloméricos de mayores pesos moleculares en los tejidos jóvenes, como sangre de cordón umbilical (CU) (control negativo de acortamiento telomérico) y menores pesos moleculares o telómeros más acortados en líneas celulares donde hay células maduras con un alto índice de proliferación (controles positivos de acortamiento). Pueden obtenerse uno o más picos teloméricos por cada muestra, en cuyo caso podrá interpretarse a qué población corresponde cada uno de ellos. Los valores individuales de TRFs obtenidos mediante el análisis densitométrico se promedian y se comparan con los controles normales, positivos y negativos. En este trabajo los valores medios de TRF en la línea celular K-562 (control positivo) y CU (control negativo) fueron: $5,20 \pm 0,10$ y $14,50 \pm 1,10$ Kb, respectivamente.

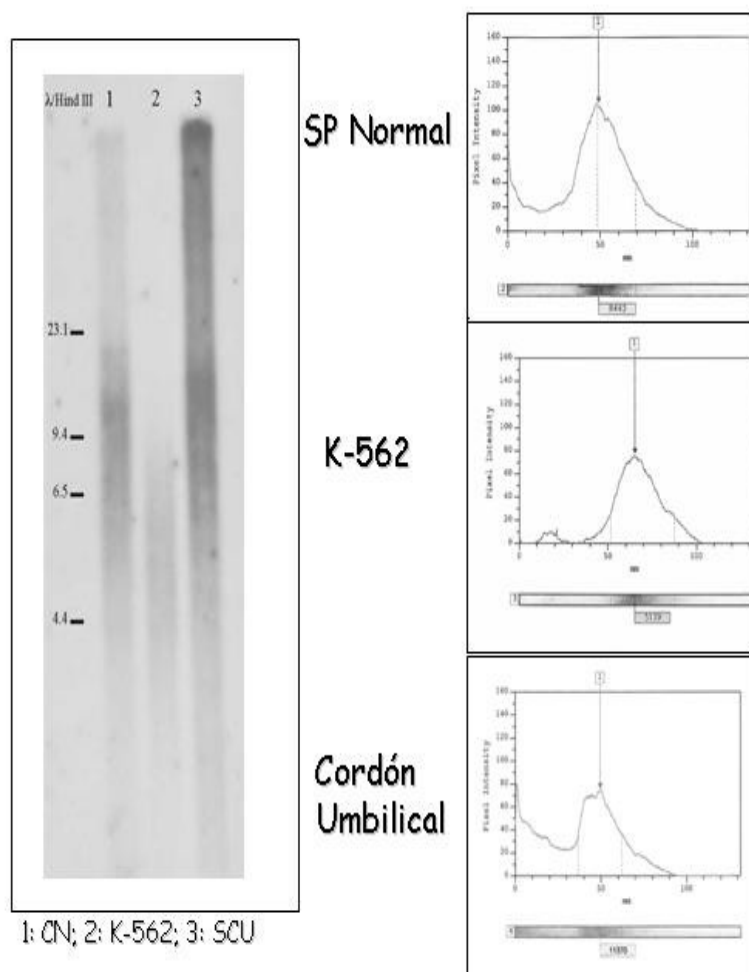


Figura 3: a) Autorradiografía mostrando los TRF de sangre periférica de un control normal (CN), la línea celular K-562 y sangre de cordón umbilical (CU), con sus respectivos perfiles de LT obtenidos por análisis densitométrico de cada una de las muestras analizadas.

3.2.3. Validación del método de TRF

Dado que los valores de LT correlacionan inversamente con la edad en individuos normales, consideramos necesario efectuar la validación de nuestra metodología de trabajo. Para ello se realizó la correlación entre los valores de TRF y la edad en 18 controles, incluyendo 12 muestras de sangre periférica de individuos normales y 6 de CU, obteniéndose una correlación negativa entre estos dos parámetros ($r=0,623$; $p<0,0001$) (Figura 4).

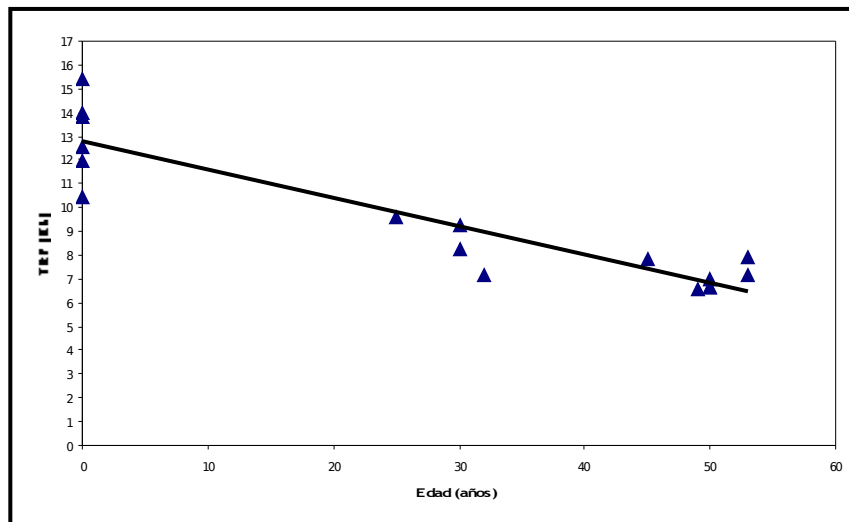


Figura 4: Correlación entre los valores de TRF y la edad en controles para validar el método de TRF

3.3. CULTIVO DE MÉDULA ÓSEA

Soluciones utilizadas

- Medio de cultivo F-12
- Suero Fetal Bovino (SFB)
- Antibióticos (Solución de gentamicina: 1 ml por cada 100 ml de medio)
- Pockweed Mitogen (PWM) (Lectina soluble de *Phytolacca americana* (uva de España)
- L-glutamina al 1%.
- Solución hipotónica KCl (0,075M)
- Colchicina: Demecolcin (CIBA) en agua bidestilada (solución madre de 10µg/ml).
- Fijador Metanol: Acido acético glacial (3:1)

Procedimiento

Se efectúan dos tipos de cultivos de médula ósea: con y sin estimulación mitogénica. Todos los cultivos se realizan por duplicado. Se parte de 0,5 a 1 ml de médula ósea extraída con jeringa estéril heparinizada. Se realiza el cultivo en medio F-12 suplementado con 15% de SFB, con el agregado de antibióticos y L-glutamina. Se incuba

en estufa gaseada con CO₂ a 37°C, durante 19-24 horas. Los cultivos estimulados con PWM (concentración final 20µg/ml) se incuban durante 96 hs a 37°C. El PWM induce la división de los linfocitos B y T. También es capaz de estimular la diferenciación de células B.

Una vez transcurrido ese tiempo, se adiciona Colchicina (concentración final 0,1 µg/ml) para detener la división celular en metafase, incubando a 37°C durante 1 hora. Luego, se centrifuga 10 minutos a 600/800 rpm. Se descarta el sobrenadante y se someten los cultivos a shock hipotónico adicionando solución de KCl 0,075M, resuspendiendo suavemente y dejando actuar 30 minutos a 37°C.

La hipotonía se detiene agregando algunas gotas de fijador metanol: ácido acético glacial (3:1), centrifugando 10 minutos a 600/800 rpm. Se descarta el sobrenadante. Se agrega fijador al pellet de células, se resuspende nuevamente, manteniendo 20 minutos a temperatura ambiente. Se centrifuga, descartando el sobrenadante. Estos lavados se repiten 4 o 5 veces y luego se diluye con fijador a una concentración adecuada. La suspensión de células se extiende sobre portaobjetos limpios y secos. Se deja secar al aire.

3.4 TECNICAS CITOGENÉTICAS

3.4.1 Bando G

Soluciones utilizadas:

- Solución madre de tripsina (DIFCO) al 1% en agua bidestilada
- HNa₂PO₄ 0,2 N
- NaCl 9‰

En el momento de utilizar se prepara una solución de tripsina al 0,1 % (dilución 1:10 con partes iguales de soluciones de HNa₂PO₄ 0,2 N y NaCl 9‰).

- Buffer de Sorensen:
H₂KPO₄ 0,067 M (Solución A)
HNa₂PO₄ 0,067 M (Solución B)

Se mezclan partes iguales de las soluciones A y B a fin de obtener un pH 6,8

- Solución de Giemsa (Merck)

Procedimiento:

Se emplea una modificación de la técnica de Seabright (1971) que utiliza una digestión con tripsina, para evidenciar las bandas G que se tiñen con Giemsa. Se sumergen los preparados con un envejecimiento preferentemente de más de 7 días en la solución de tripsina 0,1 % a 37°C, durante tiempos variables de acuerdo a las características del mismo (aproximadamente 1 segundo por día de extendido). Se colorean los preparados con solución de Giemsa 1:10 en buffer de Sorensen durante 3 minutos, luego se lava con abundante agua corriente, se deja secar al aire. Se observa al microscopio con 1000 X.

Esta técnica permite identificar los pares de cromosomas homólogos de acuerdo al patrón de diferenciación longitudinal de bandas, establecido en la Conferencia de París (París Conference, 1971) (Figura 5).

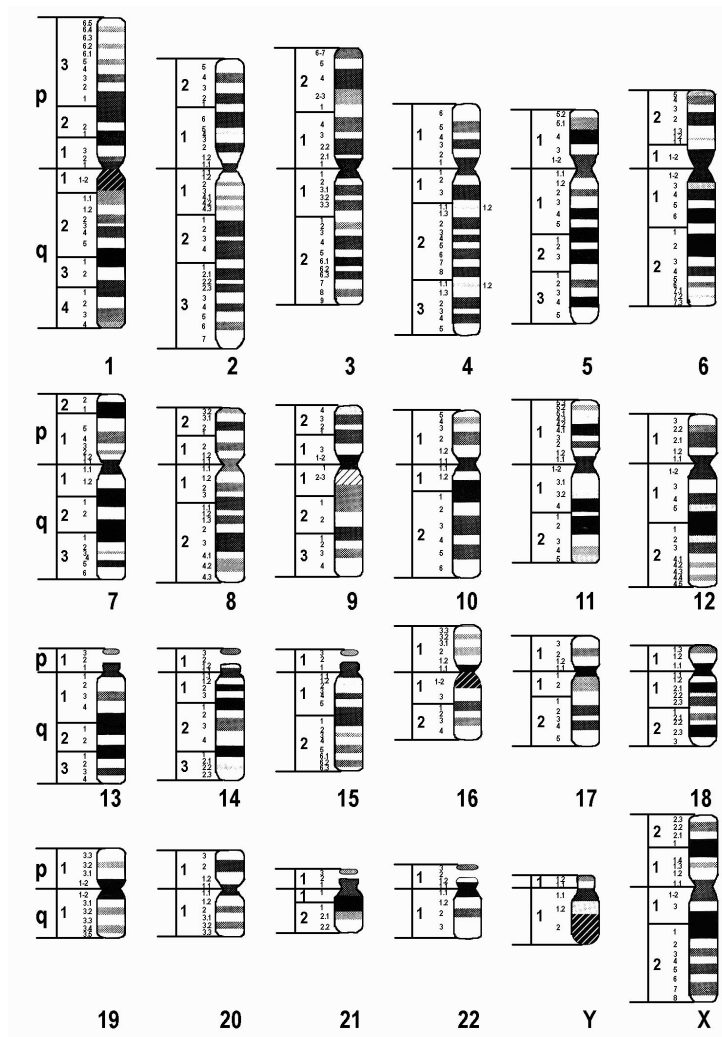


Figura 5: Patrón de bandas G (París Conference, 1971)

3.4.2 Análisis cromosómico y de asociaciones teloméricas (TAs)

El estudio cromosómico se efectúa mediante la observación directa al microscopio de 2-3 metafases con tinción clásica o standard a fin de determinar el número modal y las características citogenéticas generales del material. Este análisis se completa con la evaluación de al menos 11 metafases con bandeado G. En caso de detectarse alguna anomalía, se obtienen fotografías y se confeccionan los cariotipos de dichas células.

Para el análisis de TAs se efectúa la observación directa al microscopio de 50 metafases por individuo con tinción standard (Giemsa 1:10) a fin de determinar la presencia

de asociaciones teloméricas (TAs). Se consideraron dos tipos de TAs: asociación simple de cromátides (S-S) y asociación doble de cromátides (D-D) (Pathak, 1988) (Figura 6). El análisis de TAs fue efectuado en 6 muestras de médula ósea normales que fueron utilizadas como controles (mediana de edad 35 años, rango 24-40 años). Para ambos análisis se empleó la nomenclatura establecida en el International System for Human Cytogenetic Nomenclature (ISCN, 1995). Las metafases fueron impresas usando un sistema de video cámara y una impresora Video Graphic Printer UP-890 MD SONY.



Figura 6: Metafase mostrando una TAs de simple cromátide (S-S) con técnica de coloración standard

3.5. Análisis estadístico

La comparación de los datos obtenidos de los pacientes y controles fue efectuada empleando el test t' de Student. y el test no paramétrico de Kruskal-Wallis. Se empleó el test de t' para muestras pareadas para comparar las longitudes teloméricas de sangre periférica y biopsias en cada uno de los pacientes con EC. Las correlaciones se efectuaron empleando el coeficiente de Kendall.

4. Mieloma Múltiple

4. MIELOMA MULTIPLE

4.1. Pacientes

Se estudiaron 31 muestras de médula ósea de 29 pacientes con MM (16 mujeres y 13 varones) y tres casos con MGUS (1 mujer y 2 varones) (Tabla 2). El número de casos con MGUS es mucho menor debido a que es infrecuente efectuar a estos pacientes punción de médula ósea. El diagnóstico de MM fue definido de acuerdo a los criterios propuestos por Durie y Salmon (1975), el 87,1% de los pacientes presentó estadio III. Doce pacientes fueron estudiados al diagnóstico antes de comenzar algún tipo de tratamiento, 11 casos en la recaída después de al menos dos regímenes de quimioterapia, y 8 fueron examinados durante la remisión: 6 en remisión parcial y 2 en remisión completa. El valor medio de la β_2 M al diagnóstico, parámetro de importancia pronóstica, fue $8,98 \pm 1,61$ $\mu\text{g/ml}$ (rango: 1,9-30 $\mu\text{g/ml}$) (valores normales: $<2,30$ $\mu\text{g/ml}$ hasta 60 años; $<3,0$ $\mu\text{g/ml}$ para mayores de 60 años), mostrando el 92% de nuestros casos niveles aumentados de β_2 M. El valor medio de células plasmáticas en médula ósea fue de 38,3%, distribuidos en: 35,5% de los pacientes con $<30\%$, 35,5% con 30%-60%, y 29% con valores $>60\%$ (Tabla 2). Los pacientes con MGUS mostraron un valor medio de células plasmáticas en médula ósea del 9%.

4.2. RESULTADOS

4.2.1. Análisis de longitud telomérica

Se estudió la longitud telomérica en células de médula ósea provenientes de pacientes con MM y MGUS, mediante la técnica de TRF. Dicho análisis en el total de pacientes con MM reveló un valor medio de picos de TRF ($X \pm ES$) de: $5,20 \pm 0,35$ Kb (rango 2,69-9,44Kb), que resultó significativamente más corto que el observado en dadores normales: $8,50 \pm 0,50$ Kb (rango 7,30-8,11Kb) ($p < 0,001$). Pese a que la edad media de los controles normales fue menor que la de la población con MM, cuando se los pareó con pacientes de edades comparables, los valores de TRF de MM fueron significativamente más cortos que los de dadores normales ($p < 0,01$).

Dado que en la médula ósea de los pacientes con MM coexisten dos componentes, uno tumoral y otro de células normales, se trató de evaluar la presencia de los mismos en nuestra población. Dieciocho de las 31 muestras (54%) de MM mostraron dos picos de alta intensidad (Tabla 2) con valores medios de TRF de: $9,07 \pm 0,43\text{Kb}$ y $5,03 \pm 0,38\text{Kb}$, correspondiendo el peso molecular de mayor tamaño a los TRF de las células normales y el pico menor al componente tumoral (Engelhardt, 1998). La notación de los dos picos presentes en cada uno de los pacientes se realizó consignando los dos valores separados por un símbolo mas (+) (Tabla 2). El análisis de TRF en MGUS, mostró en dos casos un solo pico, uno similar a los valores normales ($11,92\text{Kb}$) y el otro con TRFs semejantes a los pacientes con MM ($5,76\text{Kb}$), en tanto que en el restante, se observaron dos picos ($9,36\text{Kb}$ y $3,8\text{Kb}$), probablemente representando a ambas poblaciones celulares, normal y patológica, respectivamente.

Tabla 2: Resultados individuales de TRF, citogenética, FISH y TAs de pacientes con MM

Caso	Edad/ Sexo	Estadio clínico al diagnóstico	CP en MO (%)	TRF (Kb) Pico	Citogenética	del 13q14 (%)	TAs (%)
Diagnóstico							
1		IIIA	30	3,22	46,XX	5,9	10,00
2	49/M	IIIB	32	7,16	ND	6,6	ND
3	72/F	IIA	30	8,64+3,94	ND	ND	ND
4	60/M	IIIA	50	9,44+6,64	46,XY	3,7	20,60
5	67/M	IIIA	50	2,69	46,XY, del (6) (q15) (57%)	8,1	32,00
6	59/F	IIIA	45	13,15+8,80	46,XX	24,6	12,00
7	67/F	IIIA	60	11,57+4,15	ND	8,4	ND
8	54/M	IIIA	85	4,02	46,XY	4,9	24,00
9	61/M	IIIA	50	3,05	ND	6,7	ND
10	64/F	IIIA	60	9,14+3,10	46,XX	50,9	20,00
11	67/F	IIIA	65	7,22+2,87	46,XX	19,0	18,36
12	78/F	IIIA	95	3,47	ND	ND	ND
Recaída							
13	45/M	IIIA	30	4,28	ND	ND	ND
14	66/F	IIA	25	6,57	46,XX	5,8	ND
15	68/M	IIIA	0	9,93+6,60	ND	10	ND
16	54/M	IIA	0	6,83+3,63	46,XY	6,7	28,26
17	61/M	IIIA	90	8,85+3,96	46,XY (43)/cc * (38%)/ 46,XY,del(16)(q13) (19)	13	42,85
18	74/F	IIIA	50	8,00	46,XX	7,5	18,75
19	57/F	IIIA	0	9,44	46,XX	13	8,00
20	66/M	IIIA	77	6,75+3,77	ND	7,3	ND
21	44/F	IIIA	35	10,50+4,67	46,XX	7,4	16,00
22	63/F	IIIA	85	7,58+3,44	46,XX, t(2;3) (q33;q21) (18,2%)	13,7	15,40
23	70/M	IIIA	60	3,40	47,XY, +3 (12,5%)	ND	18,00
Remisión							
RP							
24	42/M	IIIA	0	7,63+6,57	46,XY, t(3; 14) (q27;q32) (12,5%)	ND	ND
25	62/M	IIIA	15	8,44	46, XY	4,9	18,00
26	52/F	IA	2	7,18+4,87	46, XX#	4,9	20,00
27	77/F	IIIA	16	7,98+5,49	ND	ND	ND
28	62/M	IIIA	5	10,29+6,64	46, XY	6,0	ND
29	65/F	IIIA	40	11,63+4,89	46, XX	11	10,00
RC							
30	48/F	IIIA	5	9,03+6,60	46,XX	10,3	18,00
31	60/F	IIIA	0	7,06	ND	13,5	ND
MGUS							
1	54/M	-	8	11,92	46,XY	3,5	8,00
2	77/F	-	10	9,36+3,8	46,XX	5,3	4,25
3	61/M	-	10	5,76	ND	8,5	ND

CP en MO: Células plasmáticas en MO; RP: remisión parcial; RC: remisión completa; cc: cariotipo complejo; #: +13 por FISH (6,3%); * 45-46, XY, -1, der (1) del (1) (p36;q25), der (5) t(1;5)(q10-q35), del(5) (q13), +10, add (11) (p15), del (11)(p11), der (13) t(2;13)(q11;p11), del (16) (q13); ND: No Determinado

4.2.1.1. Análisis de TRF acorde al momento de la enfermedad

Los TRF obtenidos fueron analizados en función del momento de la enfermedad: diagnóstico, recaída y remisión (Tabla 2). El último grupo incluyó los pacientes en remisión parcial y remisión completa debido al pequeño número de casos y la similitud en los valores de TRF. Este análisis estadístico mostró un acortamiento telomérico significativo al diagnóstico y en recaída respecto de los controles ($p < 0,001$). Además, ambos grupos presentaron valores más bajos que en remisión ($p < 0,001$), no encontrándose diferencias entre los grupos diagnóstico y recaída. Los pacientes en remisión no mostraron diferencias estadísticas respecto a los controles (Tabla 3). En la Figura 7 se presenta la distribución de los valores de TRF en pacientes al diagnóstico, recaída y remisión. Es interesante remarcar que en dos casos fue posible analizar muestras de médula ósea al diagnóstico (casos 9 y 10) y en remisión parcial (casos 28 y 29), observándose una restitución de la longitud telomérica en la remisión.

Tabla 3: Valores medios de TRF de acuerdo al momento de la enfermedad, el cariotipo y el porcentaje de CP en MO en pacientes con MM y controles

Grupos	Número de casos	TRFs (Kb) ($X \pm SE$)	(rango)
CN	12	8,50 \pm 0,42	(7,30-11,80)
MM total	31	5,20 \pm 0,35*	(2,69-9,44)
MM D	12	4,42 \pm 0,57*#	(2,69-8,80)
MM R	11	5,25 \pm 0,62*#	(3,40-9,44)
MM RE	8	6,32 \pm 0,42	(4,87-8,44)
<u>CP en MO</u>			
<30%	11	6,54 \pm 0,47	(3,63-9,44)
30-60%	11	5,21 \pm 0,63	(2,69-8,80)
>60%	9	3,56 \pm 0,14♦	(2,87-4,15)
CaN	15	5,83 \pm 0,57	(2,87-8,80)
CaA	6	4,15 \pm 0,56●	(2,69-6,57)
RG	11	5,10 \pm 0,74	(2,69-8,80)

CN: Controles Normales; D: Diagnóstico; R: Recaída; RE: Remisión; CaN: Cariotipo Normal; CaA: Cariotipo Anormal; CP en MO: células plasmáticas en médula ósea; RG: rearrreglos genómicos detectados por citogenética y/o FISH.

* Diferencias estadísticas respecto a CN y #RE ($p < 0,001$)

♦ Diferencias estadísticas respecto a <30% ($p < 0,001$) y 30-60% ($p < 0,025$)

● Diferencias estadísticas respecto a CaN: ($p < 0,05$)

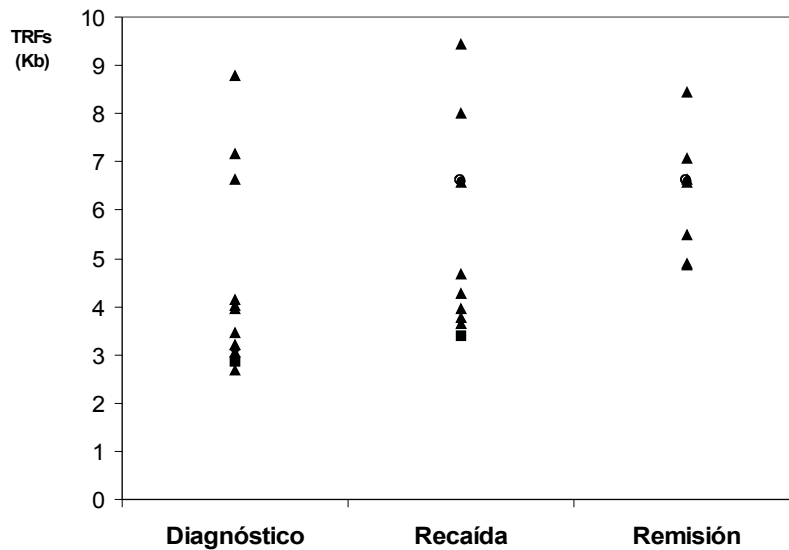


Figura 7: Distribución de TRF de pacientes con MM al diagnóstico, recaída y remisión

4.2.1.2. TRF y porcentaje de infiltración de la médula ósea

Por otro lado, se correlacionaron los valores de TRF con el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea teniendo en cuenta los tres grupos en los cuales fueron subdivididos los pacientes: <30%, 30-60% y >60%. Los pacientes con más del 60% de células plasmáticas en médula ósea mostraron un acortamiento estadísticamente significativo respecto de los otros dos grupos ($p < 0,001$ y $p < 0,025$ para <30% y 30-60%, respectivamente) (Tabla 3). El 64% de los casos del grupo con 30%-60% de células plasmáticas en médula ósea correspondieron a pacientes al diagnóstico, en tanto que el 87% de los pacientes en remisión mostraron valores de células plasmáticas en médula ósea inferiores al 30%. En la Figura 8a se muestra la distribución de los picos de TRF de acuerdo a dichos porcentajes. Asimismo, se encontró una fuerte correlación negativa entre los valores de TRF y el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea ($rK = -0,540$; $p = 0,002$) (Figura 8b), observándose altos niveles de TRF a bajos porcentajes de células plasmáticas y menores longitudes teloméricas a mayor infiltración de la médula ósea.

TRFs e infiltración de MO en MM

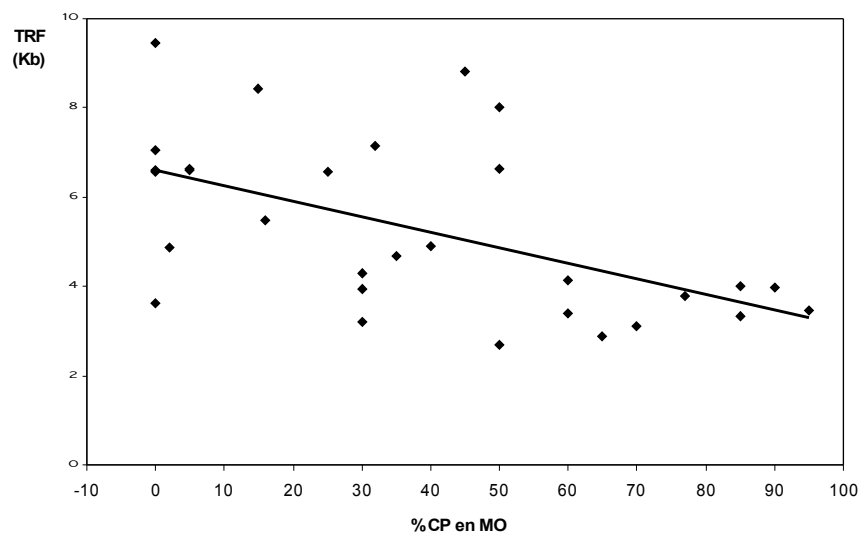
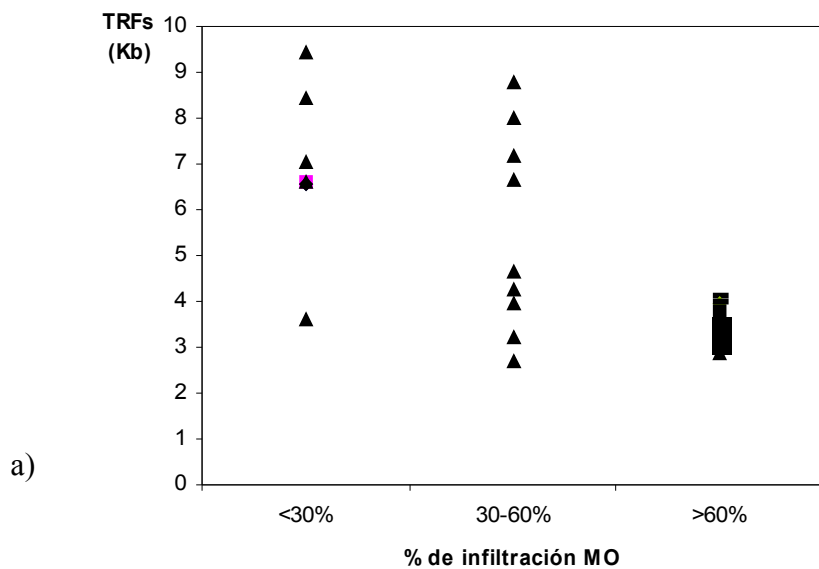


Figura 8: a) Distribución de los valores de TRF de acuerdo al porcentaje de CP en MO; b) Correlación entre los valores de TRF y el porcentaje de CP en MO

4.2.1.3. TRF y rearrreglos genómicos

Se efectuaron estudios citogenéticos en 21 pacientes con MM, 6 de ellos (28,6%) presentaron anomalías cromosómicas clonales: del(6)(q15), t(2;3)(q33;q21), t(3;14) (q27;q32), +3, +13 por FISH (caso 26) y un paciente (caso 17) mostró un cariotipo muy complejo (indicado al pie de la Tabla 2, Figura 9). Este grupo mostró un valor medio de TRF que resultó ser significativamente más corto que el observado en pacientes con cariotipos normales ($p < 0,05$) (Tabla 3). Conjuntamente se realizó el análisis de RB-1 por FISH en 25 casos, 7 de los cuales (28%) mostraron la monosomía de dicho gen (Tabla 2). El 57,1% de estos pacientes presentó altos niveles de células plasmáticas en médula ósea (60-90%). El porcentaje medio de células con delección monoalélica de 13q14 fue del 17,6% (rango: 13%-50,9%). Sólo dos casos mostraron en forma simultánea la presencia de anomalías citogenéticas, junto con la delección 13q14 (casos 17 y 22). En total, empleando las dos técnicas, se pudo detectar un 40,75% de los pacientes con rearrreglos genómicos. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de TRF de pacientes con monosomía ($5,52 \pm 1,07 \text{Kb}$, rango 2,87-9,44Kb) y aquellos sin rearrreglos genómicos ($5,50 \pm 0,44 \text{Kb}$, rango 3,05-8,44Kb). Los casos con MGUS mostraron cariotipos normales y no presentaron pérdida de RB1.

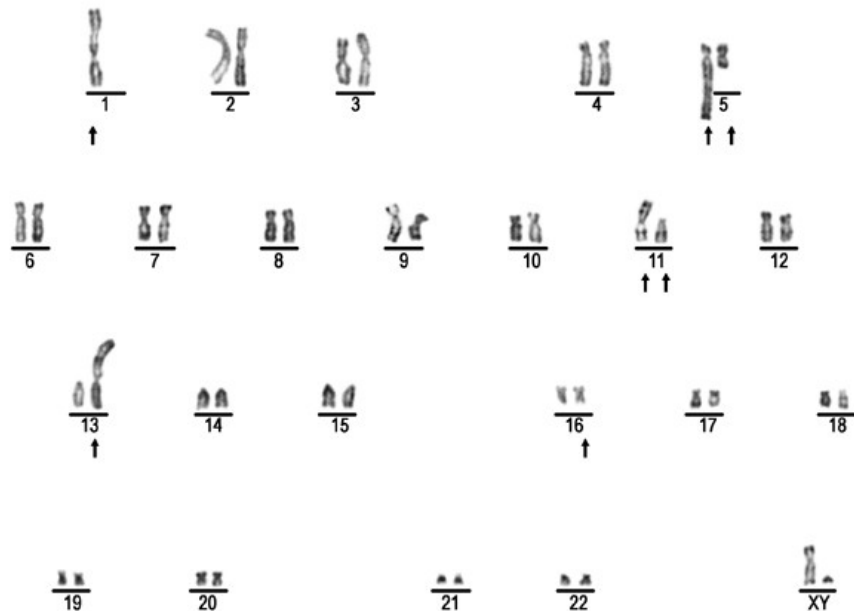


Figura 9: Cariotipo del Caso 17 mostrando los marcadores: der (1) del (1) (p36;q25), der (5) t(1;5)(q10-q35), del(5) (q13), add (11) (p15), del (11)(p11), der (13) t(2;13)(q11;p11), del (16) (q13)

4.2.2. Análisis de TAs

Simultáneamente, se efectuó el análisis citogenético de TAs en 18 pacientes con MM, detectándose un importante incremento en el porcentaje de las mismas ($19,46\pm 1,98\%$) respecto de los controles normales de médula ósea ($2,00\pm 0,93\%$), ($p<0,001$). En los pacientes se encontraron frecuencias individuales de TAs marcadamente aumentadas, con un rango entre 8 y 42,75%. Además, es interesante puntualizar que de los 4 pacientes que tuvieron más de una TAs por célula, 3 (75%) mostraron cariotipos anormales. No se detectaron diferencias estadísticas de importancia al comparar las frecuencias de TAs con el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea, la presencia de la deleción en 13q14 y el cariotipo predominante. No obstante, se observaron frecuencias aumentadas de TAs en el grupo con anomalías cromosómicas ($27,06\pm 6,40\%$) respecto del que presentaba cariotipos normales ($17,07\pm 1,62\%$) así como en los pacientes al diagnóstico y en recaída ($19,56\pm 2,78\%$ y $21,02\pm 4,26\%$, respectivamente) respecto de los de remisión ($16,05\pm 2,21\%$) y los pacientes pertenecientes al grupo con $>60\%$ de células plasmáticas en médula ósea ($23,10\pm 4,11\%$) en comparación con los otros grupos (Figura 10). Todas estas observaciones indican una tendencia a mostrar altas frecuencias de TAs al producirse una reducción telomérica evidenciada por menores valores de TRF. Además, en MGUS el porcentaje de TAs observado ($6,12\pm 1,87\%$) fue intermedio y resultó significativamente diferente de los valores de pacientes con MM, así como de los controles ($p<0,001$).

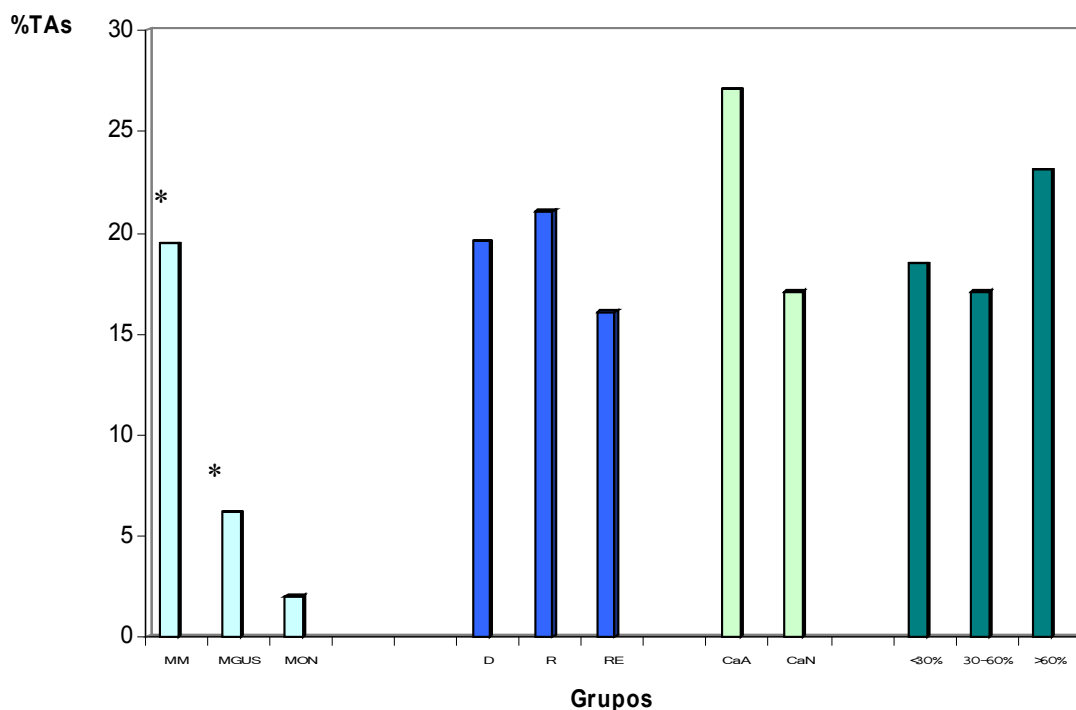


Figura 10: Porcentaje de TAs en MM, MGUS y Controles. Distribución de acuerdo al momento del estudio, el cariotipo y el % de CP en MO.

MON: MO normal; D: Diagnóstico; R: Recaída; RE: Remisión; CaA: Cariotipos Anormales; CaN: Cariotipos Normales; * $p < 0,001$

4.3 DISCUSION

En este capítulo, se ha estudiado la longitud telomérica medida por TRF en pacientes con MM y MGUS, detectándose una reducción significativa de la misma, particularmente en pacientes al diagnóstico y durante la recaída, con una restitución de los valores de TRF durante la remisión, similar a lo observado en leucemias agudas, síndromes mielodisplásicos y neoplasias hematológicas pediátricas (Ohyashiki y Col., 1994; Counter y Col., 1995; Engelhardt y Martens, 1998).

Resulta interesante remarcar que el valor medio de TRF encontrado en este trabajo (5,20Kb; rango 2,69-9,44 Kb), es similar al detectado recientemente (5,30 Kb; rango 3-15 Kb) (Wu y Col., 2003), estudiando células CD138+ aisladas de médula ósea de pacientes con MM.

Estos resultados son además consistentes con la presencia de una elevada actividad de telomerasa previamente observada en pacientes con MM (Xu, 2001), sugiriendo que ambos, el acortamiento telomérico y la actividad de telomerasa, podrían jugar un rol importante en la patogénesis de esta entidad (Hallek y Col., 1998). En cuanto a los pacientes con MGUS, su frecuente ocurrencia y su posible evolución a MM, determina la importancia de correlacionar diferentes variables con el riesgo de transformación maligna (Bladé y Col., 1992; Hallek y Col., 1998). Si bien se estudiaron sólo tres casos, la presencia de un pico de TRF de bajo peso molecular en dos de ellos estaría indicando la posibilidad de detectar una población celular patológica con acortamiento telomérico en pacientes con esta patología. Por otra parte, Xu y colaboradores (2001), encontraron altos niveles de actividad de telomerasa en MM, en tanto que observaron valores normales en MGUS. Esto apoyaría nuestros hallazgos de acortamiento telomérico en MM y longitud telomérica normales en MGUS y la probable participación de los telómeros en el proceso de transformación maligna.

Por otro lado, encontramos un aumento significativo de TAs en células de médula ósea de estos pacientes respecto de células de médula ósea de controles normales, reflejando la presencia de inestabilidad cromosómica en los primeros. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados de acortamiento telomérico ya descriptos y apoyan la idea de que una reducción en la longitud telomérica se encontraría asociada a frecuencias elevadas de TAs e inestabilidad genómica (Counter y Col., 1992; Kim y Col., 1994; Riboni y Col., 1997, Slijepcevic y Bryant, 1998). La misma estaría relacionada con un incremento en la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genéticos de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico. Además, observamos un incremento de TAs en pacientes con MGUS respecto de los controles, con valores intermedios entre células de médula ósea normal y de MM. De esta manera, nuestros resultados sustentarían la hipótesis de que los procesos que llevan a inestabilidad cariotípica empezarían en MGUS (Dalton y Col., 2001) y sugerirían la importancia de continuar este tipo de estudios, a fin de determinar si estos parámetros pueden estar relacionados con la evolución a MM. Un estudio reciente en células plasmáticas de pacientes con MM y MGUS muestra diferentes niveles de expresión de moléculas involucradas en la presentación antigénica y coestimuladoras en ambas entidades, consistentes con la disminución progresiva de las

capacidades inmunomoduladoras de dichas células plasmáticas en MM (Pérez-Andrés y Col., 2005).

Datos previos han sugerido que el aumento de actividad de telomerasa y el acortamiento telomérico estarían relacionados con la progresión de la enfermedad (Bechter y Col., 1998). Particularmente, un estudio reciente en MM (Shiratsuchi y Col., 2002) encontró una correlación entre la actividad de telomerasa, la capacidad proliferativa y la masa tumoral. En este aspecto, en nuestros pacientes con MM se observó una fuerte correlación negativa entre la presencia de telómeros cortos y el porcentaje de células plasmáticas en médula ósea, uno de los factores que refleja masa tumoral, sustentando una probable asociación con la evolución clínica.

Por otro lado, es importante puntualizar que si bien el grupo de pacientes estudiado no fue numeroso, el valor medio de picos de TRF en nuestros casos con anomalías cromosómicas clonales, fue significativamente menor que el observado para pacientes con MM con cariotipos normales. Estos hallazgos acuerdan con resultados recientemente publicados que muestran una correlación negativa entre anomalías citogenéticas y longitud telomérica en células CD138+ (Wu y Col., 2003). La literatura muestra que los estudios cromosómicos en pacientes con MM se encuentran limitados por las dificultades existentes en la obtención de metafases útiles para ser analizadas. En nuestro estudio hemos encontrado un 28,6% de los casos con alteraciones clonales, resultado que concuerda con datos de la literatura (20-60% por análisis cromosómico convencional) (Calasanz y Col., 1997; Nilsson y Col., 2002). Asimismo, pacientes con cariotipos anormales han mostrado peor pronóstico que aquellos sin anomalías (Seong y Col., 1998, Debes-Marun y Col., 2003). De hecho, todos nuestros casos con MM y cariotipos anormales se encontraban dentro del grupo con más del 60% de células plasmáticas en médula ósea, reflejando la presencia de ventajas proliferativas en células plasmáticas asociadas a cambios cromosómicos (Rajkumar y Col., 1999; Shaughnessy y Col., 2003). De esta forma, la asociación de cariotipo anormal con reducción telomérica, encontrada en este trabajo, estaría indicando el probable valor pronóstico de este último parámetro en MM, particularmente en casos en los cuales resulta imposible obtener células para el análisis citogenético.

El 28% de los pacientes con MM presentó pérdida de RB1, valor que concuerda con estudios previos que muestran esta alteración como característica independiente asociada a pronóstico adverso y corta sobrevida, en el 30-50% de los casos (Dao y Col., 1994, Desikan y Col., 2000; Zojer y Col., 2000). Si bien un trabajo reciente muestra una correlación positiva entre la delección 13q y la actividad de telomerasa y negativa con la longitud telomérica (Wu y Col., 2003), nosotros no encontramos relación entre pérdida de RB-1 y los valores de TRF, probablemente debido al tamaño de la muestra y al bajo porcentaje de células monosómicas presente en la mayoría de nuestros pacientes. En este aspecto, cabe destacar que Shaughnessy y colaboradores (2003) observaron peor pronóstico en pacientes con más del 20% de células monosómicas. No obstante, el estudio de un mayor número de casos permitirá clarificar estos hallazgos.

Los recientes avances en la biología molecular del MM permitieron tener una nueva visión dentro de la patogénesis de esta enfermedad aún incurable. Un ejemplo de ello, lo constituye el hallazgo de la proteína STAT3, que activa genes que promueven la sobrevida de células con MM, tales como el del factor de células mieloides Mcl-1, que codifica para una proteína antiapoptótica miembro de la familia Bcl-2 que regula la muerte celular programada y sería necesaria para la sobrevida de estas células (Zhang y Col., 2002). Recientes estudios de perfiles de expresión génica (Zhan y Col., 2003) han detectado una regulación negativa del gen TERF2 (telomeric repeat binding protein), que actúa protegiendo los extremos cromosómicos y previniendo la fusión telomérica, siendo importante en el mantenimiento de la estabilidad genómica, sugiriendo que dicha pérdida de expresión podría estar asociada a la aparición de rearrreglos estructurales característicos de MM.

Concluyendo, nuestros datos en pacientes con MM muestran una reducción significativa de la longitud telomérica, particularmente relacionada a mayores porcentajes de células plasmáticas en médula ósea y a cariotipos anormales. Estos hallazgos sugerirían a los TRFs como probables marcadores tumorales, asociados a la evolución clínica y sustentarían que la disminución de la longitud telomérica incrementa la frecuencia de TAs e inestabilidad cromosómica, sugiriendo su participación en el desarrollo de esta patología. De esta forma, un aumento de la actividad de telomerasa y el acortamiento telomérico presente en células con

genomas inestables conjuntamente con la desregulación de la proliferación y los factores responsables de la sobrevida celular podrían contribuir al desarrollo y la progresión del MM.

5. Enfermedad Celíaca

5. ENFERMEDAD CELIACA

5.1. Pacientes

Se evaluaron biopsias de intestino delgado y sangre periférica provenientes de 20 pacientes con EC sin tratamiento previo, 16 mujeres y 4 varones, edad media 36 años (rango 21-69 años). Los datos concernientes a edad, sexo, formas clínicas involucradas, duración de la enfermedad, estado nutricional y presencia de enfermedad malabsortiva se encuentran resumidos en la Tabla 4. Se estudiaron doce pacientes al momento del diagnóstico. Los ocho restantes fueron previamente diagnosticados y presentaban un tiempo medio de evolución de 132 meses (rango 11-285 meses), pero no cumplían con la dieta libre de gluten al momento del estudio. Ninguno de los pacientes declaró consumo de alcohol y sólo cinco fumaban.

El diagnóstico de EC se basó en datos clínicos y estudios de laboratorio e histológicos. Las biopsias de mucosa de intestino delgado se obtuvieron de la parte distal de la segunda porción del duodeno por duodenoscopia y fueron procesadas en forma convencional. Las evaluaciones cuantitativas histológicas y morfométricas (conteo de linfocitos intraepiteliales) fueron realizados por un observador experimentado independiente. Las características histológicas de la mucosa intestinal se evaluaron por microscopia óptica con tinción de hematoxilina-eosina. Las biopsias intestinales fueron categorizadas de acuerdo a la clasificación de Marsh (Marsh, 1992), presentando todos los pacientes una mucosa duodenal plana (grado III de Marsh). Teniendo en cuenta la forma clínica de la presentación de la enfermedad, se los clasificó en: asintomáticos (A, 4 pacientes), monosintomáticos (M, 5) y polisintomáticos (P, 11).

Tabla 4: Datos clínicos y valores individuales de TRF en pacientes con EC

Pacientes	Sexo/Edad (años)	Forma Clínica	Duración de la enfermedad (meses)	Estado Nutricional	Síndrome de mala absorción	Valores de Picos medios de TRF (Kb)	
						B	SP
1	F/26	A	0	NN	No	5,67	9,25
2	F/42	A	0	NN	No	3,46	8,58
3	F/31	A	23	NN	No	2,99	6,85
4	F/38	A	0	NN	No	3,19	8,05
5	F/21	M	0	NN	No	4,13	12,92
6	M/24	M	285	NN	No	3,84	8,13
7	M/30	M	0	MM	No	3,69	10,09
8	F/48	M	0	NN	No	4,59	9,32
9	M/54	M	11	NN	No	3,36	11,03
10	F/26	P	0	MS	Si	5,32	9,32
11	F/27	P	0	ML	Si	7,44	11,57
12	M/27	P	0	MM	No	5,33	9,21
13	F/30	P	26	ML	Si	5,89	11,05
14	F/30	P	117	ML	Si	5,13	7,83
15	F/69	P	0	MM	Si	3,16	8,30
16	F/26	P	230	ML	Si	2,73	9,75
17	F/39	P	0	MM	Si	2,79	8,73
18	F/66	P	0	MM	Si	2,88	7,63
19	F/23	P	266	ML	Si	3,19	6,88
20	F/40	P	23	ML	Si	5,38	8,96

A: Asintomático; M: Monosintomático; P: Polisintomático; NN: Nutrición Normal; ML: Malnutrición Leve; MM: Malnutrición Moderada; MS: Malnutrición Severa; SP: Sangre Periférica, B: Biopsias.

5.2. RESULTADOS

La longitud telomérica fue evaluada por la técnica de TRF en biopsias intestinales y sangre periférica de 20 pacientes con EC. Se estudiaron también biopsias normales y sangre periférica de controles normales. Los picos de TRF de las biopsias y las muestras de sangre periférica de cada uno de los pacientes con EC se muestran en la Tabla 4.

Se detectó un acortamiento telomérico significativo en las biopsias de los pacientes en comparación con la sangre periférica de los mismos individuos ($p < 0,0001$) (Tabla 5) (Figuras 11 y 12). Además, los valores de TRF en las biopsias de celíacos fueron significativamente menores que los observados en biopsias normales $4,21 \pm 0,29$ Kb y $8,33 \pm 0,38$ Kb ($p < 0,001$), no encontrándose diferencias entre los valores de TRF de sangre periférica de pacientes y controles (Tabla 5).

Finalmente, se pudo apreciar un importante acortamiento de telómeros en las biopsias de cada una de las formas clínicas estudiadas respecto de la sangre periférica de los mismos individuos: $3,83 \pm 0,62$ Kb y $8,18 \pm 0,51$ Kb ($p < 0,001$) para los pacientes A, $3,92 \pm 0,21$ Kb y $10,30 \pm 0,81$ Kb ($p < 0,002$) para pacientes M y $4,48 \pm 0,48$ Kb y $9,02 \pm 0,42$ Kb ($p < 0,0001$) para los pacientes P, indicando que dicha reducción telomérica sería independiente de la presentación clínica de la enfermedad.

Tabla 5: Valores medios de TRF en pacientes con EC y controles

Grupos	TRF (Kb)	
	X±ES	Rangos
EC-B	4,21±0,29*#	2,73- 7,44
EC-SP	9,17±0,35	6,85-12,90
BN	8,33±0,38	6,49-10,15
SPN	8,89±0,37	6,20-11,82

EC: Enfermedad Celíaca; BN: Biopsias Normales; SP: Sangre Periférica; SPN: SP Normal; B: Biopsias

* Diferencias significativas respecto de EC-SP (p< 0,0001)

Diferencias significativas respecto de BN (p< 0,001)

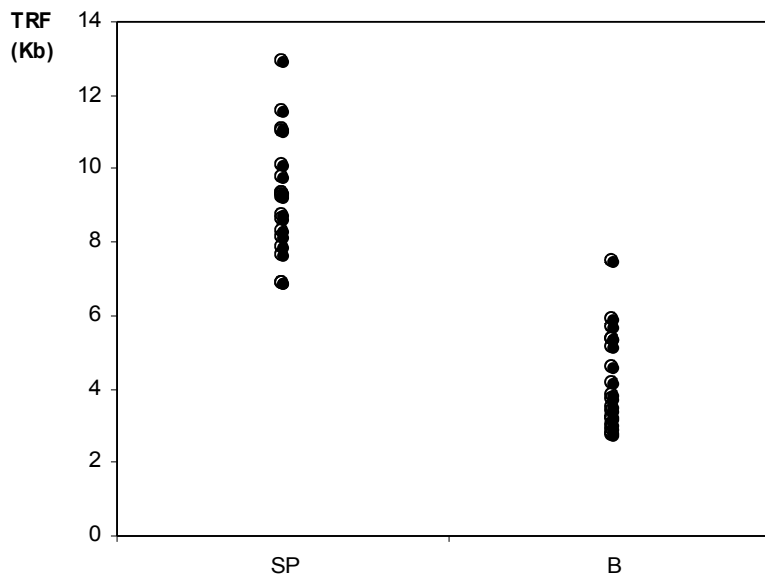
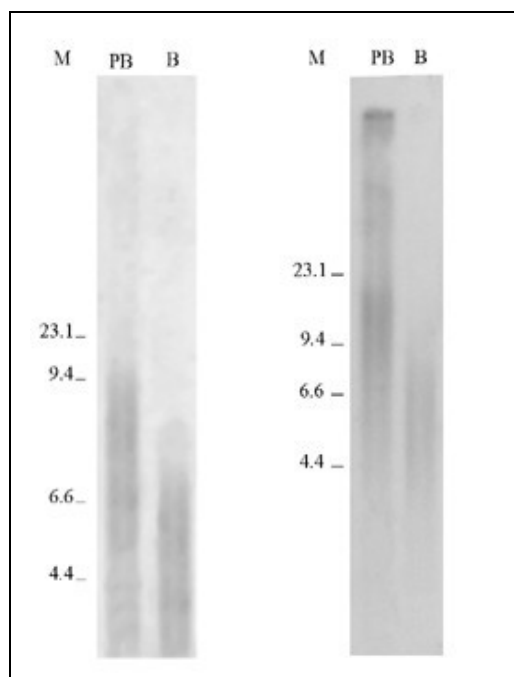


Figura 11: Distribución de los TRF (medidos en Kb) en sangre periférica y biopsias de pacientes con EC. Cada uno de los puntos representa el valor medio de TRF para cada paciente



M: Marcador de peso molecular; PB: Sangre Periférica; B: Biopsias.

Figura 12: Análisis de TRF, cada panel muestra un paciente. Ambos muestran una reducción telomérica en biopsias de intestino delgado respecto de la SP del mismo individuo. Izquierda: Los picos de TRF del caso 14 fueron 7,83 y 5,13 Kb para SP y B, respectivamente; Derecha: Caso 10: picos de TRF 9,32 y 5,32 Kb para SP y B, respectivamente.

5.3. DISCUSION

En diversas patologías se ha asociado el acortamiento telomérico con la presencia de inestabilidad cromosómica y la progresión de la enfermedad, llevando a un incremento de la proliferación, apoptosis y destrucción inmune (Shay y Col., 1996). En este capítulo, se analizó la longitud de los TRF en biopsias y sangre periférica de pacientes con EC que constituye, a nuestro conocimiento, la primera evaluación molecular de telómeros efectuada en pacientes con esta patología (Cottliar y Col., 2003 _a). En este estudio detectamos un acortamiento telomérico significativo y específico en biopsias de intestino delgado de los pacientes, independientemente de la forma clínica involucrada.

La pérdida de la longitud telomérica puede desencadenar la formación de fusiones terminales entre brazos cromosómicos, las que pueden resultar en nuevos rearrreglos

cromosómicos. Estudios recientes en tumores sólidos humanos (Gisselsson, y Col. 2002; O' Sullivan y Col., 2002; Höglund y Col., 2003) y ratones deficientes de telomerasa (Hemann y Col., 2001; Rudolph y Col., 2001) han detectado una correlación positiva entre la reducción de la longitud telomérica y la presencia de anomalías cromosómicas, mostrando una participación preferencial de cromosomas con telómeros críticamente acortados en rearrreglos estructurales. Esta idea es además sustentada por nuestros resultados que muestran una clara reducción de telómeros en pacientes con EC, en los cuales la persistencia del daño a la mucosa puede llevar a serias complicaciones y neoplasias gastrointestinales, particularmente linfomas (Swinson, 1983; Corrao, 2001; Askling y Col., 2002; Catassi y Col., 2002; Holmes y Col., 2002).

Datos de la literatura muestran una reducción telomérica en diferentes subtipos de LNH a células B analizados en conjunto (Remes y Col., 2000). Asimismo el análisis de regiones teloméricas en linfomas T cutáneos y lesiones precursoras mostró acortamiento telomérico significativo y aumento de la actividad de telomerasa (Wu y Hansen, 2001; Zuolin y Col., 2003), sustentando que estos parámetros serían importantes en la tumorigénesis. Estudios recientes indican que un mal funcionamiento de los telómeros contribuye a la carcinogénesis colorrectal promoviendo la presencia de inestabilidad cromosómica (Rudolph y Col., 2001) y proponen a la disfunción telomérica como el mecanismo predominantemente involucrado en el cáncer en humanos.

La presencia de aberraciones cromosómicas espontáneas en sangre periférica ha sido previamente utilizada para investigar el riesgo a desarrollar cáncer (Bonsái y Col., 1995), dado que la cantidad de daño genético en dicho tejido refleja eventos similares a los ocurridos en las células precursoras del proceso carcinogénico del tejido blanco. Particularmente, un estudio realizado entre varios centros ha demostrado que las frecuencias de aberraciones cromosómicas en sangre periférica de individuos sanos sirve como un marcador biológico de riesgo de cáncer (Hagmar y Col., 1998). En este aspecto, es interesante comentar que nuestro grupo previamente había encontrado un nivel elevado de inestabilidad genómica en pacientes con EC manifestado por la presencia de aberraciones cromosómicas (Fundia y Col., 1994; 1996), sugiriendo que estos hallazgos podrían estar

relacionados con la alta incidencia de cáncer observada en esta patología. Además, en ese trabajo se encontró una fuerte correlación entre bandas afectadas en EC en forma no azarosa y puntos de ruptura frecuentes en cáncer, la mayoría de ellos (75%) específicamente asociados a linfomas malignos. Nuestro grupo también ha descrito la presencia de un genoma inestable en sangre periférica de pacientes con colitis ulcerosa, una enfermedad inflamatoria crónica del colon, asociada con un riesgo incrementado de carcinoma colorrectal (Cottliar y Col., 2000_a). En esta patología, un estudio reciente ha demostrado además una correlación entre la inestabilidad cromosómica y el acortamiento telomérico en muestras de mucosa intestinal (O' Sullivan y Col., 2002) y en un trabajo previo (Rabinovitch y Col., 1999) se ha sugerido que la displasia y el cáncer en colitis ulcerosa surgirían a partir de un proceso de inestabilidad cromosómica que afectaría al colon en su totalidad.

Se sabe también que una inestabilidad genómica constitucional provee el sustrato de predisposición para el desarrollo neoplásico, contribuyendo a intensificar los cambios genéticos cruciales en los múltiples pasos que llevan a la carcinogénesis. A pesar de los diversos mecanismos posiblemente implicados como causas de inestabilidad genética, tales como las mutaciones de genes específicos y la aneuploidía adquirida, la causa real ha sido muy escasamente estudiada. Un trabajo reciente propone como hipótesis que la inestabilidad genética en células con cáncer es debida a la dinámica de los telómeros, como la erosión de los mismos y/o la amplificación de las secuencias repetitivas TTAGGG presentes en estos extremos cromosómicos (Pathak y Col., 2002). De la misma manera, se encontró una reducción telomérica en varios síndromes genéticos humanos asociados con el desarrollo de cáncer, tales como el Síndrome de Down, Anemia de Fanconi y Ataxia Telangiectasia (Vaziri y Col., 1993; Metcalfe y Col., 1996, Leteurtre y Col., 1999). Así la presencia de acortamiento telomérico observada en pacientes con EC, una enfermedad multifactorial que posee un fuerte componente genético, con alta frecuencia de desarrollo de linfoma T, está en concordancia con estos hallazgos y sustenta la hipótesis que la presencia de inestabilidad genética y reducción telomérica estarían jugando un rol de importancia en la predisposición al desarrollo neoplásico encontrada en estos pacientes.

6. Linfoma no-Hodgkin

6. LINFOMAS NO-HODGKIN

6.1. Pacientes:

Se efectuó la recolección y procesamiento de 52 muestras de médula ósea y/o ganglios provenientes de 50 pacientes con LNH, de los cuales 33 presentaron LF, 7 LBDCG secundario a LF (LBDCG-S) y 10 LBDCG *de novo*, así como de 12 controles. En la Tabla 6 se detalla la distribución por edad y sexo de los pacientes estudiados.

Tabla 6: Distribución por edad y sexo de los pacientes con LNH

Grupos	Número de casos	Edad media años (rango)		Sexo	
				F	M
LF	33	53,5	(29-77)	15	18
LBDCG <i>de novo</i>	10	51,9	(22-64)	4	6
LBDCG-S	7	61	(53-69)	2	5

LF: linfoma folicular; LBDCG: linfoma B difuso a células grandes; LBDCG-S: LBDCG secundario a LF

Los pacientes fueron estudiados al diagnóstico o previo a iniciar el tratamiento. Los casos 23 y 47 fueron analizados en dos oportunidades. Las médula ósea analizadas presentaron porcentajes de infiltración mayores al 15% o bien resultaron positivas para el rearrreglo BCL-2 (Tabla 7). La mayoría de los pacientes con LF (77,4%) presentó estadios avanzados (III y IV). Teniendo en cuenta el grado de LF, los pacientes se distribuyeron en: grado 1: 70,4%, grado 2: 25,9% y grado 3: 3,7%. Asimismo, los estadios clínicos de los LBDCG-S, fueron: III (17%) y IV (83%), mientras que los LBDCG *de novo* presentaron: 40% estadio II y el 60% restante presentó estadio IV (60%). Nuestros resultados fueron correlacionados con el análisis de los rearrreglos moleculares del gen BCL-2 efectuados en el Laboratorio.

6.2. RESULTADOS

6.2.1. Análisis de longitud telomérica en pacientes con linfoma folicular y linfoma B difuso a células grandes secundario a linfoma folicular

Se estudió la longitud telomérica mediante la técnica de TRF en médula ósea y/o ganglio de pacientes con LF (23 muestras de médula ósea y 11 de ganglio) y LBDCG-S (5 médulas óseas y 2 ganglio). En la Tabla 7 se detallan edad, sexo, tipo de muestra estudiada, porcentaje de infiltración de la médula ósea, los valores de TRF y los resultados de BCL-2 para cada uno de los casos.

El análisis de los datos obtenidos en ambos subtipos histológicos, no mostró diferencias en los valores de TRF de médula ósea y ganglio: $4,19 \pm 0,20$ Kb y $3,95 \pm 0,26$ Kb para LF y $3,07 \pm 0,19$ Kb y $3,93 \pm 0,71$ Kb para LBDCG-S, respectivamente, por lo que se decidió analizar ambos tejidos en forma conjunta.

En 22/34 muestras (64,7%) con LF y en 4/7 (57,1%) con LBDCG-S se detectaron dos poblaciones de células dentro de un único perfil telomérico, observándose dos picos de alta intensidad. El análisis específico de este grupo de pacientes mostró una media de TRF para cada pico de $7,53 \pm 0,44$ Kb y $4,13 \pm 0,22$ Kb en LF y de $6,70 \pm 0,68$ Kb y $2,93 \pm 0,16$ Kb en LBDCG-S, considerándose en ambos casos, el pico de menor peso molecular como correspondiente al componente tumoral. En las muestras restantes se obtuvo un único pico de TRF. Al analizar particularmente el grupo de 12 pacientes con LF y los 3 casos con LBDCG-S que portaban un único pico, se observó un valor medio de TRF de $4,07 \pm 0,22$ Kb para los primeros y de $3,82 \pm 0,42$ Kb para el segundo subtipo histológico, que no muestran diferencias con el valor obtenido para el pico de menor peso molecular, corroborando así que éste representa al componente tumoral.

Tabla 7: Datos clínicos y valores de TRF en pacientes con LF y LBDCG-S

infiltración en MO	BCL-2	Pico deTRF (Kb)
50	+	6,56+2,97
30	+	7,13+2,47
30	+	11,74+4,97
40	+	4,54
20	+	8,13+3,79
35	+	8,18+3,05
28	+	11,36+6,30
40	-	3,94
30	+	10,62+4,62
50	+	8,24+4,60
15	+	5,16+4,55
35	+	8,11+4,54
50	+	6,55+4,73
40	+	6,00+4,82
15	+	8,31+5,82
30	-	9,07+2,88
50	+	9,87+5,66
0	+	4,17
ND	-	3,36
0	+	5,22+3,37
0	+	6,66+4,01
ND	+	5,44+3,12
0	+	4,08
	+	4,27
	+	7,02+3,85
	+	5,76
	-	3,37
	+	4,18+3,10
	+	5,37+3,19
	-	3,38
	+	3,17
	+	4,67
	+	3,04
	+	6,83+4,48
35	+	7,13+2,47
20	-	5,62+2,96
0	+	8,45+3,10
15	-	3,20
0	+	3,64
	+	4,64
	+	5,62+3,22

LF: linfoma folicular; LBDCG-S: linfoma B difuso a células grandes secundario a LF;
MO: Médula ósea; G: Biopsia ganglionar

La evaluación de la longitud telomérica en ambos subtipos histológicos reveló un TRF medio significativamente menor que el observado en los controles ($p < 0,001$) (Tabla 8), encontrándose además telómeros significativamente acortados en los pacientes con LBDCG-S respecto de LF ($p = 0,04$) (Figura 13).

Tabla 8: Valores medios de TRF en pacientes con LF y LBDCG-S y controles.

Grupos	Número de muestras	TRFs (Kb) (X±ES) (rango)	
CN	12	8,50±0,50	(7,30-11,8)
<u>Linfomas Foliculares</u>			
LF	34	4,10±0,16*	(2,47-6,30)
LF BCL-2 -	5	3,38±0,17*Δ	(2,88-3,94)
LF BCL-2 +	29	4,23±0,17*	(2,47-6,30)
Negativos	5	3,38±0,17*	(2,88-3,94)
MBR	24	4,31±0,19*■	(2,97-6,30)
Mcr	5	3,84±0,45*	(2,47-4,62)
<u>Linfoma B difuso a células grandes secundario a LF</u>			
LBDCG-S	7	3,31±0,25*♠	(2,47-4,64)

CN: Controles normales; LF: linfoma folicular; LBDCG-S: linfoma B difuso a células grandes secundario a LF; MO: Médula ósea; G: Biopsia ganglionar; LF BCL-2 - y LF BCL-2 +: pacientes con LF negativos o positivos para el rearreglo del gen BCL-2

- * Diferencias significativas respecto de controles normales ($p < 0,001$)
- ♠ Diferencias significativas respecto de LF ($p = 0,04$)
- Δ Diferencias significativas respecto de BCL-2 + ($p = 0,05$)
- Diferencias significativas respecto de BCL-2 - ($p = 0,045$)

Por otro lado, nuestros datos de TRF fueron correlacionados con la evaluación de los rearreglos moleculares del gen BCL-2 efectuada en el Laboratorio. Dicho análisis mostró positividad para este rearreglo en el 85,3% de los pacientes con LF y en el 71,4% de los LBDCG-S (Tabla 8). Los pacientes portadores del rearreglo BCL-2 mostraron TRF más largos que los negativos para la translocación ($p = 0,05$) (Tabla 8 y Figura 14). Al analizar los TRFs en función de los puntos de ruptura del gen BCL-2, se observaron valores de longitud telomérica más pequeños en pacientes negativos para el rearreglo, intermedios en

pacientes positivos para mcr y mayores en los positivos para MBR, detectándose diferencias significativas entre éstos últimos y los casos BCL-2 negativos ($p=0,045$) (Tabla 8 y Figura 14). Simultáneamente, cabe destacar que los valores de TRF de los pacientes negativos fueron similares a los observados en aquellos que habían progresado a un LBDCG-S. El paciente estudiado simultáneamente en médula ósea y ganglio mostró valores de TRF similares en ambos tejidos. Si bien el número de casos con LBDCG-S es pequeño, la comparación entre los casos positivos y negativos para el rearrreglo BCL-2 no mostró diferencias en los valores de TRF.

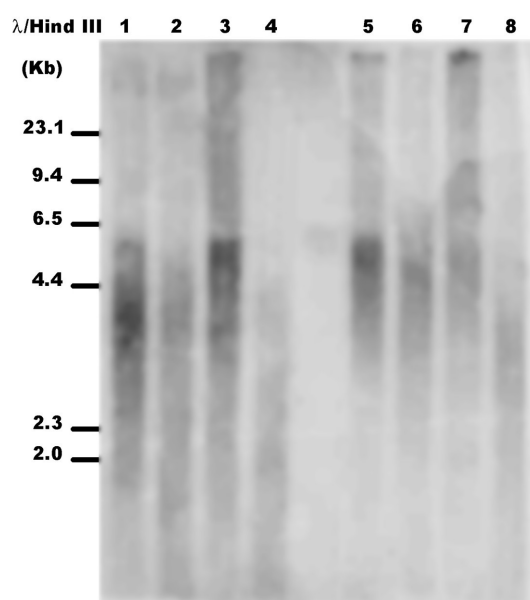


Figura 13: Autorradiografía mostrando las longitudes teloméricas de pacientes con LF: Calles 1, 2, 5, 7 y 8, y con LBDCG-S: Calles 3, 4 y 6; λ /HindIII: Marcador de peso molecular.

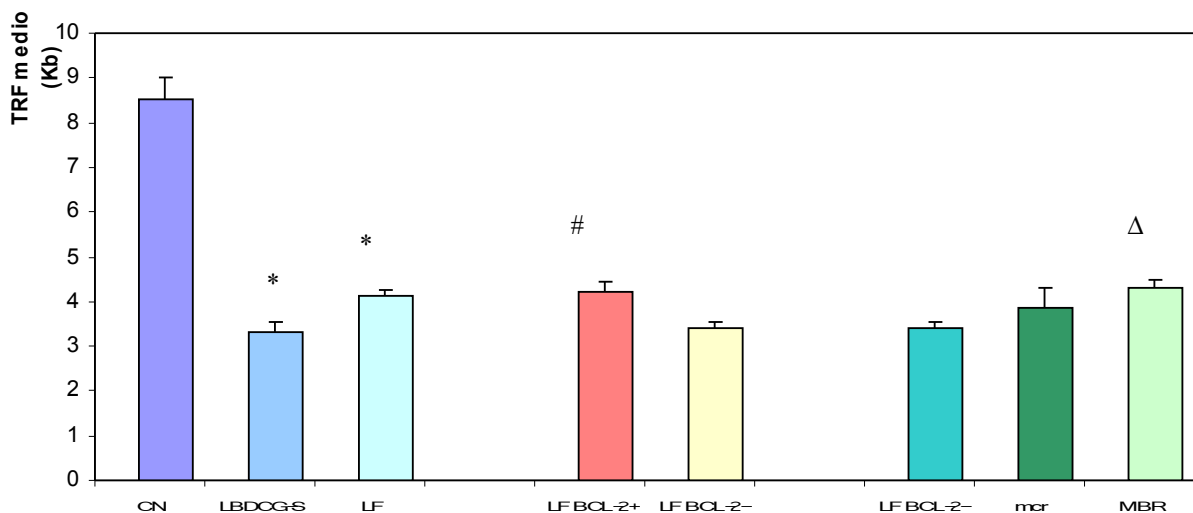


Figura 14: Distribución de TRF en LF y LBDCG-S, su relación con rearrreglos del gen BCL-2 y sus puntos de ruptura

* $p < 0,001$ respecto de CN; # $p = 0,05$ y $\Delta p = 0,045$ respecto de BCL-2 -

6.2.2. Análisis de longitud telomérica en pacientes con linfoma B difuso a células grandes *de novo*

Se efectuó el análisis de la longitud telomérica empleando la metodología de TRF en 11 muestras provenientes de 10 pacientes con LBDCG *de novo* (7 muestras de médula ósea y 4 de ganglio). En la Tabla 9, se resume edad, sexo, tipo de muestra estudiada, porcentaje de infiltración de la médula ósea, los valores de TRF y los resultados de BCL-2 para cada uno de los casos estudiados.

A diferencia de los dos subtipos analizados precedentemente, los pacientes con LBDCG *de novo* mostraron valores de TRF que difirieron significativamente entre ambos tejidos, observándose TRFs más cortos en médula ósea ($3,86 \pm 0,39$ Kb; rango 3,05-5,78 Kb) que en ganglios ($6,03 \pm 0,28$ Kb, rango: 5,20-6,42 Kb) ($p = 0,004$) (Figura 15), por tal motivo se decidió analizados en forma separada.

Tabla 9: Datos clínicos y valores de TRF en pacientes con LBDCG *de novo*

Caso	Sexo/Edad (años)	Muestra	% de infiltración en MO	BCL-2	Pico deTRF (Kb)
<u>LBDCG <i>de novo</i></u>					
41	F/40	MO	70	+	4,51
42	M/63	MO	28	+	4,21
43	M/69	MO	20	+	6,50+5,78
44	M/50	MO	0	+	8,19+3,24
45	F/58	MO	0	+	3,12
46	F/56	MO	65	-	6,19+3,05
47	M/46	MO	0	+	7,17+3,14
	M/49	G		-	6,64+5,20
48	F/64	G		+	6,37
49	F/54	G		-	6,42
50	M/22	G		-	6,15

LBDCG: linfoma B difuso a células grandes; MO: Médula ósea; G: Biopsia ganglionar

En 5/11 (45,4%) muestras con LBDCG *de novo* se observaron dos poblaciones de células dentro de un único perfil telomérico, detectándose dos picos de alta intensidad, cuatro de las cuales eran médulas óseas (Tabla 9). Este último grupo de pacientes mostró una media de TRF para cada pico de $7,01 \pm 0,44$ Kb y $3,80 \pm 0,66$ Kb, considerándose al pico de menor peso molecular, como correspondiente al componente tumoral. En las tres muestras restantes de médula ósea se obtuvo un único pico de TRF, cuyo valor medio ($3,94 \pm 0,42$ Kb) también coincide con el valor obtenido para el pico de menor peso molecular, corroborando que el mismo representa al componente tumoral. Respecto de la presencia del rearrreglo del gen BCL-2, encontramos un 63,7% de estos pacientes portando dicho rearrreglo, correspondiendo el 25% de los mismos a ganglios.

En estos pacientes con LBDCG *de novo*, se observó una reducción telomérica en ambos tejidos analizados respecto de controles normales ($8,50 \pm 0,50$ Kb) ($p < 0,001$). Asimismo, los valores de TRF de las biopsias ganglionares con LBDCG *de novo* resultaron ser significativamente mayores respecto de los valores medios de los pacientes con LF y LBDCG-S ($p = 0,0001$). No encontramos diferencias entre los valores de TRF de las médulas óseas de LBDCG *de novo* respecto de LF y LBDCG-S (Figura 15).

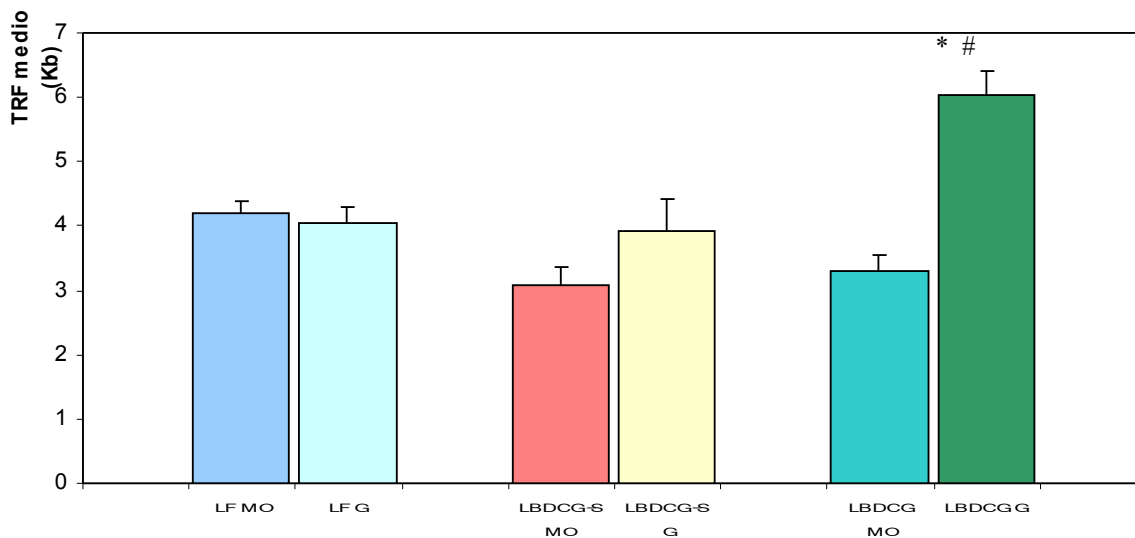


Figura 15: TRF de MO y G en los distintos subtipos histológicos de LNH estudiados
 * p=0,004 respecto de MO en LBDCG *de novo*; # p=0,0001 respecto de LF y LBDCG-S

En el paciente que fue evaluado en dos ocasiones (caso 47), cuyos estudios fueron efectuados con una diferencia de 2 años y medio, la primera muestra, al diagnóstico, presentó positividad para BCL-2 y telómeros más cortos que la segunda correspondiente a la recaída, donde la translocación BCL-2 no fue detectada. Esta negativización podría deberse a que haya sido eliminado el clon portador de la translocación o bien a que haya mutado el sitio de la translocación con lo cual los primers no hibridarían, no obteniéndose producto de amplificación, además es de recalcar que en ambas muestras se detectaron las dos poblaciones celulares.

6.3. DISCUSION

Nuestra población de pacientes con LNH presentó un acortamiento significativo de la longitud telomérica respecto de los controles mostrando, a excepción de los ganglios de LBDCG *de novo*, valores algo menores que los observados en el primer estudio publicado en el que se evalúan estos subtipos histológicos en combinación con otros linfomas de bajo y alto grado de malignidad (Remes y Col., 2000). Un estudio reciente de longitud telomérica en pacientes con desórdenes linfoproliferativos a células B maduras (Ladetto y Col., 2004) encuentra una correlación entre longitud telomérica e histogénesis,

detectándose que aquellos linfomas pre-centro germinal presentaban telómeros más cortos que los originados a nivel del centro germinal o post-centro germinal. En nuestro trabajo, encontramos que los MM presentaban TRF significativamente mayores que los observados en LF ($p=0,005$) y algo menores que los ganglios de los LBDCG *de novo*, sugiriendo patrones específicos de longitud telomérica para las distintas entidades.

Parte de nuestros casos han presentado dos picos de TRF, evento que ha sido observado previamente en LNH (Remes y Col., 2000) como así también en pacientes con mieloma múltiple (Cottliar y Col., 2003_b), considerándose al pico de menor tamaño como correspondiente al componente tumoral, situación que se encuentra avalada por la ausencia de longitudes menores a 5 Kb en individuos normales centenarios (Slagboom y Col., 1994; Mondello y Col., 1999). Dichas células con telómeros acortados tienen una alta probabilidad de adquirir anomalías cromosómicas que podrían asociarse al desarrollo neoplásico. En el caso de LNH esto sería consistente con la presencia de inestabilidad cromosómica evidenciada por un porcentaje incrementado de asociaciones teloméricas en médula ósea de pacientes con esta patología, observado en estudios previos de nuestro Laboratorio (Cottliar y Col., 2000_b).

Sabemos que la iniciación y progresión del cáncer es un proceso de múltiples pasos que determina la acumulación de alteraciones genéticas que pueden, individual o colectivamente, influenciar o determinar la manifestación clínica de la enfermedad. El LF es un buen modelo para el estudio de este proceso debido a su naturaleza crónica y a la accesibilidad del tejido involucrado para la evaluación en el laboratorio, permitiendo obtener una clara imagen de la cascada mutacional. En este contexto, nuestros pacientes con LBDCG-S mostraron una media de TRF significativamente más corta que la observada en LF, situación que podría asociarse con los múltiples eventos genómicos secundarios que acompañan a la transformación histológica de los LF, que incluyen ganancias y pérdidas de numerosas regiones cromosómicas (2q, 6p, 7p, 12q, 17q, 5p y 8q), así como mutaciones de diferentes genes (*c-myc*, *p53*, *BCL-6*, *p15* y *p16*), sugiriendo el compromiso de distintos mecanismos genéticos en su desarrollo (Nagy y Col., 2000; Martínez-Climent y Col., 2003). Simultáneamente, un estudio reciente de estas patologías por microarrays mostró

modificaciones en los perfiles de expresión de un cluster de 79 genes regulados por el oncogen C-MYC, detectándose dos caminos diferentes asociados al proceso de transformación: uno de ellos mostraba aumento de la expresión de estos genes llevando a pérdida del control de la proliferación, en tanto que el otro presentaba una disminución de su expresión, produciendo inhibición de la apoptosis (Lossos y Col., 2002).

Resulta importante remarcar en este capítulo la correlación efectuada entre los valores de longitud telomérica obtenidos en LF y los rearrreglos moleculares del gen BCL-2, parámetros que no habían sido relacionados previamente. Al evaluar esta asociación, se observaron TRF significativamente más cortos en los casos de LF BCL-2 negativos, en los cuales ya estaba descrita una inestabilidad cromosómica aumentada (Horsman y Col., 2003). Cabe destacar que el porcentaje de pacientes BCL-2 negativos (14%) resulta concordante con el de las series previamente publicadas (Gribben y Col., 1991; López-Guillermo y Col., 1999; Noriega y Col., 2004). Actualmente se considera que estos pacientes representarían un subtipo diferente, con un comportamiento clínico distinto relacionado al patrón específico de alteraciones génicas y con cambios cariotípicos que los caracterizan. Dentro de los casos BCL-2 negativos, se han encontrado anomalías secundarias no asociadas con la t(14;18), tales como rearrreglos a nivel de 3q27 y la t(8;14) (q24;q32) (Nanjangud, 2003). Por otro lado, Horsman et al (2003) identificaron dos subtipos dentro de los casos sin la translocación, encontrando distintos patrones de alteraciones cromosómicas. Un 33% de estos pacientes presentaba sobreexpresión de BCL-2 no relacionada con el rearrreglo y frecuentemente asociada al aumento del número de copias del cromosoma 18, en tanto que el 67% restante mostraba la t(3;14)(q27;q32), sugiriendo a la desregulación del gen BCL-6, un posible rol en la iniciación de este tipo de linfomas (Bosga-Bowner y Col., 2003). Todo lo anterior, implicaría distintos mecanismos patogénicos para estos LF similares a nivel de morfología y fenotipo pero genotípicamente diferentes.

Respecto de la correlación con los puntos de ruptura involucrados en el rearrreglo BCL-2, en nuestros resultados se puede apreciar una tendencia a presentar telómeros más

cortos en los pacientes con rearrreglos en *mcr* respecto de MBR, mostrando un acortamiento significativo en los pacientes negativos para la translocación respecto de aquellos con el rearrreglo MBR-J_H. La literatura presenta discrepancias en la correlación de dichos puntos de ruptura con la evolución clínica de la enfermedad. Buchonnet et al (2002) no encuentran asociación entre ambos parámetros, en tanto que López-Guillermo et al (1999) consideran a este rearrreglo como un factor pronóstico de importancia en LF, útil para identificar pacientes que requieren tratamientos diferentes. Un trabajo reciente muestra una asociación entre el subtipo histológico de LF y el rearrreglo molecular del gen BCL-2, no encontrando pacientes con LF grado 1 con punto de ruptura en *mcr* y observando un peor pronóstico para los casos negativos (Colleoni y Col., 2004). Estos datos son coincidentes con la gran similitud de los valores de TRF detectados en nuestros pacientes con LF BCL-2 negativos y los LBDCG-S, lo que podría estar relacionado con la mayor probabilidad de evolución a un linfoma de alto grado en los pacientes con LF que no presentan dicho rearrreglo.

Concluyendo, nuestros resultados muestran una reducción de la longitud telomérica en LF y LBDCG-S, con TRFs significativamente más cortos en estos últimos, sugiriendo la participación del acortamiento telomérico en la progresión tumoral. Asimismo, las diferencias detectadas entre los casos BCL-2 positivos y negativos sustentarían la presencia de diferentes mecanismos patogénicos propuestos para estos distintos LF.

En cuanto a los LBDCG *de novo*, nuestros resultados muestran un mayor acortamiento en médula ósea respecto de ganglio. Sabemos que la infiltración de la médula ósea en este tipo de linfomas constituye un factor de pronóstico adverso (Shipp y Col., 1993) que podría estar reflejándose en esta menor longitud telomérica. Un trabajo reciente (Ladetto y Col., 2004) encuentra que los subtipos con mayor índice de proliferación no muestran mayor acortamiento telomérico, situación coincidente con lo observado en nuestro trabajo donde los LBDCG *de novo* presentan longitudes teloméricas mayores que los LF. Esto también estaría en concordancia con otro estudio que evalúa la actividad de telomerasa en distintos LNH, no encontrando diferencias respecto de ganglios reactivos, resultando por lo tanto, independiente de los niveles de proliferación. Este grupo propone

que la regulación positiva de la telomerasa estaría desacoplada de los estímulos proliferativos (Klapper y Col., 2003).

El análisis de LBDCG *de novo* por microarrays permitió detectar dos categorías moleculares con diferentes patrones de expresión génica, uno de los cuales mostró un patrón de expresión característico de células B del centro germinal, mientras que el otro presentó un perfil similar al de las células B de sangre periférica activadas (Alizadeh y Col., 2000), sugiriendo dos estadios diferentes en el desarrollo de este linaje celular. Simultáneamente, otros autores pudieron diferenciar tres subgrupos de pacientes, sumándole a los dos anteriores un denominado grupo tres que comparte características de los dos anteriores (Rosenwald y Col., 2002). Asimismo, observaron una asociación del subtipo centro germinal con la presencia de la t(14;18)(q32;q21) y con la amplificación del gen REL, siendo éste el grupo con mayor tasa de sobrevida a los 5 años de seguimiento (Alizadeh y Col., 2000; Rosenwald y Col., 2002). Otro análisis (Shipp y Col., 2002) logró distinguir dos grupos de pacientes con distinta evolución clínica: uno de ellos con alta probabilidad de cura y el otro de mal pronóstico, pudiendo identificar un perfil predictor asociado a tres genes. Simultáneamente se detectaron diferencias en los perfiles de expresión génica de LBDCG *de novo* y secundarios, siendo la expresión de éstos últimos similar a la del LF previo y contrapuesta a la de los LBDCG *de novo* (Lossos y Col., 2002; Shipp y Col., 2002), lo que estaría relacionado con nuestros datos de TRF y se reflejaría en el distinto comportamiento clínico de estos dos tipos de linfomas, morfológicamente similares.

Durante la tumorigénesis, los telómeros se acortan progresivamente hasta que se restaura la actividad de telomerasa, permitiendo una replicación indefinida. Esta activación tardía es un paso crítico en el desarrollo neoplásico y la telomerasa juega un rol crucial en la sobrevida de las células tumorales. Es por eso que los tumores se caracterizan por presentar telómeros cortos en contraposición de la alta actividad de telomerasa que poseen. Esta peculiaridad de las células tumorales sugiere que la inhibición de la actividad de telomerasa puede ser un buen abordaje para disminuir la replicación de las mismas y finalmente, lograr inducir su muerte en forma selectiva (Hahn y Weinberg, 2003; Saretzki,

2003), habiéndose desarrollado estudios *in vivo* e *in vitro* que aún se encuentran en una etapa experimental. Entre ellos encontramos el empleo *in vitro* de oligonucleótidos antisentido y moléculas pequeñas tales como el BIBR-1532 (Pascolo y Col., 2002), que ha sido empleado especialmente como agente antineoplásico en tumores sólidos, pudiendo ser de utilidad en neoplasias hematológicas. Más recientemente, se ha ensayado el oligonucleótido GRN163, complementario al templado de ARN de la telomerasa en líneas celulares y células de pacientes *in vitro* de MM y LNH, así como en modelos murinos (Wang y Col., 2004), observándose una disminución en los niveles de telomerasa y reducción del volumen tumoral. Estos datos indican que las células con telómeros cortos pueden ser altamente dependientes de telomerasa para evitar la muerte celular causada por telómeros críticamente acortados y disfuncionales y sugieren que la inhibición de la misma puede representar una nueva estrategia terapéutica para muchas neoplasias a células B maduras, específicamente aquellas con telómeros cortos. Esto muestra la importancia del estudio de TRF en estas patologías, tendiente a identificar pacientes pasibles de ingresar a distintos protocolos de tratamiento anti-telomerasa, logrando de este modo un acortamiento telomérico, seguido de muerte celular.

Lo previamente expuesto nos permite concluir que estos pacientes con diferentes neoplasias a células B maduras, así como el tejido afectado de individuos con Enfermedad Celíaca muestran una significativa reducción de la longitud telomérica. En MM y LNH esta reducción se vio relacionada a diferentes parámetros de relevancia en la evolución clínica, en tanto que en EC, se observó una afectación tejido-específica probablemente asociada a la predisposición neoplásica de esta patología. Asimismo, nuestros hallazgos sustentan la idea de que la disminución de la longitud telomérica lleva a incrementos de la inestabilidad cromosómica y aumento de la sobrevivencia de estas células que escapan de la muerte celular y, progresivamente adicionan mutaciones. De esta manera, el acortamiento telomérico presente en células con genomas inestables combinado con la desregulación de la proliferación y de los factores comprometidos en la sobrevivencia celular podrían promover el desarrollo y la progresión de estas patologías.

7. Conclusiones

7. CONCLUSIONES

El presente estudio permitió arribar a las siguientes conclusiones:

- El análisis de longitud telomérica efectuado mediante la evaluación de los TRFs en pacientes con MM y LNH mostró un acortamiento telomérico estadísticamente significativo respecto de controles normales.
- En MM, se observó acortamiento telomérico al diagnóstico y en la recaída, con recuperación de la longitud durante la remisión completa. Se detectó también una correlación positiva entre el acortamiento telomérico y el aumento del porcentaje de infiltración de la médula ósea, así como una asociación con la presencia de anomalías cromosómicas clonales, sugiriendo a los TRFs como probables marcadores tumorales en esta patología.
- El análisis de asociaciones teloméricas (TAs), parámetro indicador de inestabilidad genómica, mostró incrementos en MM respecto de los controles normales de MO, con valores intermedios en MGUS, sustentando la asociación entre acortamiento telomérico, aumento de TAS e inestabilidad cromosómica, como mecanismo de desarrollo neoplásico.
- El análisis de TRF efectuado en pacientes con Enfermedad Celíaca, mostró un notable acortamiento telomérico en las biopsias respecto de la sangre periférica del mismo individuo, así como también respecto de biopsias normales, no encontrándose variaciones entre sangre periférica de individuos controles y afectados, sugiriendo un rol importante de este parámetro en la predisposición al desarrollo neoplásico observada en esta entidad.
- En pacientes con LNH se observó acortamiento telomérico en los tres subtipos histológicos estudiados (LF, LBDCG *de novo* y LBDCG-S) respecto de controles, con TRFs significativamente más cortos en los LBDCG-S, sugiriendo la participación de este mecanismo en la progresión del LF a un linfoma más agresivo.

- Se encontraron valores de TRF mayores en pacientes con LF portadores de rearrreglos del gen BCL-2 que en los negativos, lo que sustentaría la presencia de diferentes mecanismos patogénicos propuestos para estos distintos LF.
- Los pacientes con punto de ruptura en MBR mostraron TRF más largos que aquellos portadores del rearrreglo en mcr y de los BCL-2 negativos, detectándose diferencias significativas entre estos últimos y los casos positivos para MBR.
- Nuestros datos muestran la importancia de efectuar este tipo de estudios en estas patologías a fin de poder detectar pacientes pasibles de ingresar a protocolos de tratamiento antitelomerasa, tendientes a ser empleados en un futuro en aquellos casos con telómeros acortados.
- Los hallazgos de nuestro estudio sustentan el concepto de asociación entre disminución de la longitud telomérica e incremento de la inestabilidad cromosómica, factores que combinados con la desregulación de la proliferación celular podrían promover el desarrollo y la progresión neoplásica.

8. Bibliografía

8. BIBLIOGRAFIA

- ALBANELL J, LEONARDO F, RUSCH V, ENGELHARDT M, FRANCO S, MOORE MA, DMITROVSKY E. Telomerase activity and germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 91: 1321-6, 1999.
- ALIZADEH AA, EISEN MB, DAVIS RE, MA C, LOSSOS IS, ROSENWALD A, BOLDRICK JC, SABET H, TRAN T, YU X, POWELL JI, YANG L, MARTI GE, MOORE T, HUDSON J JR, LU L, LEWIS DB, TIBSHIRANI R, SHERLOCK G, CHAN WC, GREINER TC, WEISENBURGER DD, ARMITAGE JO, WARNKE R, LEVY R, WILSON W, GREVER MR, BYRD JC, BOTSTEIN D, BROWN PO, STAUDT LM. Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature* 403: 503-11, 2000.
- ANDERSON JR, ARMITAGE JO, WEISENBURGER DD. Epidemiology of the non-Hodgkin's lymphomas: distributions of the major subtypes differ by geographic locations. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Ann Oncol.* 9: 717-20, 1998.
- ANGELE S, FALCONER A, FOSTER CS, TANIÈRE P, EELES RA, HALL J. ATM protein overexpression in prostate tumors: possible role in telomere maintenance. *Am J Clin Pathol* 121: 231-6, 2004.
- ANON. A clinical evaluation of the International Lymphoma Study Group classification of non-Hodgkin's lymphoma. The Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *Blood* 89: 3909-18, 1997.
- ARGILLA D, CHIN K, SINGH M, HODGSON JG, BOSENBERG M, DE SOLORZANO CO, LOCKETT S, DEPINHO RA, GRAY J, HANAHAN D. Absence of telomerase and shortened telomeres have minimal effects on skin and pancreatic carcinogenesis elicited by viral oncogenes. *Cancer Cell.* 6: 373-85, 2004.
- ARMITAGE JO, WEISENBURGER DD. New approach to classifying non-Hodgkin's lymphomas: clinical features of the major histologic subtypes. Non-Hodgkin's Lymphoma Classification Project. *J Clin Oncol.* 16: 2780-95, 1998.
- ASKLING J, LINET M, GRIDLEY G, HALSTENSEN TS, EKSTROM K, EKBOM A. Cancer incidence in a population-based cohort of individuals hospitalized with celiac disease or dermatitis herpetiformis. *Gastroenterol.* 123: 1428-35, 2002.
- BACCHETTI S. Telomere maintenance in tumour cells. *Cancer Surv.* 28: 197-216, 1996.
- BAKKENIST CJ, KASTAN MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421: 499-506, 2003.
- BARTL R, FRISCH B, BURKHARDT R, FATEH-MOGHADAM A, MAHL G, GIERSTER P, SUND M, KETTNER G. Bone marrow histology in myeloma: its importance in diagnosis, prognosis, classification and staging. *Br J Haematol.* 51: 361-75, 1982.
- BECHTER OE, EISTERER W, PALL G, HILBE W, KUHR T, THALER J. Telomere length and telomerase activity predict survival in patients with B cell chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Res.* 58: 4918-22, 1998.

- BELL DA, LIU Y, CORTOPASSI GA. Occurrence of bcl-2 oncogene translocation with increased frequency in the peripheral blood of heavy smokers. *J Natl Cancer Inst.* 87: 223-4, 1995.
- BIAGI JJ, SEYMOUR JF. Insights into the molecular pathogenesis of follicular lymphoma arising from analysis of geographic variation. *Blood.* 99: 4265-75, 2002.
- BIROCCIO A, LEONETTI C. Telomerase as a new target for the treatment of hormone-refractory prostate cancer. *Endocr Relat Cancer* 11: 407-21, 2004.
- BLACKBURN EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 350: 569-573, 1991.
- BLACKBURN EH. Telomere states and cell fates. *Nature* 408: 53-56, 2000.
- BLADÉ J, LÓPEZ-GUILLERMO A, ROZMAN C, , CERVANTES F, SALGADO C, AGUILAR JL, VIVES-CORRONS JL, MONTSERRAT E. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol* 81: 391-4, 1992.
- BLASCO MA, LEE HW, HANDE MP, SAMPER E, LANSDORP PM, DEPINHO RA, GREIDER CW. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91: 25-34, 1997.
- BODDIE AW JR, MULLINS JD, WEST G, BOUDA D. Extranodal lymphoma: surgical and other therapeutic alternatives. *Curr Probl Cancer.* 6: 1-64, 1982.
- BODNAR AG, OUELLETTE M, FROLKIS M, HOLT SE, CHIU CP, MORIN GB, HARLEY CB, SHAY JW, LICHTSTEINER S, WRIGHT WE. Extension of life span by introduction of telomerase into normal cells. *Science* 279: 349-52, 1998.
- BOLDRINI L, FAVIANA P, GISFREDI S, DONATI V, ZUCCONI Y, URSINO S, SIMI P, BALDINOTTI F, BERTI P, GALLERI D, MATERAZZI G, BASOLO F, MICCOLI P, PINGITORE R, FONTANINI G. Regulation of telomerase and its hTERT messenger in colorectal cancer. *Oncol Rep.* 11:395-400, 2004.
- BONASSI S, ABBONDANDOLO A, CAMURI L, DAL PRA L, DE FERRARI M, DEGRASSI F, FORNI A, LAMBERTI L, LANDO C, PADOVANI P, et al. Are chromosome aberrations in circulating lymphocytes predictive of future cancer onset in humans? Preliminary results of an Italian cohort study. *Cancer Genet Cytogenet* 79: 133-35, 1995.
- BOSGA-BOWNER A, VAN IMHOFF GW, BOONSTRA R, VAN DER VEEN A, HARALAMBIEVA E, VAN DER BERG A, DE JONG B, KRAUSEY V, PALMER MC, COUPLAND R, KLUIN PM, VAN DER BERG E, POPPERMA S. Follicular lymphoma grade 3B includes 3 cytogenetically defined subgroups with primary t(14; 18), 3q27, or other translocations: t(14; 18) and 3q27 are mutually exclusive. *Neoplasia* 101: 1149-54, 2003.
- BOULTWOOD J, FIDLER C, KUSEC R, RACK K, ELLIOTT PJ, ATOYEBI O, CHAPMAN R, OSCIER DG, WAINSCOAT JS. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol* 56: 266-71, 1997.
- BROADSHAW, PS, STAVROPOULOS DJ, MEYN MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nat Genet* 37: 193-7, 2005.

- BUCHONNET G, JARDIN F, JEAN N, BERTRAND P, PARMENTIER F, TISON S, LEPRETRE S, CONTENTIN N, LENAIN P, STAMATOULAS-BASTARD A, TILLY H, BASTARD C. Distribution of BCL-2 breakpoint in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease?. *Leukemia* 16: 1852-6, 2002.
- BUTLER MG, SCIADINI M, HEDGES LK, SCHWARTZ HS. Chromosome telomere integrity of human solid neoplasms. *Cancer Genet Cytogenet.* 86: 50-3, 1996.
- CALASANZ MJ, CIGUDOSA JC, ODERO MD, FERREIRA C, ARDANAZ MT, FRAILE A, CARRASCO JL, SOLE F, CUESTA B, GULLON A. Cytogenetic analysis of 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chrom Cancer* 18: 84-93, 1997.
- CATASSI C, FABIANI E, CORRAO G, BARBATO M, DE RENZO A, CARELLA AM, GABRIELLI A, LEONI P, CARROCCIO A, BALDASSARRE M, BERTOLANI P, CARAMASCHI P, SOZZI M, GUARISO G, VOLTA U, CORAZZA GR. Italian Working Group on Coeliac Disease and Non-Hodgkin's-Lymphoma. Risk of non-Hodgkin lymphoma in celiac disease. *JAMA.* 287: 1413-9, 2002
- CATTORETTI G, CHANG CC, CECHOVA K, ZHANG J, YE BH, FALINI B, LOUIE DC, OFFIT K, CHAGANTI RS, DALLA-FAVERA R. BCL-6 protein is expressed in germinal-center B cells. *Blood.*86: 45-53, 1995.
- CAVO M, ZAMAGNI E, TOSI P, CELLINI C, CANGINI D, TACCHETTI P, TESTONI N, TONELLI M, DE VIVO A, PALARETI G, TURA S, BACCARANI M. First-line therapy with thalidomide and dexamethasone in preparation for autologous stem cell transplantation for multiple myeloma. *Haematologica* 89: 826-31, 2004.
- CELLIER C, DELABESSE E, HELMER C, PATEY N, MATUCHANSKY C, JABRI B, MACINTYRE E, CERF-BENSUSSAN N, BROUSSE N. Refractory sprue, coeliac disease, and enteropathy-associated T-cell lymphoma. French Coeliac Disease Study Group. *Lancet.* 356: 203-8, 2000.
- CHAGANTI RSK, NANJANGUD G, SCHMIDT H, TERUJA-FELDSTEIN J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: Biologic and clinical significance. *Sem Hematol* 34: 396-411, 2000.
- CLEARY ML, SKLAR J. Nucleotide sequence of a t(14;18) chromosomal breakpoint in follicular lymphoma and demonstration of a breakpoint-cluster region near a transcriptionally active locus on chromosome 18. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82: 7439-43, 1985.
- COLLEONI GW, DUARTE LC, KERBAUY FR, NOGUTI MA, DA SILVA ID, OTSUKA AY, ALVES AC, SILVA MR. Correlation between histological subtype and type of bcl-2/IgH rearrangement in follicular lymphomas. *Leuk Lymph.* 45: 331-8, 2004.
- COLLINS K, MITCHELL JR. Telomerase in the human organism. *Oncogene.* 21: 564-79, 2002.
- CORRAO G, CORAZZA GR, BAGNARDI V, BRUSCO G, CIACCI C, COTTONE M, SATEGNA GUIDETTI C, USAI P, CESARI P, PELLI MA, LOPERFIDO S, VOLTA U, CALABRO A, CERTO M. Club del Tenue Study Group. Mortality in patients with coeliac disease and their relatives: a cohort study. *Lancet.* 358: 356-61, 2001.

- CORY S. Regulation of lymphocyte survival by the bcl-2 gene family. *Annu Rev Immunol.* 13: 513-43, 1995.
- COTTLIAR A, FUNDIA A, BOERR L, SAMBUELLI A, NEGREIRA S, GIL A, GOMEZ JC, CHOPITA N, BERNEDO A, SLAVUTSKY I. High frequencies of telomeric associations, chromosome aberrations, and sister chromatid exchanges in ulcerative colitis. *Am J Gastroenterol* 95: 2301-7, 2000_a.
- COTTLIAR A, SGANZETTA N, PEDRAZZINI E, CERRETINI R, CORRADO C, ENGELBERGER I, NARBAITZ M, SLAVUTSKY I. Incremento de asociaciones teloméricas en mieloma múltiple y linfomas no-Hodgkin. *N Tend Oncol IX 1 (Supl):* 47, 2000_b.
- COTTLIAR AS, SLAVUTSKY IR. Telomeres and telomerase activity: their role in aging and in neoplastic development. *Medicina* 61: 335-42, 2001.
- COTTLIAR A, PALUMBO M, LA MOTTA G, DE BARRIO S, CRIVELLI A, VIOLA M, GOMEZ JC, SLAVUTSKY I. Telomere length study in celiac disease. *Am J Gastroenterol.* 98: 2727-31, 2003_a.
- COTTLIAR A, PEDRAZZINI E, CORRADO C, ENGELBERGER MI, NARBAITZ M, SLAVUTSKY I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur J Haematol* 71: 334-40, 2003_b.
- COUNTER CM, AVILION AA, LE FEUVRE CL, STEWART NG, GREIDER CW, HARLEY CB. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 11: 1921-9, 1992.
- COUNTER CM, GUPTA J, HARLEY CB, LEBER B, BACCHETTI S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 85: 2315-20, 1995.
- CROSSEN PE, TULLY SM, BENJES SM, Hollings PE, Beard ME, Nimmo JC, Morrison MJ. Oligoclonal B-cell leukemia characterized by spontaneous cell division and telomere association. *Genes Chrom Cancer* 8: 49-59, 1993.
- DALTON WS, BERGSAGEL PL, KUEHL WM, ANDERSEN KC, HAROUSSEAU JL. Multiple Myeloma. In: Schechter GP, Berliner N, Telen MJ, Bajus JL. *Hematology 2001.* American Society of Hematology, Education Program Book, 2001: 157-174. Washington.
- DAO D, SAWYER J, EPSTEIN J, HOOVER R, BARLOGIE B, TRICOT G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia.* 8: 1280-4, 1994.
- DEBES-MARUN CS, DEWALD GW, BRYANT S, PICKEN E, SANTANA-DAVILA R, GONZALEZ-PAZ N, WINKLER JM, KYLE RA, GERTZ MA, WITZIG TE, DISPENZIERI A, LACY MQ, RAJKUMAR SV, LUST JA, GREIPP PR, FONSECA R. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia* 17: 427-36, 2003.
- DE LANGE T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene.* 21: 532-40, 2002.

- DESIKAN R, BARLOGIE B, SAWYER J, AYERS D, TRICOT G, BADROS A, ZANGARI M, MUNSHI NC, ANAISSIE E, SPOON D, SIEGEL D, JAGANNATH S, VESOLE D, EPSTEIN J, SHAUGHNESSY J, FASSAS A, LIM S, ROBERSON P, CROWLEY J. Results of high-dose therapy for 1000 patients with multiple myeloma: durable complete remissions and superior survival in the absence of chromosome 13 abnormalities. *Blood* 95: 4008-10, 2000.
- DIETERICH W, EHNIS T, BAUER M, DONNER P, VOLTA U, RIECKEN EO, SCHUPPAN D. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med.* 3: 797-801, 1997.
- DRUMMOND MW, HOARE SF, MONAGHAN A, GRAHAM SM, ALCORN MJ, KEITH WN, HOLYOAKE TL. Dysregulated expression of the major telomerase components in leukaemic stem cells. *Leukemia.* 19: 381-9, 2005.
- DURIE BG, SALMON SE. A clinical staging system for multiple myeloma. Correlation of measured myeloma cell mass with presenting clinical features, response to treatment, and survival. *Cancer* 36: 842-54, 1975.
- DURIE BG. Cellular and molecular genetic features of myeloma and related disorders. *Hematol Oncol Clin North Am* 6: 463-77, 1992.
- ELWOOD N. Telomere biology of human hematopoietic stem cells. *Cancer Control* 11: 77-85, 2004.
- ENGELHARDT M, ALBANELL J, DRULLINSKY P, HAN W, GUILLEM J, SCHER HI, REUTER V, MOORE MA. Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res.* 3: 1849-57, 1997.
- ENGELHARDT M, MARTENS UM. The implication of telomerase activity and telomere stability for replicative aging and cellular immortality. *Oncol Rep* 5: 1043-52, 1998.
- ENGELHARDT M, MACKENZIE K, DRULLINSKY P, SILVER RT, MOORE MA. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture. *Cancer Res* 60: 610-7, 2000.
- FACON T, AVET-LOISEAU H, GUILLERM G, MOREAU P, GENEVIEVE F, ZANDECKI M, LAI JL, LELEU X, JOUET JP, BAUTERS F, HAROUSSEAU JL, BATAILLE R, MARY JY; Intergroupe Francophone du Myelome. Chromosome 13 abnormalities identified by FISH analysis and serum beta2-microglobulin produce a powerful myeloma staging system for patients receiving high-dose therapy. *Blood* 97: 1566-71, 2001.
- FASANO A, NOT T, WANG W, UZZAU S, BERTI I, TOMMASINI A, GOLDBLUM SE Zonulin, a newly discovered modulator of intestinal permeability, and its expression in coeliac disease. *Lancet* 355: 1518-9, 2000.
- FASANO A, CATASSI C. Current approaches to diagnosis and treatment of celiac disease: an evolving spectrum. *Gastroenterology* 120: 636-51, 2001.
- FONSECA R, OKEN MM, HARRINGTON D, BAILEY RJ, VAN WIER SA, HENDERSON KJ, KAY NE, VAN NESS B, GREIPP PR, DEWALD GW. Deletions of chromosome 13 in multiple

myeloma identified by interphase FISH usually denote large deletions of the q arm or monosomy. *Leukemia*. 15: 981-6, 2001.

- FONSECA R, BAILEY RJ, AHMANN GJ, RAJKUMAR SV, HOYER JD, LUST JA, KYLE RA, GERTZ MA, GREIPP PR, DEWALD GW. Genomic abnormalities in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Blood* 100: 1417-24, 2002.
- FONSECA R, BARLOGIE B, BATAILLE R, BASTARD C, BERGSAGEL PL, CHESI M, DAVIES FE, DRACH J, GREIPP PR, KIRSCH IR, KUEHL WM, HERNANDEZ JM, MINVIELLE S, PILARSKI LM, SHAUGHNESSY JD JR, STEWART AK, AVET-LOISEAU H. Genetics and cytogenetics of multiple myeloma: a workshop report. *Cancer Res*. 64: 1546-58, 2004.
- FREEMAN HJ. Lymphoproliferative and intestinal malignancies in 214 patients with biopsy-defined celiac disease. *J Clin Gastroenterol*. 38: 429-34, 2004.
- FUNDIA AF, GONZALEZ CID MB, BAI J, GOMEZ JC, MAZURE R, VAZQUEZ H, LARRIPA IB, SLAVUTSKY IR. Chromosome instability in lymphocytes from patients with celiac disease. *Clin Genet*. 45: 57-61, 1994.
- FUNDIA A, GOMEZ JC, MAURINO E, BOERR L, BAI JC, LARRIPA I, SLAVUTSKY I. Chromosome instability in untreated adult celiac disease patients. *Acta Paediatr Suppl*. 412: 82-4, 1996.
- GALLAGHER CJ, GREGORY WM, JONES AE, STANSFELD AG, RICHARDS MA, DHALI WAL HS, MALPAS JS, LISTER TA. Follicular lymphoma: prognostic factors for response and survival. *J Clin Oncol*. 4: 1470-80, 1986.
- GANDOLFI L, PRATESI R, CORDOBA JC, TAUIL PL, GASPARIN M, CATASSI C. Prevalence of celiac disease among blood donors in Brazil. *Am J Gastroenterol* 95: 689-92, 2000.
- GATTER KC, WARNKE RA. Diffuse large B-cell lymphoma. In Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues*. IARC Press, 2001. *World Health Classification of Tumours, 2001*: 142-56. Lyon.
- GISSELSSON D, JONSON T, YU C, MARTINS C, MANDAHN N, WIEGANT J, JIN Y, MERTENS F, JIN C. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer* 87: 202-7, 2002.
- GOMEZ JC, SELVAGGIO GS, VIOLA M, PIZARRO B, LA MOTTA G, DE BARRIO S, CASTELLETTO R, ECHEVERRIA R, SUGAI E, VAZQUEZ H, MAURINO E, BAI JC. Prevalence of celiac disease in Argentina: screening of an adult population in the La Plata area. *Am J Gastroenterol*. 96: 2700-4, 2001.
- GOTTSCLING DE, APARICIO OM, BILLINGTON BL, ZAKIAN VA. Position effect at *S. cerevisiae* telomeres: reversible expression of POLII transcription. *Cell* 63: 751-62, 1990.
- GOYNS MH, LAVERY WL. Telomerase and mammalian ageing: a critical appraisal. *Mech Ageing Dev* 114: 69-77, 2000.
- GREIDER CW, BLACKBURN EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43: 405-13, 1985.

- GREIDER CW, BLACKBURN EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am.* 274: 92-7, 1996.
- GRIBBEN JG, FREEDMAN AS, WOO SD, BLAKE K, SHU RS, FREEMAN G, LONGTINE JA, PINKUS GS, NADLER LM. All advanced stage non-Hodgkin's lymphomas with a polymerase chain reaction amplifiable breakpoint of bcl-2 have residual cells containing the bcl-2 rearrangement at evaluation and after treatment. *Blood* 1991; 78: 3275-80.
- GRIFFITH JD, COMEAU L, ROSENFELD S, STANSEL RM, BIANCHI A, MOSS H, DE LANGE T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-14, 1999.
- GROGAN TM, VAN CAMP B KYLE RA, MÜLLER-HERMELINK HK, HARRIS NL. Plasma Cell Neoplasms. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. *Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues.* IARC Press, 2001. World Health Classification of Tumours, 2001: 142-56. Lyon.
- GUTIERREZ NC, HERNANDEZ JM, GARCIA JL, ALMEIDA J, MATEO G, GONZALEZ MI, HERNANDEZ J, FERNANDEZ-CALVO J, SAN MIGUEL JF. Correlation between cytogenetic abnormalities and disease characteristics in multiple myeloma: monosomy of chromosome 13 and structural abnormalities of 11q are associated with a high percentage of S-phase plasma cells. *Haematologica* 85: 1146-52, 2000.
- HAGMAR L, BONASSI S, STRÖMBERG U, MIKOCZY Z, LANDO C, HANSTEEN IL, MONTAGUD AH, KNUDSEN L, NORPPA H, REUTERWALL C, TINNERBERG H, BROGGER A, FORNI A, HOGSTEDT B, LAMBERT B, MITELMAN F, NORDENSON I, SALOMAA S, SKERFVING S. Chromosomal aberrations in lymphocytes predict human cancer: A report from the European Study Group on Cytogenetics Biomarkers and Health (ESCH). *Cancer Res* 38: 4117-21, 1998.
- HAHN WC, WEINBERG RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med.* 347: 1593-603, 2002. Erratum in: *N Engl J Med.* 348: 674, 2003.
- HALLEK M, BERGSAGEL PL, ANDERSON KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91: 3-21, 1998.
- HARLEY CB, FUTCHER AB, GREIDER CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345: 458-60, 1990.
- HARLEY CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 256: 271-82, 1991.
- HARRIS NL, JAFFE ES, STEIN H, BANKS PM, CHAN JK, CLEARY ML, DELSOL G, DE WOLF-PEETERS C, FALINI B, GATTER KC. A revised European-American classification of lymphoid neoplasms: a proposal from the International Lymphoma Study Group. *Blood* 84: 1361-92, 1994.
- HARRIS NL. Principles of the revised European-American Lymphoma Classification (from the International Lymphoma Study Group). *Ann Oncol.* 8 Suppl 2: 11-6, 1997.
- HARRIS NL, JAFFE ES, DIEBOLD J, FLANDRIN G, MULLER-HERMELINK HK, VARDIMAN J, LISTER TA, BLOOMFIELD CD. The World Health Organization classification of neoplastic

diseases of the hematopoietic and lymphoid tissues. Report of the Clinical Advisory Committee meeting, Airlie House, Virginia, November, 1997. *Ann Oncol.* 10: 1419-32, 1999.

- HARRIS NL. Mature B Cell Neoplasms: Introduction. In: Jaffe ES, Harris NL, Stein H, Vardiman JW. Pathology and Genetics. Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues. IARC Press, 2001. World Health Classification of Tumours, 2001: 123-6. Lyon.
- HASTIE ND, DEMPSTER M, DUNLOP MG, THOMPSON DK, GREEN DK, ALLSHIRE RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 346: 866-8, 1990.
- HAYFLICK L., MOORHEAD PS. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25: 585-621, 1961.
- HEMANN MT, STRONG MA, HAO LY, GREIDER CW. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107: 67-77, 2001.
- HODES R. Molecular targeting of cancer: telomeres as targets. *PNAS* 98: 7649-51, 2001.
- HODES RJ, HATHCOCK KS, WENG NP. Telomeres in T and B cells. *Nat Rev Immunol* 2: 699-706, 2002.
- HÖGLUND M, GISSELSSON D, HANSEN GB, SÄHL T, MITELMAN F. Ovarian Carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Res.* 63: 3378-85, 2003.
- HOLMES GK. Coeliac disease and malignancy. *Dig Liver Dis* 34: 229-37, 2002.
- HOLT SE, WRIGHT WE, SHAY JW. Regulation of telomerase activity in immortal cells lines. *EMBO J* 16: 2932-9, 1996.
- HORSMAN DE, OKAMOTO I, LUDKOVSKY O, LE N, HARDER L, GESK S, SIEBERT R, CHHANABAHAI M, SEHN L, CONNORS JM, GASCOYNE RD. Follicular lymphoma lacking the t(14; 18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol* 120: 424-33, 2003.
- HOLZMANN K, BLIN N, WELTER C, ZANG KD, SEITZ G, HENN W. Telomeric association and loss of telomeric DNA repeats in renal tumors. *Genes Chrom Cancer* 6: 178-81, 1993.
- HOULDSWORTH J, MATHEW S, RAO PH, DYOMINA K, LOUIE DC, PARSA N, OFFIT K, CHAGANTI RS. REL proto-oncogene is frequently amplified in extranodal diffuse large cell lymphoma. *Blood.* 87: 25-9, 1996.
- HOWELL RT, KITCHEN C, STANDEN GR. Telomeric associations in a patient with B-cell prolymphocytic leukaemia. *Genes Chrom Cancer* 7: 116-8, 1993.
- HUANG JZ, SANGER WG, GREINER TC, STAUDT LM, WEISENBURGER DD, PICKERING DL, LYNCH JC, ARMITAGE JO, WARNKE RA, ALIZADEH A, LOSSOS IS, LEVY R, CHAN WC. The t(14; 18) defines a unique subset of diffuse large B- cell lymphoma with a germinal center B-cell gene expression profile. *Blood* 99: 2285-90, 2002.
- HUFFMAN KE, LEVENE SD, TESMER VM, SHAY JW, WRIGHT WE. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *JBC* 275: 19719-22, 2000.

- HUNT KA, MCGOVERN DP, KUMAR PJ, GHOSH S, TRAVIS SP, WALTERS JR, JEWELL DP, PLAYFORD RJ, VAN HEEL DA. A common CTLA4 haplotype associated with coeliac disease. *Eur J Hum Genet.* 13: 440-4, 2005.
- ISCN. An international system for human cytogenetic nomenclature in: Mitelman F, ed. Basel: Karger, 1995.
- JACOBSON JL, HUSSEIN MA, BARLOGIE B, DURIE BG, CROWLEY JJ; Southwest Oncology Group. A new staging system for multiple myeloma patients based on the Southwest Oncology Group (SWOG) experience. *Br J Haematol.* 122: 441-50, 2003.
- JAFFE ES, HARRIS NL, STEIN H VARDIMAN JW, eds. World Health Organization of Tumours (WHO). Pathology and Genetics: Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues, 2001.
- JANZ S, POTTER M, AND RABKIN C. Lymphoma- and leukemia-associated chromosomal translocations in healthy individuals. *Genes Chrom Cancer* 36: 211-23, 2003.
- JOHNSON DA, GAUTSCH JW, SPORTSMAN JR, ELDER JH. Improved technique utilizing nonfat dry milk for analysis of proteins and nucleic acidstransferred to nitrocellulose. *Gene Anal Tech* 1: 3, 1984.
- KARLSEDER J, SMOGORZEWSKA A, DE LANGE T. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295: 2446-9, 2002.
- KIM NW, PIATYSZEK MA, PROWSE KR, HARLEY CB, WEST MD, HO PLC, COVIELLO GM, WRIGHT WE, WEINRICH SL, SHAY JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-5, 1994.
- KLAPPER W, KRAMS M, QIAN W, JANSSEN D, PARWARESCH R. Telomerase activity in B-cell non-Hodgkin lymphomas is regulated by hTERT transcription and correlated with telomere-binding protein expression but uncoupled from proliferation. *Br J Cancer* 89: 713-9, 2003.
- KONIGSBERG R, ZOJER N, ACKERMANN J, KROMER E, KITTLER H, FRITZ E, KAUFMANN H, NOSSLINGER T, RIEDL L, GISSLINGER H, JAGER U, SIMONITSCH I, HEINZ R, LUDWIG H, HUBER H, DRACH J. Predictive role of interphase cytogenetics for survival of patients with multiple myeloma. *J Clin Oncol* 18: 804-12, 2000.
- KUBUKI Y, SUZUKI M, SASAKI H, TOYAMA T, YAMASHITA K, MAEDA K, IDO A, MATSUOKA H, OKAYAMA A, NAKANISHI T, TSUBOUCHI H. Telomerase activity and telomere length as prognostic factors of adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 46: 393-9, 2005.
- KUEHL WM, BERGSAGEL PL. Multiple myeloma: evolving genetic events and host interactions. *Nat Rev Cancer* 2: 175-87, 2002.
- KUGOH H, SHIGENAMI K, FUNAKI K, CARL BARRETT J, OSHIMURA M. Human chromosome 5 carries a putative telomerase repressor gene. *Genes, Chrom Cancer* 36: 37-47, 2003.
- KYLE RA. "Benign" monoclonal gammopathy--after 20 to 35 years of follow-up. *Mayo Clin Proc.* 68: 26-36, 1993.

- KYLE RA, THERNEAU TM, RAJKUMAR SV, OFFORD JR, LARSON DR, PLEVAK MF, MELTON LJ 3rd.. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 346: 564-9, 2002.
- LADETTO M, COMPAGNO M, RICCA I, PAGANO M, ROCCI A, ASTOLFI M, DRANDI D, DI CELLE PF, DELL'AQUILA M, MANTOAN B, VALLET S, PAGLIANO G, DE MARCO F, FRANCESE R, SANTO L, CUTTICA A, MARINONE C, BOCCADORO M, TARELLA C. Telomere length correlates with histopathogenesis according to the germinal center in mature B-cell lymphoproliferative disorders. *Blood* 103: 4644-9, 2004.
- LAI JL, ZANDECKI M, MARY JY, BERNARDI F, IZYDORCZYK V, FLACTIF M, MOREL P, JOUET JP, BAUTERS F, FACON T. Improved cytogenetics in multiple myeloma: a study of 151 patients including 117 patients at diagnosis. *Blood* 85: 2490-7, 1995.
- LAI R, ARBER DA, CHANG KL, WILSON CS, WEISS LM. Frequency of bcl-2 expression in non-Hodgkin's lymphoma: a study of 778 cases with comparison of marginal zone lymphoma and monocytoid B-cell hyperplasia. *Mod Pathol* 11: 864-9, 1998.
- LEEPER TL, LEULLIOT N, VARANI G. The solution structure of an essential stem-loop of human telomerase RNA. *Nucleic Acids Res* 31: 2614, 2003.
<http://faculty.washington.edu/varani/images/human%20telomeres.jpg>
- LETEURTRE F, LI X, GUARDIOLA P, LE ROUX G, SERGERE JC, RICHARD P, CAROSELLA ED, GLUCKMAN E. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br J Haematol.* 105: 883-93, 1999
- LIE BA, SOLLID LM, ASCHER H, EK J, AKSELSEN HE, RONNINGEN KS, THORSBY E, UNDLIEN DE. A gene telomeric of the HLA class I region is involved in predisposition to both type 1 diabetes and coeliac disease. *Tissue Antigens* 54: 162-8, 1999.
- LINET MS, HARLOW SD, MCLAUGHLIN JK. A case-control study of multiple myeloma in whites: chronic antigenic stimulation, occupation, and drug use. *Cancer Res.* 47: 2978-81, 1987.
- LIU D, O'CONNOR MS, QIN J, SONGYANG Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *J Biol Chem.* 279::51338-42, 2004.
- LOPEZ-GUILLERMO A, CABANILLAS F, MCDONNELL TI, MCLAUGHLIN P, SMITH T, PUGH W, HAGEMEISTER F, RODRIGUEZ MA, ROMAGUERA JE, YOUNES A, SARRIS AH, PRETI HA, LEE M-S. Correlation of BCL-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 93: 3081-7, 1999.
- LOSSOS IS, ALIZADEH AA, DIEHN M, WARNKE R, THORSTENSON Y, OEFNER PJ, BROWN PO, BOTSTEIN D, LEVY R. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large-cell lymphoma: alternative patterns with increased or decreased expression of c-myc and its regulated genes. *PNAS U S A.* 99: 8886-91, 2002.
- MAGRATH IT. Historical perspective: the evolution of modern concepts of biology and managements. In: Magrath IT, editor: *The Non-Hodgkin's second lymphomas* edition. New York: Oxford University Press 1997, pp 47-78.

- MAKI M, MUSTALAHTI K, KOKKONEN J, KULMALA P, HAAPALAHTI M, KARTTUNEN T, ILONEN J, LAURILA K, DAHLBOM I, HANSSON T, HOPFL P, KNIP M. Prevalence of Celiac disease among children in Finland. *N Engl J Med.* 348: 2517-24, 2003.
- MANN RB, BERARD CW. Criteria for the cytologic subclassification of follicular lymphomas: a proposed alternative method. *Hematol Oncol* 1: 187-92, 1983.
- MARSH, MN. Gluten, major histocompatibility complex and the small intestine. A molecular and immunologic approach to the spectrum of the gluten sensitivity (celiac sprue). *Gastroenterology* 102: 330-54, 1992.
- MARTENS UM, ZIJLMANS JM, POON SS, DRAGOWSKA W, YUI J, CHAVEZ EA, WARD RK, LANSDORP PM. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18: 76-80, 1998.
- MARTINEZ-CLIMENT JA, ALIZADEH AA, SEGRAVES R, BLESA D, RUBIO-MOSCARDO F, ALBERTSON DG, GARCIA-CONDE J, DYER MJ, LEVY R, PINKEL D, LOSSOS IS. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 101: 3109-17, 2003.
- MEEKER AK, HICKS JL, IACOBUZIO-DONAHUE CA, MONTGOMERY EA, WESTRA WH, CHAN TY, RONNETT BM, DE MARZO AM. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 10: 3317-26, 2004.
- MERGNY JL, RIOU JF, MAILLIET P, TEULADE-FICHOU MP, GILSON E. Natural and pharmacological regulation of telomerase. *Nucleic Acids Res* 30: 839-65, 2002.
- METCALFE JA, PARKHILL J, CAMPBELL L, STACEY M, BIGGS P, BYRD PJ, TAYLOR AM. Accelerated telomere shortening in ataxia telangiectasia. *Nat Genet* 13: 350-3, 1996
- METTER GE, NATHWANI BN, BURKE JS, WINBERG CD, MANN RB, BARCOS M, KJELDSBERG CR, WHITCOMB CC, DIXON DO, MILLER TP, et al. Morphological subclassification of follicular lymphoma: variability of diagnoses among hematopathologists, a collaborative study between the Repository Center and Pathology Panel for Lymphoma Clinical Studies. *J Clin Oncol.* 3: 25-38, 1985.
- MIURA N, HORIKAWA I, NISHIMOTO A, OHMURA H, ITO H, HIROHASHI S, SHAY JW, OSHIMURA M. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 93: 56-62, 1997.
- MO Y, GAN Y, SONG S, JOHNSTON J, XIAO X, WIENTJES MG, AU JL. Simultaneous targeting of telomeres and telomerase as a cancer therapeutic approach. *Cancer Res* 63: 579-85, 2003.
- MONDELLO C, PETROPOULOU C, MONTI D, GONOS ES, FRANCESCHI C, NUZZO F. Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res* 10: 234-42, 1999.
- MOSS SF, HOLT PR. Enfermedad Celíaca. En: J Willis Hurst. *Medicina para la práctica clínica.* Editorial Médica Panamericana. 4ta edición. Capítulo 19, pp1595-7, 1998.

- NAGY M, BALASZ M, ADAM Z, PETKO Z, TIMAR B, SZEREDAY Z, LASZLO T, WARNKE RA, MATOLCSY A. Genetic instability is associated with histological transformation of follicle center lymphoma. *Leukemia* 14: 2142-8, 2000.
- NANJANGUD G, NARESH K, TERUYA-FELDSTEIN J, OLSHEN AB, WILTON AS, PARSANZ, RAO PH, FILIPA DA, HEGDE A, HEDVAT CV, JHANWAR SC, MEHRA S, JOHANSSON B, MITELMAN F, ZELENETZ AD, CHAGANTY RSK. Cytogenetic analysis of follicular lymphoma: Chromosome instability associated with t(14;18)(q32;q21) positive and negative subsets, histology and transformations. *Blood* 102: 847a, 2003.
- NATHWANI BN, METTER GE, MILLER TP, BURKE JS, MANN RB, BARCOS M, KJELDSBERG CR, DIXON DO, WINBERG CD, WHITCOMB CC, et al. What should be the morphologic criteria for the subdivision of follicular lymphomas? *Blood*. 68: 837-45, 1986.
- NATHWANI BN, HARRIS NL, WEISENBURGER D, ISAACSON PG, PIRIS MA, BERGER F, MULLER-HERMELINK HK, SWERDLOW SH. Follicular lymphoma. In: *Pathology and Genetics of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* 162-7, 2001.
- NILSSON T, LENHOFF S, TURESSON I, RYLANDER L, MITELMAN F, WESTIN J, HOGLUND M, JOHANSSON B. Cytogenetics features of multiple myeloma: impact of gender, age, disease phase, culture time, and cytokine stimulation. *Eur J Haematol*. 68: 345-53, 2002.
- NORIEGA MF, DE BRASI C, NARBAITZ M, SLAVUTSKY I. Incidence of BCL-2 gene rearrangements in Argentinean non-Hodgkin lymphoma patients: increased frequency of breakpoints outside of MBR and MCR. *Blood Cells Mol Dis*. 32: 232-9, 2004.
- NORRBACK K-F, DAHLENBORG K, CARLSSON R, ROOS G. Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas. *Blood* 88: 222-9, 1996.
- NORRBACK K-F, HULTDIN M, DAHLENBORG K, OSTERMAN P, CARLSSON R, ROOS G. Telomerase regulation and telomere dynamics in germinal centers. *Eur J Haematol* 67: 309-17, 2001.
- NOWAK R. Telomeric length variation in human testicular germ cell tumours: Very long and homogeneous telomeres in spermatocytic seminoma. *Oncology Rep* 9: 1099-102, 1997.
- NUGENT CI, LUNDBLAD V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Devel*. 12: 1073-85, 1998.
- NUÑEZ G, LONDON L, HOCKENBERY D, ALEXANDER M, MCKEARN JP, KORSMEYER SJ. Deregulated Bcl-2 gene expression selectively prolongs survival of growth factor-deprived hemopoietic cell lines. *J Immunol*. 144: 3602-10, 1990.
- OBERMANN EC, DISS TC, HAMOUDI RA, MUNSON P, WILKINS BS, CAMOZZI ML, ISAACSON PG, DU MQ, DOGAN A. Loss of heterozygosity at chromosome 9p21 is a frequent finding in enteropathy-type T-cell lymphoma. *J Pathol*. 202: 252-62, 2004.
- OHYASHIKI JH, OHYASHIKI K, FUJIMURA T, KAWAKUBO K, SHIMAMOTO T, IWABUCHI A, TOYAMA K. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*. 54: 3557-60, 1994.

- OHYASHIKI K, OHYASHIKI JH, IWAMA H, HAYASHI S, SHAY JW, TOYAMA K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 11: 190-4, 1997.
- OLTVAI ZN, MILLIMAN CL, KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-19, 1993.
- OMIM. Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM). Johns Hopkins University, Baltimore, MD. MIM Number: 212750, 2002. World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>.
- O'SULLIVAN JN, BRONNER MP, BRETNALL TA, et al. Chromosomal instability in ulcerative colitis is related to telomere shortening. *Nat Genet* 32: 280-4, 2002.
- Paris Conference (1971): Standardization in human cytogenetics. *Cytogenetics* 11: 317-62, 1972.
- PARKIN D, WHELAN S, FARLAY J, RAYMOND L, YOUNG J. Cancer incidences in five continents. Volume VII. IARCS Scientific Publication N°143, 1997.
- PASCOLO E, WENZ C, LINGNER J, HAUER N, PRIEPKE H, KAUFFMANN I, GARIN-CHESA P, RETTIG WJ, DAMM K, SCHNAPP A. Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate. *JBC* 277: 15566-72, 2002.
- PATHAK S, WANG MK, DHALIWAL MK, SACKS PC. Telomeric association: another characteristic of cancer chromosomes? *Cytogenet Cell Genet* 47: 227-9, 1988.
- PATHAK S, MULTANI AS, FURLONG CL, SOHN SH. Telomere dynamics, aneuploidy, stem cells, and cancer. *Int J Oncol* 20: 637-41, 2002.
- PEREZ-ANDRES M, ALMEIDA J, MARTIN-AYUSO M, MORO MJ, MARTIN-NUNEZ G, GALENDE J, BORREGO D, RODRIGUEZ MJ, ORTEGA F, HERNANDEZ J, MORENO I, DOMINGUEZ M, MATEO G, SAN MIGUEL JF, ORFAO A; Spanish Network on multiple myeloma (G03/136); the Spanish Network of Cancer Research Centers (C03/10). Clonal plasma cells from monoclonal gammopathy of undetermined significance, multiple myeloma and plasma cell leukemia show different expression profiles of molecules involved in the interaction with the immunological bone marrow microenvironment. *Leukemia*. 19: 449-55, 2005
- PITTALUGA S, AYOUBI TA, WLODARSKA I, STUL M, CASSIMAN JJ, MECUCCI C, VAN DEN BERGHE H, VAN DE VEN WJ, DE WOLF-PEETERS C. BCL-6 expression in reactive lymphoid tissue and in B-cell non-Hodgkin's lymphomas. *J Pathol*. 179: 145-50, 1996.
- RABINOVITCH PS, DZIADON S, BRETNALL TA, EMOND MJ, CRISPIN DA, HAGGITT RC, BRONNER MP. Pancolonic chromosomal instability preceds dysplasia and cancer in ulcerative colitis. *Cancer Res* 59: 5148-53, 1999.
- RAJKUMAR SV, FONSECA R, DEWALD GW, THERNEAU TM, LACY MQ, KYLE RA, GREIPP PR, GERTZ MA. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 113: 73-7, 1999.
- RAMPERTAB SD, FORDE KA, GREEN PH. Small bowel neoplasia in coeliac disease. *Gut* 52: 1211-4, 2003.

- RAMPERTAB, SD. 69th Annual Meeting of American College of Gastroenterology, November 2004. Editora Medica digital, 2004.
- REDDEL RR, BRYAN TM, MURNAME JP. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. A review. *Biochemistry* 62: 1254-62, 1997.
- REED JC. Regulation of apoptosis by bcl-2 family proteins and its role in cancer and chemoresistance. *Curr Opin Oncol.* 7: 541-6, 1995.
- REED JC, MIYASHITA T, TAKAYAMA S, WANG HG, SATO T, KRAJEWSKI S, AIME-SEMPE C, BODRUG S, KITADA S, HANADA M. BCL-2 family proteins: regulators of cell death involved in the pathogenesis of cancer and resistance to therapy. *J Cell Biochem.* 60: 23-32, 1996.
- REMES K, NORRBACK K-F, ROSENQUIST R, MEHLE C, LINDH J, ROOS G. Telomere length and telomerase activity in malignant lymphomas at diagnosis and relapse. *Br J Cancer* 82: 601-7, 2000.
- RIBONI R, CASATI A, NARDO T, ZACCARO E, FERRETTI L, NUZZO F, MONDELLO C. Telomeric fusions in cultured human fibroblasts as a source of genomic instability. *Cancer Genet Cytogenet.* 95: 130-6, 1997.
- RICHKIND KE, WASON D, VIDAILLET HJ. Cardiac myxoma characterized by clonal telomeric association. *Genes Chromosomes Cancer* 9: 68-71, 1994.
- RIDLEY RC, XIAO H, HATA H, WOODLIFF J, EPSTEIN J, SANDERSON RD. Expression of syndecan regulates human myeloma plasma cell adhesion to type I collagen. *Blood* 81: 767-74, 1993.
- RIGOLIN GM, PORTA MD, BUGLI AM, CASTAGNARI B, MAURO E, BRAGOTTI LZ, CICCONE M, CUNEO A, CASTOLDI G. Flow cytometric detection of accelerated telomere shortening in myelodysplastic syndromes: correlations with aetiological and clinical-biological findings. *Eur J Haematol.* 73: 351-8, 2004.
- ROSENWALD A, WRIGHT G, CHAN WC, CONNORS JM, CAMPO E, FISHER RI, GASCOYNE RD, MULLER-HERMELINK HK, SMELAND EB, GILTNANE JM, HURT EM, ZHAO H, AVERETT L, YANG L, WILSON WH, JAFFE ES, SIMON R, KLAUSNER RD, POWELL J, DUFFEY PL, LONGO DL, GREINER TC, WEISENBURGER DD, SANGER WG, DAVE BJ, LYNCH JC, VOSE J, ARMITAGE JO, MONTSERRAT E, LOPEZ-GUILLERMO A, GROGAN TM, MILLER TP, LEBLANC M, OTT G, KVALOY S, DELABIE J, HOLTE H, KRAJCI P, STOKKE T, STAUDT LM; Lymphoma/Leukemia Molecular Profiling Project. The use of molecular profiling to predict survival after chemotherapy for diffuse large-B-cell lymphoma. *N Engl J Med.* 346: 1937-47, 2002.
- RUDOLPH KL, MILLARD M, BOSENBERG MW, DEPINHO RA. Telomere dysfunction and evolution of intestinal carcinoma in mice and humans. *Nat Genet* 28: 155-9, 2001.
- SALTMAN D, MORGAN R, CLEARY ML, de LANGE T. Telomeric structure in cells with chromosome ends associations. *Chromosoma* 102: 121-8, 1993.
- SAINTIGNY Y, DUMAY A, LAMBERT S, LOPEZ BS. A novel role for the Bcl-2 protein family: specific suppression of the RAD51 recombination pathway. *EMBO J.* 20: 2596-607, 2001.

- SAMBROOK J, FRITSCH EF, MANIATIS T. Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- SARETZKI G. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lett* 194: 209-19, 2003.
- SAWYER JR, ROLOSON GJ, BELL JM, THOMAS JR, TEO C, CHADDUCK WM. Telomeric associations in the progression of chromosome aberrations in pediatric solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet* 90: 1-13, 1996.
- SAWYER JR, MILLER JP, ELLISON DA. Clonal telomeric fusions and chromosome instability in a subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependimoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 100: 169-175, 1998.
- SCHWARTZ HS, JENKINS RB, DAHL RJ, DEWALD GW. Cytogenetic analysis on giant cell tumor of bone. *Clin Orthop Rel Res* 240: 250-60, 1989.
- SEABRIGHT M. A rapid banding technique for human chromosomes. *Lancet* 2: 971-2, 1971.
- SEONG C, DELASALLE K, HAYES K, WEBER D, DIMOPOULOS M, SWANTKOWSKI J, HUH Y, GLASSMAN A, CHAMPLIN R, ALEXANIAN R. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol.* 101: 189-94, 1998.
- SHAUGHNESSY J, JACOBSON J, SAWYER J, MCCOY J, FASSAS A, ZHAN F, BUMM K, EPSTEIN J, ANAISSIE E, JAGANNATH S, VESOLE D, SIEGEL D, DESIKAN R, MUNSHI N, BADROS A, TIAN E, ZANGARI M, TRICOT G, CROWLEY J, BARLOGIE B. Continuous absence of metaphase-defined cytogenetic abnormalities, especially of chromosome 13 and hypodiploidy, ensures long-term survival in multiple myeloma treated with Total Therapy I: interpretation in the context of global gene expression. *Blood* 101: 3849-56, 2003.
- SHAUGHNESSY J JR MULTIPLE MYELOMA: THE DISEASE. ITS THERAPY AND PROGNOSIS. IN: HAROUSSEAU JL, SHAUGHNESSY J JR, RICHARDSON P. Multiple myeloma. *Hematology (Am Soc Hematol Educ Program)* 237-56, 2004.
- SHAY JW, WERBIN H, WRIGHT WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia*.10: 1255-61, 1996.
- SHIPP MA, HARRINGTON DP, ANDERSON JR, ARMITAGE JO, BONADONNA G, BRITTINGER G, et al. A predictive model for aggressive NHL: The International Non-Hodgkin's Lymphoma Prognostic Factors Project, *New England Journal of Medicine* 329: 987-94, 1993.
- SHIPP MA, ROSS KN, TAMAYO P, WENG AP, KUTOK JL, AGUIAR RC, GAASENBEEK M, ANGELO M, REICH M, PINKUS GS, RAY TS, KOVAL MA, LAST KW, NORTON A, LISTER TA, MESIROV J, NEUBERG DS, LANDER ES, ASTER JC, GOLUB TR. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med.* 8: 68-74, 2002.
- SHIRATSUCHI M, MUTA K, ABE Y, MOTOMURA S, TAGUCHI F, TAKATSUKI H, UIKE N, UMEMURA T, NAWATA H, NISHIMURA J. Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. *Cancer.* 94: 2232-8, 2002.

- SIEGLOVA Z, ZILOVCOVA S, CERMAK J, RIHOVA H, BREZINOVA D, DVORAKOVA R, MARKOVA M, MAALOUFOVA J, SAJDOVA J, BREZINOVA J, ZEMANOVA Z, MICHALOVA K. Dynamics of telomere erosion and its association with genome instability in myelodysplastic syndromes (MDS) and acute myelogenous leukemia arising from MDS: a marker of disease prognosis? *Leuk Res* 28: 1013-21, 2004.
- SLAGBOOM PE, DROOG S, BOOMSMA DI. Genetic determination of telomere size: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55: 876-82, 1994.
- SLAVUTSKY I, GOMEZ JC, PEDREIRA S, NIVELONI S, BOERR LA, BAI J. Increased rDNA transcriptional activity in celiac disease. *J Clin Gastroenterol.* 14: 11-4, 1992.
- SLIJEPCEVIC P, BRYANT PE. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. *Int J Radiat Biol* 73: 1-13, 1998.
- SMADJA NV, BASTARD C, BRIGAUDEAU C, LEROUX D, FRUCHART C, GROUPE FRANCAIS DE CYTOGENETIQUE HEMATOLOGIQUE. Hypodiploidy is a major prognostic factor in multiple myeloma. *Blood* 98: 2229-38, 2001.
- SMITH JK, YEH G. Telomere reduction in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol.* 167: 1883-7, 1992.
- SONET A, THEATE I, DELOS M, MONTFORT L, MINEUR P, DRIESSCHAERT P, MICHAUX L, FERRANT A, BOSLY A. Clinical and pathological features of 14 non-Hodgkin's lymphomas associated with coeliac disease. *Acta Clin Belg.* 59: 143-51, 2004.
- SOUTHERN E. Detection of specific sequences among DNA fragments separates by gel electrophoresis. *J Mol Biol* 98: 503-17, 1975.
- STANSEL RM, DE LANGE T, GRIFFITH JD. T-loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *EMBO J.* 20: 5532-40, 2001.
- SUGIMURA K, YOSHIDA N, HISATOMI H, NAKATANI T, IKEMOTO S. Telomerase activity in human renal carcinoma. *BJU Int* 83: 693-7, 1999.
- SUZUKI S, FUKUSHIMA T, AMI H, ONOGI H, NAKAMURA I, TAKENOSHITA S. New attempt of preoperative differential diagnosis of thyroid neoplasms by telomerase activity measurement. *Oncol Rep.* 9: 539-44, 2002.
- SWINSON CM, SLAVIN G, COLES EC, et al. Coeliac disease and malignancy. *Lancet* 1: 111-5, 1983.
- TSUJIMOTO Y, FINGER LR, YUNIS J, NOWELL PC, CROCE CM. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science* 226: 1097-9, 1984.

- VADER W, KOOY Y, VAN VEELLEN P, DE RU A, HARRIS D, BENCKHUIJSEN W, PENA S, MEARIN L, DRIJFHOUT JW, KONING F. The gluten response in children with celiac disease is directed toward multiple gliadin and glutenin peptides. *Gastroenterology* 122: 1729-37, 2002.
- VAN STEENSEL B, DE LANGE T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 385: 740-3, 1997.
- VAZIRI H, SCHACHTER F, UCHIDA I, WEI L, ZHU X, EFFROS R, COHEN D, HARLEY CB. Loss of telomeric DNA during aging of normal and trisomy 21 human lymphocytes. *Am J Hum Genet* 52: 661-7, 1993.
- VENTURA A, MAGAZZU G, GRECO L. Duration of exposure to gluten and risk for autoimmune disorders in patients with celiac disease. SIGEP Study Group for Autoimmune Disorders in Celiac Disease. *Gastroenterology*. 117: 297-303, 1999.
- VOSE JM, CHIU BCH, CHESON BD, DANCEY J, WRIGHT J. Update on epidemiology and therapeutics for non-Hodgkin's lymphomas. I- Epidemiology of non-Hodgkin's lymphomas. In: *Hematology*, pp 241-62, 2002.
- WALKER CL, CARGILE CB, FLOY KM, DLANNOY M, MIGION BR. The Barr body is a looped chromosome formed by telomere association. *Proc Nat Acad USA* 88: 6191-5, 1991.
- WANG S, WU K, CHIN AC, CHEN-KIANG S, PONGRACZ K, GRYAZNOV S, MOORE MA. Telomerase inhibition with an oligonucleotide telomerase template antagonist: in vitro and in vivo studies in multiple myeloma and lymphoma. *Blood* 103: 258-66, 2004.
- WEST J, LOGAN RF, SMITH CJ, HUBBARD RB, CARD TR. Malignancy and mortality in people with coeliac disease: population based cohort study. *BMJ*. 329: 716-9, 2004
- WILLIS TG, DYER MJ. The role of immunoglobulin translocations in the pathogenesis of B-cell malignancies. *Blood* 96: 808-22, 2000.
- WOOLLEY N, HOLOPAINEN P, OLLIKAINEN V, MUSTALAHTI K, MAKI M, KERE J, PARTANEN J. A new locus for coeliac disease mapped to chromosome 15 in a population isolate. *Hum Genet*. 111: 40-5, 2002.
- WU KD, HANSEN ER. Shortened telomere length is demonstrated in T-cell subsets together with a pronounced increased telomerase activity in CD4 positive T cells from blood of patients with mycosis fungoides and parapsoriasis. *Exp Dermatol* 10: 329-36, 2001.
- WU K-D, ORME LM, SHAUGHNESSY J JR, JACOBSON J, BARLOGIE B, MOORE MAS. Telomerase and telomere length in multiple myeloma: correlations with disease heterogeneity, cytogenetic status, and overall survival. *Blood* 101: 4982-9, 2003.
- XU D, ZHENG C, BERGENBRANT S, HOLM G, BJORKHOLM M, YI Q, GRUBER A. Telomerase activity in plasma cell dyscrasias. *Br J Cancer* 84: 621-5, 2001.
- YAMADA O, OSHIMI K, MIZOGUCHI H. Telomere reduction in hematologic cells. *Int J Hematol* 57: 181-6, 1993.

- YANG J, CHANG E, CHERRY AM, BANGS CD, OEI Y, BODNAR A, BRONSTEIN A, CHIU CP, HERRON GS. Human endothelial cell life extension by telomerase expression. *JBC* 274: 26141-8, 1999.
- YOUNG CK, CHO HJ, KIM SH, KIM HB, KIM MH, CHANG IY, LEE JS, CHUNG MH, HAHM KS, YOU HJ. Bcl-2 expression suppresses mismatch repair activity through inhibition of E2F transcriptional activity. *Nat Cell Biol.* 7: 137-47, 2005.
- ZHAN F, TIAN E, BUMM K, SMITH R, BARLOGIE B, SHAUGHNESSY J Jr. Gene expression profiling of human plasma cell differentiation and classification of multiple myeloma based on similarities to distinct stages of late-stage B-cell development. *Blood.* 101: 1128-40, 2003.
- ZHANG W, PIATYSZEK MA, KOBAYASHI T, ESTEY E, ANDREEFF M, DEISSEROTH AB, WRIGHT WE, SHAY JW. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: Inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 2: 799-803, 1996.
- ZHANG B, GOJO I, FENTON RG. Myeloid cell factor-1 is a critical survival factor for multiple myeloma. *Blood.* 99: 1885-93, 2002.
- ZOJER N, KONIGSBERG R, ACKERMANN J, FRITZ E, DALLINGER S, KROMER E, KAUFMANN H, RIEDL L, GISSLINGER H, SCHREIBER S, HEINZ R, LUDWIG H, HUBER H, DRACH J. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood.* 95: 1925-30, 2000.
- ZUOLIN Y, JIANFANG S, SHAN L. Detection of telomerase activity in patients with mycosis fungoides. *Chin Med Sci J.* 18: 124-7, 2003.

9. Abreviaturas

9. ABREVIATURAS

A: Asintomático

BCL-2: Gen BCL-2

EC: Enfermedad Celíaca

EC-B: Biopsias de pacientes con Enfermedad Celíaca

EC-SP: Sangre periférica de pacientes con Enfermedad Celíaca

FISH: Hibridación *in situ* con fluorescencia, del inglés *Fluorescent in situ hybridization*

hTERT: Subunidad catalítica de la telomerasa, del inglés *human Telomerase Reverse Transcriptase*

hTR: Parte ARN de la telomerasa, del inglés *human Telomerase RNA*

Ig: Inmunoglobulina

Kb: Kilobases

LBDCG: Linfoma B difuso a células grandes

LBDCG-S: LBDCG secundario a Folicular

LF: Linfoma Folicular

LNH: Linfoma no-Hodgkin

M: Monosintomático

MBR: Major Breakpoint Region

mcr: minor cluster region

MGUS: Gamopatía monoclonal de significado incierto, del inglés *monoclonal gammopathy of undetermined significance*

MHC: Complejo mayor de histocompatibilidad, del inglés Major Histocompatibility Complex

MM: Mieloma Múltiple

NK: células *natural killer*

P: Polisintomático

RB1: Gen retinoblastoma 1

TAs: asociaciones teloméricas, del inglés *telomeric associations*

TRF: Fragmentos de restricción terminal, del inglés *terminal restriction fragments*

TRF1: Proteína TRF1

TRF2: Proteína TRF2

VEGF: Vascular endothelial growth factor