

ANALISIS MOLECULAR DE LA LONGITUD TELOMERICA EN LINFOMAS FOLICULARES SU PARTICIPACION EN LA PROGRESION TUMORAL *

ALEJANDRA S. H. COTTLIAR¹, MARIA F. NORIEGA¹, MARINA NARBAITZ², IRMA R. SLAVUTSKY¹

Departamentos de Genética¹ y Patología², Instituto de Investigaciones Hematológicas Mariano R. Castex, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen 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 (LT) aumenta la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genómicos importantes para el desarrollo neoplásico, determinando desbalances de material genético. En este trabajo se evaluó la LT mediante el análisis de fragmentos de restricción terminal (TRF) en médula ósea y/o biopsia ganglionar de 36 pacientes (edad media: 54.2 años; rango 29-77 años; 21 varones): 29 con linfoma folicular (LF) al diagnóstico y 7 con linfoma B difuso a células grandes secundario a LF (LBDCG-S). Se efectuó el análisis del rearreglo molecular del gen BCL-2 por PCR anidada y de larga distancia. Las medias de TRF en LF (4.18 ± 0.18 Kb) y LBDCG-S (3.31 ± 0.25 Kb) resultaron significativamente menores que en controles (8.50 ± 0.50 Kb) ($p < 0.001$), encontrándose diferencias entre ambos subtipos histológicos ($p = 0.036$). Las muestras negativas para el rearreglo BCL-2 mostraron LT menores (3.39 ± 0.30 Kb) que las positivas (4.25 ± 0.19 Kb) ($p = 0.023$), observándose una tendencia a valores menores en pacientes negativos para el rearreglo BCL-2, intermedios en positivos para *mcr*, *minor cluster region*, (3.84 ± 0.45 Kb) y mayores en los positivos para MBR, *Major Breakpoint Region*, (4.35 ± 0.21 Kb). Nuestros resultados muestran una reducción de la LT 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 sustentan la presencia de diferentes mecanismos patogénicos propuestos para estos distintos LF.

Palabras clave: linfoma folicular, linfoma B difuso a células grandes, telómeros, BCL-2

Abstract *Molecular analysis of telomere length in follicular lymphomas. Its participation in tumor progression.* Telomeres are essential for maintaining chromosomal integrity and stability. We studied here telomere length (TL) in bone marrow and/or lymph node from 36 patients: 29 with follicular lymphoma (FL) at diagnosis and 7 with diffuse large B cell lymphoma secondary to FL (S-DLBCL). TL was evaluated using terminal restriction fragments (TRF) assay. BCL-2 gene rearrangement was analyzed by nested and long distance PCR. Mean TRF values showed significant telomere shortening in FL (4.18 ± 0.18 Kb) and S-DLBCL (3.31 ± 0.25 Kb) respect to controls (8.50 ± 0.50 Kb) ($p < 0.001$). Differences between both histological subtypes ($p = 0.036$) were also detected. Moreover, the samples positive for BCL-2 rearrangements showed longer TL (4.25 ± 0.19 Kb) than the negative ones (3.39 ± 0.30 Kb) ($p = 0.023$). A trend to telomere shortening was observed when *Major Breakpoint Region* (MBR-J_H), *minor cluster region* (*mcr*-J_H) and BCL-2 negative patients were compared (4.35 ± 0.21 Kb; 3.84 ± 0.45 Kb and 3.39 ± 0.30 Kb, respectively). Our results show a TL reduction in FL and S-DLBCL, with significant short TRFs in the last group, suggesting the participation of telomere shortening in tumor progression. Furthermore, the differences detected between BCL-2 positive and negative FL support the involvement of diverse pathogenic mechanisms.

Key words: follicular lymphoma, diffuse large B cell lymphoma, telomeres, BCL-2

Los telómeros son regiones de ADN no codificantes ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias muy conserva-

das, (TTAGGG)_n repetidas en *tandem* y proteínas asociadas, y presentan una estructura especial que impide su unión a los extremos de otros cromosomas, permitiéndoles una correcta segregación en mitosis, cumpliendo un rol esencial en la preservación de la integridad cromosómica y en el mantenimiento de la estabilidad genómica¹. 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 durante las sucesivas divisiones celulares, lo que determina el acortamiento de los

* Este trabajo ha sido distinguido con el Premio Patricio M. Cossio en el I Congreso Conjunto de Sociedades Biomédicas, 20 de noviembre de 2004, Mar del Plata.

Dirección postal: Lic. Alejandra Cottliar, Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4803-9475 e-mail: acottliar@yahoo.com.ar

telómeros. Esta reducción aumenta la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genómicos importantes para el proceso de desarrollo neoplásico, que llevarían a desbalances de material genético².

Dentro de las neoplasias linfoides, los linfomas no-Hodgkin (LNH) constituyen un grupo heterogéneo de tumores, diferenciables por su histología, comportamiento biológico, curso clínico y respuesta terapéutica. Los datos de la literatura muestran un incremento en la incidencia de los LNH a nivel mundial³. Entre ellos, el linfoma folicular (LF) es una neoplasia indolente de bajo grado, caracterizada por la proliferación de células B provenientes del centro folicular del nódulo linfático, que representa alrededor de 40% de los linfomas del adulto. Se encuentra genotípicamente asociado a la t(14;18) (q32;q21) (50-85% de los casos), que determina la yuxtaposición del proto-oncogen BCL-2 (18q21) con una de las regiones J_H de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (14q32), originando su desregulación⁴. El 60% de los puntos de ruptura se localizan en una región de 100 pb conocida como MBR (*Major Breakpoint Region*) en tanto que el 25% se ubica en mcr (*minor cluster region*), en ambos casos la región codificante del gen permanece inalterable⁵. Un 25-60% de los casos sufre una transformación a linfoma B difuso a células grandes (LBDCG) de alto grado. Este proceso se encuentra asociado a pérdida de la arquitectura histológica folicular, un curso clínico rápido y progresivo, refractariedad al tratamiento y corta sobrevida.

El objetivo del presente trabajo fue evaluar, a nivel molecular, las posibles modificaciones de la longitud telomérica (LT) en biopsias ganglionares (G) y/o médulas óseas (MO) de pacientes con LF y LBDCG secundarios a LF (LBDCG-S) y correlacionarlas con los rearrreglos moleculares del gen BCL-2, tendiente a analizar su participación en el proceso de progresión tumoral.

Se evaluó un total de 36 pacientes, de los cuales 29 presentaron diagnóstico de LF (edad media: 52 años, rango 31-77 años; 16 varones) y 7 de LBDCG-S (edad media: 61 años, rango 53-69 años; 5 varones) (5 MO y 2 G). Dos casos con LF fueron estudiados en dos oportunidades, evaluándose un total de 31 muestras (20 de MO y 11 de G). Las MO analizadas presentaron porcentajes de infiltración mayores al 15%, excepto en 3 casos que no estaban infiltradas pero eran BCL-2 positivas.

El diagnóstico histopatológico se efectuó sobre cortes de 4-5 µm coloreados con hematoxilina-eosina y Giemsa, realizándose el estudio inmunohistoquímico por método indirecto con técnica de streptavidina-biotina-peroxidasa, utilizando los anticuerpos primarios CD20, BCL-2, CD10, BCL-6 y Ki-67 (*Dako*). Se empleó diamidobencidina como cromógeno para la localización del anticuerpo.

Para el análisis de TRF, se extrajo ADN genómico de células de G y MO y se efectuó doble digestión con las

enzimas de restricción HinfI y RsaI –ambas cortan fuera del motivo de las repeticiones teloméricas– a 37 °C. Los productos digeridos fueron separados por electroforesis en geles de agarosa al 0.8%, realizándose transferencia a membranas de nylon por *Southern blot*, utilizando 10XSSC. Las membranas fueron hibridadas con una sonda telomérica (TTAGGG)_n marcada con ATP $\gamma^{32}P$ por '5' end-labelling' y expuestas a películas radiográficas a -70° C. Las autorradiografías fueron evaluadas con el *software Image Master 1D (Pharmacia-Biotech)* a fin de obtener el perfil densitométrico y definir los picos de TRF de cada calle, considerándose pico al punto de máxima intensidad de banda y evaluándose dentro del rango de 2-23 Kb. Se estudiaron además células de sangre periférica de 7 donadores sanos como controles normales (CN) (4 mujeres, edad media 52 años, rango 33-54 años) y se utilizaron dos controles de acortamiento telomérico: la línea celular K-562 (control positivo), que posee telómeros cortos debido a su estado de inmortalización, y sangre de cordón umbilical (CU) (control negativo) que por ser un tejido muy joven, sus células no presentan acortamiento telomérico.

Para la amplificación por PCR anidada de los rearrreglos MBR-J_H y mcr-J_H del gen BCL-2 se emplearon los primers propuestos por Gribben, et al (1991)⁶. Se efectuó una amplificación inicial de 25 ciclos: 1 min a 94 °C (desnaturalización), 1 min a 55 °C para MBR-J_H y 58 °C para mcr-J_H (*annealing*) y 1 min a 72 °C (extensión) seguido de 10 min a 72 °C (*tailing*). La segunda reacción fue de 30 ciclos, con temperatura de *annealing* 58 °C y 61 °C, respectivamente. Los productos obtenidos se visualizaron en geles de agarosa al 2% teñidos con bromuro de etidio (EtBr), detectándose una banda positiva para MBR-J_H entre 180-250 pb y para mcr-J_H entre 600-700 pb. Para la amplificación por PCR de larga distancia se utilizaron los *primers* propuestos por Akasaka, et al (1998)⁷. En la reacción se emplearon 100 ng/µl de ADN, con el siguiente ciclo: 2 min a 9 °C, 3 ciclos de 20 seg a 94 °C y 13 min a 72 °C, 3 ciclos de 20 s a 94 °C y 13 min a 70 °C y finalmente 30 ciclos: 20 s a 94 °C, 13 min a 68 °C, incrementando en 15 segundos cada ciclo. Los productos fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 1% con EtBr, observándose una banda positiva de 1.9 a 10.7 Kb en la fusión MBR-J_H y de 1.9 a 9.4 Kb en el rearrreglo mcr-J_H.

El análisis estadístico de los resultados se efectuó con el test t de Student, empleado para comparar los valores medios de TRF de los distintos grupos.

Los valores medios de TRF obtenidos para los controles de acortamiento fueron ($\bar{X} \pm ES$): 5.20 \pm 0.10 Kb y 14.50 \pm 1.10 Kb, para K-562 y CU, respectivamente. En los pacientes no se observaron diferencias entre los valores de TRF de MO y G, por lo que se los analizó conjuntamente. En 19/31 (61.3%) muestras 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: 7.74 ± 0.49 Kb y 4.16 ± 0.25 Kb en LF y de 6.70 ± 0.68 Kb y 2.93 ± 0.16 Kb en LBDCG-S. En ambos casos, el pico de menor peso molecular fue considerado como correspondiente al componente tumoral, situación avalada por la ausencia de longitudes menores a 5 Kb en individuos normales centenarios⁸, considerándose que el otro pico representa las células normales. Este evento ha sido observado previamente en LNH⁹ así como también en pacientes con mieloma múltiple¹⁰. En las muestras restantes se obtuvo un único pico de TRF. La evaluación de la LT en ambos grupos de pacientes reveló un TRF medio significativamente menor que el observado en los controles normales ($p < 0.001$) (Tabla 1), encontrándose LT significativamente menores en LBDCG-S respecto de LF ($p = 0.036$) (Fig. 1).

Por otra parte, el análisis molecular del rearrreglo del gen BCL-2 mostró positividad en el 86.2% de los pacientes con LF y en el 71.4% de los LBDCG-S. Los pacientes con LF que presentaron dicho rearrreglo mostraron TRF más largos que los negativos para la translocación ($p = 0.023$) (Tabla 1). Al analizar los valores de TRF en función de los puntos de ruptura del gen BCL-2, se apreció una tendencia a presentar valores más pequeños en pacientes negativos para el rearrreglo, intermedios en positivos para mcr y mayores en los positivos para MBR (3.39 ± 0.30 Kb, 3.84 ± 0.45 Kb y 4.35 ± 0.21 Kb, respectivamente). En los pacientes estudiados en dos ocasiones, no se observaron diferencias entre los valores de TRF, ni modificaciones del rearrreglo BCL-2.

Actualmente se considera que la presencia de acortamiento telomérico y de actividad de telomerasa contribuiría al desarrollo de las anomalías cromosómicas encontradas usualmente en diversos tipos de cáncer. En el

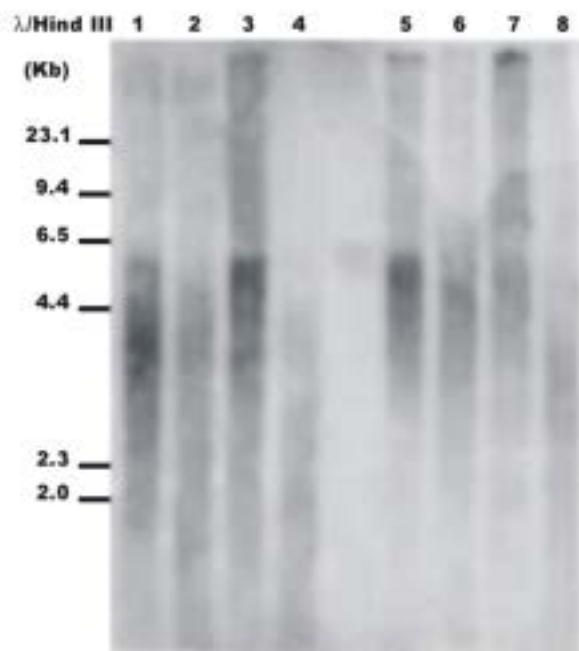


Fig. 1.— Autorradiografía mostrando las longitudes teloméricas de pacientes con LF: Calles 1, 2, 5, 7 y 8, y con LBDCG-S: Calles 3, 4 y 6; λ /Hind III: Marcador de peso molecular.

caso de los LNH, esto sería consistente con la presencia de inestabilidad cromosómica evidenciada por un porcentaje incrementado de asociaciones teloméricas encontrado en MO de pacientes con esta patología¹¹.

Nuestra población de pacientes con ambos tipos de LNH presentó un acortamiento significativo de la LT respecto de los controles, mostrando valores algo menores que los observados en el único estudio publicado en el que se evalúan estos subtipos histológicos en combinación con otros linfomas de bajo y alto grado de malignidad⁹. Cabe destacar que este sería el primer estudio donde se analizan LF y LBDCG-S en forma separada y específica, estableciéndose su correlación con los rearrreglos del gen BCL-2. Nuestros pacientes con LBDCG-S mostraron una LT significativamente menor que los LF, situación que podría asociarse con los múltiples eventos genómicos secundarios que acompañan a la transformación histológica 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 p16¹², sugiriendo el compromiso de distintos mecanismos genéticos.

Al evaluar la asociación entre la LT y la presencia de rearrreglos del gen BCL-2, parámetro indicador de diferentes subgrupos de LNH, se observaron TRF significativamente más cortos en los casos BCL-2 negativos. Actualmente se considera que estos pacientes representarían un subtipo diferente, con un comportamiento clínico

TABLA 1.— Valores medios de fragmentos de restricción terminal (TRF) en pacientes con linfoma folicular (LF) y B difuso a células grandes secundario a LF (LBDCG-S) y en controles

Grupos	Número de muestras	TRFs (Kb) $\bar{X} \pm ES$ (rango)
CN	7	8.50 \pm 0.50 (7.30-11.8)
LF	31	4.18 \pm 0.18* (2.47-6.30)
LBDCG-S	7	3.31 \pm 0.25* [▲] (2.47-4.64)
LF BCL-2 -	4	3.39 \pm 0.30* [#] (2.88-4.34)
LF BCL-2 +	27	4.25 \pm 0.19* (2.47-6.30)

BCL-2: B-cell lymphoma 2; ES: error estándar

* Diferencias significativas respecto de controles normales ($p < 0.001$)

[▲] Diferencias significativas respecto de LF ($p = 0.036$)

[#] Diferencias significativas respecto de BCL-2 + ($p = 0.023$)

co distinto relacionado al patrón específico de alteraciones génicas y cambios cariotípicos que los caracterizan, los que implicarían diferentes mecanismos patogénicos posiblemente relacionados a la desregulación del gen BCL-6¹³. Asimismo, existe cierta discrepancia en la correlación de los puntos de ruptura del rearreglo BCL-2 con la evolución clínica de la enfermedad. Buchonnet et al¹⁴ no encuentran asociación entre ambos parámetros, en tanto que López-Guillermo et al¹⁵ consideran a este rearreglo como un factor pronóstico de importancia en LF, útil para identificar pacientes que requieren tratamientos diferentes. Además, resulta importante destacar las similitudes observadas en los valores de TRF detectados en pacientes con LF BCL-2 negativos y los LBDCG-S, lo cual podría tener relación con la mayor probabilidad de evolución a un linfoma de alto grado en los pacientes que no presentan dicho rearreglo.

Concluyendo, nuestros resultados muestran una reducción de la LT 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.

Agradecimientos: Este trabajo fue financiado con Subsidios otorgados por: Fundación Gador, Fundación Alberto J. Roemmers, Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT) y Beca Ramón Carrillo-Arturo Oñativia. Los autores agradecen la colaboración de Romina Fraiman y Marcia Leguiza.

Bibliografía

- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
- Goyns MH, Lavery WL. Telomerase and mammalian ageing: a critical appraisal. *Mech Ageing Dev* 2000; 114: 69-77.
- Parkin D, Whelan S, Farlay J, Raymond L, Young J. Cancer incidences in five continents. Volume VII. IARC Scientific Publication N° 143, 1997.
- Chaganti RSK, Nanjangud G, Schmidt H, Teruja-Feldstein J. Recurring chromosomal abnormalities in non-Hodgkin's lymphoma: Biologic and clinical significance. *Sem Hematol* 2000; 34: 396-411.
- 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 USA* 1985; 82: 7439-43.
- Gribben JG, Freedman AS, Woo SD, et al. 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.
- Akasaka T, Akasaka H, Yonetani N, et al. Refinement of the BCL2/immunoglobulin heavy chain fusion gene in t(14;18)(q32;q21) by polymerase chain reaction amplification for long targets. *Gene Chrom Cancer* 1998; 21: 17-9.
- 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* 1999; 10: 234-42.
- 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: 601-7.
- Cottliar A, Pedrazzini E, Corrado C, Engelberger MI, Narbaitz M, Slavutsky I. Telomere shortening in patients with plasma cell disorders. *Eur J Haematol* 2003; 71: 334-340.
- Cottliar A, Sganzzetta N, Pedrazzini E, et al. Incremento de asociaciones teloméricas en mieloma múltiple y linfomas no-Hodgkin. *N Tend Oncol* 2000; IX 1 (Supl): 47.
- Martinez-Climent JA, Alizadeh AA, Seagraves R, et al. Transformation of follicular lymphoma to diffuse large cell lymphoma is associated with a heterogeneous set of DNA copy number and gene expression alterations. *Blood* 2003; 101: 3109-17.
- Horsman DE, Okamoto I, Ludkovsky O, et al. Follicular lymphoma lacking the t(14; 18)(q32;q21): identification of two disease subtypes. *Br J Haematol* 2003; 120: 424-33.
- Buchonnet G, Jardin F, Jean N, et al. Distribution of BCL-2 breakpoint in follicular lymphoma and correlation with clinical features: specific subtypes or same disease?. *Leukemia* 2002; 16: 1852-6.
- Lopez-Guillermo A, Cabanillas F, McDonnell TI, et al. Correlation of BCL-2 rearrangement with clinical characteristics and outcome in indolent follicular lymphoma. *Blood* 1999; 93: 3081-7.

El argentino, a diferencia de los americanos del Norte y de casi todos los europeos, no se identifica con el Estado. Ello puede atribuirse a la circunstancia de que, en este país, los gobiernos suelen ser pésimos o al hecho general de que el Estado es una inconcebible abstracción; lo cierto es que el argentino es un individuo, no un ciudadano.

Jorge Luis Borges (1899-1986)

Nuestro pobre individualismo. Otras inquisiciones (1952). Obras Completas.

Buenos Aires: Emecé, 1974, pp 658-66