

Acortamiento telomérico e inestabilidad cromosómica en mieloma múltiple (MM) y gamapatía monoclonal de significado incierto (MGUS)

Alejandra S. H. Cottliar¹, Estela M. Pedrazzini^{1,4}, Claudia Corrado²,
María I. Engelberger², Marina Narbaitz³, Irma R. Slavutsky¹

Departamentos de Genética¹, Oncohematología² y División Patología³, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires, Argentina.

Facultad de Ciencias Exactas⁴, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina.

Mención XVI Congreso Argentino de Hematología

Correspondencia: Lic. Alejandra Cottliar - Departamento de Genética - Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina Pacheo de Melo 3081, 1425 - Buenos Aires, Argentina

TE: (5411) 4805-5759 int. 241 y 291. FAX: (5411) 4803-9475. e-mail: acottliar@yahoo.com.ar

Fecha de recepción: 03-09-03
Fecha de aceptación: 18-10-03

HEMATOLOGIA, Vol. 7 N° 3: 176-182
Noviembre-Diciembre, 2003



ARTÍCULO ORIGINAL

RESUMEN

Objetivos: Los telómeros son estructuras esenciales para el mantenimiento de la integridad cromosómica y la capacidad replicativa de la célula. En este trabajo se evaluó la longitud telomérica (LT) y la presencia de asociaciones teloméricas (TAs) en médula ósea (MO) de MM y MGUS.

Material y métodos: Se estudiaron 31 pacientes (pts) con MM: 12 al diagnóstico (D), 11 en recaída (R), 8 en remisión (RE) y 2 con MGUS. La LT se evaluó mediante el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF).

Resultados: En MM, la media de TRF resultó menor ($5,20 \pm 0,35$ Kb) que en controles ($8,50 \pm 0,50$ Kb) ($p < 0,001$). Los TRF al D y en R fueron más cortos que en RE ($p < 0,001$). Se observó una correlación negativa entre TRF y el porcentaje de células plasmáticas en MO ($rK = -0,540$; $p = 0,002$). Los pacientes con anomalías cromosómicas tuvieron TRFs significativamente más cortos ($p < 0,05$). Los MGUS no difirieron de los controles. Se observó un incremento de TAs en MM ($19,46 \pm 1,98\%$) respecto de MGUS ($6,12 \pm 1,87\%$) y MO normal ($2,00 \pm 0,93\%$) ($p < 0,001$).

Conclusiones: Nuestros hallazgos indican que los TRFs podrían ser marcadores tumorales y sustentan que la disminución de la LT incrementa la frecuencia de TAs e inestabilidad cromosómica, sugiriendo su participación en el desarrollo de MM.

Palabras clave: Mieloma Múltiple; MGUS; telómeros; longitud telomérica; asociaciones teloméricas.

INTRODUCCIÓN

El Mieloma Múltiple (MM) es una neoplasia clonal caracterizada por una infiltración atípica de

células plasmáticas en la médula ósea (MO) y la presencia de una proteína monoclonal en suero y/u orina. Se origina a partir de un proceso de transformación neoplásica de múltiples pasos que conduce a la acumulación progresiva de eventos genéticos que favorecen la proliferación y expansión clonal¹. La Gamapatía Monoclonal de Significado Incierto (MGUS) se caracteriza por presentar una proteína monoclonal en suero u orina sin otra característica clínica de MM. A nivel clínico, los pacientes con MGUS tienen un curso benigno, con un seguimiento de 25 años, existe una probabilidad actuarial del 30% de desarrollar una neoplasia de células plasmáticas².

Los telómeros son estructuras especializadas ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos, constituidos por secuencias de ADN (TTAGGG)_n repetidas en tandem y proteínas asociadas. Cumplen un rol esencial en el mantenimiento de la integridad y estabilidad cromosómica, que les permiten una correcta segregación en mitosis e impiden las fusiones terminales con otros cromosomas, constituyendo un factor crítico en la supervivencia celular. Interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular, y su acortamiento progresivo refleja una reducción en la capacidad replicativa de la célula, llevándola a la senescencia³.

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.

La integridad y funcionalidad de los mismos 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 secuencias teloméricas con cada ronda de replicación del ADN, durante las sucesivas divisiones celulares, lo que determina el acortamiento telomérico⁴. Este proceso puede ser compensado por una síntesis telomérica *de novo* por parte de la telomerasa^{5,6}, que permitiría mantener la longitud telomérica en equilibrio, de modo que la célula pueda seguir proliferando⁷. Se sabe que esta enzima se encuentra ausente en células somáticas humanas normales, detectándose su actividad en células germinales, células stem y en la mayoría de las células tumorales *in vivo* o inmortalizadas *in vitro*, sugiriendo que tanto la telomerasa, como el mantenimiento telomérico son requeridos para una proliferación celular ilimitada y para la tumorigénesis^{3,8}.

En estudios previos se ha encontrado que el acortamiento telomérico está asociado a una senescencia replicativa y a la presencia de inestabilidad cromosómica^{9,10}, mecanismos que contribuyen directamente a la aparición de las anomalías cromosómicas usualmente observadas en diversos tipos de cáncer. De hecho, se ha demostrado una reducción telomérica en diferentes neoplasias hematológicas¹¹⁻¹⁵ y tumores sólidos, así como en líneas celulares¹⁶. Esta reducción de la longitud de los telómeros llevaría a la formación de asociaciones teloméricas (TAs), que aumentaría la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genéticos de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico, los que ocurrirían como resultado de ciclos de ruptura y fusión que llevarían a desbalances de material genético. Estudios recientes han mostrado una correlación positiva entre la presencia de anomalías cromosómicas y el acortamiento telomérico¹⁷, habiéndose detectado que aquellos cromosomas con telómeros críticamente acortados se encontraban

preferentemente involucrados en rearrreglos estructurales en neoplasias¹⁸.

El objetivo de este trabajo fue evaluar la longitud telomérica, medida a través del análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF), y la presencia de TAs en células de MO de pacientes con MM y MGUS. Dicho análisis permitió detectar un acortamiento telomérico significativo y frecuencias incrementadas de TAs en los pacientes con MM, observándose una fuerte correlación entre la LT y el porcentaje de infiltración de células plasmáticas (CP) en MO. Asimismo, se observaron TRFs significativamente más cortos en pacientes con MM con cariotipos anormales.

MATERIAL Y MÉTODOS

Pacientes

Se estudiaron 31 pacientes con MM (17 mujeres) y dos casos con MGUS (1 mujer) (Tabla 1). El estudio de la enfermedad fue definido de acuerdo a los criterios propuestos por Durie y Salmon¹⁹. Doce pts fueron estudiados al diagnóstico (D) antes de comenzar algún tipo de tratamiento, 11 fueron evaluados en la recaída (R) después de al menos, dos regímenes de quimioterapia, y 8 fueron examinados durante la remisión (RE): 6 en remisión parcial (RP) y 2 en remisión completa (RC). El valor medio de β_2 M al diagnóstico en nuestra serie de pts con MM fue $8,98 \pm 1,61$ μ g/ml (valores normales: <2,3 μ g/ml hasta 60 años; <3,0 μ g/ml para mayores de 60 años), mostrando el 92% de los casos niveles aumentados de β_2 M.

La información referente a los diferentes factores pronóstico, incluyendo CP en MO, el análisis citogenético y de hibridación *in situ* con fluorescencia (FISH) fue comparada con los parámetros evaluados. El valor medio de CP en MO fue de 38%: 36% de los casos se presentaron con <30% de CP, 36% con 30%-60%, y 28% con valores superiores al 60% (Tabla 1). Los pacientes con MGUS mostraron un valor medio de CP en MO del 9%.

TABLA 1
Datos clínicos de los pacientes con MM y MGUS:

Grupos	Sexo		Edad mediana (años) (Rango)	Momento del estudio			Estadio Clínico			CP en MO (%)		
	F	M		D	R	RE	I	II	III	<30	30-60	>60
MM	17	14	64 (42-78)	12	11	8	1	3	27	11 (36)	11 (36)	9 (28)
MGUS	1	1	61	2	0	0	-	-	-	2	0	0

MM: mieloma múltiple; MGUS: gamapatías monoclonales de significado incierto; CP en MO: células plasmáticas en médula ósea; D: Diagnóstico; R: Recaída; RE: Remisión.

Estudios Citogenéticos y de FISH

Se cultivaron las muestras de MO durante 19-24 horas a 37°C en medio F-12 suplementado con 15% de suero fetal bovino y durante 96 hs con la estimulación del mitógeno Pockeweet. Para el análisis cromosómico se utilizó la técnica de bandejo G. El análisis de TAs fue llevado a cabo en 50 metafases por individuo, provenientes de cultivos de MO. Seis muestras de MO normales fueron utilizadas como controles (mediana de edad 35 años, rango 24-40 años). Se efectuó el análisis de FISH con la sonda de secuencia única del gen RB1 (Retinoblastoma), localizado a nivel de 13q14 (LSI RB1, VYSIS), procesada siguiendo los protocolos establecidos. Se analizaron 400 núcleos interfásicos de cada muestra. El punto de corte para la presencia de monosomía de RB1 (media control normal + 3 desvíos estándar, DS) fue de 12%.

Evaluación de Longitud Telomérica

Para el análisis de TRF, se extrajo ADN genómico de células de MO. Se efectuó doble digestión de 10 µg de ADN con las enzimas de restricción *HinfI* y *RsaI* -ambas cortan fuera del motivo de la repetición telomérica- a 37°C durante una noche. Los productos digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0,8% durante 20 hs a 35V. Los geles fueron depurinados, desnaturalizados y neutralizados y luego transferidos a membranas de nylon por Southern blot, usando 10XSSC como buffer de transferencia. Los fragmentos teloméricos fueron detectados en las membranas de nylon hibridando con una sonda telomérica (TTAGGG), marcada por '5' end-labelling' y purificada usando columnas de Sephadex G-50. Las membranas hibridadas fueron expuestas a películas radiográficas a -70°C durante 3-10 días antes de revelar. Las señales de hibridación fueron evaluadas a partir de las autorradiografías, mediante escaneo densitométrico de cada calle respecto del marcador de peso molecular λ /*HindIII*, y analizadas utilizando el software Image Master 1D Prime (Pharmacia-Biotech). La longitud telomérica media de cada muestra fue calculada considerando los picos observados y evaluando dentro del rango de 2-23 Kb. Los picos teloméricos se midieron por estimación del tamaño de banda correspondiente al punto con mayor intensidad. Para un análisis comparativo, se estudiaron células de sangre periférica de 7 dadores sanos como controles normales (CN) (4 mujeres, mediana edad 52 años, rango 33-54). Además, se utilizaron dos controles internos de acortamiento telomérico: la línea celular K-562 (control positivo), que posee telómeros cortos debido a su estado de inmortalización, y células de sangre de cordón umbilical (CU) (control negativo) que por ser un tejido muy joven, no presenta acortamiento telomérico.

Evaluación estadística

La comparación de los datos obtenidos de los pacientes y controles fue efectuada empleando el test *t* de Student. El coeficiente de Kendall fue utilizado para correlacionar el porcentaje de CP en MO y los valores de TRF.

RESULTADOS

En el presente estudio se efectuó la evaluación de la LT, mediante el análisis de TRF, en células de MO de 31 pacientes con MM y 2 con MGUS. El análisis de la LT en el total de pacientes con MM reveló un TRF medio significativamente más corto que el observado en los controles ($p < 0,001$) (Tabla 2). Pese a que la edad media de los controles normales fue menor que la de la población con MM, cuando se comparó pacientes y controles de edades similares, los valores de TRF de los pacientes fueron significativamente más cortos que los normales ($p < 0,01$). Por otro lado, los valores medios de TRF en K-562 y CU fueron $5,20 \pm 0,10$ y $14,50 \pm 1,10$ Kb, respectivamente. Dado que en la MO de los pacientes con MM coexisten dos componentes, uno tumoral y otro de células normales, se trató de evaluar la presencia de las mismas en nuestros pacientes. Dieciocho de los 31 pacientes con MM mostraron dos picos de alta intensidad con valores medios de TRF de: $9,07 \pm 0,43$ Kb y $5,03 \pm 0,38$ Kb, correspondiendo el peso molecular de mayor tamaño a los TRF de las células normales y el pico menor al componente tumoral²⁰. En este aspecto, en MGUS, el análisis de TRF mostró un solo pico de TRF similar a los valores normales en uno de los pacientes (11,92Kb), en tanto que el otro, con 10% de CP en MO, presentó dos picos (9,36Kb y 3,8Kb), probablemente representando a ambas poblaciones celulares, normal y patológica, respectivamente.

Asimismo, realizamos el análisis de TRF en cada grupo de pacientes con MM de acuerdo al momento de la enfermedad: D, R y RE (Tabla 2). Los casos en RP y RC fueron incluidos en el último grupo debido al pequeño número de pacientes y a la similitud en los valores de TRF. El análisis estadístico mostró un acortamiento telomérico significativo al D y en R respecto de los controles. Además, ambos grupos presentaron valores más bajos que en RE ($p < 0,001$), no encontrándose diferencias entre los grupos D y R. Contrariamente, los pacientes en RE no mostraron diferencias estadísticas respecto a los controles (Figura 1). Es interesante remarcar que en dos pacientes fue posible analizar muestras de MO al D y en RP, observándose una restitución de la LT en la remisión (datos no mostrados).

Por otro lado, se correlacionaron los valores de TRF con el porcentaje de CP en MO teniendo en cuenta los tres grupos en los cuales fueron subdivididos

TABLA 2
Valores medios de TRF de acuerdo al momento de la enfermedad, cariotipo y porcentaje de CP en MO en pacientes con MM y controles.

Grupos	Número de casos	TRFs (Kb) ($X \pm SE$)	(rango)
CN	7	8,50 \pm 0,50	(7,3-11,8)
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)
CP en MO			
<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	14	5,77 \pm 0,61	(2,87-8,80)
CaA	6	4,15 \pm 0,67*	(2,69-6,57)

CN: Controles Normales; D: Diagnóstico; R: Recaída; RE: Remisión; CaN: Cariotipo Normal; CaA: Cariotipo Anormal; CP en MO: células plasmáticas en médula ósea

- * 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: $p < 0,05$

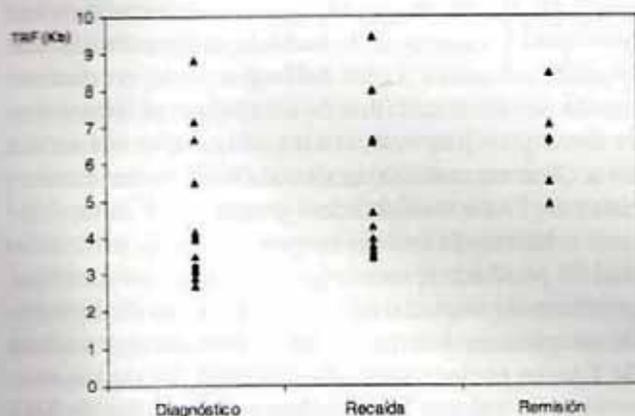


Fig. 1: Distribución de TRF en pacientes con MM al diagnóstico, recaída y remisión.

los pacientes con MM: <30%, 30-60% y >60% de CP en MO. En la Figura 2a se muestra la distribución de los picos de TRF de acuerdo a dichos porcentajes. Se pudo observar que el 64% de los casos del grupo con 30%-60% de CP en MO correspondieron a pacientes al D, en tanto que el 87% de los pacientes en RE mostraron valores de CP en MO inferiores al 30%. En los pacientes con más del 60% de CP en MO se detectó un acortamiento estadísticamente significativo respecto de los otros grupos ($p < 0,001$ y $p < 0,025$ para

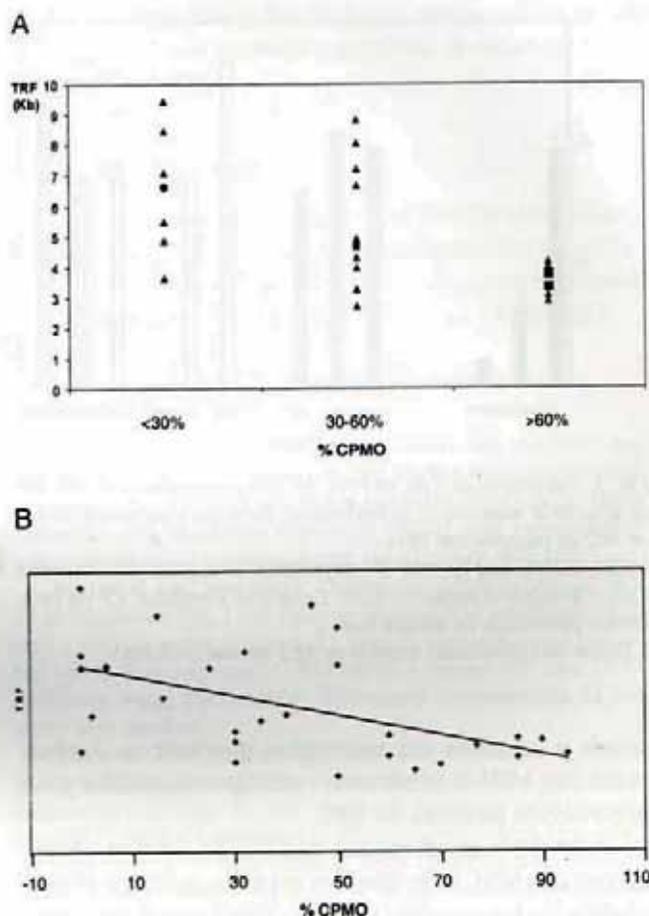


Fig. 2: a) Distribución de los valores de TRF de acuerdo al porcentaje de CP en MO; b) Correlación entre el porcentaje de CP en MO y los valores de TRF en MM ($r_k = -0,540$; $p = 0,002$)

<30% y 30-60%, respectivamente) (Tabla 2). Asimismo, se encontró una fuerte correlación negativa entre los valores de TRF y el porcentaje de CP en MO ($r_k = -0,540$; $p = 0,002$) (Figura 2b).

Además, se efectuaron estudios citogenéticos en 20 pacientes, 6 de ellos (30%) mostraron la presencia de anomalías cromosómicas clonales: del(6)(q15), t(2;3)(q33;q21), t(3;14)(q27;q32), +3, +13 y un paciente presentó un cariotipo muy complejo. Este grupo mostró un valor medio de TRF que resultó significativamente más corto que el observado para pacientes con MM con cariotipos normales ($p < 0,05$). Conjuntamente, se realizó el análisis de RB1 por FISH en 25 casos, 7 de los cuales (28%) mostraron monosomía de dicho gen. El porcentaje medio de células con delección monoalélica de 13q14 fue del 21% (rango: 13%-50,9%). En total, utilizando las dos técnicas, se detectó un 44,4% de pacientes con MM portadores de rearrreglos genómicos. Sólo un paciente mostró simultáneamente la presencia de un cariotipo anormal junto con la delección 13q14. No se encontraron diferencias significativas entre los valores de TRF de pacientes con mono-

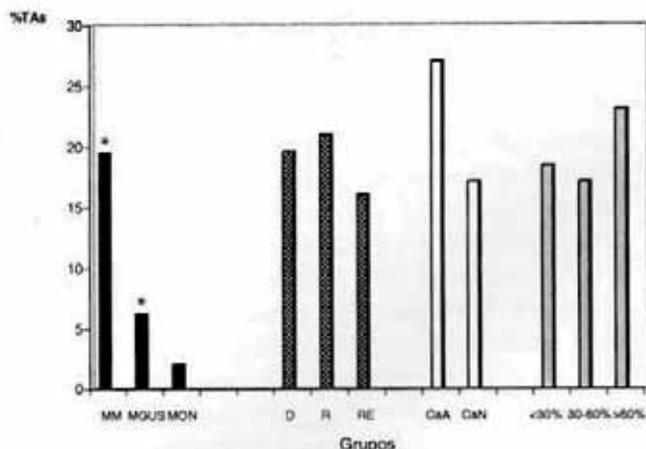


Fig. 3: Frecuencias de TAs en MM, MGUS y controles. Distribución de acuerdo al momento de la enfermedad, cariotipo y porcentaje de CP en MO en pacientes con MM.

MON: médula ósea normal; D: diagnóstico; R: recaída; RE: remisión; CaA: Cariotipos Anormales; CaN: Cariotipos Normales; CP en MO: células plasmáticas en médula ósea.

* Diferencias estadísticas respecto de MO normal ($p < 0,001$).

somía y aquellos sin rearrreglos genómicos. Ambos casos con MGUS mostraron cariotipos normales y no presentaron pérdida de RB1.

Asimismo, se efectuó el análisis de TAs en 18 pacientes con MM, detectándose un incremento en el porcentaje de las mismas ($19,46 \pm 1,98\%$) respecto de los controles normales de MO ($2,00 \pm 0,93\%$), ($p < 0,001$). 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 al comparar las frecuencias de TAs con el porcentaje de CP en MO, la presencia de delección de 13q14 y el cariotipo predominante. No obstante, hemos detectado 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 D y en R ($19,56 \pm 2,78\%$ y $21,02 \pm 4,26\%$, respectivamente) respecto de los de RE ($16,05 \pm 2,21\%$) y los pacientes con $>60\%$ de CP en MO ($23,10 \pm 4,11\%$) en comparación con los otros grupos (Figura 3). Todas estas observaciones podrían estar indicando una tendencia a mostrar altas frecuencias de TAs al producirse una reducción telomérica evidenciada por valores bajos de TRF. Además, en MGUS el porcentaje de TAs observado ($6,12 \pm 1,87\%$) resultó significativamente diferente de los valores de pacientes con MM y de los controles ($p < 0,001$).

DISCUSIÓN

Diferentes estudios han relacionado el acortamiento telomérico con la presencia de anomalías cromosómicas y la progresión neoplásica, así como

con un incremento en la proliferación y apoptosis^{11, 13, 20, 21}. En este trabajo, se ha estudiado la LT medida por TRF en pacientes con MM y MGUS, detectándose una reducción 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 otras neoplasias hematológicas^{20, 22}. 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 por Wu y col.²³ (5,3 Kb; rango 3-15 Kb), estudiando células CD138+ aisladas de MO de pacientes con MM. Este hecho sustenta la estrecha relación existente entre las LT de las diferentes muestras hematopoyéticas²⁴. En cuanto a los pacientes con MGUS, en uno de ellos no se observó acortamiento telomérico, mientras que en el otro se detectaron dos picos de TRF. La frecuente ocurrencia de MGUS y su posible evolución a MM, determina la importancia de correlacionar diferentes variables con el riesgo de transformación maligna^{1, 25}. Si bien se estudiaron sólo dos pacientes con MGUS, la presencia de un pico de TRF de bajo peso molecular en un caso estaría indicando la posibilidad de detectar una población celular patológica con acortamiento telomérico en pacientes con esta patología.

Por otro lado, encontramos un aumento significativo de TAs en células de MO de pacientes con MM respecto de células de MO de controles normales, reflejando la presencia de inestabilidad cromosómica en estos pacientes. Estos hallazgos están en concordancia con los resultados de acortamiento telomérico ya descritos y apoyan la idea de que una reducción en la LT se encontraría asociada a frecuencias aumentadas de TAs e inestabilidad genómica^{9, 10}, la cual 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 MO normal y de MM. De esta manera, nuestros resultados sustentarían la hipótesis que los procesos que llevan a inestabilidad cariotípica empezarían en MGUS²⁶ y sugerirían la importancia de estudiar la LT y evaluar las TAs en un número mayor de pacientes con esta patología, a fin de determinar si estos parámetros pueden estar relacionados con la evolución a MM.

Estudios previos han sugerido que el aumento de actividad de telomerasa y el acortamiento telomérico estarían relacionados con la progresión de la enfermedad¹⁴. Particularmente, un estudio reciente en MM²⁷ 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 CP en MO, uno de los factores que refleja masa tumoral, sustentando una probable asociación con la evolución clínica.

Además, se sabe que el acortamiento telomérico contribuye directamente a la presencia de las anomalías cromosómicas usualmente encontradas en distintos tipos de cáncer^{10, 17, 18}. De esta manera, 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 LT en células CD138⁺²³. 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 30% de los casos con alteraciones clonales, resultado que concuerda con datos de la literatura (20%-60% por análisis cromosómico convencional)^{28, 29}. Asimismo, pacientes con cariotipos anormales mostraron peor pronóstico que aquellos con un patrón diploide^{30, 31}. De hecho, todos nuestros casos con MM y cariotipos anormales se encontraban dentro del grupo con más del 60% de CP en MO, reflejando la presencia de ventajas proliferativas asociadas a cambios cromosómicos³². 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 es imposible obtener células para el análisis citogenético.

En nuestro trabajo observamos pérdida de RB1 en el 28% de los pacientes con MM, valores que concuerdan con estudios previos que muestran esta alteración asociada a pronóstico adverso y corta supervivencia, en el 30%-50% de los casos^{33, 34}. No se encontró relación de este parámetro con los valores de TRF, probablemente debido al pequeño porcentaje de células monosómicas presente en la mayoría de nuestros pacientes.

En conclusión, los pacientes con MM mostraron una significativa reducción de la LT, particularmente relacionada a porcentajes mayores al 60% de CP en MO y a cariotipos anormales, sugiriendo una probable asociación con la evolución clínica. Asimismo, nuestros hallazgos sustentan la idea de que la disminución de la LT lleva a incrementos de las frecuencias de TAs e inestabilidad cromosómica. De esta forma, el acortamiento telomérico presente en células con genomas inestables combinado con la desregulación

de la proliferación y los factores responsables de la supervivencia celular podrían contribuir al desarrollo y la progresión del MM.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue realizado con fondos provenientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

SUMMARY

Objectives: Telomeres are essential for maintaining chromosomal integrity and stability. In this work we studied telomere length (TL) on bone marrow (BM) cells from patients with multiple myeloma (MM) and monoclonal gammopathies of undetermined significance (MGUS).

Material and methods: Thirty-one MM patients (pts): 12 at diagnosis (D), 11 at relapse (R) and 8 at remission (RE) and 2 MGUS were studied. TL was evaluated using terminal restriction fragment (TRF) assay. Cytogenetic and FISH analyses were performed. Telomeric associations (TAs) were also studied.

Results: TRF analysis in MM showed a mean value (5.20 ± 0.35 Kb) shorter than controls (8.5 ± 0.5 Kb) ($p < 0.001$). Moreover, D and R pts showed telomere shortening ($p < 0.001$), with TL restored at RE. A strong correlation with the percentage of BM plasma cells (BMPC) ($rK = -0.540$; $p = 0.002$) was found. Patients with abnormal karyotypes (AK) had shorter TRFs than those normal ones ($p < 0.05$). TRFs in MGUS patients did not differ respect to controls. TAs were increased in MM pts ($19.46 \pm 1.98\%$) as compared to MGUS ($6.12 \pm 1.87\%$) and normal BM ($2.00 \pm 0.93\%$) ($p < 0.001$).

Conclusions: MM patients showed TL reduction, particularly related to $>60\%$ of BMPC and AK, suggesting an association with clinical outcome. Moreover, our findings support the fact that telomere shortening might lead to an increased frequency of TAs and chromosome instability.

Key words: Multiple myeloma; MGUS; telomeres; telomere length; telomeric associations.

BIBLIOGRAFÍA

- Hallek M, Bergsagel PL, Anderson KC. Multiple myeloma: Increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*. 1998; 91: 3-21.
- Kyle RA, Therneau TM, Rajkumar SV y col. A long-term study of prognosis in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *N Engl J Med* 2002; 346: 564-569.
- Bacchetti S. Telomere maintenance in tumour cells. *Cancer Surv*. 1996; 28: 197-216.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 1990; 345: 458-460.
- Greider CW, Blackburn EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell*. 1985; 43: 405-413.
- Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Devel*. 1998; 12: 1073-1085.
- Greider CW, Blackburn EH. Telomeres, telomerase and cancer. *Sci Am*. 1996; 274: 92-97.

8. Holt SE, Wright WE, Shay JW. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity. *Eur J Cancer*. 1997; 33: 761-766.
9. Counter CM, Avilion AA, Lefevre CE y col. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J*. 1992; 11: 1921-1929.
10. Riboni R, Casati A, Nardo T y col. Telomeric fusions in cultured human fibroblasts as a source of genomic instability. *Cancer Genet Cytogenet*. 1997;95: 130-136.
11. Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia*. 1996; 10: 1255-1261.
12. 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*. 2000; 60: 610-617.
13. Boulwood J, Fidler C, Kusec R y col. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am J Hematol*. 1997; 56: 266-271.
14. 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*. 1998; 58: 4918-4922.
15. 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*. 2000; 82: 601-607.
16. Kim NW, Plastyszczek MA, Prowse KR y col. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266: 2011-2015.
17. Höglund M, Gisselsson D, Hansen GB, Sähl T, Mitelman F. Ovarian carcinoma develops through multiple modes of chromosomal evolution. *Cancer Res*. 2003; 63: 3378-3385.
18. Gisselsson D, Jonson T, Yu C y col. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer*. 2002; 87: 202-207.
19. 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*. 1975; 36: 842-854.
20. Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drullinsky P y col. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia*. 1998; 12: 13-24.
21. Counter CM, Gupta J, Harley CB, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood*. 1995; 85: 2315-2320.
22. 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*. 1997; 11: 190-194.
23. 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*. 2003; 101: 4982-4989.
24. Sakoff JA, De Wall E, Garg MB y col. Telomere length in haematopoietic stem cells can be determined from that of mononuclear blood cells or whole blood. *Leuk & Lymph*. 2002; 43: 2017-2020.
25. Bladé J, López-Guillermo A, Rozman C y col. Malignant transformation and life expectancy in monoclonal gammopathy of undetermined significance. *Br J Haematol*. 1992; 81: 391-394.
26. 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.
27. Shiratsuchi M, Muta K, Abe Y y col. Clinical significance of telomerase activity in multiple myeloma. *Cancer*. 2002; 94: 2232-2238.
28. Calasanz MJ, Cigudosa JC, Otero MD y col. Cytogenetics analysis in 280 patients with multiple myeloma and related disorders: primary breakpoints and clinical correlations. *Genes Chrom Cancer*. 1997; 18: 84-93.
29. Nilsson T, Lenhoff S, Turesson I y col. Cytogenetics features of multiple myeloma: impact of gender, age, disease phase, culture time, and cytokine stimulation. *Eur J Haematol*. 2002; 68: 345-353.
30. Seong C, Delasalle K, Hayes K y col. Prognostic value of cytogenetics in multiple myeloma. *Br J Haematol*. 1998; 101: 189-194.
31. Debes-Marun CS, Dewald GW, Bryant S y col. Chromosome abnormalities clustering and its implications for pathogenesis and prognosis in myeloma. *Leukemia*. 2003; 17: 427-436.
32. Rajkumar SV, Fonseca R, Dewald GW y col. Cytogenetic abnormalities correlate with the plasma cell labeling index and extent of bone marrow involvement in myeloma. *Cancer Genet Cytogenet*. 1999; 113: 73-77.
33. Dao D, Sawyer J, Epstein J, Hoover R, Barlogie B, Tricot G. Deletion of the retinoblastoma gene in multiple myeloma. *Leukemia*. 1994; 8: 1280-1284.
34. Zojer N, Königsberg R, Ackerman J y col. Deletion of 13q14 remains an independent adverse prognostic variable in multiple myeloma despite its frequent detection by interphase fluorescence in situ hybridization. *Blood*. 2000; 95: 1925-1930.