

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA



TESIS DOCTORAL

Análisis de parámetros de función telomérica en tejidos tumorales
y adiposos de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal. Relación
con obesidad

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Sergio García Martínez

DIRECTORA

María Pilar Iniesta Serrano

Madrid, 2022

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA

Programa de Doctorado en Bioquímica, Biología Molecular y Biomedicina



TESIS DOCTORAL

**Análisis de parámetros de función telomérica en tejidos tumorales y adiposos de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal.
Relación con obesidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Sergio García Martínez

DIRECTORA:

María Pilar Iniesta Serrano

Madrid, 2022

Este trabajo ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, sección de la Facultad de Farmacia, de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección y tutela de la Dra. María Pilar Iniesta Serrano. La investigación ha sido financiada con los fondos del Proyecto de Investigación en Salud del Instituto de Salud Carlos III PI15/01199, titulado: “Marcadores de senescencia y de función telomérica en pacientes obesos con cáncer colorrectal reseado con intención curativa. Implicaciones pronósticas” (proyecto activo desde el año 2016 al 2018, prorrogado hasta el 30 de junio de 2020).

AGRADECIMIENTOS

Antes de comenzar con el manuscrito, me gustaría agradecer a todas aquellas personas que han hecho posible que este trabajo salga adelante y pueda plasmarlo en estas hojas. En primer lugar, quiero agradecer a mi Directora de Tesis, la Prof. María Pilar Iniesta Serrano, por darme la oportunidad de formarme y conseguir el título de Doctor en su grupo de investigación. Gracias por haberme acogido en su momento como estudiante de Máster, y haberme dado la confianza para sacar este proyecto adelante, en la medida de lo posible, desde aquel Trabajo de Fin de Máster.

Gracias al Prof. Antonio Torres y a los Dres. Ana Barabash, Sofía de la Serna, Inmaculada Domínguez, Óscar Cano, Carmen de Juan, y al resto de integrantes tanto del Grupo de Biología Molecular del Cáncer de la UCM, del Grupo del IdISSC Cáncer y Obesidad, como de los Servicios de Cirugía General y del Aparato Digestivo, Anatomía Patológica y Endocrinología y Nutrición del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Sin vuestra colaboración y organización de las distintas etapas de los proyectos no hubiese sido posible este Trabajo.

Gracias a Juan Fernández, con el que me inicié en este mundo de la investigación siendo dos estudiantes de Máster sin apenas experiencia, pero que me sirvió de gran apoyo y con el que he compartido muy buenos momentos y he aprendido mucho. También, gracias a Marina por transmitirme sus conocimientos con tanta paciencia y saber estar en todo momento.

Por supuesto, agradecer a mi compañero de Tesis, Daniel González, estos 5 años de debates e hipótesis científicas que intentaran dar una explicación a lo que veíamos. También quiero acordarme y agradecer a los estudiantes de colaboración que han pasado por el laboratorio desde que llegué, como son Juan y Guille. Muchas gracias por implicaros en los proyectos como si os pertenecieran, y por la dedicación que pusisteis en los pocos meses que, por desgracia, pudimos disfrutar de vosotros.

Gracias a Sofía. Aunque hayas sido la última en incorporarte al laboratorio y no hayamos podido compartir mucho tiempo, tu ayuda durante estos meses también ha permitido poder completar este trabajo. Espero que puedas dar visibilidad a esos resultados a los que nosotros no hemos podido llegar.

Gracias a Tamara por la ayuda y consejos para los protocolos más desconocidos. Aunque cuando te conocí ya no pertenecías a nuestro Grupo de Investigación, nos ayudaste con el mismo entusiasmo como si no te hubieses ido nunca.

Gracias, por supuesto, a todos los profesores del Departamento, cuyos consejos nos permitieron salvar más de un experimento. Y a los demás doctorandos, estudiantes de máster y grado, y compañeros en general, por dejarme compartir con vosotros dudas y preguntas que, seguramente, me habrán hecho mejor investigador.

Y ahora toca el turno de agradecer a todas esas personas que, sin pertenecer al mundo de la ciencia y de la investigación, han hecho posible que pueda llegar al lugar donde estoy a día de hoy.

Infinitas gracias a mis padres Cristina y Andrés, y a mi hermana Paula. Ya son casi 10 años desde que empecé esta andadura, con algún que otro sacrificio que ha tocado hacer para poder llegar hasta aquí. Pero gracias a vosotros he aprendido que, a base de esfuerzo y trabajo, las cosas terminan consiguiéndose. Muchas gracias a mis abuelos, tíos, primos, etc. A los que están, y a los que desgraciadamente ya no pueden seguir con nosotros. Espero que, desde donde estéis, os sintáis igual de orgullosos que el resto de ver hasta dónde hemos llegado.

Por supuesto, dar las gracias a Lucía. Han sido muchos días duros, y bastante de ellos con ganas, incluso, de tirar la toalla y abandonar. Pero siempre aparecía alguna palabra, algún consejo, algún abrazo, que hacía que siguiese hacia adelante y hoy pueda estar escribiendo todas estas líneas.

Y cómo olvidarme de mis amigos. Marcos, Luismi, Aroa, Marta, María, Soraya, Tania, Carlos, Isabel. Gracias, chicos, por todos los buenos momentos y por el apoyo que me habéis dado todos estos años. Han sido el plus de fuerza necesario para alcanzar la meta.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY.....	7
ABREVIATURAS	13
1. INTRODUCCIÓN.....	17
1.1. FUNCIÓN TELOMÉRICA: TELÓMEROS Y TELOMERASA	19
1.1.1. TELÓMEROS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.	19
1.1.2. PROTECCIÓN DE LOS TELÓMEROS: COMPLEJO <i>SHELTERIN</i>	20
1.1.3. MANTENIMIENTO DE LOS TELÓMEROS: TELOMERASA	30
1.1.4. ALTERNATIVA A LA TELOMERASA: MECANISMO ALT	40
1.1.5. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA TELOMÉRICA.....	42
1.1.6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LOS TELÓMEROS	43
1.1.7. DISFUNCIÓN TELOMÉRICA, SENESCENCIA Y CÁNCER	45
1.2. CÁNCER COLORRECTAL	51
1.2.1. INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CCR.....	51
1.2.2. PATOGÉNESIS DEL CCR.....	54
1.2.3. PAPEL DE LA DISFUNCIÓN TELOMÉRICA EN EL DESARROLLO DEL CCR	58
1.3. TEJIDO ADIPOSO.....	61
1.3.1. TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO: CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS Y FUNCIONALES.....	61
1.3.2. REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD	62
1.4. OBESIDAD, TEJIDO ADIPOSO Y CÁNCER COLORRECTAL	64
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	69
3. MATERIAL Y MÉTODOS	73
3.1. PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES	75
3.1.1. ESTUDIOS EN TEJIDOS COLORRECTALES DE PACIENTES CON CCR	78
3.1.2. ESTUDIOS EN TEJIDOS ADIPOSOS DE SUJETOS CON Y SIN CCR	80
3.2. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DEL ADN.....	83
3.3. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS	85

3.4.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN EL ANÁLISIS DE TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS	86
3.4.1.	ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA DE TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS	86
3.4.2.	ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS	97
3.5.	ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	104
4.	RESULTADOS	107
4.1.	FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS TUMORALES Y NO TUMORALES DE PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR). RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL	109
4.1.1.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS DE PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR).....	109
4.1.2.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL (CCR) EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)	118
4.1.3.	ESTUDIOS PRONÓSTICO EN PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR) EN RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA E ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC).....	128
4.2.	FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES Y SUBCUTÁNEOS DE INDIVIDUOS CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL. RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.....	141
4.2.1.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) DE INDIVIDUOS CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL.....	141
4.2.2.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)	143
4.2.3.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS), EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR)	147
4.2.4.	ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) EN RELACIÓN CON LA AFECTACIÓN POR CÁNCER COLORRECTAL (CCR) Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) DE LOS INDIVIDUOS	154
4.2.5.	ESTUDIOS PRONÓSTICO EN RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC).....	169
5.	DISCUSIÓN	175
5.1.	FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TUMORES COLORRECTALES.....	177
5.2.	FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS, EN RELACIÓN CON EL CÁNCER COLORRECTAL Y CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL... ..	192

6.	CONCLUSIONES.....	209
7.	BIBLIOGRAFÍA.....	213

RESUMEN

ANÁLISIS DE PARÁMETROS DE FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS TUMORALES Y ADIPOSOS DE PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL. RELACIÓN CON OBESIDAD

Introducción

Los telómeros son complejos nucleoproteicos que protegen los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas. Esto se consigue a través de la formación de unas estructuras denominadas *t-loops*, y mediante la participación de un complejo multiproteico denominado complejo *Shelterin*, constituido por las proteínas TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 y TPP, así como por otras proteínas asociadas. Este complejo impide que los telómeros sean reconocidos como eventos de daño en el ADN (puesto que contienen una región monocatenaria 3' debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para completar la síntesis de estas regiones durante la replicación celular), y regula la acción de la enzima principalmente encargada de elongar las secuencias teloméricas, llamada telomerasa.

Se sabe que la disfunción telomérica, entendida como acortamiento crítico de los telómeros, constituye un evento molecular implicado en el desarrollo de una amplia variedad de tipos tumorales, entre ellos el Cáncer Colorrectal (CCR). Su relación con la tumorigénesis y con la evolución del CCR viene marcada por el correcto funcionamiento de las vías de senescencia celular en respuesta a la pérdida de protección de los telómeros. Si estos mecanismos funcionan de manera adecuada, el acortamiento progresivo de los telómeros activará las vías de senescencia, impidiendo que las células continúen dividiéndose y evitando así la inestabilidad genómica. Si, por el contrario, su activación es deficiente, las células continuarán replicándose sin control, dando lugar a una inestabilidad genómica incrementada, lo cual conduce a la transformación maligna y a la progresión tumoral.

Además, la bibliografía actual indica que un aumento en el Índice de Masa Corporal (IMC) y, por tanto, la obesidad, provoca un mayor acortamiento telomérico, debido principalmente al ambiente inflamatorio y oxidativo derivado de los elevados niveles de adipocinas y citoquinas proinflamatorias característicos de esta condición física. La obesidad se ha asociado con un mayor acortamiento telomérico y un incremento en el riesgo

de desarrollo de CCR. Sin embargo, hasta la fecha, la relevancia de estos factores en el pronóstico del CCR resulta controvertida.

Objetivos

El **principal objetivo** de esta Tesis consiste en conocer el impacto que, sobre el pronóstico de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal, tienen los parámetros relacionados con la función telomérica así como el Índice de Masa Corporal. Para su consecución, establecemos los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal.
2. Analizar la relación entre los parámetros de función telomérica evaluados y el Índice de Masa Corporal de los sujetos incluidos en la serie objeto de estudio.
3. Establecer estudios de pronóstico en función de la longitud de los telómeros y de la actividad telomerasa de los tejidos colorrectales indicados, considerando grupos de individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad.
4. Estudiar parámetros de función telomérica en tejidos adiposos viscerales y subcutáneos de sujetos afectados y no afectados de Cáncer Colorrectal.
5. Analizar la relación entre la longitud telomérica y la actividad telomerasa de los tejidos adiposos considerados en el estudio y el Índice de Masa Corporal de los pacientes incluidos en los protocolos.
6. Establecer estudios de pronóstico en función de parámetros de función telomérica analizados en tejidos adiposos de individuos con Cáncer Colorrectal.

Resultados

En la población analizada para tejidos colorrectales, la Longitud Telomérica Media (LTM) de las muestras tumorales resultó inferior a la obtenida para los tejidos no tumorales ($5,84 \pm 0,17$ kb y $7,52 \pm 0,18$ kb; media \pm error estándar, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Los tumores con menor invasión local (T1 y T2) presentaron telómeros más cortos que los tumores clasificados como T3 y T4 (LTM = $5,44 \pm 0,22$ kb y $6,38 \pm 0,29$ kb; media \pm error estándar, respectivamente) ($p = 0,013$). Los casos con tamaños teloméricos tumorales (LTM T) y no tumorales (LTM

NT) inferiores a 6,5 kb y 7,1 kb, respectivamente, se relacionaron con un pronóstico clínico más favorable ($p = 0,002$ y $0,009$, respectivamente). Además, estas diferencias resultaron independientes del estadio tumoral ($p = 0,026$ y $0,038$ para la LTM T y NT, respectivamente). En pacientes varones afectados de CCR, un IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$ se relacionó con un mejor pronóstico clínico, en comparación con valores de IMC superiores ($p = 0,026$).

En relación con la población de tejidos adiposos analizada, se observó una correlación positiva entre la longitud telomérica relativa (medida como *Ratio* T/S) de los tejidos adiposos viscerales (TAV) y de los tejidos adiposos subcutáneos (TAS) para la población general ($r = 0,4,70$; $p < 0,001$). Independientemente de la afectación por CCR, los TAS de los individuos con normopeso tuvieron unos telómeros más largos en comparación con los medidos en los TAS de sujetos con sobrepeso y obesidad (*Ratio* T/S = $1,21 \pm 0,16$ y $0,89 \pm 0,05$; media \pm error estándar, respectivamente), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,046$). Para los TAV, también independientemente de la afectación por CCR, el número de casos con actividad telomerasa positiva fue significativamente inferior en sujetos con obesidad (12,6%), en comparación con el detectado en individuos con normopeso (20%) y sobrepeso (34,8%) ($p = 0,010$). Tanto los TAV como los TAS mostraron tamaños teloméricos superiores (*Ratio* T/S = $1,08 \pm 0,08$ y $1,07 \pm 0,07$, media \pm error estándar, respectivamente) en pacientes afectados de CCR, en comparación con los telómeros de individuos sin CCR (*Ratio* T/S = $0,77 \pm 0,06$ y $0,75 \pm 0,06$, media \pm error estándar, para los TAV y TAS, respectivamente), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,007$ y $0,003$, respectivamente). En sujetos obesos, la telomerasa se reactivó, en una mayor proporción, en los TAS de pacientes afectados de CCR (20,8%), en comparación con los TAS de individuos sin CCR (3%) ($p = 0,007$).

Conclusiones

La longitud de los telómeros constituye un biomarcador de utilidad en el establecimiento del pronóstico clínico de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal y que son sometidos a cirugía de intención curativa. Además, el estado de obesidad confiere una evolución clínica desfavorable, aunque se relaciona con el sexo de los individuos considerados. Por otra parte, los tejidos adiposos analizados presentan telómeros más largos

en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal, al compararse con los de individuos sin dicha patología.

Estos datos ponen de manifiesto la relevancia de la función telomérica y del Índice de Masa Corporal en el análisis del pronóstico clínico de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal. Sin embargo, también se deduce la necesidad de llevar a cabo investigaciones adicionales con objeto de analizar más exhaustivamente el efecto de la obesidad en el curso clínico del Cáncer Colorrectal en el contexto de otros factores individuales.

SUMMARY

ANALYSIS OF TELOMERIC FUNCTION PARAMETERS IN TUMOR AND ADIPOSE TISSUES OF PATIENTS AFFECTED BY COLORECTAL CANCER. RELATIONSHIP WITH OBESITY

Introduction

Telomeres are nucleoprotein complexes that protect the end of linear chromosomes in eukaryotic cells. This is achieved through the formation of the called *t-loop* structures, and through the action of a multiprotein complex called Shelterin complex, made up for the TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 and TPP proteins, as well as by other linked proteins. This complex prevents telomeres from being recognized as DNA damage (since telomeres contain a 3' single stranded region due to the inability of DNA polymerase to complete the synthesis of these regions during cell replication), and regulates the enzyme mainly involved in the telomeric regions elongation, known as telomerase.

It is known that telomere dysfunction, described as telomere critical shortening, plays an essential role in the development of a wide variety of tumors, including Colorectal Cancer (CRC). Its implication in tumorigenesis and CRC evolution depends on the right working of the senescence pathway in response to the telomere protection loosing. If these mechanisms work properly, the telomere progressive shortening will trigger senescence pathways activation, keeping off cells from continuing to divide, preventing genome instability. On the other hand, if its activation is deficient, cells will continue to replicate without control, getting higher levels of genomic instability that could lead to malignant transformation and tumor progression.

Besides, current bibliography shows that Body Mass Index (BMI) increase and, therefore, obesity, cause a greater telomere shortening, mainly due to the inflammatory and oxidative environment derived from the high levels of adipokines and proinflammatory cytokines linked to this physical condition. Obesity has been associated with higher telomere shortening and a CRC risk increase. However, to date, the relevance of these factors in the prognosis of CRC is controversial.

Aims

The main aim of this Thesis is to know the impact that parameters related to telomere function as well as the Body Mass Index have on the prognosis of patients affected by Colorectal Cancer. To achieve this, we established the following specific objectives:

1. To analyze the telomere length and telomerase activity both in tumoral and non-tumoral colorectal tissues from patients affected by Colorectal Cancer.
2. To analyze the relationship between the evaluated telomere function parameters and the Body Mass Index of the subjects included in this study.
3. To establish prognostic studies based on telomere length and on the telomerase activity of the colorectal tissues submitted to analysis, considering groups of individuals with normal weight, overweight and obesity.
4. To study telomeric function parameters both in visceral and subcutaneous adipose tissues from subjects with and without CRC.
5. To analyze the relationship between telomere length and telomerase activity of the evaluated adipose tissues and BMI of the patients included in this study.
6. To establish prognostic studies based on the telomeric function parameters analyzed in adipose tissues from individuals affected by CRC.

Results

In the colorectal tissue population, the mean telomere length (MTL) of the colorectal tumor samples was significantly lower than that detected in the non-tumor tissues samples (5.84 ± 0.17 kb and 7.52 ± 0.18 kb; mean \pm standard error, respectively), with statistically significant differences ($p < 0.001$). Tumors showing a lesser degree of local invasion (T1 and T2 tumors) had shorter telomeres compared to T3 and T4 tumors (5.44 ± 0.22 kb and 6.38 ± 0.29 kb; mean \pm standard error, respectively) ($p = 0.013$). Cases with tumor (T MTL) and non-tumor telomere length (NT MTL) less than 6.5 kb and 7.1 kb, respectively, were related with a better clinical prognosis ($p = 0.002$ and 0.009 , respectively).

Furthermore, these differences were independent from tumor stage ($p = 0.026$ and 0.038 for T MTL and NT MTL, respectively). In male patients affected by CRC, a BMI

less than 31.85 kg/m^2 was related to a better clinical evolution, compared to higher BMI values ($p = 0.026$).

Regarding adipose tissue population, a positive correlation was observed between visceral adipose tissue (VAT) and subcutaneous adipose tissue (SAT) relative telomere length (measured as *T/S Ratio*) for the general population ($r = 0.470$; $p < 0.001$). Regardless of CRC involvement, SAT from subjects with normal weight had longer telomeres compared to SAT from overweight and obese subjects (*T/S Ratio* = 1.21 ± 0.16 and 0.89 ± 0.05 ; mean \pm standard error, respectively), with statistically significant differences ($p = 0.046$).

For TAVs, also independently of CRC involvement, the number of cases with positive telomerase activity was significantly lower in subjects with obesity (12.6%), compared to that detected in subjects with normal weight (20%) and overweight (34.8%) ($p = 0.010$). Both TAV and TAS showed larger telomere sizes (*T/S Ratio* = 1.08 ± 0.08 and 1.07 ± 0.07 , mean \pm standard error, respectively) in patients affected by CRC, compared to telomeres of individuals without CRC (*T/S Ratio* = 0.77 ± 0.06 and 0.75 ± 0.06 , mean \pm standard error, for TAV and TAS, respectively), with statistically significant differences ($p = 0.007$ and 0.003 , respectively). In obese subjects, telomerase was reactivated to a greater extent in SAT from patients with CRC (20.8%), compared to SAT from subjects without CRC (3%) ($p = 0.007$).

Conclusions

Telomere length is a useful biomarker in establishing the clinical prognosis of patients affected by Colorectal Cancer, who have undergone surgery with curative intention. In addition, the state of obesity confers an unfavorable clinical evolution, although it is related to the sex of subjects. On the other hand, the analyzed adipose tissues present longer telomeres in patients affected by Colorectal Cancer, when compared to those of individuals without this pathology.

These data highlight the relevance of telomere function and Body Mass Index in the analysis of the clinical prognosis of patients affected by Colorectal Cancer. However, it could be also deduced the need to carry out additional research in order to more

thoroughly analyze the effect of obesity on the clinical course of Colorectal Cancer in the context of other individual factors.

ABREVIATURAS

ADN: ácido desoxirribonucleico.

ALT: *alternative lengthening of telomeres* (elongación alternativa de los telómeros).

ARN: ácido ribonucleico.

ARNlcn: ARN largos no codificantes.

ASC: *adipose-derived stem cells* (células progenitoras derivadas del tejido adiposo).

BER: *base excision repair* (reparación por escisión de bases).

CCR: cáncer colorrectal.

Cols: colaboradores.

DBS: *double strand breaks* (roturas de doble cadena).

DC: disqueratosis congénita.

DDR: *DNA-damage response* (respuesta al daño en el ADN)

dNTP: desoxinucleósido trifosfato.

EDTA: ácido etilen-di-amino-tetra-acético.

ELISA: *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*

EMT: *epitelial-mesenchymal transition* (transición epitelio-mesénquima).

HR: *homologous recombination* (recombinación homóloga).

ILE: intervalo libre de enfermedad.

IMC: índice de masa corporal.

Kb: kilobases.

LTM NT: longitud telomérica media no tumoral.

LTM T: longitud telomérica media tumoral.

LTM: longitud telomérica media.

mi-ARN: micro ARN.

MMR: *mismatch repair system* (reparación de errores de coincidencia).

NER: *nucleotide excision repair* (reparación por escisión de nucleótidos).

NHEL: *non-homologous end joining* (unión de extremos no homólogos).

PCR: *polymerase chain reaction* (reacción en cadena de la polimerasa).

qPCR: *quantitative PCR*.

ROS: *reactive oxygen species* (especies reactivas de oxígeno).

Rpm: revoluciones por minuto.

RPN: ribonucleoproteína.

RT-PCR: *reverse transcription PCR*.

siARN: ARN pequeño de interferencia.

TAS: tejidos adiposos subcutáneos.

TAV: tejidos adiposos viscerales.

TMM: *telomere maintenance mechanisms* (mecanismos de mantenimiento telomérico).

TPE: *telomere position effect* (efecto de posición telomérico).

1. INTRODUCCIÓN

1.1. FUNCIÓN TELOMÉRICA: TELÓMEROS Y TELOMERASA

1.1.1. TELÓMEROS: ESTRUCTURA Y FUNCIÓN.

Los telómeros son complejos nucleoproteicos localizados en los extremos de los cromosomas lineales de eucariotas, cuya función es la de mantener la estabilidad genómica. En humanos, su tamaño varía entre 5 y 15 kb, y están constituidos por una secuencia de ADN hexamérica, repetida en tándem (5'-TTAGGG/CCCTAA-3') (**Samassekou et al., 2010**).

Debido a la incapacidad de la ADN polimerasa para completar la síntesis de los cromosomas lineales durante la replicación, cuando se eliminan los cebadores de los últimos fragmentos de Okazaki, se genera una región monocatenaria en el extremo 3' de los cromosomas (**Figura 1.1, A**). Para evitar que dicha región sea reconocida por los sistemas de reparación celulares como una zona de daño en el ADN, los telómeros se organizan en una estructura en bucle llamada *t-loop*: el extremo monocatenario 3' invade la región de doble cadena del telómero, formando un nuevo bucle de desplazamiento (*displacement loop* o *d-loop*), que genera así la estructura de *t-loop* (**Figura 1.1, B**). Esta organización del ADN telomérico se asocia con un conjunto de proteínas que componen el denominado complejo *Shelterin*. Su función consiste en estabilizar la estructura de los telómeros y regular el acceso de proteínas implicadas en la reparación y elongación del ADN. En el extremo de los telómeros también pueden aparecer otras estructuras especializadas llamadas G-cuádruplex o tétradas G (**Figura 1.1, C**), formadas por la asociación de 4 guaninas sobre un plano con capacidad para apilarse unas encima de otras en presencia de las condiciones iónicas adecuadas, otorgando así protección a los telómeros en sustitución al complejo *Shelterin* (**Turner et al., 2019; Giardini et al., 2014**).

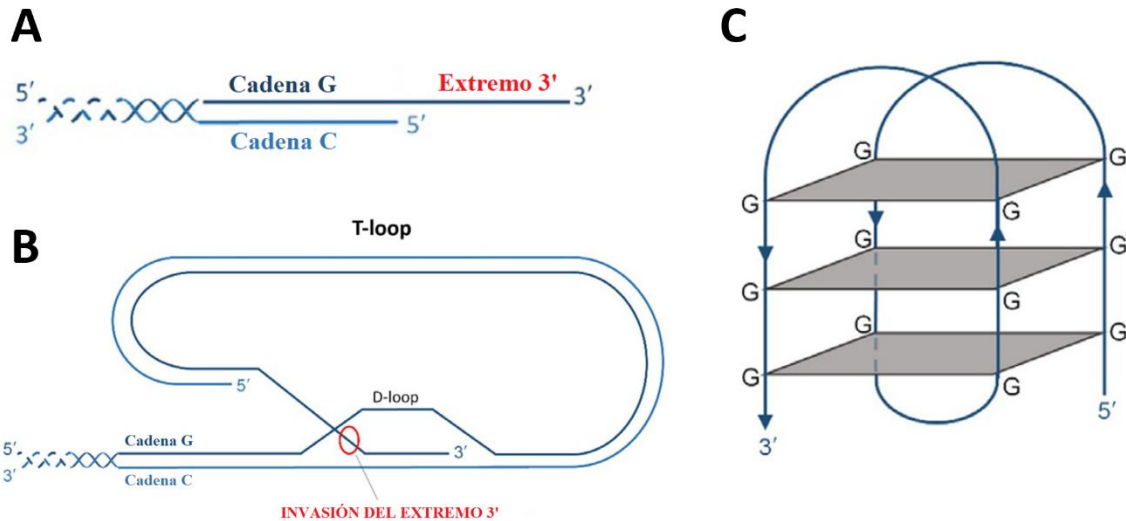


Figura 1.1.- Estructura de los extremos del ADN telomérico (A), *T-loop* (B) y G-cuádruplex (C). Adaptado de **Giardini, 2014**.

1.1.2. PROTECCIÓN DE LOS TELÓMEROS: COMPLEJO *SHELTERIN*

El complejo *Shelterin* está constituido por un conjunto de 6 proteínas proteicas denominadas TRF1, TRF2, POT1, RAP1, TIN2 y TPP (**Figura 1.2**). Dicho complejo está involucrado en la protección de los telómeros, impidiendo su degradación y la activación de los sistemas de reparación del ADN; también está implicado en la regulación del acceso de la telomerasa a los telómeros. El complejo telomérico tiene un papel imprescindible en la senescencia celular y está relacionado con patologías asociadas a la edad (**Mir et al., 2020**). Se encuentra vinculado a otro conjunto trimérico de proteínas denominado CST (formado por las proteínas, CTC1, STN1/OBFC1 y TEN1), junto con el cual realiza las funciones anteriormente citadas (**Rice & Skordalakes, 2016**).

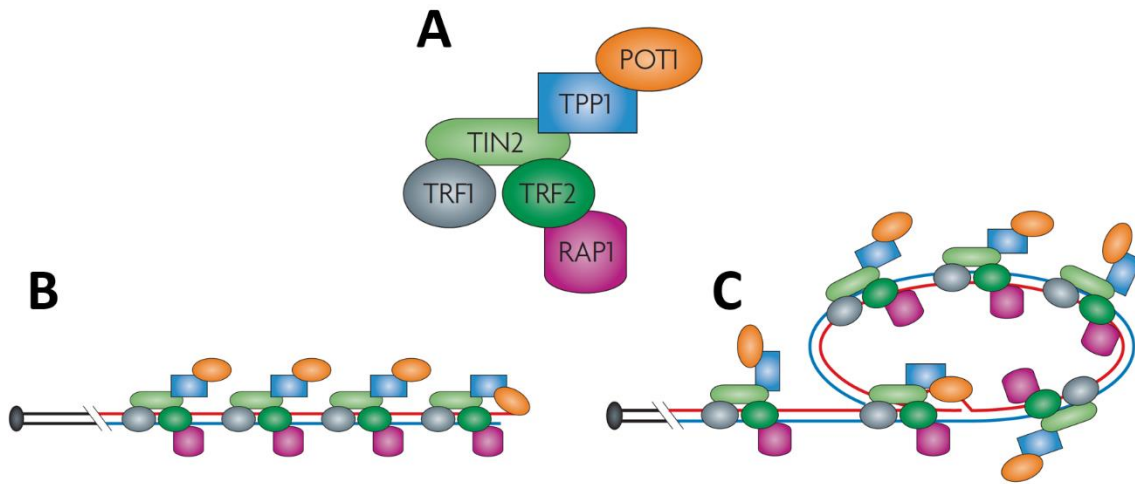


Figura 1.2.- Representación del Complejo *Shelterin* (A), unión del complejo *Shelterin* a las secuencias teloméricas lineales (B), y formación del *t-loop* (C). Adaptado de **Cesare & Reddel, 2010**.

1.1.2.1. *Telomeric Repeat Binding Factor 1 y 2 (TRF1 y TRF2).*

Las proteínas *Telomeric Repeat Binding Factor 1 y 2* (TRF1 y 2) contribuyen a la protección y mantenimiento del ADN telomérico (**Smorgorzewska et al., 2000**). Ambas proteínas contienen en su extremo C-terminal unas secuencias denominadas *Myb-type DNA binding domain*, con las que pueden unirse al ADN telomérico, y secuencias que les permiten formar homodímeros (pero nunca heterodímeros) llamadas *TRF homology* o TRFH en su extremo N-terminal (**Broccoli et al., 1997; Karlseder, 2003**).

TRF1 y 2 participan en múltiples funciones, como son la regulación de la longitud telomérica, protección y prevención de fusiones cromosómicas, detección de daño en el ADN y regulación de la senescencia (**de Lange, 2005**).

- TRF1.

TRF1 juega un papel importante en la regulación de la longitud telomérica, ya que tiene la capacidad de unirse a los telómeros e impedir la movilización de la enzima telomerasa a esas regiones (**Tong et al., 2015**): los telómeros más largos podrán unir una

mayor proporción de TRF1, impidiendo a la telomerasa que pueda elongarlos. Los telómeros irán acortándose con las sucesivas etapas de división celular, hasta que los niveles de TRF1 que puedan unirse al telómero se reduzcan lo suficiente como para que la telomerasa pueda retomar su función (homeostasis telomérica) (**van Steensel & de Lange, 1997**). Estas observaciones coinciden con el trabajo realizado por Muñoz y cols., que descubrieron que la proteína TRF1 se encontraba en mayor proporción en las células que tienen telómeros más cortos (**Muñoz et al., 2009**).

También se ha sugerido que las células con telómeros cortos expresan niveles superiores de TRF1 para intentar contrarrestar una menor unión de esta proteína a las regiones teloméricas y poder mantener la homeostasis de la función telomérica (**Valls-Bautista et al., 2012**).

Sin embargo, la entrada de la célula en mitosis requiere que TRF1 se separe de la región telomérica para permitir el acceso al resto de proteínas que participan en la replicación del ADN. Esto se consigue mediante la fosforilación de TRF1 por parte de la quinasas CDK1 (*Cyclin B-dependent kinase 1*), que impide que TRF1 pueda unirse al ADN, quedando libre en el núcleo (**McKerlie & Zhu, 2011**). Aunque la mayor parte de TRF1 fosforilada se detecta en la fase de mitosis, una pequeña proporción de esta proteína fosforilada también puede encontrarse en la interfase. TRF1 fosforilada, a través de su reclutamiento por parte de proteínas que detectan roturas de la doble hebra de ADN (*DNA Double-strand breaks* o DSBs), como la proteína ATM, participa en mecanismos de reparación del ADN como la Recombinación Homóloga o HR (*Homologous Recombination*, en inglés) (**McKerlie et al., 2013**).

- TRF2.

Esta proteína es la responsable de la formación de las estructuras del *t-loop* que estabilizan los telómeros, ya que su unión al ADN telomérico provoca un superenrollamiento positivo en la doble hebra y estimula la invasión del extremo 3' (**Amiard, 2007**). Sin embargo, durante la replicación celular (fase S), es necesario un proceso de defosforilación de TRF2 para permitir el acceso a los telómeros de la maquinaria replicativa necesaria para la división celular (**Sarek, 2019**).

Otra de las funciones más estudiadas de TRF2 es la evitar los mecanismos de reparación del ADN en respuesta a roturas en la doble hebra (DBS), mediados principalmente por la proteína quinasa ATM. Karlseder y cols. observaron que TRF2 impedía la acción de ATM al interferir en su interacción con otros sensores de daño en el ADN, o evitando la autofosforilación y activación de ATM (TRF2 se une a los monómeros de ATM y los inactiva) (Karlseder, 2004). El progresivo acortamiento telomérico asociado a la replicación celular reduce la unión de moléculas de TRF2 al ADN, reduciéndose así la formación de los *t-loop* y la capacidad para inhibir los mecanismos de detección DBS mediados por ATM, provocando la parada del ciclo celular (Denchi & de Lange, 2007; Benarroch-Popivker et al., 2016).

Como ocurre con TRF1, TRF2 también es fosforilada en respuesta al daño en el ADN a través de la vía dependiente de ATM, separándose de las regiones teloméricas y movilizándose hacia las zonas dañadas (DBS) activando el mecanismo de reparación *Non-homologous end joining* o NHEJ (Huda et al., 2009).

1.1.2.2. *TRF1-Interacting Protein 2* (TIN2).

La proteína TIN2 actúa como puente de unión entre TRF1, TRF2 y la región telomérica, además de estabilizar la interacción del complejo TPP1/POT con la enzima telomerasa (Ye Jeffrey et al., 2004; Frescas & de Lange, 2014; Pike et al., 2019). TIN2 contiene dos regiones principales que le permiten interactuar con el resto de proteínas: los dominios *TRFH-binding motif* o TBM (reconocen las regiones TRFH de TRF1 y 2, esenciales para su unión) y dominios TRFH (son reconocidos por TPP1 a través de su dominio *TIN2-binding motif* o TBM) (Figura 1.3). La unión de TIN2 con TPP1 y TRF2 puede ocurrir de manera simultánea y generándose un complejo estable (Hu et al., 2017).

TIN2 regula la acción de la enzima telomerasa mediante la estabilización de las interacciones entre el complejo TPP1/POT1 con la subunidad hTERT de la telomerasa y la región monocatenaria de los telómeros (Pike et al., 2019). Frank y cols. demostraron que, como ocurre en la disqueratosis congénita (enfermedad relacionada con telómeros acortados), mutaciones en la proteína TIN2 impiden el reclutamiento de la telomerasa hacia las regiones teloméricas, por lo que se favorece el acortamiento telomérico (las

mutaciones en *TIN2* provocarían que TPP1 no pudiese interactuar de manera correcta con la telomerasa) (Frank, 2015).

Además, *TIN2* es imprescindible para la interacción entre TRF1 y TRF2. Se ha observado que, en ausencia del complejo *TIN2*/TRF1, los niveles de TRF2 se reducen, dejando los telómeros desprotegidos e impidiendo la proliferación celular. Por ello, se considera a *TIN2* el “eje” del complejo *Shelterin* (Ye Jeffrey et al., 2004).

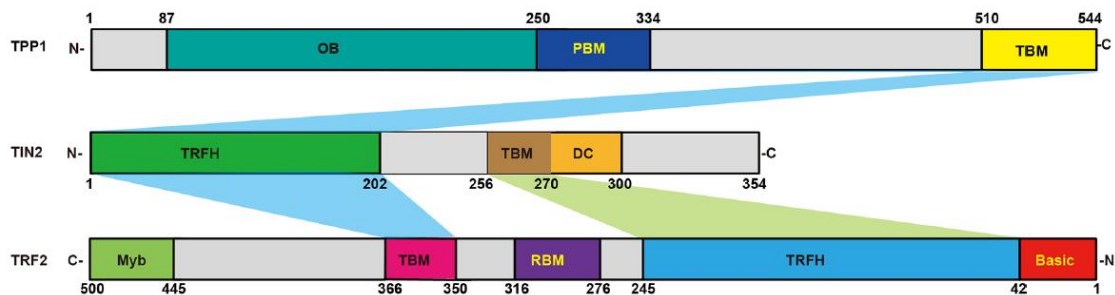


Figura 1.3.- Estructura de los dominios de *TIN2*, *TPP1* y *TRF2*. TRFH: *Telomeric Repeat Factor Homology domain*, OB: *Oligosaccharide-binding fold*, PBM: *POT1-binding motif*, TBM en *TPP1* y *TRF2*: *TIN2-binding motif*, TBM en *TIN2*: *TRFH-binding motif*. DC: *Dis-keratosis congenita hotspot*, RBM: *RAP1-binding motif*. Adaptado de Hu et al., 2017.

1.1.2.3. Protection Of Telomeres 1 (POT1).

POT1 es la única proteína del complejo *Shelterin* que puede unirse a la región monocatenaria de los telómeros a través de sus dos dominios *oligonucleotide/oligosaccharide-binding* 1 y 2 (OB1 y OB2), que reconocen la secuencia telomérica 3' (Lei et al., 2004). POT1 también participa en la inhibición de los mecanismos de DDR en las regiones teloméricas, evitando que la proteína RPA (*Replication Protein A*, en inglés) se una a los telómeros y se activen las vías de reparación mediadas por ATM (Gong & de Lange, 2010).

POT1 impide que la telomerasa desarrolle su función, ya que, al estar unida el extremo 3', la enzima no puede acceder a dicha región para elongar los telómeros (Kelleher et al., 2005). Sin embargo, la unión de POT1 y TPP1 (complejo POT1-TPP1) promueve la actividad telomerasa: el complejo POT1-TPP1 se une a los telómeros acortados para

promover su elongación por medio del reclutamiento y la acción de la telomerasa. A medida que los telómeros se van elongando, los nuevos complejos POT1-TPP1 se van uniendo, hasta alcanzar una longitud lo suficientemente elevada como para que los niveles de POT1-TPP1 que se han unido vuelvan a frenar la acción de la telomerasa, deteniéndose así el proceso de elongación telomérica. Esto permite que las nuevas repeticiones teloméricas que se incorporan a los telómeros acortados sean aproximadamente del mismo tamaño que las que se han eliminado durante la replicación celular, manteniéndose así una longitud telomérica constante (**Xu et al., 2019**).

1.1.2.4. *TINT-PTOP-PIP1 protein (TPP1)*.

TPP1 es el componente del complejo *Shelterin* encargado de reclutar y activar la telomerasa en las regiones teloméricas. La interacción entre TPP1 y la enzima telomerasa se produce a través del dominio *OB-fold* que contiene TPP1 (región conocida como *TELPatch*), el cual es reconocido por los dominios TEN y CTE de la subunidad hTERT de la telomerasa. Esta interacción permite que la enzima se acople a la región del ADN telomérico que va a ser elongado (**Nandakumar et al., 2012; Zhong et al., 2012**).

Además de sus funciones relacionadas con la telomerasa, se ha demostrado que TPP1 actúa como regulador en las interacciones de todos los componentes del complejo *Shelterin*: O'Connor y cols. observaron que TPP1 estabiliza las interacciones TIN2-TRF2 y TRF1-TIN2-TRF2, ya que la unión de TPP1 con TIN2 induciría un cambio conformacional en este último que potencia las interacciones tanto con TRF1 como con TRF2 (**O'Connor et al., 2006**).

1.1.2.5. *Repressor/Activator Protein 1 (RAP1)*.

RAP1 se une a TRF2 en las regiones teloméricas a través de su dominio RCT en el extremo C-terminal, que es reconocido por la secuencia RBM (*Rap1-binding motif*) de TRF2 (**Chen et al., 2011**). Esta unión incrementa la afinidad de TRF2 por el ADN telomérico, posiblemente debido a interacciones alostéricas entre RAP1 y TRF2 (**Arat &**

Griffith, 2012). RAP1 también impide la activación de los mecanismos de reparación del ADN, como pueda ser NHEJ, sin necesidad de su interacción con TRF2: en telómeros demasiado acortados, la formación de *t-loops* puede verse comprometida debido a la poca cantidad de moléculas de TRF2 que pueden unirse al telómero y estabilizar estas estructuras de protección. No obstante, se ha observado que existen mecanismos que impiden la vía de reparación NHEJ por mecanismos alternativos a TRF2 que involucrarían a RAP1 (**Bae & Buamann, 2007; Sarthy et al., 2009**).

Además de las funciones anteriores, se ha descubierto una correlación entre los niveles de expresión de telomerasa y RAP1. En situaciones de acortamiento telomérico, debido a una reducción en los niveles de actividad telomerasa, RAP1 se desvincula de los telómeros y se asocia con regiones de ADN genómico (**Martinez et al., 2016**). Varias de estas regiones de ADN genómico, a las que RAP1 se une, son regiones promotoras de diversos genes involucrados en los mecanismos que se activan durante la senescencia, como los genes que codifican para las histonas H4, sugiriendo que RAP1 podría actuar como regulador genómico cuando la longitud de los telómeros se reduce críticamente (**Platt et al., 2013**).

1.1.2.6. Proteínas vinculadas al complejo *Shelterin*.

En las regiones teloméricas, no todas las proteínas forman parte del complejo *Shelterin*, sino que existen varias que cumplen funciones determinantes para una correcta función telomérica (**De Lange, 2005**).

- Tankirasa 1 y 2.

Dos de las principales proteínas asociadas a TRF1 son la tankirasa 1 y 2. Ambos factores pertenecen a la familia de las poli(ADP)-ribosa polimerasas (PARPs), que catalizan la transferencia de un grupo ADP-ribosa hacia su sustrato gracias a la presencia de varios dominios de unión llamados *Ankyrin Repeat Cluster* o ARC (**Haikarainen et al., 2014**). Estas tankirasas llevan a cabo la ADP-ribosilación de TRF1, lo que da lugar a que se

separe de los telómeros, sea ubiquitinada y degradada por el proteosoma. Por ello, las tankirasas 1 y 2 participan en la regulación de la longitud telomérica puesto que permiten el acceso de la telomerasa a las regiones teloméricas (**Chang et al., 2003**).

- PinX1.

PinX1 también interacciona con TRF1, además de inhibir la acción de la telomerasa. PinX1 reconoce los dominios TRFH de TRF1 y se une a ellos, acumulándose en las regiones teloméricas e inhibiendo la acción de la telomerasa mediante la unión a la subunidad hTERT (**Banik & Counter, 2004**). Cuando los telómeros son demasiado cortos, la disminución de moléculas de TRF1 unidas a estas regiones va acompañada de menores niveles de PinX1, lo que facilita la acción de la telomerasa y la elongación de los telómeros. Una vez reestablecida la longitud de los telómeros, las nuevas secuencias teloméricas generadas irán incorporando moléculas de TRF1 y, en consecuencia, PinX1, favoreciendo de nuevo su papel inhibidor de la telomerasa (**Soohee et al., 2011**). Los estudios llevados a cabo por Yoo y cols. revelaron que PinX1, además de estabilizar la estructura de TRF1 para incrementar su afinidad por los telómeros, necesita interactuar con hTERT para poder llevar a cabo sus funciones reguladoras con TRF1 (**Yoo et al., 2014**).

- SNM1B/Apollo.

La exonucleasa SNM1B/Apollo se asocia con TRF2, actuando tanto en el mantenimiento de los telómeros como en respuestas al daño en el ADN (DDR) en regiones no teloméricas (**Schmiester & Demuth, 2017**). Con respecto a sus funciones, participa en la formación del extremo 3' monocatenario característico de las regiones teloméricas en la hebra conductora durante el proceso de replicación gracias a su función exonucleasa 5' y al reclutamiento por parte de TRF2 hacia los telómeros (**Wu et al., 2012**). Estudios adicionales demuestran su protección frente a respuestas de reparación del ADN no deseadas en los telómeros y su participación en la activación de rutas de respuesta al daño en el ADN mediado por ATM (**Demuch et al., 2008**).

- Complejo MRN (MRE11, RAD50, NBS1).

El complejo proteico MRN es un heterotrímero formado por las proteínas MRE11, RAD50 y NBS1 que participa en los mecanismos de detección y reparación de roturas en la doble hebra de ADN (DSB), principalmente a través de la vía de ATM. Tras la formación de regiones de DSB, el complejo MRN reconoce estas regiones y se une a ATM, lo que provoca que este se active, fosforilando y activando el resto de moléculas implicadas en los mecanismos de reparación del ADN (**Paul & Lee, 2005; Situ et al., 2019**). El complejo MRN también participa en la formación del extremo 3' monocatenario de los telómeros durante el proceso de replicación celular y en el reclutamiento de moléculas de ATM a las regiones teloméricas, necesarias para fosforilar y activar a TRF1 y favorecer así la elongación de los telómeros (**Wu et al., 2007; Attwooll et al., 2009**).

- Ku70/80.

El heterodímero Ku70/80 actúa como pieza principal en el reconocimiento de zonas DSB y en la activación de la vía de reparación NHEJ, uniéndose a cada extremo generado por la rotura y reclutando al resto de proteínas que participan en este proceso de reparación (**Walker et al., 2001**).

Varios estudios han demostrado la participación de este heterodímero Ku70/80 en el mantenimiento de los telómeros mediante la interacción tanto con la subunidad hTERT de la telomerasa (se une a ella e inhibe su función catalítica) como con TRF2 (incrementa su afinidad por el ADN telomérico e impide que sea degradado por el proteosoma) (**Chai et al., 2002; Fink et al., 2010**).

- *Phosphatase 1 Nuclear Targeting Subunit* (PNUTS).

El factor PNUTS es el responsable de regular y activar el complejo *DNA-dependent protein kinase* o DNA-PK, constituido por las proteínas Ku70, Ku80 y la subunidad

catalítica DNA-PK (DNA-PKcs). Gracias a su mecanismo de acción, PNUTS participa en la reparación del ADN mediante NHEJ (**Zhu et al., 2017**).

- *Microcephalin 1* (MCPH1).

MCPH1 es una proteína implicada en el reconocimiento de roturas en el ADN y en la activación de la vía ATM (**Wood et al., 2007**). En situaciones de disfunción telomérica, provocadas por la eliminación de POT1 de la secuencia 3', MCPH1 es desfosforilada. Esta modificación le permite interactuar con TRF2 (se une a sus dominios TRFH) para inducir el reclutamiento de diferentes factores que participan en los mecanismos de reparación del ADN (**Cicconi et al., 2020**).

- Helicasas RecQ: WRN y BLM.

Las helicasas de la familia RecQ denominadas WRN (*Werner Syndrome RecQ helicase-like*) y BLM (*Bloom síndrome RecQ helicase-like*) participan en la separación del ADN bicatenario durante procesos de replicación, recombinación y reparación del ADN (**Croteau et al., 2014**).

Ambas helicasas parecen estar asociadas a los telómeros a través de TRF1. Se ha observado que WRN se une a TRF1 en señal de daño oxidativo en el ADN telomérico para favorecer la reparación de dichas zonas, y la helicasa BLM interactúa con TRF1 durante la replicación del ADN para eliminar las estructuras de G-cuádruplex y permitir el avance de la maquinaria de replicación (**Zimmermann et al., 2014; Sun et al., 2017**).

- *Flap Endonuclease 1* (FEN1).

La endonucleasa FEN1 interviene en la eliminación de los cebadores que dan lugar a la síntesis de los fragmentos de Okazaki durante el proceso de replicación celular (**Liu et al., 2004**). Entre sus funciones se encuentran el correcto procesamiento de los fragmentos

de Okazaki durante la replicación de los telómeros, y la reparación del ADN telomérico ante daños por estrés oxidativo (reparación principalmente por mecanismos denominados *Base Excision Repair* o BER), siendo reclutado por TRF2 (Muftuoglu et al., 2006; Sampathi et al., 2009).

- *Origin Recognition Complex* (ORC).

El complejo ORC se une directamente a los orígenes de replicación del ADN y moviliza al resto de proteínas implicadas en la replicación celular (Sasaki & Gilbert, 2007). Como consecuencia, este complejo tiene una implicación esencial en la replicación de los telómeros, ya que es reclutado por TRF2 hacia las regiones teloméricas para que se inicie dicho proceso replicativo (Deng et al., 2007).

- Complejo ERCC1-XPF.

Las subunidades ERCC1 y XPF conforman un complejo con actividad nucleasa que participa en la reparación del ADN a través del mecanismo denominado *nucleotide excision repair* (NER) (Manandhar et al., 2015). La participación del complejo ERCC1-XPF en el mantenimiento de los telómeros se produce mediante la interacción con TRF2 a través de dos posibles escenarios: el complejo ERCC1-XPF se une a TRF2 y provoca cambios conformacionales que le impiden a TRF2 interactuar con otras proteínas implicadas en la regulación telomérica (Apollo, WRN, MRE11/RAD50/NBS1, etc.), o modifica la secuencia telomérica a través de su función nucleasa para impedir que TRF2 pueda formar las estructuras *T-loops* que protegen los telómeros (Wu et al., 2008).

1.1.3. MANTENIMIENTO DE LOS TELÓMEROS: TELOMERASA

Debido al problema de la replicación terminal, responsable del acortamiento de las regiones teloméricas en cada ciclo de división celular, las células eucariotas se han visto

obligadas a desarrollar una estrategia que impide la erosión de los telómeros (responsable de la aparición de inestabilidad genómica y muerte celular): la enzima telomerasa (**Blackburn & Collins, 2011**). La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico (*ribonucleo-protein* o RPN, en inglés) en el que destacan la subunidad hTERT (constituye la subunidad catalítica, con actividad transcriptasa reversa) y la subunidad hTR (componente ARN que contiene el molde necesario para la elongación de las repeticiones teloméricas), junto con una serie de proteínas imprescindibles para su correcto funcionamiento y localización celular (**Figura 1.4**) (**Blackburn et al., 2006; Gómez et al., 2016**).

La subunidad hTERT (subunidad con función transcriptasa reversa) está constituida por 4 dominios estructurales: dominio N-terminal (llamado TEN), dominio C-terminal (CTE), dominio de unión a ARN (TRBD, en inglés) y dominio transcriptasa reversa (RT, en inglés). El dominio TEN participa en el reclutamiento de la subunidad hTR y se une al ADN monocatenario de las regiones teloméricas, favoreciendo que la enzima permanezca unida al telómero durante el proceso de replicación, en las células en las que la telomerasa está activa; el dominio CTE regula la localización de la enzima en los telómeros al unirse también al ADN monocatenario; el dominio RT contiene 7 regiones necesarias para unión del ARN y nucleótidos, así como para la actividad enzimática de hTERT; y el dominio TRBD es esencial para la unión del molde de ARN y la adición de las repeticiones teloméricas (**Kelleher et al., 2002; Autexier & Lue, 2006**) (**Mason et al., 2011**). Los dominios TRBD, RT y C-terminal se unen para formar el denominado “anillo TERT”, con una cavidad central que acoge al dúplex de ARN-ADN (de unos 7-8 nucleótidos de extensión) que va a ser elongado (**Gillis et al., 2008**).

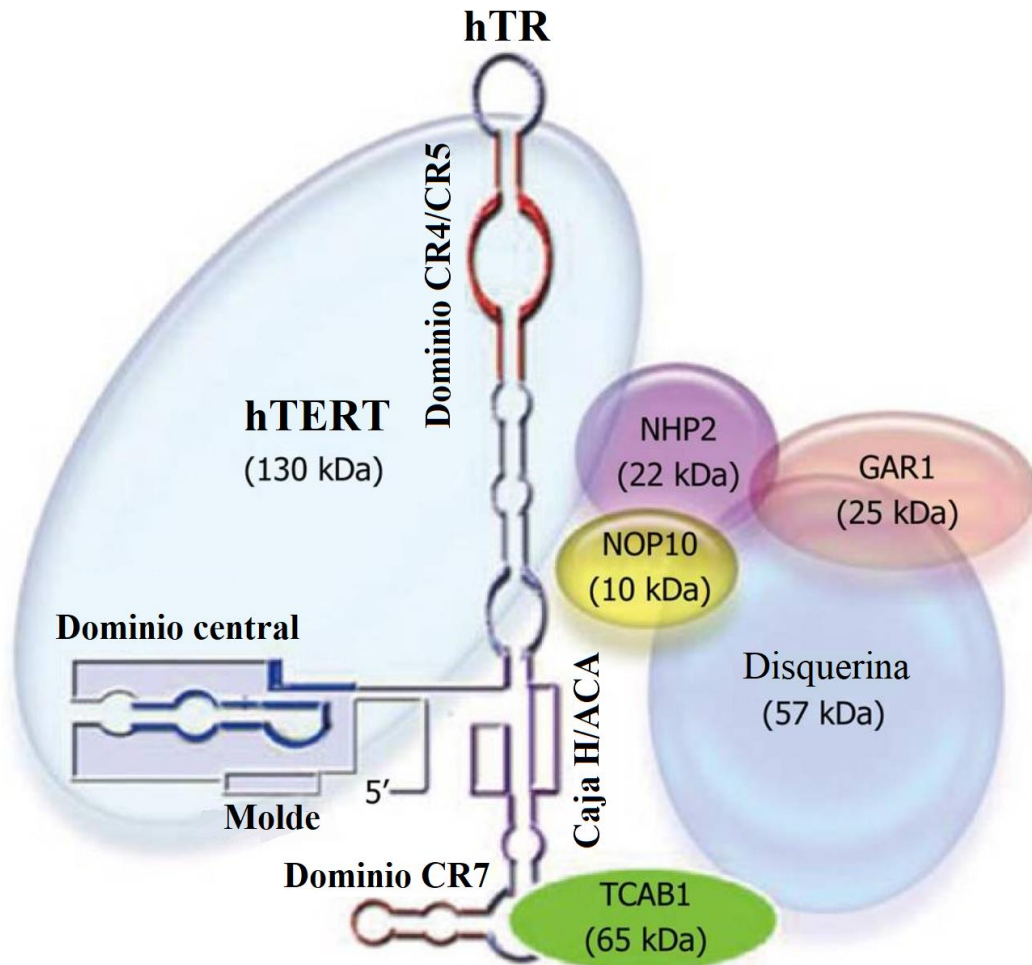


Figura 1.4.- Representación de los diferentes componentes de la telomerasa humana. Adaptado de Ly, 2011.

Por su parte, la subunidad hTR o hTERC (molde de ARN complementario a las secuencias teloméricas) es transcrita por la ARN polimerasa II (Feng et al., 1995). Aunque a lo largo de las distintas especies presenta variaciones tanto en secuencia como en tamaño, contiene 3 dominios estructurales conservados. En la región 5' de la molécula se localizan el dominio central (*pseudoknot/template domain*, en inglés), que incluye el molde de ARN para la elongación de los telómeros, y el dominio CR4/CR5 (*Conserved Regions 4 y 5*, en inglés). Estos dos elementos pueden unirse de manera independiente a la subunidad hTERT y son los únicos de la subunidad hTR necesarios para reconstituir la actividad catalítica de la enzima. Por su parte, el dominio H/ACA, situado en la región 3', contiene un elemento llamado CR7 que integra la denominada caja CAB. El dominio H/ACA participa en la biogénesis y regulación de la enzima, y es esencial para su unión

a varias proteínas como la disquerina, GAR1, NOP10 y NHP2 (**Figura 1.5**) (**Zhang et al., 2011; Chan et al., 2017**).

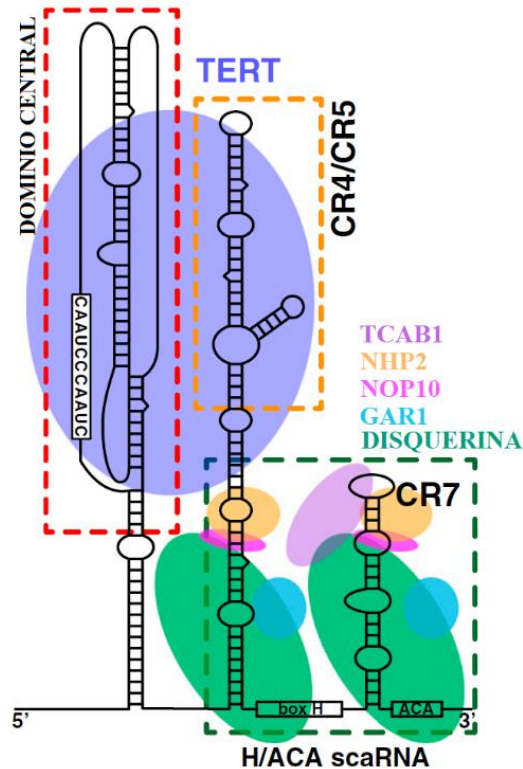


Figura 1.5.- Representación de la estructura secundaria de la subunidad hTR. scaRNA: ARNs pequeños específicos del cuerpo de Cajal. Adaptado de **Zhang et al., 2011**.

Existen unas estructuras nucleares relacionadas con la biogénesis de la enzima telomerasa, llamada cuerpos de Cajal. Estos orgánulos, localizados en el núcleo de las células eucariotas, participan en la modificación postraduccional de diversas ribonucleoproteínas nucleares, entre ellas la telomerasa (**Nizami et al., 2010**). En estas estructuras la telomerasa adquiere las modificaciones necesarias para ser funcionalmente activa, como la adición del capuchón TMG y su unión con el resto de proteínas asociadas a la telomerasa (**Jády et al 2004; Zhu et al., 2004**). La movilización hacia estas estructuras se produce gracias a la región llamada caja CAB presente en la subunidad hTR (**Zhang et al., 2011**).

Otra proteína que forma parte de la estructura de la telomerasa es la proteína TCAB1 (*Telomerase and Cajal body protein 1*, en inglés). Participa en el correcto plegamiento de la subunidad hTR para poder unirse a hTERT (a través de los dominios CR4/5), y en

la movilización de hTR desde los cuerpos de Cajal hacia los telómeros durante el proceso de replicación (Venteicher et al., 2009; Zhong et al., 2011; Chen et al., 2018). Esta proteína se une a la telomerasa a través de la caja CAB de la subunidad hTR y de la disquerina (Tycowski et al., 2009; Egan & Collins, 2010). Se ha observado que, ante la falta de TCAB1, la sobreexpresión de la enzima telomerasa no compensa esta ausencia *in vivo*, sugiriendo que la interacción de TCAB1 con proteínas asociadas a los telómeros constituye un evento esencial en el reclutamiento de la telomerasa hacia las regiones teloméricas (Stern et al., 2012).

1.1.3.1. Biogénesis de la telomerasa.

Una vez que la subunidad hTR se ha sintetizado, se une al complejo proteico formado por las proteínas disquerina/NOP10/NAHP2/NAF1, lo que protege al transcrito de ARN de posibles modificaciones postraduccionales. La ribonucleoproteína recién formada se dirige hacia los cuerpos de Cajal, donde hTR termina de adquirir las modificaciones necesarias para que sea funcional y la proteína NAF1 es sustituida por GAR1 (Jady et al., 2004; Darzacq et al., 2006)

Por su parte, la maduración de hTERT para poder unirse a hTR implica su interacción con la chaperona Hsp90 (Keppler et al., 2006).

La formación del complejo hTERT/hTR requiere de la acción de dos ATPasas llamadas pontina y reptina, que estabilizan la unión de ambas subunidades de la enzima con el resto de proteínas (disquerina, principalmente) (Venteicher et al., 2008). Aunque existen trabajos que defienden que hTERT tiene que transportarse al núcleo para unirse a hTR, no se conoce con exactitud si es hTERT la que se importa al núcleo para asociarse con hTR, o si la subunidad hTR es exportada fuera del núcleo para unirse a hTERT (Frohnert, et al., 2014; Schmidt & Cech, 2015).

La movilización de la telomerasa hacia los cuerpos de Cajal implica la unión hTR/hTERT, a través de la interacción entre la caja CAB de la subunidad hTR y la proteína TCAB1 (Tomlinson et al., 2008; Venteicher & Artandi, 2009).

1.1.3.2. Reclutamiento de la telomerasa hacia los telómeros.

Una vez que la telomerasa se transporta hacia las regiones teloméricas durante la fase S del ciclo celular, la enzima tiene que reconocer y unirse a los telómeros para que pueda llevar a cabo su función. Este reconocimiento se produce gracias a la interacción de hTERT con el dímero TPP1-POT1 del complejo *Shelterin* (los dominios CTE y TEN de la subunidad hTERT se unen al dominio OB *fold* de TPP1) (Abreu et al., 2010; Zhong et al., 2012). Las proteínas TPP1 y POT1 reducen la probabilidad de que la telomerasa se disocie del extremo 3' monocatenario que está siendo elongado e incrementan la eficiencia de la adición de repeticiones teloméricas (Lattrick & Cech, 2010).

Además de TPP1 y POT1, la proteína TIN2 también tiene implicación en la regulación de la telomerasa. Tiene la capacidad de unir TPP1 con el resto del complejo *Shelterin*, pudiendo ejercer un control alostérico sobre el reclutamiento y actividad de la telomerasa una vez que la enzima y TPP1 interactúan (Yang et al., 2011).

La movilización de la telomerasa hacia las regiones teloméricas durante la fase S se produce mediante difusión a través del núcleo, pudiéndose asociar con TPP1. Debido al corto periodo de tiempo que conforma esta fase del ciclo celular, la mayoría de las interacciones entre la enzima y los telómeros ocurren con muy poca duración (menos de 1 segundo), favoreciendo que la enzima pueda llevar a cabo muchos más procesos de elongación durante este proceso celular (Schmidt et al., 2016).

- Ciclo catalítico de la telomerasa.

El ciclo de elongación de los telómeros comienza con la unión entre la región telomérica 3' y el molde presente en la subunidad hTR, formando el dúplex inicial. Una vez conseguido esto, se suceden una serie de pasos descritos a continuación (Figura 1.6) (Wu et al., 2017):

- 1) El dúplex inicial formado por el molde de hTR y el extremo 3' telomérico se sitúan en el sitio activo de la subunidad TERT, donde la unión de dNTPs provoca que la enzima telomerasa adquiere una conformación cerrada (activa) que da lugar a que comience la elongación.

- 2) La adición de dNTPs se inicia en el extremo 3' del molde, que va desplazándose por el sitio activo de la enzima hasta llegar al extremo 5' del molde de ARN.
- 3) Cuando el extremo 5' del molde de ARN llega al sitio catalítico, el molde no dispone de espacio suficiente para unir más dNTPs.
- 4) El avance del molde a través del sitio activo hace que se forme un *loop* en el extremo 3' del molde.
- 5) Este *loop* formado en el extremo 3' del molde provoca interacciones ARN-ARN o ARN-proteínas que llevan a la enzima a una conformación abierta, promoviendo que el molde de ARN se separe del telómero. Sin embargo, la región telomérica elongada no se separa de la enzima, sino que queda anclada en una región denominada SRS (*single-stranded DNA retention site*, en inglés).
- 6) La liberación del molde de ARN de sitio catalítico permite su traslocación a una nueva zona.
- 7) Esta traslocación puede llevar a una nueva unión del extremo 3' del molde con el extremo 3' del ADN telomérico anclado en la región SRS de la enzima, comenzando un nuevo ciclo de elongación telomérica (paso 1).

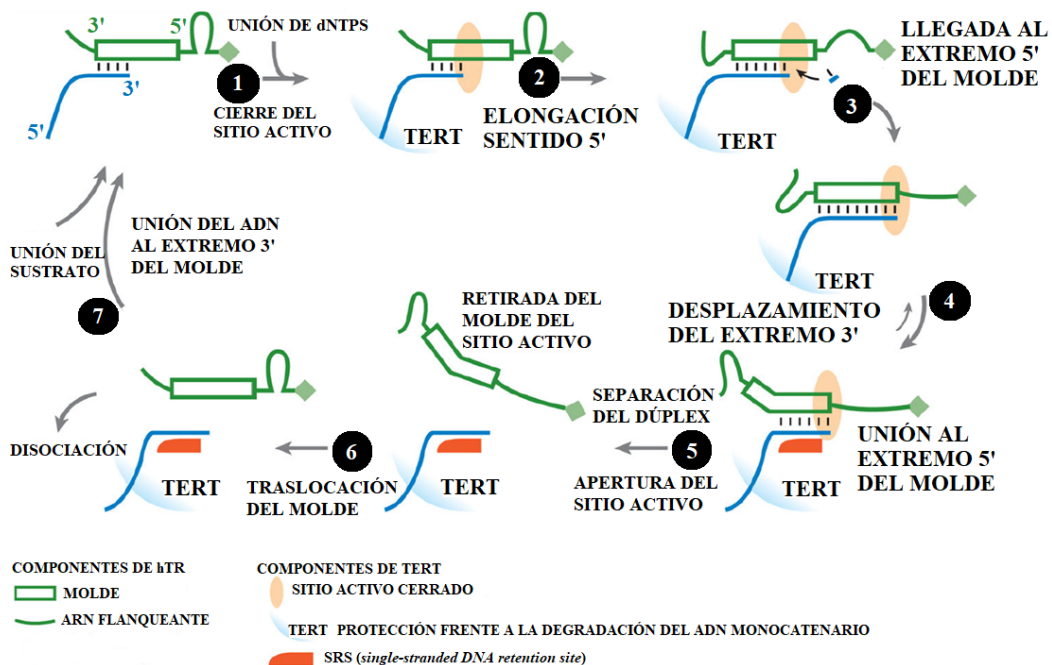


Figura 1.6.- Representación del ciclo catalítico de la telomerasa. Extremo telomérico (en azul); SRS: superficie de retención del ADN monocatenario (*single-stranded DNA retention surface*, en inglés). Adaptado de Wu et al., 2017.

En el proceso de elongación, el ADN telomérico de nueva síntesis se pliega para formar estructuras G-cuádruplex características de los telómeros, hasta que las nuevas moléculas de POT1 y TPP1 se unen para protegerlo de los mecanismos de reparación del ADN. Si los nuevos G-cuádruplex afectan a las zonas del ADN telomérico que se encontraban ancladas a las regiones SRS de la telomerasa, el ADN se separará de la enzima y el proceso de elongación telomérica habrá finalizado (**Jansson et al., 2019**).

1.1.3.3. Regulación de la telomerasa.

La actividad telomerasa puede regularse tanto a nivel de expresión de *hTERT* como de *hTR*. La actividad de hTERT está sometida a varios niveles de regulación (**Skvortzov et al., 2009**):

- Regulación a nivel del promotor de *hTERT*: incluye procesos de metilación y acetilación/desacetilación de histonas (**Ge et al., 2010; Wang et al., 2010**), regulación a través de NF- κ B y de la vía MAPK (**Li et al., 2015; Villarelli et al., 2016**), de oncogenes como *c-Myc* (**Toaldo et al., 2010**), de genes supresores de tumores como *TP53* y *p21* (**Shats et al., 2004**), o de hormonas como progesterona, estrógenos o andrógenos (**Calado et al., 2009; Cen et al., 2015; Valentijn et al., 2015**).
- Regulación postraduccional de hTERT: se han identificado 7 variantes de *splicing* alternativo para hTERT, todas ellas con propiedades inhibitoras de la actividad telomerasa (**Liu et al., 2017**). Una de las variantes más importante es la “ β -deleción”, la cual se une a la subunidad hTR e impide el correcto funcionamiento de la enzima (se expresa en distintos estadios del desarrollo embrionario) (**Listerman et al., 2013**).
- Fosforilación: el ensamblaje completo de la telomerasa, así como la adquisición de su actividad enzimática, implica la entrada de hTERT desde el citoplasma hacia el núcleo gracias a las secuencias NLS (*nuclear localization signal*, en inglés) presentes en esta subunidad. Esta entrada se ve favorecida por la fosforilación de hTERT por parte de la quinasa Akt, que permite que se ensamble correctamente y pueda interactuar con los mecanismos de importación nucleares (**Chung et al., 2012; Jeong et al., 2015**). Por el contrario, la actuación de la fosfatasa PP2A

reduce el transporte de hTERT hacia el núcleo (Xi et al., 2013). La fosforilación de hTERT también permite su interacción con la chaperona Hsp90 para poder plegarse correctamente (Chang et al., 2006).

Por su parte, la subunidad hTR también se regula a nivel del promotor de su gen y mediante modificaciones postraduccionales (Skvortzov et al., 2009):

- Regulación del promotor de *hTR*: la acción sobre el promotor de *hTR* de distintos factores pueden ejercer un papel activador (como NF- κ B, Sp1 o pRB) o inhibidor (Mdm2 o p53) sobre la ARN polimerasa II, regulando así la transcripción de *hTR* (Zhao et al., 2005).
- Regulación postraduccional: para que hTR pueda dirigirse hacia los cuerpos de Cajal, es necesario el correcto procesamiento del extremo 3' donde se encuentra la caja CAB (Theimer et al., 2007).

Además de la regulación de la enzima, la actividad telomerasa también se puede controlar a nivel de las proteínas del complejo *Shelterin*. La fosforilación de TRF1 en el residuo T271 incrementa su afinidad por el ADN telomérico, impidiendo que la telomerasa pueda acceder a estas regiones (Ho et al., 2016). Por su parte, mutaciones en *TIN2* o *TPPI* impedirían la localización y el reconocimiento adecuado de las regiones teloméricas por parte de la telomerasa (Yang et al., 2011; Bisht et al., 2016).

1.1.3.4. Funciones de la telomerasa independientes a los telómeros.

La telomerasa participa en diversos mecanismos celulares, independientemente del mantenimiento del tamaño telomérico: se ha demostrado que hTERT interviene en la protección de los telómeros a través de su interacción con POT1 (Mukherjee et al., 2011), regula la acción de varios factores de transcripción como la β -catenina, NF- κ B y c-MYC (Liu et al., 2012; Ghosh et al., 2012; Koh et al., 2015), y reduce la producción de especies reactivas de oxígeno (*reactive oxygen species* o ROS, en inglés) en la mitocondria que conducen a la muerte celular en situaciones de estrés oxidativo (Mattiusi et al., 2012; Singhapol et al., 2013).

Otra de las funciones “extra-teloméricas” que hTERT puede tener es la de, en combinación con un componente ARN (similar a hTR), actuar como una ARN polimerasa

dependiente de ARN o RdRP (*RNA-dependent RNA polymerase*, en inglés) y sintetizar moléculas que pueden actuar como ARN de interferencia (siRNA, en inglés) (Maida et al., 2009). Este mecanismo resulta importante en la regulación de la heterocromatina y la expresión de diversos genes durante el proceso de mitosis (Maida et al., 2014).

Por su parte, la subunidad hTR de la telomerasa también tiene un papel no relacionado con la elongación de los telómeros. Se ha observado que el componente ARN de la telomerasa es transportado a la mitocondria, donde es escindido a una molécula de ARN de menor tamaño (denominada hTERC-53), que puede mantenerse en la mitocondria o ser exportada al citoplasma (Cheng et al., 2018). Esta forma modificada de hTR activa las vías de senescencia celular, aunque en células del sistema inmunitario (linfocitos T) puede tener efectos antiapoptóticos (Gazzaniga & Blackburn, 2014; Zheng et al., 2019).

1.1.3.5. Enfermedades relacionadas con la telomerasa.

Una de las enfermedades más relevantes debida a defectos en la actividad telomerasa es la disqueratosis congénita o DC. Esta enfermedad se caracteriza por mutaciones que afectan elementos implicados directamente en la acción de la telomerasa, como son hTERT, hTR o disquerina, pero también pueden afectar a proteínas relacionadas de manera indirecta con la telomerasa, como TIN2. Como consecuencia, los telómeros de estos pacientes sufren un acortamiento prematuro, desarrollando síntomas que incluirían una pigmentación cutánea anormal y fallos en la médula ósea (Vulliamy & Dokal, 2008; Dokal, 2011).

Además, la actividad telomerasa se ha vinculado en el desarrollo de otras enfermedades, como afecciones cardíacas o autoinmunes (Kroenke et al., 2012; Invernizzi et al., 2014). Sin embargo, su relación más importante se le atribuye al desarrollo de diversos tipos de tumores (Kumari et al., 2009; Kulic et al., 2016; Minafra et al., 2017).

1.1.4. ALTERNATIVA A LA TELOMERASA: MECANISMO ALT

Se ha demostrado que la mayoría de las células tumorales (80-85%) utilizan la telomerasa para elongar sus telómeros. No obstante, una pequeña proporción de tumores (10-15%) emplea un mecanismo alternativo de elongación telomérico denominado *alternative lengthening of telomeres* o ALT, en inglés (Sommer & Royle, 2020). Es característico de tumores procedentes de células mesenquimales y neuroepiteliales (sarcomas, principalmente), siendo poco habitual en tumores de colon, próstata o páncreas (las células epiteliales que inician estos tumores regulan de manera más eficiente la telomerasa) (Heaphy et al., 2011).

Se ha observado que las células que mantienen sus telómeros mediante ALT contienen en sus núcleos unas estructuras de ADN circular, denominadas círculos T (*t-circles*, en inglés) (Cesare & Griffith, 2004), originadas mediante 3 posibles procesos (Figura 1.7): recombinación homóloga intramolecular entre repeticiones teloméricas, recombinación homóloga intramolecular iniciada en un *t-loop*, o circularización de fragmentos teloméricos lineales (Tomaska et al., 2004).

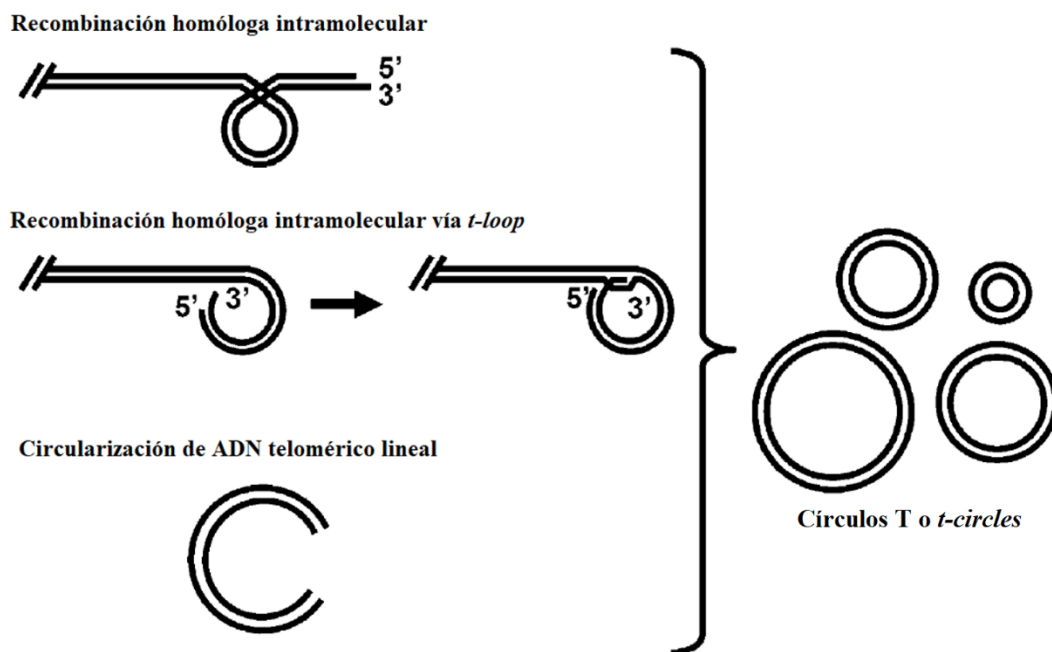


Figura 1.7.- Posibles mecanismos para la formación de los círculos T o *t-circles*. Adaptado de Tomaska et al., 2004.

Se han descrito dos posibles modelos a través de los cuales las células pueden elongar sus telómeros mediante ALT (**Cesare & Reddel, 2010**):

- Modelo del intercambio de cromátidas teloméricas hermanas (*Telomere sister chromatid exchanges* o *T-SCE*, en inglés) desigual: durante la división celular, una de las células hijas heredará la región telomérica completa, generándose una célula con los telómeros elongados y otra con ellos acortados. Este mecanismo asegura que la región telomérica completa siempre sea heredada por una de las células hijas.
- Modelo de la replicación de ADN dependiente de Recombinación Homóloga (HR): el nuevo ADN telomérico se sintetiza empleando como molde una región telomérica adyacente, que podría ser el propio telómero (mediante los *t-loops*), una cromátida hermana, fragmentos de ADN cromosómicos lineares o las estructuras de círculos T.

Si bien los círculos T se han detectado, en baja proporción, en células con una actividad telomerasa regulada, estas estructuras son características de células con telómeros muy extensos, como ocurre en situaciones de sobreexpresión de la telomerasa (**Henson et al., 2009; Pickett et al., 2009**). La formación de los círculos T está vinculada con el “colapso” de las horquillas de replicación durante la fase S del ciclo celular, debido a roturas de la doble cadena de ADN en estas regiones, lo que lleva a la formación de bucles que impiden el avance de la maquinaria replicativa. Para solucionarlo, la topoisomerasa II (Topo II) escinde y libera estos bucles, activándose la vía de reparación NHEJ (mediado por Akt) para unir entre sí los extremos de los bucles (generándose los círculos T) y conectar los extremos de la zona de los telómeros que había sido escindida (representado en la **Figura 1.8**). Este evento permite a las células con telómeros muy extensos poder resolver los colapsos en las horquillas de replicación y mantener la integridad de su genoma (**Zhang et al., 2017; Zhang et al., 2019**).

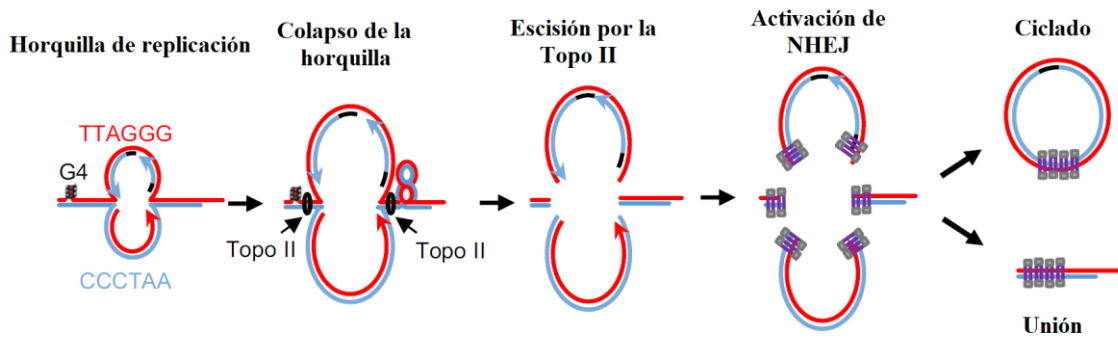


Figura 1.8.- Modelo de resolución del colapso de una horquilla de replicación y liberación de círculos T. Adaptado de **Zhang et al., 2017**.

1.1.5. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA TELOMÉRICA

El ADN se organiza en unas estructuras nucleoproteicas denominadas nucleosomas. En las regiones teloméricas, los nucleosomas están favorecidos por la acción del complejo *Shelterin*, principalmente por TRF1 y 2, que promueven el plegamiento del ADN en estructuras más compactas. También se ha observado que la cromatina telomérica contiene marcadores epigenéticos tanto de heterocromatina (H3K9me3) como de eucromatina (H2BK5me1 y H3K4me3), en función de la longitud de los telómeros (**Ichikawa et al., 2015**).

Por definición, las secuencias teloméricas se localizan en los extremos de los cromosomas. Sin embargo, en ciertas especies de vertebrados, incluidos los seres humanos, se han detectado repeticiones teloméricas en zonas intracromosómicas, que reciben el nombre de secuencias teloméricas intersticiales o ITS (*interstitial telomeric sequences*, en inglés). Estas secuencias ITS son susceptibles de comportarse como como sitios de rotura, recombinación o amplificación genética, por lo que tienen una importancia crucial en patologías asociadas con la inestabilidad genómica (**Lin & Yan, 2008**).

La heterocromatina localizada en las regiones teloméricas está regulada por las proteínas metil-transferasas SUV39H1/H2, que realizan una triple metilación en las histonas H3K9 (H3K9me3). La metilación del ADN telomérico únicamente ocurre en las regiones subteloiméricas, puesto que son las únicas zonas de los telómeros que contienen regiones CpG (**Barral & Déjardin, 2020**). Esta heterocromatina participa en la regulación de

genes a través del fenómeno denominado efecto de posición telomérico o *telomere position effect* (TPE, en inglés). Este mecanismo está basado en el silenciamiento de determinados genes y depende tanto del tamaño de los telómeros como de la distancia hasta el gen. El fenómeno TPE permitiría explicar la relación que existe entre el acortamiento progresivo de las secuencias teloméricas y cambios en la expresión génica, como ocurre con el gen *hTERT* (Kim & Shay, 2018).

La región 3' de la cromatina situada en las regiones teloméricas puede ser transcrita por la ARN Pol II y generar unas moléculas de ARN largos no codificantes (ARNlnc), conocidas como TERRA (*telomeric repeat-containing RNA*, en inglés), con tamaños que van desde 100 nt hasta 9 kb (Lalonde & Chartrand, 2020).

TERRA participa en la regulación de varias funciones, como son el mantenimiento de la heterocromatina telomérica o la actividad telomerasa (Wang et al., 2015). Estos ARNlnc son necesarios para la estabilidad estructural de los telómeros y la formación de heterocromatina, a través de su interacción con proteínas del complejo *Shelterin* como TRF1 y TRF2, ORC1 o HP1 (Deng et al., 2009). Inicialmente, TERRA fue considerado un inhibidor de la actividad telomerasa, ya que contiene secuencias 5'-UUAGGG-3' que se unen a la subunidad hTR de la telomerasa e impide que pueda acceder a las regiones teloméricas (Redon et al., 2010). No obstante, estudios posteriores han demostrado que TERRA promueve la acumulación de moléculas de telomerasa en aquellos telómeros que se han acortado en exceso, permitiendo que estos puedan recuperar su tamaño original (Cusanelli et al., 2013; Moravec et al., 2016).

1.1.6. ENFERMEDADES RELACIONADAS CON LOS TELÓMEROS

El mal funcionamiento de los elementos encargados de mantener la homeostasis telomérica puede desencadenar el desarrollo de ciertas enfermedades, conocidas como telomeropatías. Este conjunto de enfermedades se puede clasificar en: primarias (promovidas por defectos en la maquinaria encargada de mantener el adecuado funcionamiento de los telómeros) o secundarias (si los elementos afectados participan en los mecanismos de respuestas a daño en el ADN) (Opresko & Shay, 2016; Armando et al., 2019):

- Telomeropatías primarias:
 - Disqueratosis congénita: ya definida anteriormente, se trata de la principal telomeropatía primaria que se conoce. Es una patología asociada a mutaciones en genes relacionados con la acción de la telomerasa, como son *DKC1* (codifica para la disquerina), *hTR* o *TERT*. Los pacientes no suelen desarrollar síntomas hasta la primera década de vida, y se caracterizan por un fallo en la médula ósea, fibrosis hepática y/o pulmonar, que pueden desencadenar en cáncer de hígado o pulmón.

- Telomeropatías secundarias:
 - Ataxia telangiectasia: se trata de una patología de tipo autosómico recesivo, causada por mutaciones en el gen *ATM*, cuyo producto participa en la reparación del daño en el ADN. Por ello, las células de estos pacientes son extremadamente sensibles a las radiaciones ionizantes. Entre los síntomas característicos cabe destacar la ataxia cerebelar, telangiectasia oculocutánea, inmunodeficiencia y un elevado riesgo para el desarrollo de tumores pulmonares, linfomas y leucemias.
 - Síndromes de Bloom y Werner: el síndrome de Bloom (BS) y el síndrome de Werner (WS) son producidos por mutaciones en los genes que codifican para las helicasas *BLM* y *WRN*, respectivamente. Dado que estas proteínas se encargan de eliminar las torsiones producidas en el ADN durante su reparación mediante recombinación homóloga (HR), las células de los pacientes afectados presentan una elevada tasa de intercambios de cromátidas hermanas (*sister chromatid exchanges* o SCE, en inglés). Ambos síndromes provocan falta de crecimiento, inmunodeficiencia, osteoporosis o predisposición a una amplia variedad de cánceres.

1.1.7. DISFUNCIÓN TELOMÉRICA, SENESCENCIA Y CÁNCER

Las células germinales y las células madre embrionarias son capaces de mantener sus longitudes teloméricas invariables gracias a la expresión de la telomerasa de manera constitutiva. En el caso de las células madre pluripotentes, la actividad telomerasa se encuentra regulada, y únicamente sufren un ligero acortamiento de los telómeros a lo largo de la vida del organismo. Sin embargo, en las células somáticas de organismos adultos, al no expresar la enzima telomerasa, el acortamiento telomérico inherente a la división celular se producirá a un ritmo superior, llegando a alcanzar niveles de acortamiento críticos (**Figura 1.9.**) (**Shay & Wright, 2011**)

Las células cuentan con dos “puntos de control” frente al acortamiento telomérico, denominados senescencia replicativa (M1) y crisis replicativa (M2) (**Nassour et al., 2021**). La senescencia replicativa (M1) se inicia cuando alguno de los telómeros es identificado como una rotura en el ADN, lo que activa los mecanismos DDR mediados principalmente por dos de las vías oncosupresoras más importantes: vía de p53 y vía p16-RB (**Figura 1.10**) (**Yaswen et al., 2015; Jäger & Walter, 2016**). A través de ATM, p53 se activa e induce la expresión de otro factor, llamado p21, encargado de inhibir el complejo formado por la ciclina E y la CDK2. Por su parte, la vía de p16 también es activada por los sensores de daño en el ADN, lo que en este caso provoca que se inhiban los complejos formados por la ciclina D y las CDK 4/6. Sin la acción de las ciclinas y las CDKs, la proteína RB no se encuentra fosforilada y puede evitar que el factor E2F acceda al núcleo celular y estimular la expresión de genes implicados en proliferación celular. Ambas vías de señalización permiten a las células con telómeros disfuncionales detener su ciclo celular y entrar en un estado de senescencia replicativa.

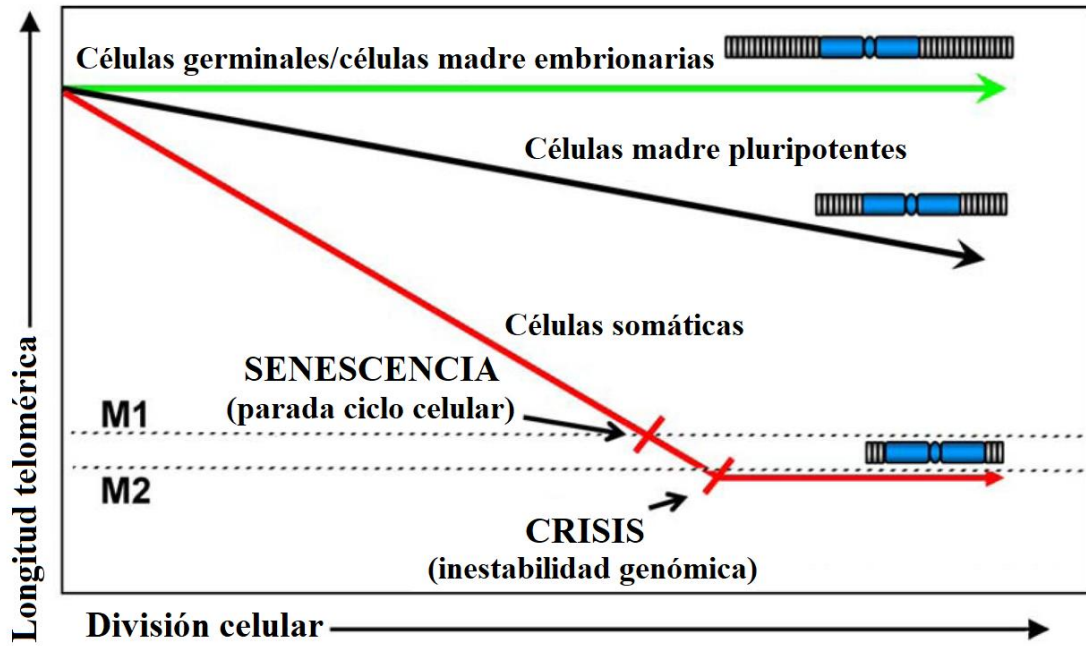


Figura 1.9.- Acortamiento telomérico en función de la actividad de la telomerasa en diferentes tipos celulares. Adaptado de **Shay & Wright, 2011**.

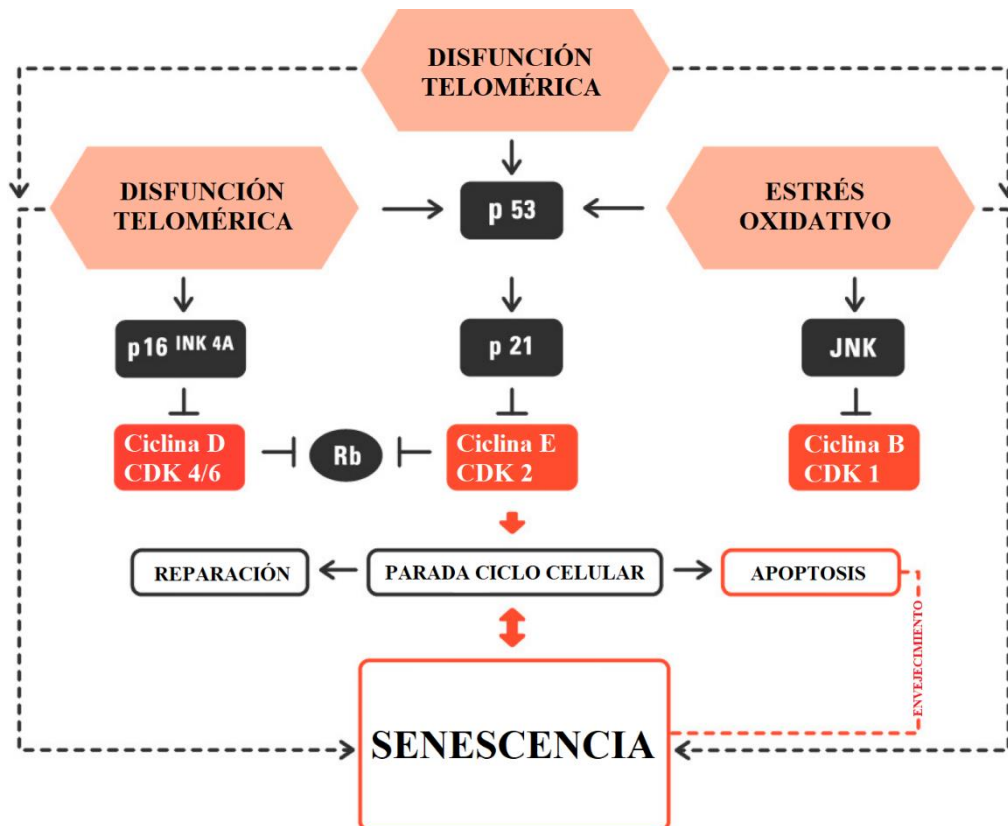


Figura 1.10.- Activación de la senescencia celular a través de las vías de p53 y de p16-RB. Adaptado de **Jäger & Walter, 2016**.

En 2005, un estudio llevado a cabo con células MCF-7 determinó que la exposición de estas células a radiaciones ionizantes provocaba disfunción telomérica, activándose las vías de senescencia mediadas por p53 (**Jones et al., 2005**). Dos años después, se observó que el acortamiento telomérico inducía un fenotipo senescente, también a través de la acción de p53 (**Feldser & Greider, 2007**). En células deficientes para telomerasa y que utilizan la recombinación homóloga para elongar sus telómeros, la reintroducción de la enzima reducía el proceso de senescencia (**Chen et al., 2009**). Un experimento llevado a cabo en un modelo murino para el linfoma de Burkett demostró que la activación de la vía DDR mediada por p53 ante un acortamiento telomérico impedía la formación de linfomas (**Wang et al., 2016**).

Este estado de senescencia replicativa implica la parada irreversible del ciclo celular, aunque las células mantienen su actividad metabólica y expresan factores antiapoptóticos como proteínas de la familia BCL-2 (BCL-W y BCL-XL). La senescencia replicativa también se caracteriza por una expresión por parte de las células de un fenotipo proinflamatorio, conocido como SASP (*senescence-associated secretory phenotype*, en inglés). En este primer punto de control, la estabilidad cromosómica todavía no se ve comprometida (**Nassour et al., 2021**).

No obstante, la pérdida de función de las vías p53 y p16-RB provoca que las células se vuelvan insensibles a las señales DDR, por lo que pueden continuar dividiéndose hasta que sus telómeros alcanzan tal grado de acortamiento que son incapaces de mantener su estructura protectora. Este escenario es el responsable de la activación de la segunda barrera proliferativa, denominada crisis replicativa (M2), que se caracteriza por la aparición de fusiones cromosómicas y formaciones de puentes entre las cromátidas hermanas (**Nassour et al., 2021**).

El grupo de Davoli realizó un experimento con fibroblastos deficientes para RB y p53, mimetizando los efectos del acortamiento telomérico en células con mutaciones en estas moléculas. Como resultado, las células mostraban grandes alteraciones genómicas, caracterizadas por la tetraploidización inducida por procesos de endoreduplicación (replicación del material genético sin el proceso de citocinesis) y mitosis fallida (**Davoli & de Lange, 2012**). En 2015, se observó que el tratamiento de células con siARNs frente a RB y p21, junto con la eliminación de TRF2, provocaba una división celular defectuosa, con formación de puentes entre las cromátidas de las células hijas y eventos de cromotripsis (reordenamientos genómicos inter o intracromosómicos que afectan a uno o varios

cromosomas) y *kataegis* (regiones del genoma susceptibles a procesos de hipermutaciones) (Maciejowski et al., 2015). Otro trabajo publicado en 2015 recoge el efecto que tiene la disfunción telomérica en el desarrollo de alteraciones genómicas cuando los mecanismos de senescencia no funcionan correctamente. Para ello se empleó la línea celular RPE-1 deficiente en p53, que fue tratada con ARN de interferencia frente a TRF2 para mimetizar una situación de telómeros desprotegidos. Tras la inducción de daño en el ADN, estas células sufrieron eventos de cromotripsis y otras alteraciones genómicas características de varios tipos de tumores (Mardin et al., 2015).

Haapaniemi y cols., mimetizaron un escenario de daño en el ADN a través de la tecnología de edición génica CRISPR-Cas 9 y demostraron que aquellas células deficientes para p53 eran las que sufrían mayores eventos de recombinación homóloga (en células con p53 activa, este daño celular induce la parada del ciclo celular) (Haapaniemi et al. 2018). En varias líneas celulares, la activación de los mecanismos de senescencia en respuesta a la inestabilidad telomérica sólo se producía en presencia de p16. Cuando este factor era eliminado, el acortamiento telomérico inducía apoptosis en estas células a través de la caspasa 3 (Selvam et al., 2018).

Por lo expuesto en los párrafos anteriores, el estado de crisis replicativa se caracteriza, principalmente, por la aparición de inestabilidad genómica que, en la mayoría de los casos, conduce a la muerte celular. Además, la eliminación de las células que alcanzan este punto también se produce a través de sucesos de mitosis prolongada y autofagia (Hayashi et al., 2015; Nassour et al., 2019).

Inicialmente, el estado de crisis replicativa fue considerado como la última línea de control frente al inicio de la tumorigénesis. No obstante, esta situación desencadena un ambiente óptimo para la adquisición de alteraciones genéticas y epigenéticas que favorezcan la transformación maligna de una pequeña proporción de células capaces de evadir el estado de crisis replicativa (Nassour et al., 2021).

La capacidad replicativa ilimitada, o inmortalización celular, está vinculada a mecanismos de mantenimiento telomérico (*telomere maintenance mechanisms* o TMM, en inglés) basados, principalmente, en la reactivación de la telomerasa (en una menor proporción, el mantenimiento de las secuencias teloméricas se lleva a cabo mediante mecanismos ALT). El análisis genómico de 56 neuroblastomas detectó en aquellos con mayor agresividad un incremento en los reordenamientos genómicos que afectaban a una región

proximal de *hTERT*, incrementando tanto su expresión como la actividad de la telomerasa en respuesta a la sobreexpresión del gen *MYC* (Peifer et al., 2015). Chiba y cols. observaron que las mutaciones en el promotor de *hTERT* contribuían a la tumorigénesis, promoviendo la inmortalización y la inestabilidad genómica en varias muestras de glioblastomas analizadas (Chiba et al., 2017). Las mutaciones en el promotor de *TERT* están consideradas como la principal alteración genética que provoca la sobreexpresión de esta subunidad de la telomerasa. Sin embargo, el grupo de Lee analizó más de 1.300 tumores humanos y determinó que, aproximadamente, la mitad de estos tumores (entre los que se incluyen tumores colorrectales) mostraban una región hipermetilada cercana al promotor de *TERT* (región denominada *TERT hypermethylated oncological region* o THOR, en inglés), que favorecía su expresión. Estos resultados ponen de manifiesto que la hipermetilación de la región THOR es un evento frecuente en los tumores que reactivan la telomerasa (Lee et al., 2019).

Como se ha demostrado, la reactivación de la telomerasa se puede deber tanto a mutaciones o metilaciones que afecten al promotor de la subunidad catalítica, como a reordenamientos génicos y amplificaciones que impliquen a *hTERT* y a oncogenes relacionados con su activación (como *MYC*).

Sin embargo, se han identificado diferentes tumores sin ningún tipo de TMM. Los autores han intentado explicar este fenómeno desde el punto de vista de la ausencia de presión selectiva. En algunos neuroblastomas iniciados en edades tempranas, se ha observado que las células cuentan con telómeros lo suficientemente largos como para abordar los sucesivos ciclos de división celular que acompañan al proceso de tumorigénesis, sin necesidad de tener que elongar las secuencias teloméricas. También se han definido alteraciones genéticas en estas células capaces de permitir su escape del estado de crisis replicativas (Nassour et al., 2021).

Por tanto, si las células son capaces de sobreponerse al acortamiento crítico de los telómeros que desencadena la activación de la senescencia y de la crisis replicativa y, además, consiguen desarrollar algún mecanismo que les permita mantener una longitud telomérica adecuada que solvante la inestabilidad genómica desencadenada por este acortamiento telomérico (principalmente, mediante la reactivación de la telomerasa), habrán adquirido una capacidad proliferativa ilimitada que favorezca el desarrollo tumorigénico.

La reactivación de la enzima telomerasa constituye un evento esencial en las células tumorales para poder estabilizar la longitud de sus telómeros. No obstante, se han establecido 3 hipótesis que intentan explicar la fase del proceso tumorigénico en la que las células reactivan la enzima (**Figura 1.11**) (**Kumar et al., 2016**). El concepto de reactivación en etapas tempranas de la tumorigénesis establece que la reactivación de la actividad enzimática ocurre al inicio del proceso carcinogénico, inducida por mutaciones en el promotor de *hTERT* o por la pérdida de mecanismos que regulen negativamente la telomerasa, provocando que la actividad telomerasa sea elevada en los siguientes estadios de la progresión tumoral. Una segunda posibilidad considera que los tumores pueden derivar de células madre/progenitoras, las cuales presentan actividad telomerasa; por tanto, de acuerdo con esta segunda hipótesis, el proceso tumorigénico se desarrollaría con la intervención de células que son positivas para la enzima desde su inicio. Por último, la hipótesis más plausible en tumores sólidos es la que indica que la telomerasa se reactiva en etapas avanzadas de la progresión tumoral (**Kumar et al., 2016**).

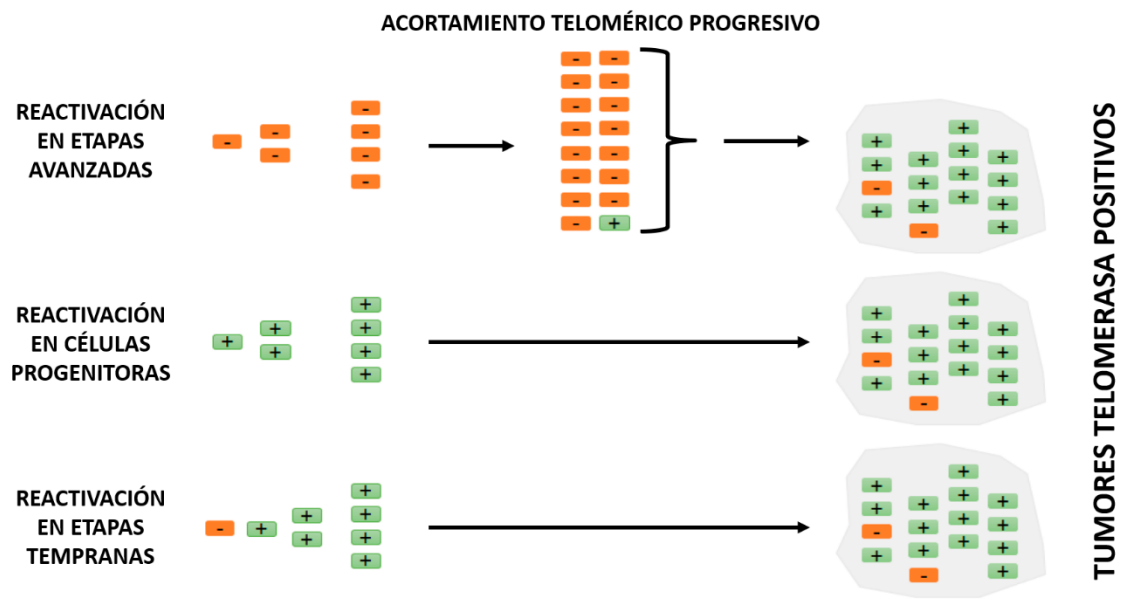


Figura 1.11.- Hipótesis sobre la reactivación de la telomerasa durante la tumorigénesis. Adaptado de **Kumar et al., 2016**.

1.2. CÁNCER COLORRECTAL

1.2.1. INCIDENCIA Y FACTORES DE RIESGO DEL CCR

Los últimos datos recogidos en la base GLOBOCAN, en el año 2020, indican que el Cáncer Colorrectal (CCR) presenta una incidencia del 10% y una mortalidad del 9,4% en hombres y mujeres. En hombres, la incidencia y mortalidad se sitúan en valores similares, siendo del 10,6% y 9,3%, respectivamente. Para las mujeres, la incidencia baja mínimamente, fijándose en el 9,4%, aunque la mortalidad aumenta hasta el 9,5% (**Sung et al., 2021**).

Los factores de riesgo que pueden desencadenar la aparición de CCR son múltiples, si bien se fundamentan mayoritariamente tanto en los antecedentes médicos personales y familiares como en el estilo de vida del individuo (**Sawicki et al., 2021**).

- Antecedentes médicos personales y familiares.
 - Historial genético familiar.

Un historial familiar de casos de CCR incrementa el riesgo de desarrollo de este tipo tumoral, dependiendo de la distancia generacional y edad del diagnóstico, el número de familiares afectados, y el desarrollo de otros tipos de tumores por parte de los familiares. Existen estudios que demuestran que los individuos con familiares en primer grado (padres, hermanos o hijos) que desarrollan CCR, ven incrementado en dos veces su riesgo para desarrollar la enfermedad. Además, entre el 2 y el 8% de los CCRs suponen síndromes hereditarios que predisponen a los sujetos a desarrollarlo, como son el cáncer colorrectal hereditario no polipósico (*hereditary nonpolyposis colorectal cancer* o HNPCC, en inglés) o síndrome de Lynch, y la poliposis adenomatosa familiar (*familial adenomatous polyposis coli* o FAP, en inglés). El HNPCC y la FAP se caracterizan por mutaciones en genes que intervienen en la reparación del ADN (genes *MHL1* y *MSH2*) y en la regulación de la proliferación celular (gen *APC*) (**Sawicki et al., 2021**).

- Enfermedades intestinales inflamatorias (Enfermedad de Crohn y colitis ulcerativa).

Este tipo de patologías constituyen el tercer factor de riesgo para el desarrollo de CCR, por detrás del HNPCC y la FAP. Se caracterizan por una inflamación crónica descontrolada del tracto gastrointestinal promovida por alteraciones en el sistema inmunitario. Este estado de inflamación permanente promueve el crecimiento y progresión tumoral, por lo que incrementa entre dos y seis veces el riesgo de padecer CCR (**Sawicki et al., 2021**).

- Pólipos colónicos.

Los pólipos colónicos son lesiones neoplásicas precancerosas provocadas por un crecimiento anormal del tejido que conforma la mucosa del colon. Los pólipos se clasifican en neoplásicos (adenomatosos) y no neoplásicos, siendo los primeros los más importantes por su potencial para transformarse en malignos (el 95% de los tumores colorrectales proceden de pólipos adenomatosos, aunque sólo el 5% de los pólipos dan lugar a esta enfermedad) (**Sawicki et al., 2021**).

- Diabetes Mellitus.

Los sujetos que padecen este desorden metabólico tienen entre el doble y el triple de veces de riesgo de desarrollar CCR, en comparación con la población no diabética. Entre las causas asociadas, cabe citar el incremento en la concentración de insulina, relacionada con la proliferación y reducción de la muerte celular. La diabetes también genera un estado inflamatorio crónico que aumenta la síntesis de citoquinas relacionadas con la tumorigénesis, como son TNF- α e IL-6 (**Sawicki et al., 2021**).

- Estilo de vida.
 - Dieta.

La composición de la dieta es el principal factor de riesgo ambiental para el desarrollo del CCR. La aparición de este tipo de tumores se incrementa con los hábitos alimenticios poco saludables, como son un elevado consumo de carne roja y carne procesada (contienen compuestos tóxicos, generados a partir de los procesos de elaboración), así como una dieta baja en fibra (la fibra reduce el tiempo de contacto entre las sustancias carcinogénicas y la mucosa intestinal, y las diluye al favorecer la entrada de agua en el intestino), bajo consumo de frutas y verduras (contienen compuestos con acción antioxidante y antiinflamatoria), reducción en el consumo de calcio (tiene la capacidad de unirse a las sales biliares secundarias y ácidos grasos, reduciendo su potencial tumorigénico, así como de inhibir la proliferación e inducir apoptosis) y bajos niveles de vitamina D (favorece la absorción del calcio ingerido en la dieta y reduce la expresión de genes implicados en proliferación y diferenciación celular) (**Sawicki et al., 2021**).

- Tabaco y alcohol.

Los individuos fumadores incrementan su riesgo de padecer CCR en 2-3 veces, debido a la elevada cantidad de compuestos carcinogénicos que contiene el humo del tabaco (N-nitrosaminas, hidrocarburos aromáticos policíclicos, aldehídos o metales, entre otros), capaces de dañar el ADN. También, el alcohol aumenta la probabilidad de desarrollar CCR entre un 20-40%, en base a la cantidad diaria consumida. El metabolismo del etanol produce especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno, acetaldehído (metabolito primario del etanol) y reduce la expresión de genes supresores tumorales (**Sawicki et al., 2021**).

- Obesidad.

La obesidad supone un aumento entre el 20% y el 50% de sufrir CCR en mujeres y hombres, respectivamente. La capacidad endocrina del tejido adiposo tiene un papel

crucial en la regulación de la ingesta calórica y la respuesta inflamatoria, ya que la acumulación excesiva de grasa provoca la secreción de diferentes factores (TNF- α e interleuquinas) que estimulan la proliferación celular, reducen la apoptosis y promueven el estrés oxidativo (Sawicki et al., 2021).

- Otros factores de riesgo.
 - Microbiota intestinal.

Actualmente se considera que la composición de la microbiota intestinal constituye un factor de riesgo importante para el desarrollo de CCR. La alteración del microbioma puede causar la secreción de diversas sustancias que provocan daño en el ADN, alteración del ciclo celular y estimulación de la respuesta inmunitaria (Sawicki et al., 2021).

1.2.2. PATOGÉNESIS DEL CCR

Los tumores colorrectales son heterogéneos desde un punto genético, y pueden desarrollarse a través de diversas vías. Las más estudiadas son la vía de la inestabilidad cromosómica (*chromosome instability* o CIN, en inglés), también conocida como vía supresora; la vía del fenotipo mutador o de inestabilidad en microsatélites (*microsatellite instability* o MSI, en inglés) y la vía que da lugar a las neoplasias serradas (Nguyen et al., 2020).

- Vía de inestabilidad cromosómica (CIN).

Esta ruta tumorigénica se puede detectar en el 65-75% de los tumores colorrectales esporádicos, y se caracteriza por alteraciones en el número de copias de ciertos genes como consecuencia de procesos de aneuploidías, deleciones, inserciones, amplificaciones o pérdidas de heterociguidad. Estas anomalías en el cariotipo suelen verse acompañadas

de mutaciones inhibitoras en los genes supresores tumorales *APC* y *TP53*, así como mutaciones en genes activadores u oncogenes, como *KRAS* y *PIK3CA* (Nguyen et al., 2020).

La pérdida de función de *APC* parece ser el inicio del proceso tumoral, tal y como se demostró en 1992 por el grupo de Powell y cols., al analizar 41 tumores colorrectales y observar que más del 60% de estos presentaban mutaciones en *APC* en las etapas tempranas del desarrollo tumoral (Powell et al., 1992). En ausencia de Wnt, APC forma un complejo multiproteico que fosforila y degrada a la β -catenina, impidiendo que acceda al núcleo y actúe como factor de transcripción para regular la expresión de múltiples genes implicados en proliferación celular (Salahshor & Woodgett, 2005). Por estas razones, la vía Wnt está activada prácticamente en la totalidad de los tumores CIN y se detectan mutaciones en *APC* en, aproximadamente, el 80% de estos tumores (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Las mutaciones en *KRAS* también suelen ocurrir durante las primeras etapas del desarrollo tumoral, como así se observó en 2008 por parte del grupo de Santini, tras analizar más de 100 muestras tumorales de pacientes afectados de CCR (Santini et al., 2008). La proteína *KRAS* pertenece a la familia de las proteínas Ras, activadoras de la ruta Raf-MEK-ERK, dando como resultado la fosforilación de diversos factores que promueven la progresión del ciclo celular (Pruitt & Der, 2001). Las mutaciones en *KRAS* pueden ir acompañadas de otras que afectan al gen *PIK3CA*, apareciendo en el 10-20% de tumores colorrectales, en fases avanzadas durante la transición adenoma-carcinoma (Samuels et al., 2004). El producto de *PIK3CA* es una de las subunidades catalíticas que componen la proteína PI3K, necesaria para la síntesis de mensajeros intracelulares que regulan la proliferación, supervivencia y diferenciación celular (Katso et al., 2001). Por tanto, la activación de los oncogenes citados tendrá un efecto promotor en el inicio y progresión de los carcinomas colorrectales.

El gen *TP53* se encarga de regular la transcripción de genes vinculados con la reparación del ADN y la respuesta celular al estrés oxidativo (Aubrey et al., 2016). Esto lo coloca como el gen más comúnmente mutado en la mayoría de los tumores, incluidos los colorrectales. Un meta-análisis con más de 3.500 pacientes afectados de CCR estableció que *TP53* presentaba mutaciones en el 42% de los casos, relacionándose con estadios de Dukes avanzados (Russo et al., 2005). También se ha observado que el tratamiento de líneas celulares de cáncer de colon con ARNs de interferencia frente a MDM2 (inhibidor

de p53) induce la parada del ciclo celular, lo que demostraría el papel de p53 en la regulación de la proliferación y división celular (**Shangary et al., 2008**).

En 2011, se analizaron los niveles circulantes del mi-ARN miR-125b en pacientes afectados de CCR, y se observó que una mayor expresión de este mi-ARN se correlacionaba con un tamaño e invasión superiores. Estos resultados se explican porque miR-125b se encarga de inhibir a p53, impidiendo que este pueda ejercer su papel antioncogénico (**Nishida et al., 2011**). En líneas celulares tumorales de colon, como las HTC116, a las que se les había eliminado el gen *TP53* mostraban un incremento en los niveles de la proteína Axina 2, que participa en la activación de la vía Wnt. Una mayor expresión de Axina 2 en células de la línea HTC116 sin *TP53*, en comparación con los niveles detectados en las células *wild type*, sugiere una relación entre *TP53* y procesos de transición epitelio-mesénquima o EMT (*epithelial-mesenchymal transition*, en inglés), vinculados con la desregulación de la vía Wnt (**Kim et al., 2013**).

Los experimentos del grupo de Zhou y cols., realizados también en líneas celulares tumorales de colon, demostraron que la proteína MNAT1 es capaz de unirse a p53 y promover su degradación a través del proteosoma. Esta degradación favorece la proliferación y crecimiento celular en las líneas celulares analizadas (**Zhou et al., 2018**).

- Vía del Fenotipo Mutador o de inestabilidad de microsatélites (MSI).

Esta vía de patogénesis del CCR se caracteriza por la aparición de mutaciones en el genoma, fundamentalmente localizadas a nivel de las secuencias repetidas en tándem conocidas como microsatélites. El mecanismo molecular se debe a fallos en el sistema de reparación de errores de replicación (sistema *Mismatch repair system* o MMR, en inglés). Las células que integran este tipo de tumores son incapaces de detectar y reparar los errores producidos durante la replicación del ADN, favoreciendo su mantenimiento y adquiriendo nuevas mutaciones en sucesivos ciclos de división celular, lo que desencadena un fenotipo mutador (**Nguyen et al., 2020**).

El análisis de 25 tumores colorrectales desarrollados mediante la vía MSI determinó que 13 de ellos presentaban mutaciones que implicaban a los genes del mecanismo MMR *MLH1* y *MSH2* (**Mensenkamp et al., 2014**). Nowak y cols. realizaron un estudio en más

de 243 pacientes afectados de CCR, estando 10 de ellos relacionados con el síndrome de Lynch. En 7 de estos 10 casos se detectaron mutaciones que afectaban a los principales genes que componen el mecanismo MMR, como son *MLH1*, *MSH2*, *MSH6* y *PMS2* (**Nowak et al., 2017**).

En los tumores MSI, el gen *APC* también aparece afectado en un 35-50% de casos, por lo que existe un evento inicial en la formación de los adenomas que comparten los tumores MSI y CIN (**Nguyen et al., 2020**).

La vía MSI se detecta en, aproximadamente, el 12-15% de los tumores colorrectales esporádicos y en la práctica totalidad de los que se desarrollan en pacientes con el síndrome de Lynch (**Parine et al., 2016**).

- Neoplasias serradas.

Los pólipos serrados, definidos como un conjunto heterogéneo de lesiones, son los responsables del inicio de, aproximadamente, el 15% de los tumores colorrectales (**Nguyen et al., 2020**). El desarrollo tumoral mediante este mecanismo se caracteriza por la activación de *BRAF*, que participa en la vía de las MAPK: un estudio realizado por el grupo de Rosenberg indicó que este gen presentaba mutaciones en el 60% de estas lesiones, en comparación con el 3% que se detectó en pólipos no serrados (**Rosenberg et al., 2007**). De manera adicional, el hecho de que *BRAF* se encuentre mutado en un amplio porcentaje de las neoplasias serradas, pero no en los adenomas generados por otras vías, es un indicio de que los pólipos serrados constituyen una vía adicional de desarrollo tumoral (**Kambara et al., 2004**).

Otra de las rutas que aparece alterada en los pólipos serrados es la de Wnt, aunque en este caso se cree que su origen no tiene relación con mutaciones inhibitoras de *APC*, sino que puede deberse a mecanismos alternativos que estimulen dicha vía de señalización (**Borowsky et al., 2017**).

La tumorigénesis a través de pólipos serrados también se caracteriza por una elevada metilación de islas CpG (regiones ricas en citosina y guanina que se suelen localizar en regiones promotoras de numerosos genes), lo que da lugar al llamado fenotipo metilador de islas CpG o CIMP (*CpG island methylation phenotype*, en inglés) (**Nguyen et al.,**

2020). Uno de los genes afectados por esta metilación, y que participa en esta vía neoplásica, es *MHL1*. Su promotor es metilado por la acción de BRAF, lo que conduce a su silenciamiento génico (Fang et al., 2014).

1.2.3. PAPEL DE LA DISFUNCIÓN TELOMÉRICA EN EL DESARROLLO DEL CCR

Existen numerosos trabajos que tratan acerca de la importancia que puede tener la disfunción telomérica, desencadenada por un acortamiento crítico de los tumores, en el inicio y evolución del CCR.

La existencia de mutaciones en determinados aminoácidos de la proteína TPP1 impide que pueda interactuar correctamente con TIN2, por lo que tanto la estructura protectora de los telómeros como el reclutamiento de la telomerasa hacia las regiones teloméricas se ven comprometidos. Estas alteraciones generan, en células de la línea tumoral de colon HCT116, un acortamiento telomérico y un incremento en su capacidad proliferativa, siendo un indicativo de que la disfunción telomérica observada promueve el desarrollo de estas células tumorales (Li et al., 2018). Cleal y cols. demostraron, también en células de la línea HCT116, que los eventos de fusión teloméricos, característicos de unos telómeros disfuncionales, sólo se producen en ausencia de p53. En su trabajo, observaron que el mecanismo de reparación del ADN mediante NHEJ, que se activa ante situaciones de acortamientos teloméricos críticos, sólo permite a las células evadir la crisis replicativa si son deficientes en p53 (Cleal et al., 2019).

Un trabajo publicado en 2019 por Li y cols. recogió los resultados obtenidos tras el tratamiento de diversas líneas celulares de cáncer de colon (líneas HCT116 y LoVo) con un medio condicionado en el cual sido cultivadas células madre mesenquimales procedentes de tumores colorrectales. Estos resultados indicaron que, al inducir daño en el ADN mediante el tratamiento de las células con doxorrubicina, las células que habían estado en contacto con el medio condicionado reducían sus niveles de senescencia (menor expresión de *TP53* y *p21*) y veían incrementado su potencial proliferativo. Además, las células tumorales sometidas a dicho tratamiento fueron inyectadas en ratones, originando tumores de tamaño superiores en comparación con el grupo control. Estas observaciones

revelan que un funcionamiento incorrecto de las vías de senescencia permite la progresión tumoral en células cancerosas de colon (**Li et al., 2019**).

Por último, nuestro grupo de investigación también ha demostrado que el acortamiento telomérico puede actuar como supresor tumoral si los mecanismos de senescencia funcionan correctamente. En tumores colorrectales, la expresión de factores implicados en senescencia, como p53, está incrementada con respecto a los tejidos no tumorales. Además, el acortamiento de los telómeros en este tipo tumoral confiere un mejor pronóstico clínico a los pacientes afectados de CCR (**Fernández-Marcelo et al. 2012; Fernández-Marcelo et al., 2016**).

La proliferación de las células epiteliales del colon provoca que los telómeros se acorten gradualmente con cada proceso de división celular. En el caso de que las vías encargadas de detectar este acortamiento telomérico no funcionen adecuadamente (por ejemplo, por mutaciones en genes como *TP53* o elementos del complejo MMR), se favorece un escenario caracterizado por fusiones teloméricas y demás eventos relacionados con inestabilidad genómica. Fruto de esta inestabilidad genómica puede producirse la reactivación de la telomerasa (principalmente, mediante la expresión de *hTERT*), que permitirá a las células poder dividirse de manera ilimitada y favorecer la progresión tumoral (**Figura 1.12**) (**Bertorelle et al., 2014**). En Cáncer Colorrectal, se ha descrito que la reactivación de la telomerasa ocurre durante la transición adenoma-carcinoma (**Figura 1.13**) (**Baichoo & Boardman, 2014**).

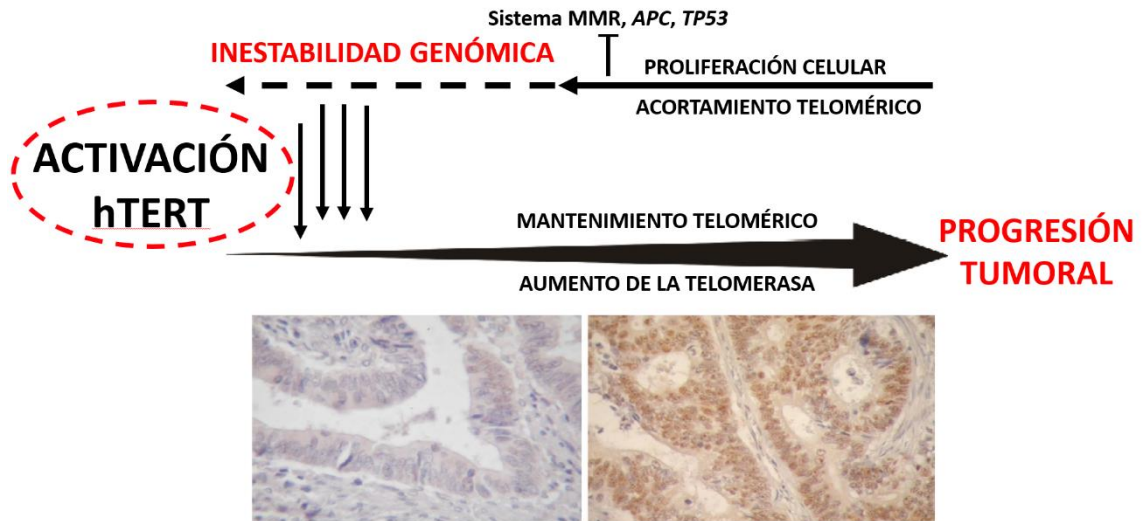


Figura 1.12.- Modelo de la interacción telómeros/telomerasa en la carcinogénesis Colorrectal. Adaptado de Bertorelle et al., 2014.

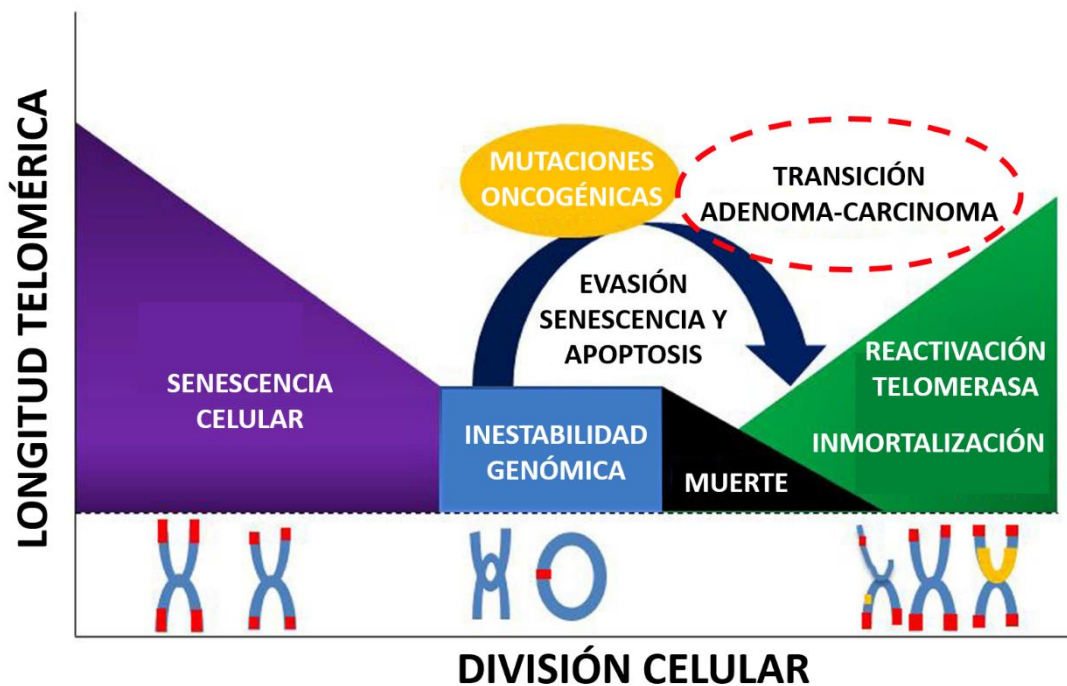


Figura 1.13.- Acortamiento telomérico y reactivación de telomerasa en Cáncer Colorrectal. Adaptado de Baichoo & Boardman, 2014.

Todas estas investigaciones ponen de manifiesto el comportamiento dual de la disfunción telomérica en el inicio y desarrollo del CCR, estando supeditado al correcto funcionamiento de las vías de senescencia celulares. Si estos mecanismos son capaces de

actuar de manera eficaz, un acortamiento crítico de los telómeros servirá de control frente al crecimiento celular ilimitado. Si, por el contrario, los elementos que participan en la senescencia y muerte celular son defectuosos, la erosión telomérica originada por las diferentes divisiones celulares conducirá a la aparición de inestabilidad genómica, dando como resultado alteraciones genéticas que pueden otorgar a las células la capacidad de poder dividirse de manera incontrolada y adquirir características propias de la malignidad tumoral.

1.3. TEJIDO ADIPOSO

1.3.1 TEJIDO ADIPOSO VISCERAL Y TEJIDO ADIPOSO SUBCUTÁNEO: CARACTERÍSTICAS METABÓLICAS Y FUNCIONALES

La distribución local del tejido adiposo constituye una característica indicadora, tanto del riesgo cardiovascular como metabólico. Los dos principales depósitos de tejido adiposo en el organismo son los tejidos adiposos viscerales (TAV) y los tejidos adiposos subcutáneos (TAS) (**Sam, 2018**).

El tejido adiposo subcutáneo representa el principal depósito para la acumulación de grasas (triglicéridos) en situaciones en las que la ingesta calórica supera el gasto energético, localizándose principalmente en las regiones del abdomen, espalda y gluteofemoral. Cuando el tejido adiposo de estas localizaciones excede su capacidad de almacenamiento, debido a una incapacidad para generar nuevos adipocitos, comienza a acumularse en zonas externas, formándose el tejido adiposo visceral, alrededor de los órganos situados en las regiones mesentéricas y omentales (**Ibrahim, 2010**).

Los adipocitos constituyen el principal componente celular del tejido adiposo, sirviendo como almacén de energía en forma de triglicéridos. Además, también liberan diferentes hormonas y otras moléculas que convierten al tejido adiposo en un órgano endocrino y paracrino, afectando a diferentes funciones como el apetito, balance energético, angiogénesis o inmunidad.

Los adipocitos que componen el tejido adiposo visceral y el subcutáneo difieren en varios aspectos de su morfología y de su metabolismo. El tamaño de los adipocitos

localizados en el tejido adiposo visceral es superior al de los adipocitos que integran el tejido adiposo subcutáneo (Ibrahim, 2010). Con respecto a la producción y secreción de adipocinas y otras citoquinas que participan en el metabolismo y en la inflamación, el tejido adiposo subcutáneo se relaciona con una mayor liberación de leptina y adiponectina, así como de citoquinas antiinflamatorias como IL-10. Por su parte, el tejido adiposo visceral se vincula con la secreción de moléculas inflamatorias como TNF- α , IL-6 y la proteína C reactiva (Zha et al., 2009; Lee et al., 2013). Además, el tejido adiposo visceral muestra una mayor resistencia a la insulina que el subcutáneo, debido a dos motivos: incremento en la liberación de ácidos grasos y glicerol hacia el sistema porta-hepático (altera las vías de señalización de la insulina), y menor lipogénesis y acumulación de lípidos (Bodis & Roden, 2018).

Aunque los adipocitos ocupan la mayor parte del volumen del tejido adiposo, únicamente suponen el 50% de la fracción celular de este tejido. El resto lo constituyen fibroblastos y células precursoras derivadas del tejido adiposo o ASCs (*adipose-derived stem cells*, en inglés) (Koenen et al., 2021). El tejido adiposo también se caracteriza por la presencia de células del sistema inmunitario, principalmente macrófagos y linfocitos. El recuento de estas células es superior en el tejido adiposo visceral, favorecido por un incremento en los niveles de citoquinas proinflamatorias y quimioquinas como MCP-1 (Bruun et al., 2005; Harman-Boehm et al., 2007).

1.3.2 REMODELACIÓN DEL TEJIDO ADIPOSO Y OBESIDAD

La obesidad se define como un estado de acumulación excesiva de masa grasa. Según los actuales estudios poblacionales, un individuo se considera con obesidad si presenta un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 30 kg/m² (Schwartz et al., 2017).

Se ha demostrado que la primera opción del tejido adiposo para hacer frente al exceso de nutrientes es la hipertrofia (aumento en el tamaño celular). Cuando los adipocitos superan un tamaño crítico, se recurre a la hiperplasia (aumento en el número de células) para intentar recuperar las funciones metabólicas (Spalding et al., 2008).

En ratones, se ha observado que una dieta alta en grasas estimula el crecimiento del tejido adiposo visceral mediante hipertrofia, mientras que la expansión del tejido adiposo subcutáneo ocurre a través de la hiperplasia. Estos experimentos ponen de manifiesto un comportamiento diferente en cuanto al proceso de expansión de ambos tejidos adiposos (**Joe et al., 2009**). El grupo de Baglioni, en 2012, analizó la capacidad de expansión de células ASCs procedentes de muestras humanas de TAV y TAS. Las células ASCs de los TAS mostraron un mayor *ratio* de proliferación *in vitro*, apoyando la teoría de que este tipo tisular presenta una mejor respuesta ante un aumento de la ingesta calórica mediante la hiperplasia (**Baglioni et al., 2012**).

El tamaño de los adipocitos influye en su metabolismo y en el desarrollo de enfermedades relacionadas. Los resultados experimentales de Wueest demostraron que los adipocitos procedentes de TAV de ratones incrementaban su capacidad de lipólisis cuanto mayor era su tamaño (hipertrofia) (**Wueest et al., 2009**). Por su parte, el grupo de Roberts analizó biopsias de TAS de más de 50 pacientes, detectándose que los adipocitos de menor tamaño se relacionaban con una mejor sensibilidad a la insulina, independientemente del IMC de los sujetos evaluados (**Roberts et al., 2009**).

El proceso de adipogénesis (formación de nuevos adipocitos) comprende una amplia variedad de vías y moléculas. Entre las más importantes se encuentra la vía Wnt, que inhibe la adipogénesis y favorece la diferenciación hacia un linaje osteoblástico (**Longo et al., 2019**). Para que las células progenitoras puedan dar lugar a adipocitos, la proteína DKK1 juega un papel crucial, actuando como antagonista de Wnt al unirse a su mismo receptor e induciendo la diferenciación hacia preadipocitos (**Christodoulides et al., 2009**).

El fenotipo de resistencia a la insulina e inflamación que acompaña a los sujetos obesos cuyos tejidos adiposos (principalmente, subcutáneo) han perdido la capacidad de expansión, puede explicarse por una inactivación defectuosa de la vía Wnt provocada por la reducción en los niveles de expresión de *DKK1*, como así se demostró en 2012 con los experimentos de Gustafson y cols. en muestras humanas de TAS (**Gustafson & Smith, 2012**).

La inflamación propia de la condición de obesidad está desencadenada por diversos factores, entre los que se encuentran moléculas procedentes tanto de la dieta (ácidos grasos) como de la microbiota intestinal (lipopolisacáridos), aunque también por la hipoxia

generada y por la muerte de células que componen estos tejidos. Este estado inflamatorio se origina por la movilización e infiltración de células del sistema inmunitario, principalmente macrófagos (**Reilly & Saltiel, 2017**). Se estima que la presencia de estas células en los tejidos adiposos de individuos obesos puede ser del 50%, en comparación con el 10% observado en sujetos con normopeso (**Weisberg et al., 2003**). No obstante, la función y el efecto que los macrófagos pueden tener en este ambiente tisular depende de su fenotipo: macrófagos M1 o pro-inflamatorios (caracterizados por la secreción de citoquinas inflamatorias y vinculados con resistencia a la insulina), y macrófagos M2 o anti-inflamatorios (producción de moléculas relacionadas con sensibilidad a la insulina y reducción de la inflamación) (**Castoldi et al., 2016**).

Los resultados obtenidos por el grupo de Lacasa, tras el tratamiento de células precursoras de adipocitos con productos secretados por macrófagos, indicaron una reducción drástica en la diferenciación de estas células progenitoras hacia adipocitos. Entre las moléculas liberadas por los macrófagos se encuentra el factor NF- κ B, que reduce la expresión de uno de los principales genes implicados en la adipogénesis, como es *PPAR γ 2* (**Lacasa et al., 2007**). Del mismo modo, Esteve y cols. establecieron que el tratamiento de células Msc1+ (precursores de adipocitos) con citoquinas propias de células inmunitarias, como son TNF α , IFN γ e IL-17, disminuye la capacidad de adipogénesis y mantiene a estas células Msc1+ en un estado no diferenciado de manera permanente (**Esteve et al., 2015**).

1.4. OBESIDAD, TEJIDO ADIPOSO Y CÁNCER COLORRECTAL

La obesidad constituye un factor de riesgo para el desarrollo de diferentes tipos de tumores, entre los que se incluye el CCR. Se consideran tres factores que vinculan la obesidad con el riesgo de cáncer colorrectal: el eje insulina-IGF-1, las hormonas sexuales y las citoquinas derivadas del tejido adiposo o adipoquinas (especialmente, la leptina y la adiponectina). Cada uno de estos tres factores se encuentra íntimamente ligado con una desregulación endocrina y paracrina del tejido adiposo en individuos con obesidad (**Park et al., 2014**).

Durante la tumorigénesis, además de los fibroblastos y macrófagos asociados a tumores, los adipocitos constituyen otro de los principales componentes del estroma tumoral, puesto que actúan como un órgano endocrino que libera adipocinas, citoquinas proinflamatorias o factores proangiogénicos, capaces de contribuir con el crecimiento tumoral y con la metástasis. Entre las adipocinas más relevantes que vinculan la obesidad con el desarrollo de CCR se encuentran la leptina y la adiponectina (**Park et al., 2014**).

La leptina estimula la proliferación e inhibe la apoptosis en líneas celulares de cáncer de colon (línea HT-29) mediante la activación de los factores JAK2, PI3K y JNK, lo que desencadena la transcripción de diversos elementos oncogénicos (como STAT3) (**Ogunwobi & Beales, 2007**). Un estudio publicado en 2012 por el grupo de Wang recoge los resultados recopilados a partir de 108 muestras de pacientes afectados de CCR, los cuales indicaron que una mayor expresión tanto de leptina como de su receptor Ob-R se correlacionaba con un incremento en la invasión local y distal del tumor. Además, este mismo trabajo demostró que el tratamiento con leptina de células procedentes de la línea celular de carcinoma de colon HCT-116 aumenta la proliferación e inhibe la apoptosis de estas células, posiblemente a través de la estimulación de la vía PI3K/Akt/mTOR (**Wang et al., 2012**).

Por su parte, la adiponectina parece actuar como represor frente al CCR. Esta adipocina, en las líneas celulares de cáncer de colon HCT116 y HT29, inhibe la proliferación. La adiponectina detiene el ciclo celular mediante la expresión de *p21*, y activa *AMPK* (**Kim et al., 2010**). En ratones deficientes para el gen de la adiponectina, la formación de pólipos y lesiones precancerígenas se ve aumentada entre dos y tres veces con respecto a ratones capaces de sintetizar esta molécula, sugiriendo que la adiponectina ejerce su efecto protector al impedir la activación de la vía Akt (**Mutoh et al., 2011**).

Otra de las alteraciones metabólicas relacionadas con la obesidad y que promueve la tumorigénesis es la hiperinsulinemia. En 2014, un trabajo publicado por el grupo de Kushlinskii, indicó que los niveles séricos de IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*, en inglés) y de IGFBP- 2 (*IGF-binding protein 2*, en inglés) eran superiores en pacientes afectados de CCR, con respecto a los detectados en individuos sin esta patología (**Kushlinskii et al., 2014**). La activación del receptor IGF-1 activa diversos mecanismos vinculados con crecimiento, proliferación y supervivencia celular. La insulina tiene la capacidad de activar el receptor de IGF-1, por lo que los niveles elevados de esta hormona (hiperinsulinemia),

que suelen acompañar a la condición de obesidad, son un elemento más que contribuye a la oncogénesis (**Sandhu et al., 2002**).

El papel de los adipocitos en la progresión tumoral también se ha definido para otros tipos de cánceres. Los experimentos del grupo de Park permitieron identificar a la endotrofina, producto de la escisión del colágeno VI sintetizado por adipocitos, como una de las responsables de la EMT en lesiones tumorales de mama (**Park & Scherer, 2012**). En cáncer de ovario, se ha demostrado que los adipocitos son capaces de promover el rápido crecimiento de las células tumorales al servir como fuente de nutrientes (lípidos) y favorecer la metástasis hacia regiones omentales a través del efecto quimiotáctico que ejerce citoquina IL-8, secretada por los adipocitos, sobre las células cancerígenas (**Nie-man et al., 2014**).

Los adipocitos asociados al cáncer, denominados CAA (*cancer-associated adipocytes*, en inglés), muestran alteraciones morfológicas y funcionales durante la progresión del tumor, que no sólo afectan a los patrones de expresión de adipocinas. Entre estas modificaciones se incluyen la disminución en su contenido lipídico y el incremento en los patrones de expresión de metaloproteasas (MMP-11) y citoquinas proinflamatorias (entre ellas, IL-6). Estos cambios metabólicos adquiridos por los adipocitos tienen una influencia importante en la capacidad de progresión e invasión del tumor (**Dirat et al., 2011**).

Los CCAs también participan en la formación y evolución tumoral al favorecer la supervivencia y proliferación de las denominadas células madre del cáncer o CSC (*cancer-stem cells*, en inglés). El grupo de Chen y cols. recoge en su trabajo de 2015 un mecanismo de retroalimentación entre las células tumorales de colon y las células ASC cultivadas conjuntamente. Las células ASC inducen en las células tumorales la expresión de genes relacionados con procesos de EMT, como *ZEB1* o *Snail*. Por su parte, las células tumorales provocan en las células ASC la liberación de citoquinas y factores relacionados con metástasis, los cuales incluyen FGF10 o VEGFC (**Chen et al., 2015**).

Se ha comprobado que las ASC que componen los TAV son capaces de promover la metástasis (expansión de las células metastásicas CD44v6+) en los tumores colorrectales mediante la secreción de citoquinas como la IL-6 o el factor de crecimiento de hepatocitos (*hepatocyte growth factor* o HGF, en inglés). Además, se ha observado que la interacción entre las ASC y las células tumorales de colon induce en las últimas una reducción en la

expresión del micro ARN *miR-200a*, relacionado con la inhibición de la capacidad invasiva de estos tumores (**Di Franco et al., 2021**).

Los estudios actuales que recogen los resultados acerca de la función telomérica de los tejidos adiposos se basan, principalmente, en cómo se ve afectada por el aumento en el IMC y el desarrollo de la obesidad. Tras analizar 72 muestras de TAS procedentes de pacientes obesos y no obesos, el grupo de Moreno-Navarrete observó que la longitud telomérica de estos tejidos adiposos era inversamente proporcional al IMC de los individuos de los que procedían (**Moreno-Navarrete et al. 2010**). Otro estudio con más de 20 muestras, en este caso, de TAV, mostró que el tamaño de los telómeros era inferior cuanto mayor era el valor del IMC de los sujetos analizados, además observarse un incremento en el proceso de fibrosis para mayores valores de IMC (indicativo de la disfunción de este tejido) (**el Bouazzaoui et al., 2014**).

Con respecto a la actividad telomerasa, las células que conforman el tejido adiposo que mayor se relacionan con esta enzima son las células ASC, por su capacidad para renovación y proliferación de este tejido. Carter y cols. analizaron los niveles de hTERT y la actividad telomerasa en células ASC procedentes de TAS tanto de individuos obesos como de sujetos con normopeso. Las células precursoras adiposas de los individuos con obesidad mostraron mayores niveles tanto de la enzima como de su actividad enzimática, con respecto a las células ASC de los sujetos con normopeso (**Carter et al., 2014**). La inducción en ratones hacia un fenotipo obeso mediante una dieta alta en grasas incrementa, en el tejido adiposo visceral, los niveles de expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa y de proteínas del complejo *Shelterin* relacionadas con esta enzima, como *POT1*. También se ha observado que la expresión de estos genes se correlaciona positivamente con marcadores de inflamación como MCP1 y TNF- α (**Bloom et al., 2020**).

Tal y como indica la bibliografía, tanto la longitud telomérica como la actividad telomerasa de los tejidos adiposos son indicativos del proceso de expansión de estos tejidos. Por lo tanto, el posible papel que puede tener la función telomérica en el desarrollo del CCR será el reflejo de la implicación que tendrá la obesidad sobre este tipo de tumores, como se ha comentado en los párrafos anteriores.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La disfunción telomérica está estrechamente relacionada con la aparición de numerosas patologías humanas, entre las que se encuentra el desarrollo de varios tipos de tumores, como es el CCR. Esta disfunción se debe a la incapacidad de la ADN polimerasa para completar la síntesis de los extremos cromosómicos de las células eucariotas constituidos por los telómeros, dando como resultado un acortamiento de estos en cada ciclo replicativo. Cuando este acortamiento alcanza un nivel crítico, la viabilidad celular se ve afectada y las células activan las vías de senescencia y apoptosis para impedir una inestabilidad genómica que pueda comprometer un correcto funcionamiento celular. Sin embargo, en el caso de que las células no activen los mecanismos de senescencia ante un acortamiento telomérico crítico, la inestabilidad genómica se incrementa lo cual, junto con la reactivación de la telomerasa, facilita un potencial replicativo prácticamente ilimitado en un contexto de importantes alteraciones genómicas. Este escenario facilita la progresión tumoral.

En cáncer y más concretamente en el Cáncer Colorrectal, la disfunción telomérica, entendida como acortamiento crítico de los telómeros, presenta un papel dual. Cuando los mecanismos de senescencia celular funcionan adecuadamente, este hecho se relacionaría con un mecanismo protector tumoral, ya que las células corruptas frenarían su proliferación; sin embargo, la inestabilidad genómica asociada al incorrecto funcionamiento de las vías de senescencia tendría un papel oncogénico.

Por otro lado, varios trabajos han demostrado que los telómeros de individuos con un IMC igual o superior a 30 kg/m² (sujetos con obesidad) tienen un tamaño inferior. Esto se debe, fundamentalmente, al estado proinflamatorio que acompaña a esta condición física, inducido principalmente por una mayor liberación de adipocinas y otras citoquinas proinflamatorias, así como por la infiltración de células del sistema inmunitario (macrófagos y linfocitos, entre otros).

Teniendo en cuenta los antecedentes mencionados, la **hipótesis** del presente trabajo considera que el análisis de la función telomérica en pacientes obesos que desarrollan Cáncer Colorrectal puede facilitar la identificación de marcadores útiles en el establecimiento del pronóstico clínico y en la identificación de nuevas dianas terapéuticas.

El **principal objetivo** de esta Tesis consiste en conocer el impacto que, sobre el pronóstico de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal, tienen los parámetros relacionados

con la función telomérica, así como el Índice de Masa Corporal. Para su consecución, establecemos los siguientes **objetivos específicos**:

1. Analizar la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa en tejidos colorectales tumorales y no tumorales de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal.
2. Analizar la relación entre los parámetros de función telomérica evaluados y el Índice de Masa Corporal de los sujetos incluidos en la serie objeto de estudio.
3. Establecer estudios de pronóstico en función de la longitud de los telómeros y de la actividad telomerasa de los tejidos colorectales indicados, considerando grupos de individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad.
4. Estudiar parámetros de función telomérica en tejidos adiposos viscerales y subcutáneos de sujetos afectados y no afectados de Cáncer Colorrectal.
5. Analizar la relación entre la longitud telomérica y la actividad telomerasa de los tejidos adiposos considerados en el estudio y el Índice de Masa Corporal de los pacientes incluidos en los protocolos.
6. Establecer estudios de pronóstico en función de parámetros de función telomérica analizados en tejidos adiposos de individuos con Cáncer Colorrectal.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Esta tesis engloba dos grandes bloques de análisis en función del tipo tisular objeto de estudio: **A)** análisis de tejidos colorrectales procedentes de pacientes afectados de CCR (tejidos tumorales y tejidos no tumorales) y **B)** análisis de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) obtenidos a partir de individuos con y sin CCR.

Todos los sujetos incluidos en este trabajo fueron clasificados en función de su Índice de Masa Corporal (IMC), siguiendo los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS). Esto es, aquellos individuos con un $IMC < 25 \text{ kg/m}^2$ fueron considerados en el grupo de normopeso; los sujetos con un IMC entre 25 y $29,9 \text{ kg/m}^2$ se incluyeron en el grupo de sobrepeso; y los individuos que tenían un $IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$ se clasificaron en el grupo de obesidad.

Respecto al análisis de tejidos adiposos, puesto que las muestras empleadas proceden de individuos que han sido sometidos a cirugía de tipo oncológica (en el grupo de pacientes con CCR) o de tipo bariátrica (en el grupo de individuos sin CCR), no fue posible incluir en el estudio un grupo control conformado por individuos sin CCR y con un IMC inferior a 25 kg/m^2 (grupo de normopeso).

Las muestras de tejidos colorrectales empleadas en esta Tesis proceden de pacientes que han sido sometidos a cirugía de intención curativa en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del Hospital Clínico San Carlos (HCSC). El periodo de seguimiento medio de la serie fue de 5 años (60 meses). Una vez realizada la resección quirúrgica, en el caso de los tejidos colorrectales, se obtuvieron secciones utilizando un criostato y se empleó una tinción de hematoxilina y eosina (HE) para confirmar el carácter tumoral de las muestras. Dicho estudio se llevó a cabo por dos patólogos que, microscópicamente, comprobaron la presencia de un 80% de células tumorales en los cortes obtenidos. A su vez, los tejidos no tumorales de los mismos pacientes, empleados como controles, también se analizaron microscópicamente para asegurar su naturaleza. Todas estas muestras tisulares fueron inmediatamente congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C en el Biobanco del HCSC, hasta el momento de su utilización.

Referente a las muestras obtenidas de tejidos adiposos (TAV y TAS), estas fueron registradas como colección de muestras (C.0001253) del mismo hospital.

De forma previa al estudio, se aseguró a los pacientes la confidencialidad de datos, de acuerdo con la normativa establecida en la Ley Orgánica 3/2018, de 5 de diciembre, de Protección de Datos Personales y Garantía de los Derechos Digitales. Asimismo, se recabaron los consentimientos informados de los pacientes para donación de muestras biológicas.

Los cánceres colorrectales considerados en este trabajo (tanto para los análisis de tejidos colorrectales como para los análisis de tejidos adiposos), según la clasificación basada en el trabajo de Turnbull y cols. que modifica la original clasificación descrita por Dukes, se agruparon en cuatro estadios clínico-patológicos, definidos en la **Tabla 3.1** (Turnbull et al., 1967):

Tabla 3.1.- Clasificación de CCR según las variables clínico-patológicas de los adenocarcinomas colorrectales estudiados.

ESTADIO	CARACTERÍSTICAS PATOLÓGICAS
Estadio A	Tumor localizado en el colon y sus capas.
Estadio B	Extensión del tumor hacia el tejido graso pericólico.
Estadio C	Metástasis tumoral hacia los nódulos linfáticos mesentéricos, aunque sin evidencias de diseminación a distancia.
Estadio D	Metástasis tumoral hacia hígado, hueso, pulmones. Tumor no operable debido a la invasión de órganos adyacentes.

Así pues, para todos los CCR incluidos en el trabajo (referentes a los estudios de tejidos colorrectales y a los estudios de tejidos adiposos) se obtuvo la información referente al sistema de clasificación TNM, en el que se evalúan tres tipos de descriptores en relación a una serie de propiedades anatómicas que permiten la caracterización global del tumor: T (hace referencia a la extensión del tumor primario, hacia el interior de la pared del estómago y órganos cercanos), N (indica la propagación hacia nódulos linfáticos adyacentes) y M (referente a la existencia de metástasis a distancia). A continuación, se muestra la clasificación TNM establecida por la *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) en su 8ª edición (**Tabla 3.2**) (Weiser, 2018):

Tabla 3.2.- Clasificación de los descriptores T, N y M definidos para los tumores colorrectales por la *American Joint Committee on Cancer (AJCC) 8th ed.*

T: Tumor primario	<p>TX: el tumor primario no se puede evaluar.</p> <p>T0: no existen evidencias de tumor primario.</p> <p>Tis (Carcinoma <i>in situ</i>): tumor intraepitelial sin invasión de la lámina propia.</p> <p>T1: el tumor invade la lámina propia, <i>muscularis mucosae</i> o la submucosa.</p> <p style="padding-left: 40px;">T1a: el tumor invade la lámina propia o la <i>muscularis mucosae</i>.</p> <p style="padding-left: 40px;">T1b: el tumor invade la submucosa.</p> <p>T2: el tumor invade la <i>muscularis propria</i>.</p> <p>T3: el tumor penetra hacia el tejido conectivo subseroso sin invasión del peritoneo o estructuras adyacentes.</p> <p>T4: el tumor invade la capa serosa (peritoneo) o estructuras adyacentes.</p> <p style="padding-left: 40px;">T4a: el tumor invade la capa serosa (peritoneo).</p> <p style="padding-left: 40px;">T4b: el tumor invade estructuras adyacentes como el bazo, hígado, diafragma o páncreas.</p>
N: invasión ganglionar	<p>NX: los ganglios linfáticos locales no se pueden evaluar.</p> <p>N0: ganglios linfáticos locales sin metástasis.</p> <p>N1: metástasis en 1 - 2 ganglios linfáticos locales.</p> <p>N2: metástasis en 3 - 6 ganglios linfáticos locales.</p> <p>N3: metástasis en 7 o más ganglios linfáticos locales.</p>
M: metástasis	<p>M0: ausencia de metástasis a distancia.</p> <p>M1: existencia de metástasis visceral a distancia</p> <p style="padding-left: 40px;">M1a: metástasis a distancia hacia un órgano.</p> <p style="padding-left: 40px;">M1b: metástasis a distancia hacia más de un órgano.</p> <p style="padding-left: 40px;">M1c: metástasis peritoneal (peor pronóstico que la metástasis visceral).</p>

Por último, los tumores también se clasificaron según su localización anatómica en tumores de colon derecho, de colon izquierdo o de recto.

3.1.1. ESTUDIOS EN TEJIDOS COLORRECTALES DE PACIENTES CON CCR

La población incluida en el estudio de los tejidos colorrectales estuvo conformada por un total de 181 pacientes sometidos a cirugía de intención curativa (distribución detallada de la población analizada en la **Figura 3.1**). En relación con el IMC, este valor se obtuvo para 116 pacientes, clasificados en 31 pacientes con normopeso, 52 con sobrepeso y 33 pacientes con obesidad. Respecto a las variables clínico-patológicas, la siguiente tabla resume la distribución de la población analizada (**Tabla 3.3**):

Tabla 3.3.- Variables clínico-patológicas de las muestras de CCR consideradas en el estudio.

VARIABLE	Nº CASOS
SEXO	181
MUJER	91
HOMBRE	90
ESTADIO DE DUKES	169*
A	22
B	70
C	44
D	33
LOCALIZACIÓN TUMORAL	173*
COLON DERECHO	54
COLON IZQUIERDO	37
RECTO	82

*Para el estadio de Dukes y la localización tumoral, la información no se dispuso para 12 y 18 casos, respectivamente.

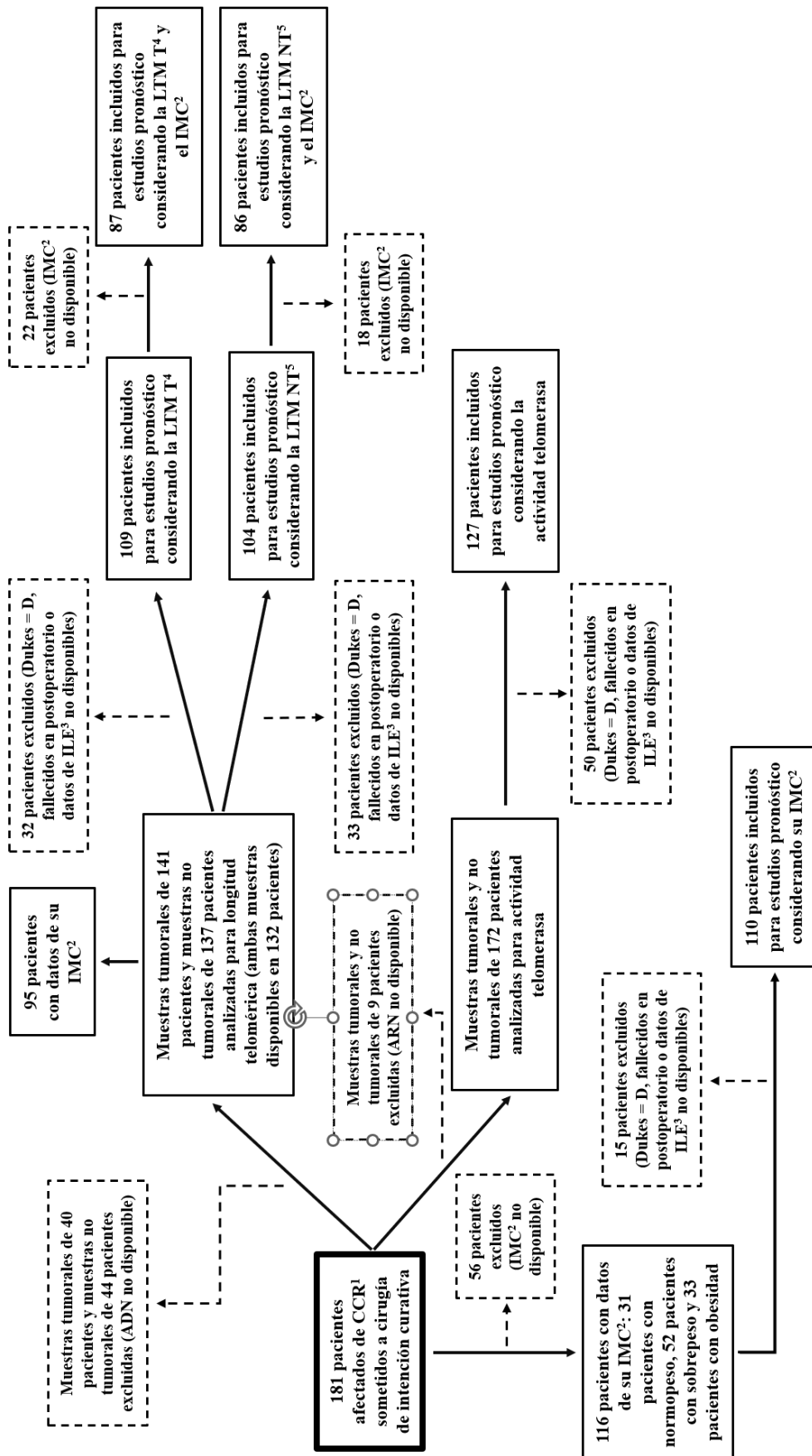


Figura 3.1.- Distribución de muestras y pacientes incluidos en los estudios realizados en tejidos colorrectales. Se indican el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión. ¹Cáncer Colorrectal; ²Índice de Masa Corporal; ³Intervalo Libre de Enfermedad; ⁴Longitud Telomérica Media tumoral; ⁵Longitud Telomérica Media no tumoral.

La edad de la población considerada fue de $70,6 \pm 0,93$ años (media \pm error estándar), teniendo un valor medio de $70,63 \pm 1,36$ años (media \pm error estándar) en mujeres y $70,46 \pm 1,28$ años (media \pm error estándar) en hombres.

3.1.2. ESTUDIOS EN TEJIDOS ADIPOSOS DE SUJETOS CON Y SIN CCR

Para el estudio de los tejidos adiposos, la población analizada incluyó un total de 159 individuos (73 de ellos fueron pacientes afectados de CCR y 86 sin afectación por CCR), con muestras para TAV de 159 individuos y muestras para TAS de 154 individuos (distribución de la población detallada en la **Figura 3.2**). Para todos los individuos incluidos en este estudio se dispuso de los datos de IMC correspondientes (**Tabla 3.4**).

Tabla 3.4.- Nº casos analizados en el estudio realizado en tejidos adiposos. Distribución en función del Índice de Masa Corporal.

	TAV ¹	TAS ²
CCR*	73	70
NORMOPESO	16	16
SOBREPESO	31	30
OBESIDAD	26	24
NO CCR*	86	84
SOBREPESO	22	20
OBESIDAD	64	64
TOTAL	159	154

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos;
*Cáncer Colorrectal.

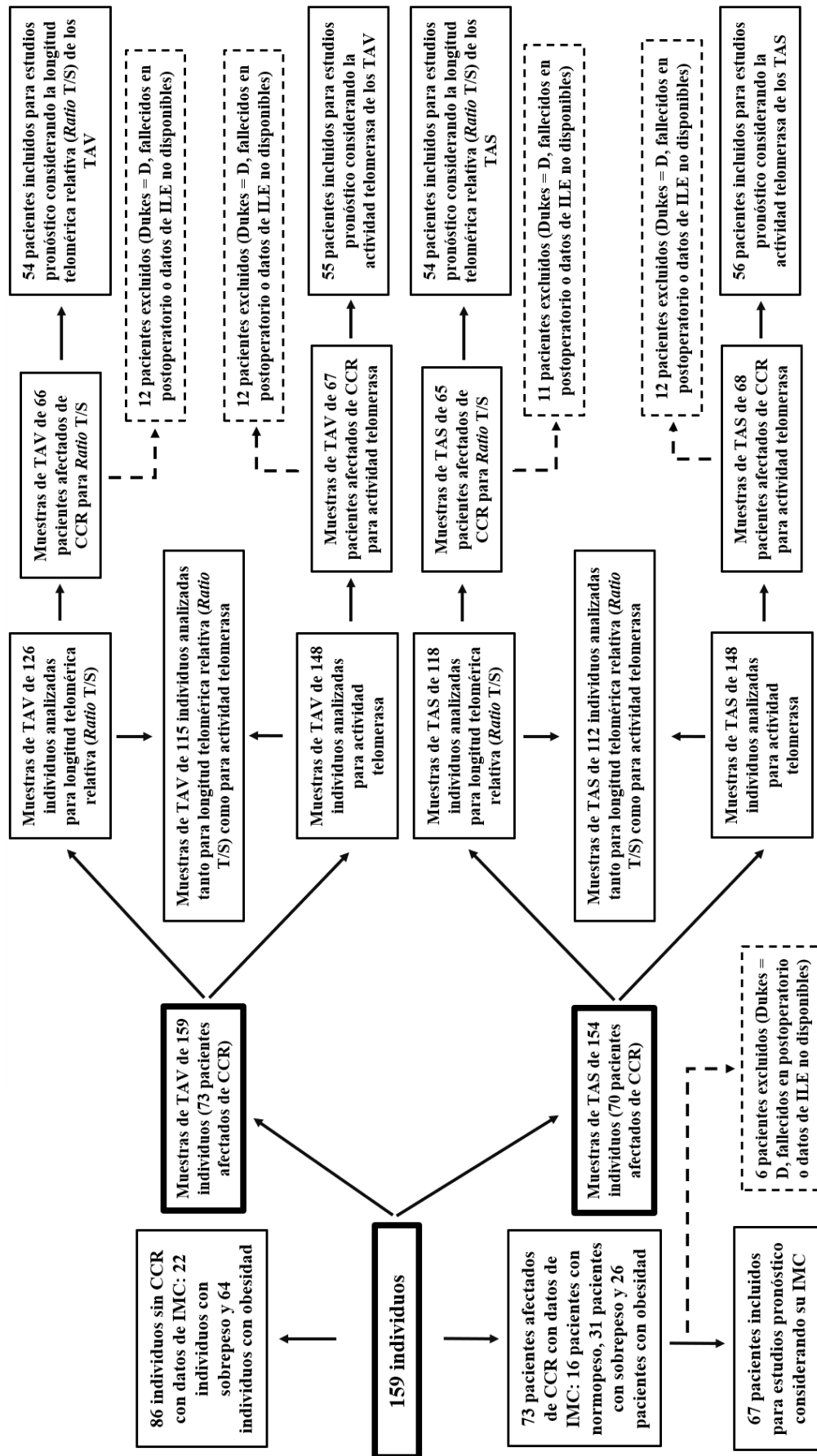


Figura 3.2.- Distribución de muestras e individuos incluidos en los estudios realizados en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS). Se indican el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión.

La siguiente tabla (**Tabla 3.5**) resume las características clínico-patológicas de los casos pertenecientes a la población de pacientes con CCR que participan en el estudio de los tejidos adiposos (73 pacientes para TAV y 70 pacientes para TAS):

Tabla 3.5.- Variables clínico-patológicas de los tumores colorrectales considerados en el estudio de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS).

VARIABLE	Nº CASOS	
	TAV ¹	TAS ²
SEXO	73	70
MUJER	31	30
HOMBRE	42	40
ESTADIO DE DUKES	71*	69[#]
A	11	10
B	34	33
C	18	18
D	8	8
LOCALIZACIÓN TUMORAL	73	70
COLON DERECHO	23	22
COLON IZQUIERDO	17	17
RECTO	33	31

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos. *No se facilitó el estadio en 2 casos; # No se facilitó el estadio en 1 caso.

La edad de la población total considerada en los estudios de tejidos adiposos fue de $63,38 \pm 1,19$ años (media \pm error estándar). Considerando el sexo, la edad fue de $62,53 \pm 1,62$ años (media \pm error estándar) en mujeres y $64,43 \pm 1,77$ años (media \pm error estándar) en varones.

La media de edad de la población afectada de CCR (73 pacientes) fue de $70,04 \pm 1,56$ años (media \pm error estándar), con un valor medio de $71,48 \pm 2,41$ años (media \pm error estándar) en mujeres y $68,98 \pm 2,05$ años (media \pm error estándar) en varones. Para la

población sin CCR (81 individuos), el valor medio de edad fue de $57,38 \pm 1,51$ años (media \pm error estándar), $57,39 \pm 1,82$ años (media \pm error estándar) en mujeres y $57,37 \pm 2,73$ años (media \pm error estándar) en varones.

3.2. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DEL ADN

La extracción de ADN tisular se ha realizado siguiendo el método descrito por Blin y Stafford (**Blin & Stafford, 1976**), con pequeñas modificaciones. Tanto para los tejidos colorrectales como para los adiposos, se partió de pequeños fragmentos de tejido de aproximadamente 20 mg de tejido fresco congelado conservado en solución RNAlater (solución acuosa que estabiliza y protege el ARN celular durante su almacenamiento gracias a la presencia de inhibidores de ARNasas) (Life Technologies, Carlsbad, California), o a partir de 10-15 cortes de 20 μ m de grosor obtenidos a partir de bloques de tejido embebido en medio Tissue-Tek[®] (compuesto de glicoles y resinas hidrosolubles que aportan la matriz adecuada a la muestra para un seccionamiento del criostato en temperaturas inferiores a -10°C) (Sakura Europe, Alphen aan den Rijn, Países Bajos).

Los tejidos se introdujeron en un tubo eppendorf de 2 ml, el cual contenía 1,25 ml de la solución Tampón 1 (**Tabla 3.6**). Se homogeneizó el tejido con ayuda de un homogeneizador mecánico IKA[®] T10 Basic ULTRA-TURRAX[®] (IKA, Staufen, Alemania) cuyo vástago se mantuvo la noche anterior en una solución de NaOH 4 N para eliminar la posible presencia de nucleasas (siendo aclarado con agua ultraestéril antes y entre cada uso). Después se añadieron 50 μ l de una solución de proteinasa K de concentración 500 μ g/ml (Sigma Aldrich, St. Louis, Missouri, Estados Unidos), se volvió a homogeneizar, y se añadieron 62,5 μ l de SDS al 20%, mezclando por inversión. Este homogeneizado se transfirió a un tubo falcon de 15 ml y se sometió a una digestión de 3h a una temperatura de 65°C .

Una vez finalizada la digestión, se añadió a cada tubo 1,25 ml de la solución Tampón 2 (**Tabla 3.6**) y un volumen de una solución de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 25:24:1, pH 8, para la extracción fenol-cloroformo. Después, los tubos se agitaron y se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente.

Finalizada la centrifugación, la fase acuosa se transfirió a un nuevo tubo estéril de 15 ml y se añadió un volumen de la mezcla cloroformo:alcohol isoamílico en proporción 24:1. Esta mezcla se agitó y se centrifugó nuevamente durante 5 minutos a 4.000 rpm, a temperatura ambiente, para después transferir la fase acuosa a un tubo nuevo y añadir 2 volúmenes de etanol absoluto para llevar a cabo la precipitación del ADN a -20°C durante toda la noche.

Pasado este tiempo, los tubos se centrifugaron a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se añadieron 2 ml de etanol frío al 70% para lavar el precipitado. Para finalizar la extracción, se centrifugó por última vez de nuevo a 4.000 rpm durante 15 minutos a 4°C y se decantó el sobrenadante. El precipitado obtenido de ADN, una vez seco, se resuspendió en 30 µl de agua ultrapura estéril.

Tabla 3.6.- Composición de las soluciones Tampón 1 y 2 empleadas para la extracción de ADN.

REACTIVO	COMPOSICIÓN
Solución Tampón 1	Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; NaCl 0,15 M
Solución Tampón 2	Tris HCl 10 mM, pH 7,5; EDTA 10 mM; NaCl 0,65 M

Para valorar la concentración de ADN, se llevó a cabo una lectura espectrofotométrica a 260 nm (A_{260}) en el espectrofotómetro NanoDrop® 2000 (ThermoFisher, Waltham, Massachusetts), teniendo en cuenta que una unidad de densidad óptica a dicha longitud de onda corresponde a una concentración de ADN de doble cadena de concentración 50µg/ml (**Sambrook et al.1989**). Respecto al grado de pureza en relación a otros compuestos, se midió la absorbancia a 280nm (A_{280}) para detectar posibles contaminaciones con proteínas (considerándose un grado de pureza adecuado si el *ratio* de A_{260}/A_{280} se encontraba entre 1,8 y 2) y la absorbancia a 230 nm (A_{230}) para contaminaciones con compuestos orgánicos o sales (pureza adecuada si el *ratio* A_{260}/A_{230} es superior a 230 nm).

El blanco utilizado en ambas lecturas se compuso de 1 µl de agua ultrapura estéril.

Una vez valorado, el ADN se sometió a una electroforesis en gel de agarosa 1,2% en tampón TBE 1X (a partir de TBE 10X: Tris 1 M, ácido bórico 0,9 M y EDTA 0,01 M) a 80V durante 50 minutos para comprobar su integridad, representada por la visualización de una sola banda de ADN sin degradación o “*smearing*”. Para ello, se cargó un volumen de muestra correspondiente a 500ng de ADN (completando hasta 10 μ l con agua ultrapura estéril) y 2 μ l de tampón de carga o *Loading Buffer* en cada pocillo.

Una vez finalizada la valoración de la integridad, las muestras de ADN se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

3.3. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se llevó a cabo asimismo a partir de fragmentos de tejido fresco congelado en medio RNAlater o a partir de 10-15 cortes de 20 μ m de tejidos embebidos en Tissue-Tek®.

Estos fragmentos se introdujeron en un tubo eppendorf estéril con 400 μ l del reactivo de lisis incluido en el kit *TeloTTAGGG* Telomerase PCR ELISA® (Roche, Basilea, Suiza), el cual contiene inhibidores de ARNasas y proteasas para facilitar la extracción proteica. Se homogeneizaron las muestras con un homogeneizador mecánico IKA® T10 Basic ULTRA-TURRAX® (IKA, Staufen, Alemania). Al igual que para la extracción de ácidos nucleicos, para las proteínas también se mantuvo el vástago la noche anterior en una solución de NaOH 4 N y se aclaró con agua ultrapura estéril antes y entre cada muestra. Realizado lo anterior, las muestras se dejaron en hielo durante 30 minutos con el fin de favorecer la extracción de proteínas, para después centrifugarse a 12.000 rpm a 4°C durante 20 minutos.

Finalizada la centrifugación, el sobrenadante, que contenía las proteínas, se repartió en alícuotas en dos tubos estériles nuevos para ser almacenadas a -80°C hasta su utilización.

Para la valoración de la concentración de proteínas se emplearon dos procedimientos: el método de Bradford (**Bradford, 1976**) y/o la valoración espectrofotométrica a 280 nm.

En el caso del método de Bradford, a cada una de las muestras se les añadieron 200 μl del reactivo comercial Bio-Rad Protein Assay (Bio-Rad, Hércules, California, Estados Unidos) y 800 μl de agua ultrapura estéril en una cubeta espectrofotométrica, donde después se incluyeron 4 μl del extracto proteico a analizar (como blanco se empleó 1ml de la mezcla anterior). Para poder interpolar los resultados de las medidas a unos resultados de concentración exactos se construyó una curva de calibrado a partir de una solución estándar de albúmina sérica bovina (BSA) de concentración 2 mg/ml (Bio-Rad) con diluciones de 0 a 10 $\mu\text{g/ml}$. Para medir la concentración de proteínas, se realizó una lectura de la absorbancia a 595 nm de cada muestra por duplicado.

La valoración de proteínas por medida espectrofotométrica a 280 nm se realizó en el espectrofotómetro NanoDrop[®] 2000, valorando 1,5 μl de cada muestra (como blanco se utilizó 1,5 μl de la solución de lisis empleada en la extracción de proteínas). Este método tiene la ventaja de ofrecer una medida más rápida a la vez que permite gastar menos cantidad de muestra que el anterior procedimiento.

3.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN EL ANÁLISIS DE TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS

3.4.1. ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA DE TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS

En la población estudiada para tejidos colorrectales (181 pacientes), la longitud telomérica de los tejidos tumorales se analizó en 141 casos, y la longitud telomérica correspondiente de los tejidos no tumorales en 137 casos, pudiendo determinar la longitud telomérica para ambos tejidos colorrectales en 132 pacientes. Se dispuso de los datos de IMC en un total de 95 pacientes. La distribución de los pacientes y sus muestras se detalla en la **Figura 3.3**.

La población incluida en este trabajo para el estudio de tejidos adiposos, tanto viscerales como subcutáneos, estuvo integrada por 159 individuos, cuantificándose la longitud

telomérica de TAV en 126 casos y la longitud telomérica de TAS en 118 sujetos (la longitud telomérica de ambos tejidos adiposos pudo analizarse en un total de 111 individuos).

La **Figura 3.4** muestra la distribución de las muestras y pacientes incluidos en el estudio.

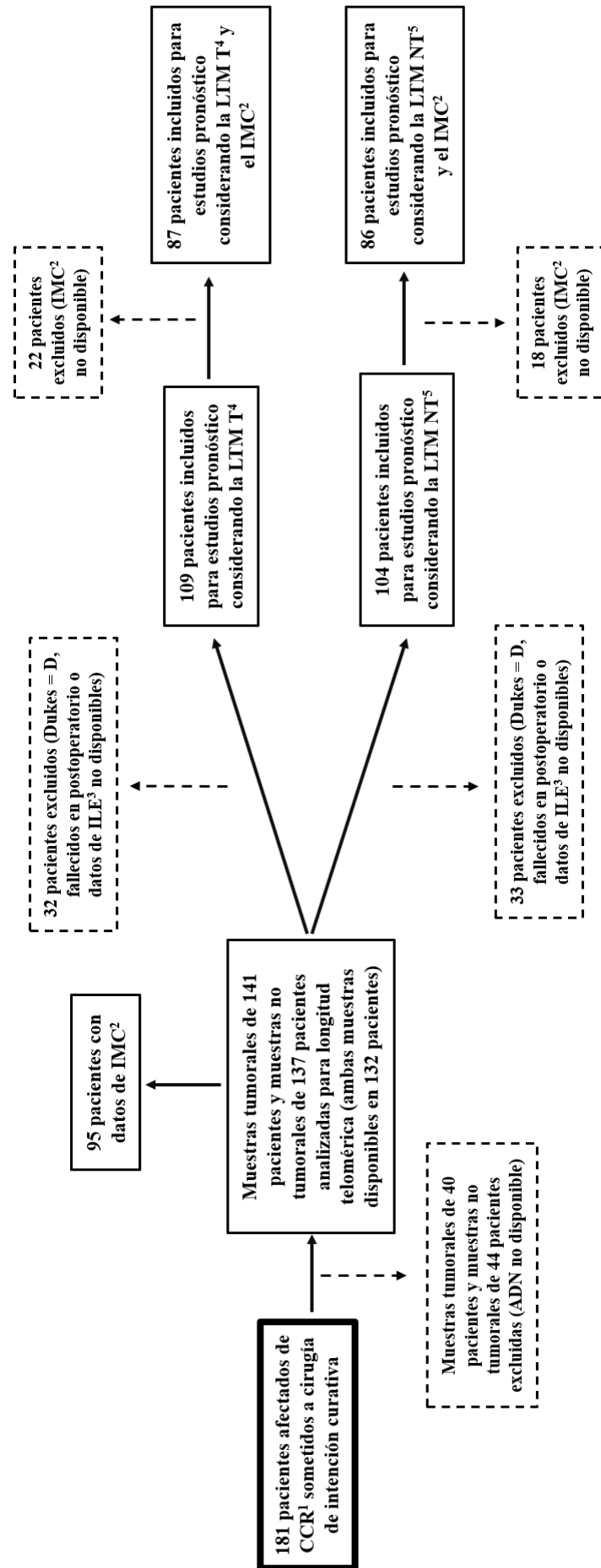


Figura 3.3.- Distribución de muestras y pacientes incluidos en los análisis de longitud telomérica de tejidos colorrectales. Se indican el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión. ¹Cáncer Colorrectal; ²Índice de Masa Corporal; ³Intervalo Libre de Enfermedad; ⁴Longitud Telomérica Media tumoral; ⁵Longitud Telomérica Media no tumoral.

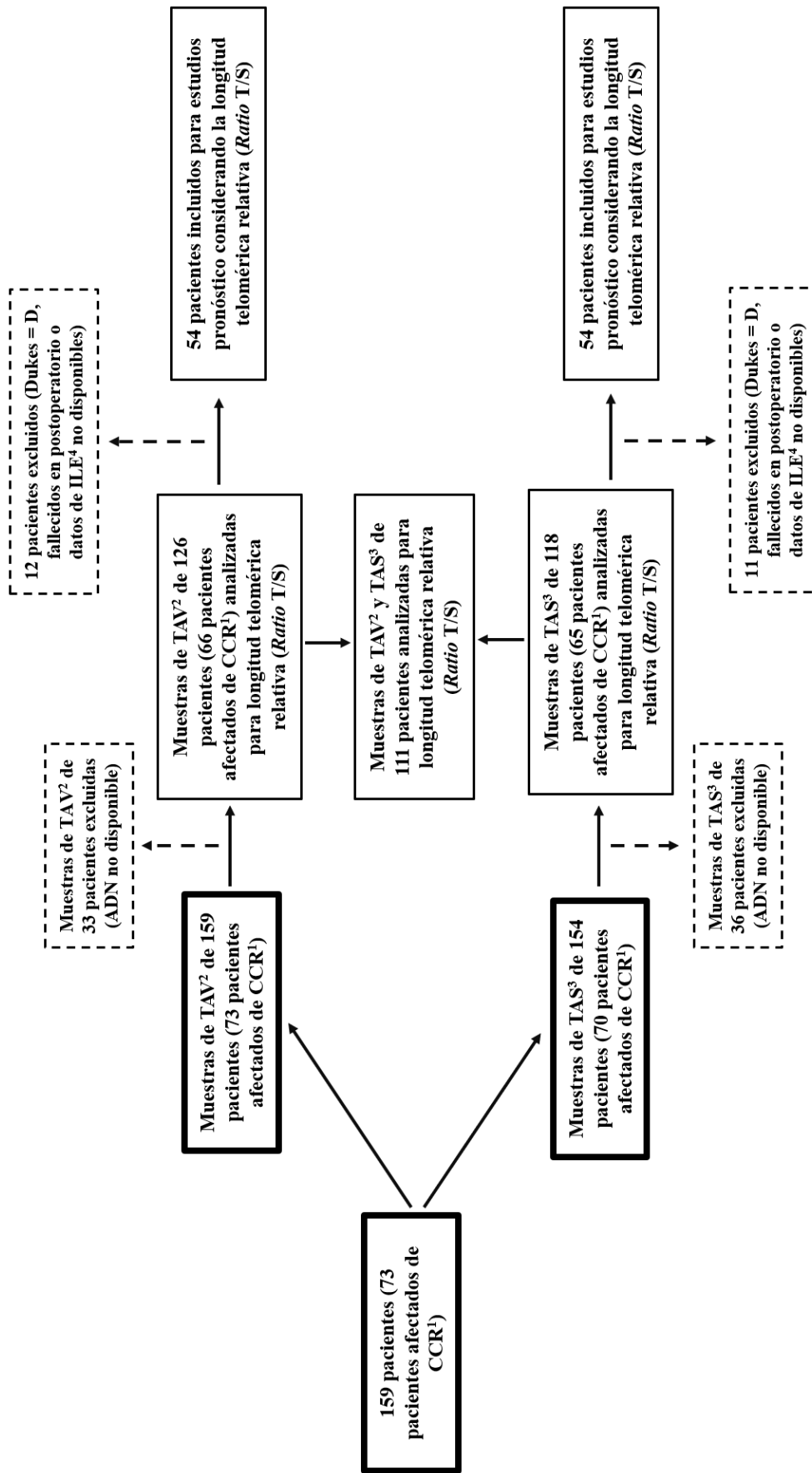


Figura 3.4.- Distribución de muestras y pacientes incluidos en los análisis de longitud telomérica de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS). Se indican el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión. ¹Cáncer Colorrectal; ²Tejidos adiposos viscerales; ³Tejidos adiposos subcutáneos; ⁴Intervalo Libre de Enfermedad.

3.4.1.1. Determinación de la longitud telomérica mediante el análisis de los fragmentos teloméricos de restricción.

Para poder determinar la medida absoluta de los fragmentos teloméricos se utilizó el kit *TeloTAGGG[®] Telomere Length Assay* (Roche, Basilea, Suiza). En esta técnica, el ADN extraído (genómico) es tratado mediante una digestión con una mezcla de enzimas de restricción para posteriormente separar los fragmentos de ADN en un gel de electroforesis y transferirlos a una membrana de nailon mediante la técnica de *Southern blot*.

Una vez transferidos a la membrana, los fragmentos son hibridados con una sonda específica para repeticiones teloméricas, marcada con digoxigenina, y se incuban con un anticuerpo anti-digoxigenina que lleva unida fosfatasa alcalina (llamado anti-DIG-AP o *DIG antibody coupled to Alkaline Phosphatase*). Por último, la adición del sustrato *CDP-Star* provoca su metabolización por parte de la enzima, generándose la señal quimioluminiscente necesaria para la visualización de los fragmentos teloméricos (**Figura 3.5**).

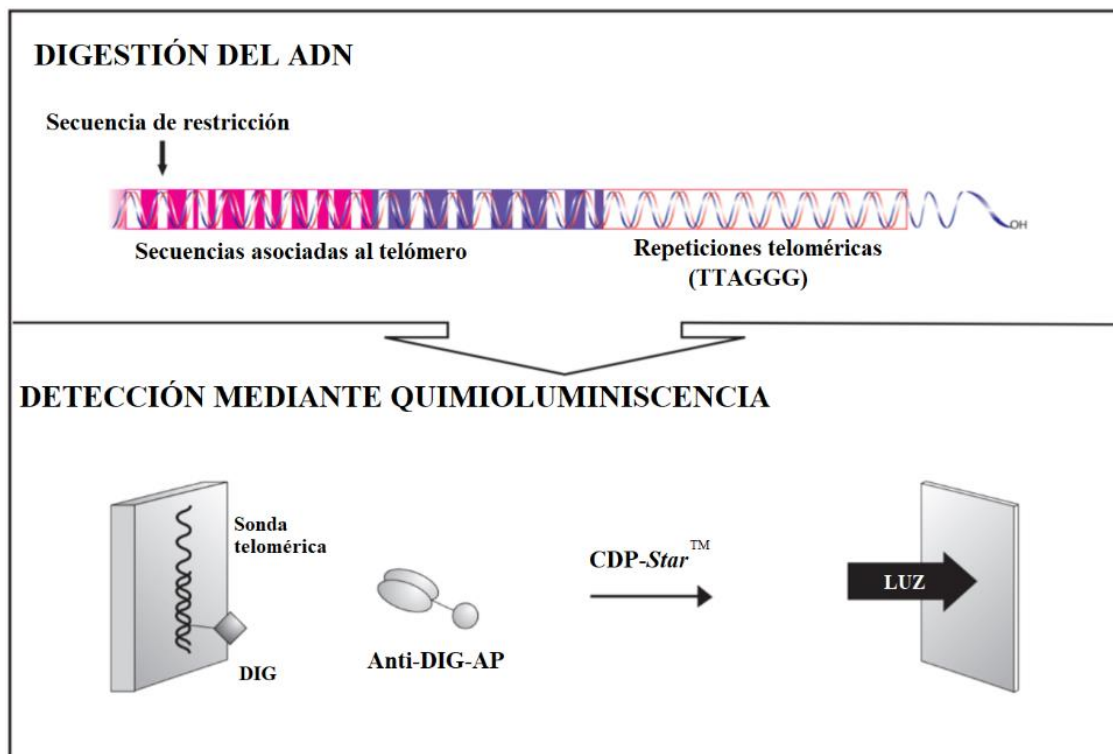


Figura 3.5.- Representación esquemática del proceso de determinación de la longitud telomérica mediante el análisis de los fragmentos teloméricos de restricción empleando el kit *TeloTAGGG[®] Telomere Length Assay*. Fuente oficial: <https://www.sigmaaldrich.com>

Para cada caso, considerando tanto el tejido tumoral como el tejido no tumoral, se partió de una cantidad de ADN genómico de 2,5 µg para la digestión enzimática. Se añadió el volumen correspondiente de tampón de digestión 1X y 20 U/µl de cada enzima de restricción, Hinf I y RsaI, en un volumen de reacción de 20 µl. Además de las muestras, en el estudio se incluyeron los ADN control del kit empleado; se trata de 2 ADN control con telómeros cortos y largos, respectivamente. La digestión se realizó a 37°C durante 2 horas.

Terminada la digestión, se añadieron a cada muestra 4µl del tampón de carga procedente del kit, que frena la reacción enzimática. Para separar los fragmentos digeridos de ADN, se realizó una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X (TAE 50X: Tris 2 M, 57,1 ml de ácido acético glacial, pH 8, y EDTA 50 mM), empleando un marcador de peso molecular. La electroforesis se desarrolló a 83V durante 4 horas.

Finalizado este paso, se retiró el gel de la cubeta de electroforesis y se sometió a un tratamiento con una solución de HCl 0,25 M durante 10 minutos, se aclaró dos veces con agua destilada, y se sumergió dos veces durante 15 minutos en una solución de desnaturalización (NaCl 1,5 M, NaOH 0,5 M) en agitación orbital suave a temperatura ambiente. Se aclaró nuevamente 2 veces con agua destilada, y se trató dos veces con una solución de neutralización (0,5 M tris-HCl, 3 M NaCl, pH 7,5) durante 15 minutos, también en agitación suave y a temperatura ambiente.

Para la transferencia a la membrana de nailon cargada positivamente, esta se trató previamente con agua ultrapura estéril durante 7 minutos para su activación, y como tampón de transferencia se utilizó una solución de SSC 20X (NaCl 3 M, citrato sódico 0,3 M, pH 7). La transferencia se realizó durante toda la noche y, una vez terminada, para fijar el ADN a la membrana, esta se expuso a luz ultravioleta (254 nm durante 7 minutos) y posteriormente se sometió a calentamiento a 80°C durante 30 minutos. Acabada la fijación, la membrana se lavó con SSC 2X para después ser introducida en un cilindro de hibridación, al que se añadieron 18 ml de la solución de prehibridación previamente calentada a 42°C. Esta prehibridación se realizó en rotación durante 60 minutos a 42°C. Después, se retiró la solución y se añadieron 10 ml de la solución de hibridación, la cual incluía 2 µl de la sonda específica marcada con digoxigenina. La hibridación se desarrolló nuevamente a 42°C en rotación, pero esta vez durante 3h.

Los siguientes pasos consistieron en retirar la membrana del cilindro de hibridación, realizar dos lavados de 5 minutos con la solución astringente de lavado I o *Stringent Washing Buffer I* (SSC 2X, SDS 0.1%) a temperatura ambiente, otros dos lavados de 15 minutos cada uno con la solución astringente de lavado II o *Stringent Washing Buffer II* (SSC 0,2X, SDS 0,1%) a 50°C, y un lavado de 4 minutos con el tampón de lavado o *Washing Buffer 1X* del kit a temperatura ambiente.

A continuación, se realizó el bloqueo de la membrana con un tratamiento de 70 ml de la solución de bloqueo 1X durante 30 minutos a temperatura ambiente, para posteriormente añadir el anticuerpo anti-digoxigenina unido a fosfatasa alcalina (se añadieron 7 µl del anticuerpo de concentración 75 mU/ml) en una incubación de 30 minutos a temperatura ambiente. Terminada la incubación, se lavó la membrana dos veces durante 15 minutos con *Washing Buffer 1X* a temperatura ambiente, y se realizó una nueva incubación también a temperatura ambiente con 100 ml de *Detection Buffer 1X* procedente del kit.

Para finalizar, se llevó a cabo el revelado de la membrana mediante el tratamiento durante 15 segundos con una mezcla de 11,2 ml de agua ultrapura estéril, 1,250 ml de *Detection Buffer 10X* y 5 ml del reactivo de revelado para ponerla en contacto con una película autorradiográfica (Amersham Hyperfilm[®] MP. GE Healthcare, Little Chalfont, Reino Unido) y poder ser analizada empleando el programa informático Quantity one[®] (Bio-Rad).

Para poder cuantificar la longitud telomérica se utilizó el software Image gauge 3.46[®] (Fujifilm, Tokyo, Japon), en el cual se compararon los resultados de cada muestra tumoral con su pareja no tumoral. La digestión con las enzimas de restricción y la posterior hibridación con sondas específicas de telómeros permitió observar un *smear* correspondiente a la combinación de las distintas longitudes de los cromosomas de las diferentes células comprendidas en las muestras analizadas, por lo que la longitud telomérica para cada muestra hizo referencia a la Longitud Telomérica Media (LTM), medida en kb, en función de las diferentes intensidades que la hibridación ofreció según el tamaño telomérico.

Dado que cuanto mayor es el peso molecular del fragmento telomérico, mayor es la densidad óptica que se obtiene, la longitud media de los fragmentos teloméricos se determinó utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Longitud Telomérica Media (LTM)} = (\text{DO}_i) / (\text{DO}_i/\text{Li})$$

DO_i hace referencia a la densidad óptica para la posición *i*, y L_i es la longitud de los fragmentos teloméricos, medidos en kb, en dicha posición.

3.4.1.2. Determinación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa (qPCR).

Determinar la longitud telomérica de manera relativa es posible gracias a una técnica basada en la reacción en cadena de la polimerasa a tiempo real o qPCR (Cawthon, 2002), lo que permite evaluar la amplificación de nuestro gen diana con respecto a un gen de referencia. Para la longitud telomérica, se cuantifica relativamente esta longitud empleando un *ratio*, llamado *Ratio T/S*, para cada una de las muestras. Este *ratio* hace referencia al número de copias de la secuencia telomérica (denominado como T) dividido entre el número de copias de un gen *housekeeping* o de copia única (denominado S), ambos respecto a un ADN de referencia. Para nuestros experimentos, el gen de copia única empleado es el gen *RPLPO* (*Ribosomal Protein Large P0*), que codifica para la proteína P0 que integra la subunidad grande 60S del ribosoma eucariota.

Para poder detectar la amplificación se empleó el reactivo comercial SYBR Green® (Roche, Alemania), el cual se intercala en la doble hélice del ADN y produce fluorescencia. Tiene la desventaja de que es una molécula inespecífica, por lo que se une a cualquier molécula de ADN de doble cadena, incluidos los dímeros de *primers* que se forman.

Dado que se pretende llevar a cabo la amplificación de dos secuencias génicas diferentes (secuencia telomérica y gen *RPLPO*), para cada gen se prepararon dos mezclas de reacción distintas, las cuales contenían un volumen del extracto de ADN correspondiente a una cantidad de 20 ng de ADN junto con sus *primers* correspondientes: 0,18 µl del *primer reverse* a una concentración de 300 nM y 0,06 µl del *primer forward* de concentración 900 nM para la secuencia telomérica. En el caso del gen *RPLPO*, se utilizó 0,1 µl del *primer reverse* a concentración de 300 nM y 0,06 µl del *primer forward* a concentración 500 nM (secuencia de oligonucleótidos mostrada en la **Tabla 3.7**).

En ambos casos, se añadieron 10 µl de la mezcla de reacción *FastStar Universal SYBR Green Master* (ROX) 2X (Roche, Alemania), y se completó con agua ultrapura estéril para obtener un volumen final de reacción de 20 µl.

Tabla 3.7.- Secuencia de *primers* empleados en el estudio de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

GEN	SECUENCIA PRIMERS
<i>TEL</i> (secuencia telomérica)	<i>Primer forward:</i> 5' - CGGTTTGTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT - 3'
	<i>Primer reverse:</i> 5' - GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT - 3'
	<i>Primer forward:</i> 5' - CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC - 3'
<i>RPLPO</i>	<i>Primer reverse:</i> 5' - CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA - 3'

El ADN de referencia empleado fue un *pool* de ADNs procedentes de muestras de tejidos no tumorales con telómeros de longitud media aproximada de 7 kb (determinado previamente mediante la técnica TRF descrita en el punto anterior). La amplificación de las muestras se realizó por triplicado en un termociclador *7900HT Fast Real-Time PCR System* (Life Technologies, EE. UU.), siguiendo el programa de amplificación detallado en la **Figura 3.6** (las condiciones de qPCR para la amplificación del gen *RPLPO* son las mismas, pero con una temperatura de hibridación de 60°C y 35 ciclos de amplificación).

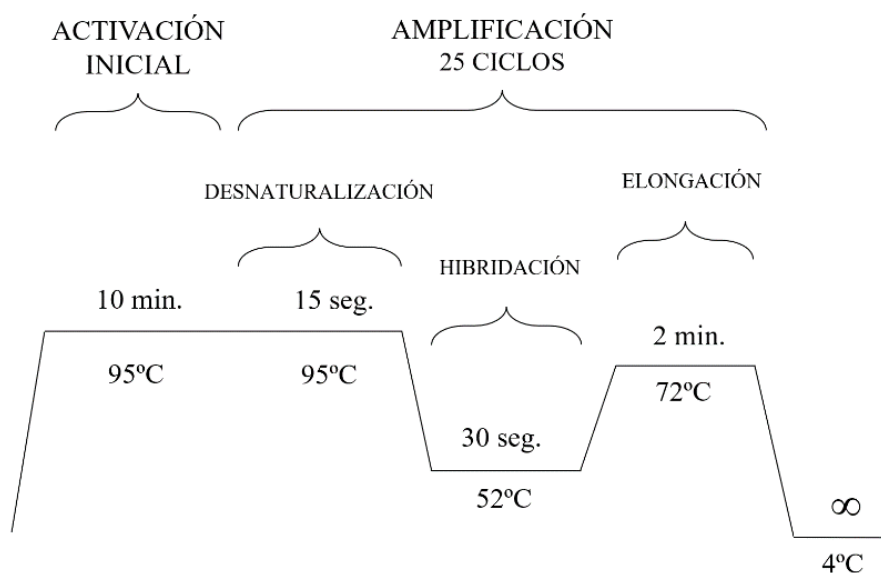


Figura 3.6.- Programa de amplificación de secuencias teloméricas (*TEL*) mediante qPCR para el estudio de la longitud telomérica relativa.

Durante el proceso de amplificación, el termociclador recoge la fluorescencia emitida por el fluorocromo excitado al haber sido sometido a un haz de luz de longitud de onda determinada, obteniéndose así el denominado ciclo umbral o Ct, que se define como el ciclo en el cual el nivel de fluorescencia emitido por la muestra varía de manera significativa al alcanzar el umbral o *threshold* (esta variación siempre ocurre en la fase exponencial de la curva de amplificación) (**Figura 3.7, A**). El valor de Ct se empleó para los cálculos de esta técnica, tal y como se define en el método descrito por Pfaffl (**Pfaffl, 2001**).

Para poder validar esta técnica, es necesario que la eficiencia de cada pareja de *primers* sea la adecuada, (una eficiencia del 100% indica que se ha realizado la amplificación del doble de cantidad de la secuencia diana en cada ciclo de PCR). En nuestros experimentos, la eficiencia se calculó utilizando, tanto para la secuencia telomérica como para el gen endógeno, una curva estándar generada a partir de diluciones 1/5 del *pool* de ADN empleado como ADN de referencia. Para el cálculo de cada eficiencia, se representó una gráfica con los valores de Ct obtenidos para cada dilución de la curva estándar, respecto al logaritmo en base 10 de la cantidad de ADN analizado. Así se obtuvo la ecuación de la recta patrón y se calculó su pendiente (**Figura 3.7, B**).

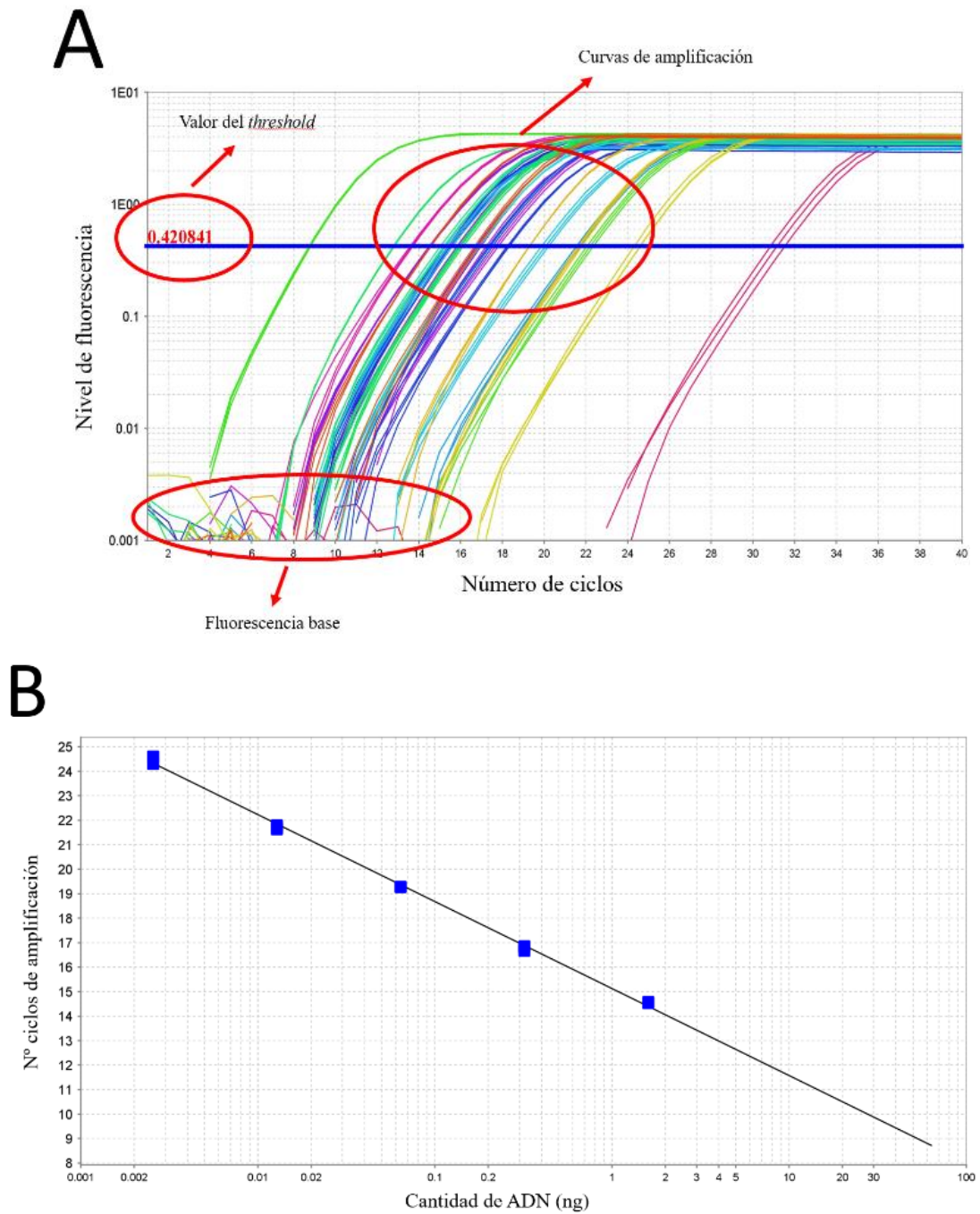


Figura 3.7.- Gráfica para las curvas de amplificación por qPCR de las secuencias teloméricas (A). Curva estándar empleada para el cálculo de la eficiencia de los *primers* durante el proceso de amplificación de las secuencias teloméricas (B).

El cálculo de la eficiencia de cada pareja de *primers* se realizó con la siguiente fórmula:

$$EFF = [10^{(-1/pendiente)}]$$

Sólo se aceptaron eficiencias comprendidas entre el 80-120%

Conocida la eficiencia, el cálculo de la longitud telomérica relativa se llevó a cabo según lo establecido por Pfaffl (**Pfaffl, 2001**):

$$Ratio\ T/S = \frac{EFF\ TEL \ ^{[Ct\ ADN\ Referencia - Ct\ muestra]}}{EFF\ RPLP0 \ ^{[Ct\ ADN\ Referencia - Ct\ muestra]}}$$

3.4.2. ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN TEJIDOS COLORRECTALES Y TEJIDOS ADIPOSOS

La actividad telomerasa se analizó, de 181 pacientes que se incluyeron en el estudio, en muestras de tejido colorrectal de un total de 172 pacientes. Se dispuso de los datos de IMC en 113 de estos casos (**Figura 3.8**).

En el caso de los tejidos adiposos, la actividad telomerasa se evaluó en 148 casos de los 159 individuos incluidos en el estudio, tanto en TAV como en TAS, incluyendo el estudio de la actividad telomerasa de ambos tejidos adiposos en un total de 141 individuos (pacientes y muestras detallados en la **Figura 3.9**).

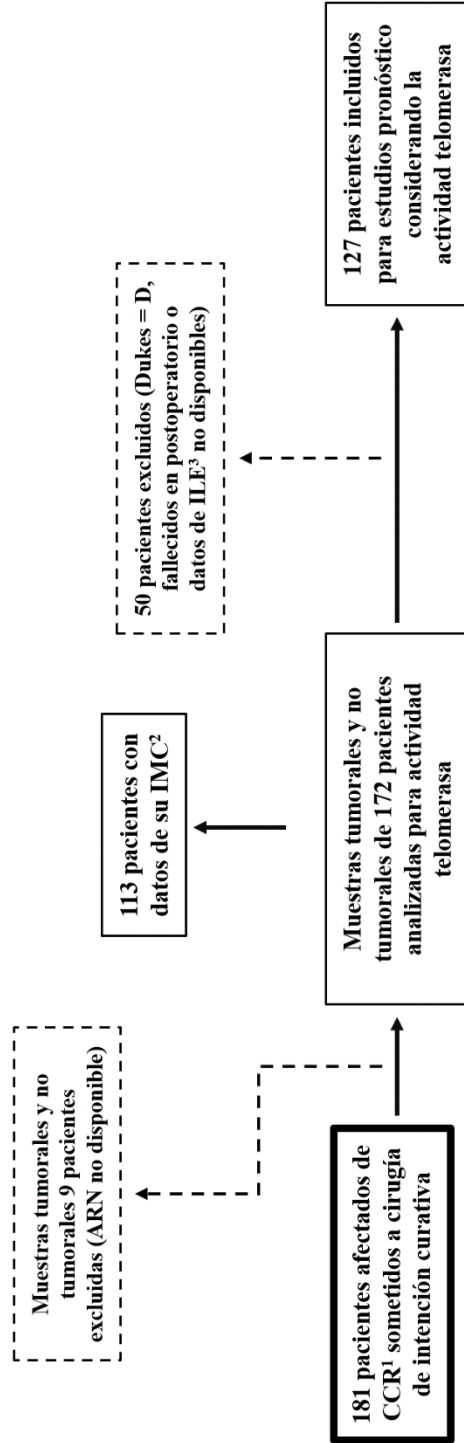


Figura 3.8.- Distribución de muestras y pacientes incluidos en los análisis de actividad telomerasa en tejidos colorrectales. Se indica el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión. ¹Cáncer Colorrectal; ²Índice de Masa Corporal; ³Intervalo Libre de Enfermedad.

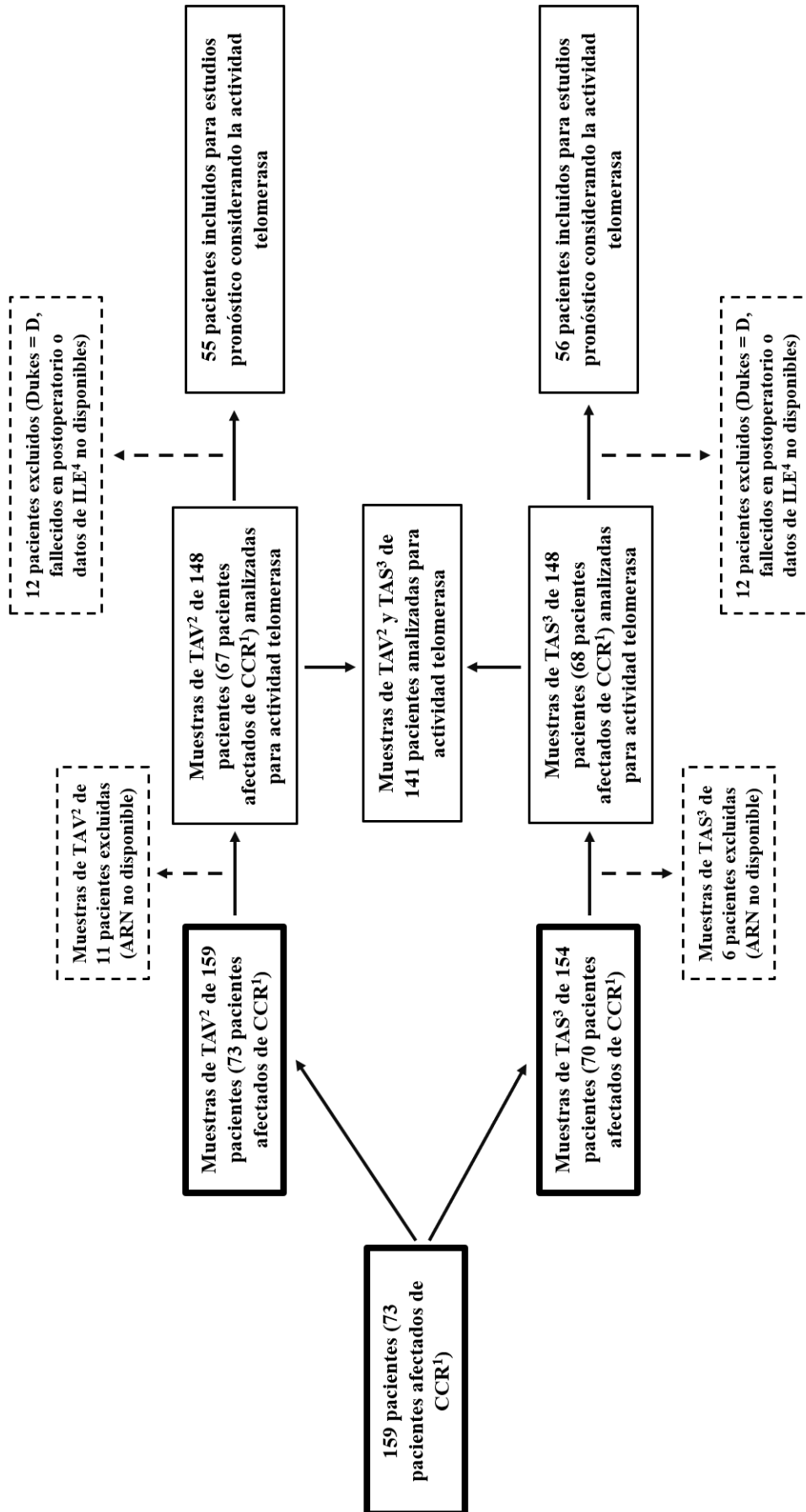


Figura 3.9.- Distribución de muestras y pacientes incluidos en los análisis de actividad telomerasa de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS). Se indica el número de casos incluidos y excluidos en cada análisis, así como las causas de exclusión. ¹Cáncer Colorrectal; ²Tejidos adiposos viscerales; ³Tejidos adiposos subcutáneos; ⁴Intervalo Libre de Enfermedad.

3.4.2.1. Determinación de la actividad telomerasa mediante *Telomeric Repeat Amplification Protocol* (TRAP).

La determinación de la actividad telomerasa se realizó conforme al método descrito por Kim y cols. (**Kim et al., 1994**) utilizando el kit comercial TeloTAGGG[®] Telomerase PCR ELISA (Roche).

El desarrollo de este procedimiento se basa en dos grandes etapas: elongación y amplificación de sondas específicas de la secuencia telomérica, y posterior detección por ELISA.

En la primera etapa, la enzima telomerasa presente en la muestra proteica añade las repeticiones teloméricas -TTAGGG- al extremo 3' de un cebador específico biotinilado llamado P1-TS. Una vez elongados gracias a la actividad telomerasa, los productos se amplifican mediante PCR empleando los cebadores P1-TS y P2, generándose por lo tanto diversas secuencias que difieren entre sí en 6 pb (como se ilustra en la **Figura 3.10**).

Finalizada la amplificación, la segunda etapa consistiría en una desnaturalización e hibridación de dichos fragmentos con una sonda específica marcada con digoxigenina (denominada P3), para posteriormente ser inmovilizados en una placa de ELISA, cuyos pocillos están recubiertos con estreptavidina. Esto permite que la biotina de los cebadores P1-TS amplificados se una a ella para así fijar los amplicones. Después se detecta con un anticuerpo anti-digoxigenina (anticuerpo policlonal procedente de oveja llamado anti-DIG-POD o anti-digoxigenina-peroxidasa) el cual se encuentra conjugado con peroxidasa. Esta enzima, en contacto con su sustrato (el cromógeno tetrametilbenzidina o TMB), cataliza su transformación en un sustrato de color azul, por lo que la absorbancia emitida por dicha conversión será proporcional a la cantidad de ADN telomérico que la telomerasa ha añadido.

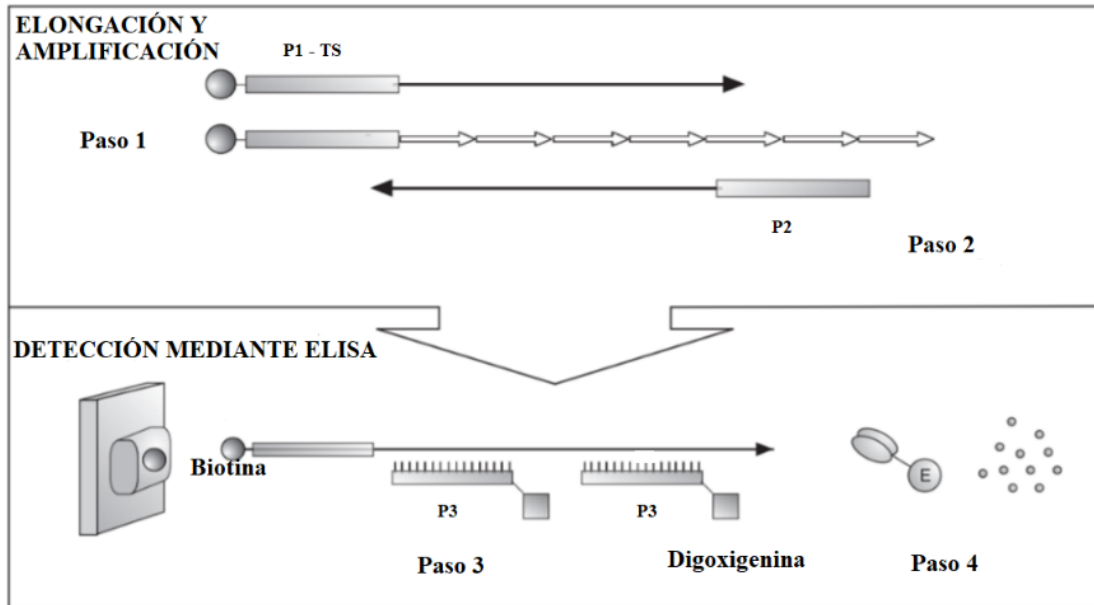


Figura 3.10.- Representación esquemática del proceso de determinación de la actividad telomerasa mediante *TRAP* empleando el kit *TeloTTAGGG*[®] Telomerase PCR ELISA. Fuente oficial: <https://www.sigmaaldrich.com>

❖ Elongación y amplificación.

Para iniciar el procedimiento, se empleó un volumen correspondiente a 10-15 μg de proteínas del extracto proteico que previamente había sido purificado y almacenado, tanto para las muestras tumorales y no tumorales de tejido colorrectal como para las muestras de tejidos adiposos visceral y subcutáneo. Este volumen se añadió a un tubo de PCR de 0,2 ml, se completó hasta 25 μl con agua ultrapura estéril y se incorporaron 25 μl de *Reaction mixture* (contiene buffer Tris, el cebador P1-TS marcado con biotina, cebador P2, el sustrato de la telomerasa, *primers*, nucleótidos y la Taq polimerasa).

Dado que ciertos trabajos han informado de la presencia de inhibidores de la Taq polimerasa en un gran número de tejidos, los experimentos de amplificación se realizaron también para esas mismas muestras, pero tras haber sido diluidas 1:10 en reactivo de lisis, ya que se sabe que tras esta dilución la amplificación sigue siendo viable (**Wright et al., 1995**). Esto nos permitió identificar aquellos posibles falsos negativos debido a la presencia de dichos inhibidores.

Como control positivo, incluido en el kit, se empleó un extracto celular procedente de células humanas de riñón inmortalizadas que expresan telomerasa (línea 293). Estas

células, previamente liofilizadas, se reconstituyeron en agua ultrapura estéril para obtener una concentración aproximada de 10^3 células/ μl . Se añadieron 3 μl de esta reconstitución celular a un tubo de PCR junto con 22 μl de agua ultrapura estéril (para completar un volumen de 25 μl), y se adicionaron 25 μl de *Reaction mixture*. Como controles negativos del experimento, el control negativo 1 hace referencia al extracto celular sometido al siguiente tratamiento: una vez mezclados los 3 μl del extracto celular con 7 μl de agua ultrapura estéril, se incubó a 85°C durante 10 minutos para una inactivación enzimática por calor. Finalizada la incubación, se dejó en hielo 5 minutos y se añadió 1.2 μl de enzima ARNasa *DNase-free* (concentración 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$; Roche) y 25 μl de *Reaction mixture* para después ser incubada a 37°C durante 30 minutos. Este tratamiento permitió inutilizar su actividad enzimática debido a la degradación de su componente ARN. Por su parte, en el control negativo 2 se sustituyó el extracto celular por agua ultrapura estéril.

Una vez preparados tanto los tubos de las muestras como los controles del experimento, se llevó a cabo el proceso de elongación y amplificación de las sondas con el siguiente programa de termociclador (**Figura 3.11**):

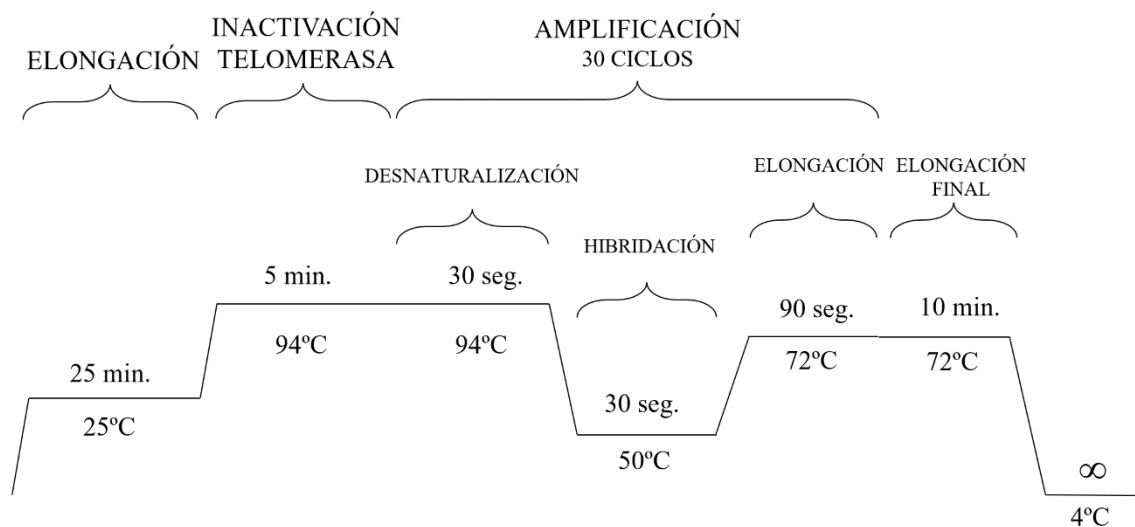


Figura 3.11.- Programa de amplificación de los fragmentos teloméricos elongados por enzima telomerasa.

❖ Detección mediante ELISA.

Acabado el proceso de elongación y amplificación, se tomaron 5 μl del producto de amplificación y se añadieron a un tubo nuevo junto con 20 μl de *Denaturation reagent* (solución de NaOH < 0.5%). Se dejó actuar a temperatura ambiente durante 10 minutos para después añadir 225 μl de *Hibridation buffer* (el cual contiene la sonda P3 unida a DIG complementaria a las repeticiones teloméricas). Se mezcló en vórtex y se transfirieron 100 μl de la nueva mezcla a cada uno de los pocillos de la placa de ELISA, los cuales estaban recubiertos con estreptavidina, necesaria para la unión de la biotina. La placa se tapó con una lámina autoadhesiva y se dejó incubar a 37°C durante 2 horas en agitación orbital (unas 250 rpm).

Finalizada la incubación, se eliminó el *Hibridation buffer* de cada pocillo y se lavaron 3 veces con 250 μl de *Washing buffer 1X*, dejando actuar cada lavado un mínimo de 30 segundos para asegurarnos de su correcta acción. Posteriormente, a cada pocillo se añadieron 100 μl del anticuerpo anti-DIG-POD, previamente reconstituido en agua ultrapura estéril, a una concentración de 0.5 U/ml, se tapó de nuevo la placa con otra lámina autoadhesiva y se dejó incubando 30 minutos a temperatura ambiente en agitación orbital (250 rpm). Pasados los 30 minutos, se retiró el exceso de anticuerpo y se realizaron 5 lavados nuevamente con otros 250 μl de *Washing buffer 1X*, también esperando 30 segundos entre lavado. El siguiente paso consistió en añadir a los pocillos 100 μl del sustrato de la digoxigenina, el TMB, tapar con lámina autoadhesiva e incubar a temperatura ambiente y en agitación durante 15 minutos (durante este tiempo se empezaba a observar el color azul característico de la reacción enzimática). Como paso final, terminada la incubación con el TMB y sin eliminarlo de los pocillos, se añadieron 100 μl del *Stop reagent* (solución de ácido sulfúrico 5%) para detener la reacción, lo que permitió el viraje del color azul a amarillo, permitiendo así obtener una máxima sensibilidad en el análisis de la absorbancia.

Para poder medir dicha absorbancia, se empleó el programa bioinformático Microplate Manager® (Bio-Rad), el cual realizó mediciones a 450 nm con una longitud de onda de 690 nm como referencia.

Para el cálculo de los resultados, se realizó la media de la diferencia de absorbancia o ΔA ($A_{450\text{nm}} - A_{690\text{nm}}$) de ambos controles negativos, y esta se restó a la diferencia de

absorbancia de cada muestra. Para poder considerar una muestra con “actividad telomerasa positiva”, dicha resta debía ser superior a 0,2 unidades de absorbancia. La validación de la prueba se podía realizar cuando para el control positivo se obtuviese una $\Delta A > 1,5$ unidades y los controles negativos tuviesen una $\Delta A < 0,2$ unidades.

3.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

Los análisis estadísticos para los resultados incluidos en esta tesis fueron desarrollados por el programa estadístico IBM SPSS® Statistics 25. Para poder realizar pruebas paramétricas o no paramétricas, primero se comprobó que las variables cumplieren las condiciones de normalidad y homocedasticidad necesarias para ser consideradas como variables normales a través de la prueba de normalidad Kolmogorov-Smirnov. En esta prueba, un valor de $p < 0.05$ nos indica que la variable no cumple las condiciones previamente citadas, por lo que será analizada como una variable no paramétrica.

La asociación entre dos variables cuantitativas se evaluó mediante los análisis de correlación o regresión: si se trata de dos variables paramétricas se realizó el coeficiente de correlación de Pearson, pero para variables no paramétricas se utilizó el coeficiente de correlación de Spearman. En ambos casos, se aceptó una asociación entre ambas variables si el valor de $p < 0,05$.

Para determinar la asociación entre una variable cuantitativa y una variable nominal o categórica, en cada grupo de la variable nominal se compararon las medias de la variable cuantitativa. Para aquellas variables clasificadas como normales, la asociación entre estas medias se determinó mediante el test llamado t de Student cuando la variable nominal presentó menos de tres grupos, mientras que, si estaba formada por tres o más categorías, el análisis realizado fue el de Análisis de la Varianza o ANOVA. Para ambos test, un valor de $p < 0,05$ indicó que las diferencias de las medias fueron estadísticamente significativas. Sin embargo, si las variables a analizar no eran paramétricas el análisis estadístico que se empleó fue U de Mann-Whitney para variables categóricas de menos de tres grupos, mientras que si constaba de 3 o más categorías el test empleado fue Kruskal-Wallis (considerando nuevamente una diferencia entre las medias estadísticamente significativa si el valor de $p < 0,05$). Para dos muestras relacionadas, la diferencia de medias

se analizó mediante la prueba T en caso de ser variables paramétricas, o en su defecto a través de la prueba de rangos de Wilcoxon si eran no paramétricas. Finalmente, para evaluar la existencia de dependencia entre dos variables cualitativas se empleó la prueba Chi-cuadrado o χ^2 , considerando que ambas variables comparten dependencia si el valor de $p < 0,05$.

Además de los anteriores análisis, también se estimaron las curvas de supervivencia expresadas como Intervalo Libre de Enfermedad o ILE, haciendo referencia al número de meses que transcurre desde la cirugía hasta el momento en que aparece recurrencia tumoral. Para ello se empleó el método Kaplan-Meier; las comparaciones se realizaron aplicando el test de Log-Rank. En estos estudios sólo se incluyeron aquellos pacientes que habían sido sometidos a cirugía con intención curativa, es decir, aquellos pacientes con tumores colorrectales clasificados como estadios A, B o C de Dukes, quedando excluidos pacientes con tumores de estadio D de Dukes y aquellos que habían fallecido en el postoperatorio (valores de supervivencia inferiores a 0,5). El tiempo medio de seguimiento de la serie fue de 60 meses y se censuraron aquellos pacientes con los que se había perdido el contacto antes de este intervalo de tiempo. Además, en los casos en los que los análisis univariados arrojaron diferencias estadísticamente significativas, o al borde de la significación estadística, se aplicó el análisis multivariable de Cox, con el fin de conocer el impacto de las diferentes variables en el pronóstico de los pacientes afectados de CCR.

El punto de corte óptimo que permitió diferenciar estadísticamente a una subpoblación de otra con diferente pronóstico clínico se calculó mediante la aplicación electrónica *Cutoff Finder* (Budczies et al., 2012).

4. RESULTADOS

4.1. FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS TUMORALES Y NO TUMORALES DE PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR). RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL

4.1.1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS DE PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

La evaluación de la función telomérica en los tejidos colorrectales se realizó mediante el estudio tanto de la longitud telomérica como de la actividad telomerasa de dichos tejidos. La Longitud Telomérica Media (LTM) de las muestras de tejidos colorrectales tumorales tuvo un valor de $5,84 \pm 0,17$ kb (media \pm error estándar; 141 casos), y $7,52 \pm 0,18$ kb (media \pm error estándar; 137 casos) en tejidos colorrectales no tumorales, existiendo diferencias estadísticamente significativas entre ambos tejidos ($p < 0,001$; test de Wilcoxon) (**Figura 4.1**).

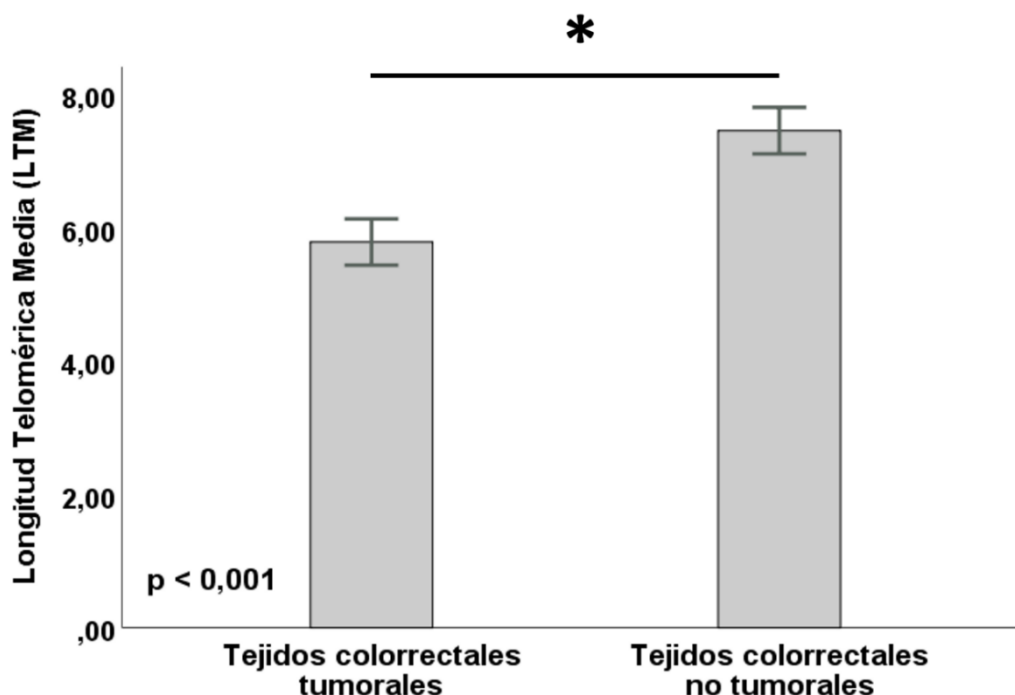


Figura 4.1.- Valores medios para la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorrectales tumorales (141 muestras) y no tumorales (137 muestras).

Una vez conocidos los valores de LTM de los tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, se procedió al cálculo del *Ratio* T/N, el cual hace referencia al cociente entre las LTM de ambos tejidos colorrectales. Este *Ratio* T/N permitió definir un estado de acortamiento telomérico en aquellas muestras cuyo valor fue inferior a 1, o mantenimiento telomérico si dicho valor fue igual o superior a 1.

Para la población considerada en este estudio, el valor medio del *Ratio* T/N fue de $0,80 \pm 0,02$ (media \pm error estándar) en un total de 132 casos para los cuales se pudieron cuantificar las LTM colorrectales tumorales y no tumorales de los mismos pacientes.

Los resultados de los estudios de correlación entre los valores de LTM en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales se pueden observar en la **Figura 4.2**, obteniéndose un valor de $r = 0,470$ ($p < 0,001$; Rho de Spearman) y para los que se incluyeron 132 casos.

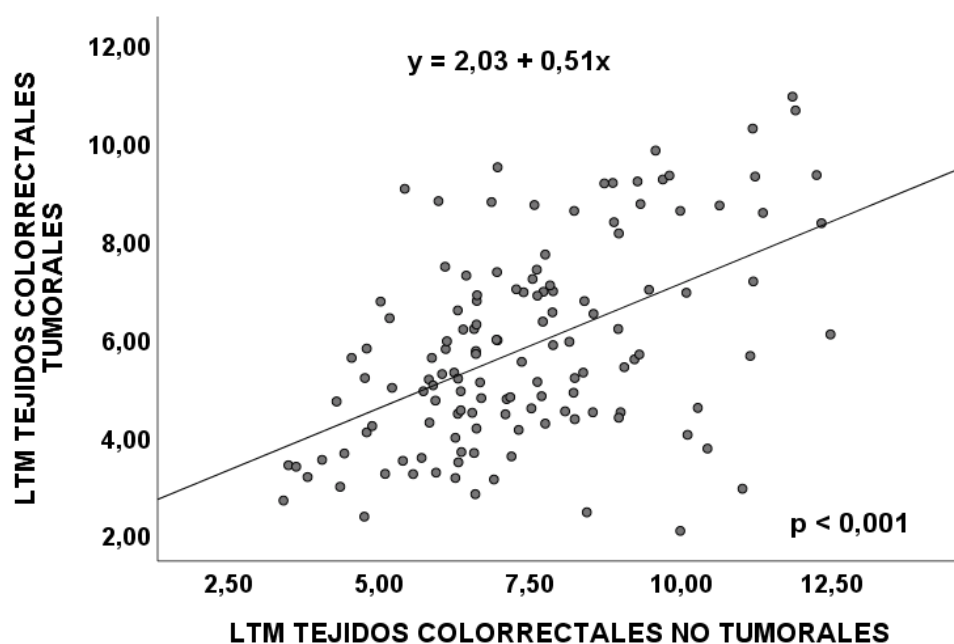


Figura 4.2.- Análisis de correlación entre la Longitud Telomérica Media (LTM) de los tejidos colorrectales tumorales y no tumorales. N° casos considerados: 132.

También se realizaron estudios de correlación entre los valores de LTM de ambos tejidos colorrectales y la edad de los pacientes, con un valor de $r = -0,109$ ($p = 0,238$; Rho de Spearman) para la LTM de tejidos tumorales (119 casos) y $r = -0,206$ ($p = 0,028$; Rho de Spearman) para la LTM de tejidos no tumorales (114 casos).

La actividad telomerasa se estudió para un total de 172 pacientes con CCR. En tejidos tumorales se detectaron 126 casos con actividad telomerasa positiva, lo que implicó una reactivación de la actividad telomerasa en el 75% de los casos. En tejidos no tumorales, los 14 casos detectados con actividad telomerasa positiva (en un total de 91 muestras) mostraron niveles mínimos de esta enzima, correspondiente a un 15% de reactivación de la telomerasa.

Al analizar la LTM de tejidos colorrectales tumorales y no tumorales respecto a la actividad telomerasa, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los tejidos colorrectales estudiados, como se muestra en la **Tabla 4.1**. La evaluación del *Ratio* T/N en los casos con actividad telomerasa positiva y negativa tampoco arrojó diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 4.2**):

Tabla 4.1.- Valores medios de la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorrectales tumorales y no tumorales, en relación con la actividad telomerasa.

	Nº casos	LTM T ¹ (Media ± EE ³)	p *	Nº casos	LTM NT ² (Media ± EE ³)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	120	5,94 ± 0,19		118	7,68 ± 0,19	
NEGATIVA	21	6,32 ± 0,49	0,344	22	7,97 ± 0,50	0,435
POSITIVA	99	5,86 ± 0,21		96	7,61 ± 0,21	

¹Longitud Telomérica Media tumoral; ²Longitud Telomérica Media no tumoral; ³Error Estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.2.- Valores medios del *Ratio* T/N, en relación con la actividad telomerasa.

	Nº casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ¹)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	113	0,79 ± 0,02	
NEGATIVA	20	0,83 ± 0,04	0,209
POSITIVA	93	0,78 ± 0,03	

¹Error Estándar; *U de Mann-Whitney.

➤ Validación de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa (qPCR).

La longitud de los telómeros se analizó, además, para un conjunto de muestras incluidas en los análisis citados anteriormente mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR), lo que permitió tanto validar los resultados de longitud telomérica obtenidos por TRF, como poner a punto una nueva técnica que permita una cuantificación de longitud de telómeros mucho más económica y rápida en comparación con la determinación por *southern-blot*. El análisis de la longitud telomérica mediante qPCR no permite conocer la medida de los telómeros en valores absolutos, sino que ofrece un valor de longitud relativo (conocido como *Ratio T/S*) con respecto a un ADN de referencia.

La técnica se aplicó en los estudios de tejidos colorrectales, tanto en muestras tumorales como en no tumorales, de 28 pacientes. La comparación entre ambas técnicas se realizó en base al grado de acortamiento telomérico de cada muestra tumoral con respecto a su muestra control (*Ratio T/N*). Para la técnica de la qPCR, el *Ratio T/N* se definió como el *ratio* entre la longitud relativa (*Ratio T/S*) de los telómeros de tejidos tumorales y la longitud relativa (*Ratio T/S*) de los telómeros de tejidos no tumorales. Para los análisis de correlaciones entre los *Ratios T/N* obtenidos mediante las técnicas de TRF y qPCR, los resultados obtenidos fueron normalizados mediante una transformación logarítmica de la función inversa, obteniéndose un valor de $r = 0,396$ ($p = 0,037$; Correlación de Pearson) (**Figura 4.3**).

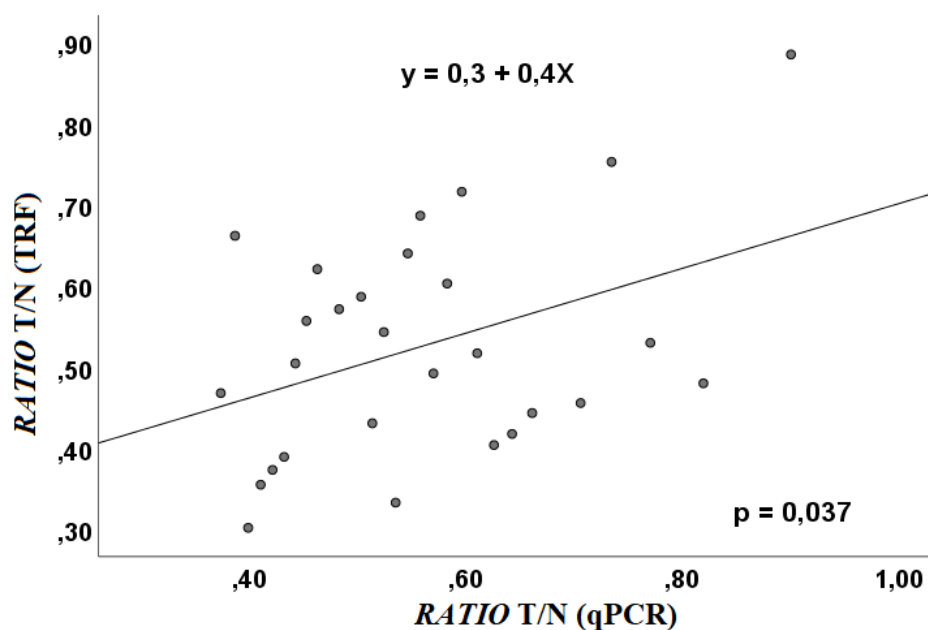


Figura 4.3.- Análisis de correlación entre los *Ratios* T/N de las longitudes teloméricas de tejidos tumorales y no tumorales obtenidas mediante TRF y qPCR. N° casos considerados: 28.

4.1.1.1. Longitud telomérica en tejidos colorrectales y variables clínico-patológicas.

El comportamiento de la longitud telomérica en tejidos colorrectales tumorales para las variables clínico-patológicas analizadas se muestra en la **Tabla 4.3**.

Se pudo observar que los tumores colorrectales de estadios avanzados (C y D de Dukes) mostraron unos valores medios de LTM superiores a los detectados en tumores de estadios tempranos (estadios A y B). Estos valores fueron de $6,38 \pm 0,29$ kb (media \pm error estándar) para tumores de estadios C y D, y $5,44 \pm 0,22$ kb (media \pm error estándar) para tumores de estadios A y B de Dukes, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,013$; Kruskal-Wallis).

Tabla 4.3.- Valores medios de la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas.

	Nº casos	LTM T ¹ (Media ± EE ²)	p
SEXO	141	5,84 ± 0,17	
MUJER	75	5,57 ± 0,23	0,082
HOMBRE	66	6,16 ± 0,25	*
ESTADIO DE DUKES	131	5,84 ± 0,18	
A	17	4,96 ± 0,37	
B	59	5,58 ± 0,26	0,052
C	36	6,55 ± 0,39	#
D	19	6,08 ± 0,42	
ESTADIO DE DUKES AGRUPADO	131	5,84 ± 0,18	
A, B	76	5,44 ± 0,22	0,013
C, D	55	6,38 ± 0,29	*
LOCALIZACIÓN TUMORAL	134	5,81 ± 0,17	
COLON DERECHO	41	5,12 ± 0,22	0,040
COLON IZQUIERDO	30	5,97 ± 0,44	#
RECTO	63	6,18 ± 0,26	

¹Longitud Telomérica Media tumoral; ²Error Estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

También se detectó que los tumores con un origen en el colon derecho mostraban una longitud telomérica más corta ($5,12 \pm 0,22$ kb; media \pm error estándar) al comparar su tamaño con tumores originados en el colon izquierdo ($5,97 \pm 0,44$ kb; media \pm error estándar) o recto ($6,18 \pm 0,26$ kb; media \pm error estándar), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,040$; Kruskal-Wallis) (**Tabla 4.3**).

La **Tabla 4.4** recoge los resultados correspondientes a las variables de tumor primario (T), invasión ganglionar (N) y metástasis (M). Los tumores con elevada invasión local (T3 y T4) presentaron telómeros más largos que los tumores de menor invasión (T1 y T2), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,021$; U de Mann-Whitney): valores medios de LTM de $5,72 \pm 0,26$ kb vs. $4,54 \pm 0,24$ kb (media \pm error estándar).

Tabla 4.4.- Valores medios de la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas.

	Nº casos	LTM T ¹ (Media ± EE ²)	p
TUMOR PRIMARIO (T)	68	5,48 ± 0,22	
T1	2	3,44 ± 0,21	0,058 #
T2	12	4,73 ± 0,23	
T3	44	5,88 ± 0,30	
T4	10	5,05 ± 0,42	
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	68	5,48 ± 0,22	0,021 *
T1, T2	14	4,54 ± 0,24	
T3, T4	54	5,72 ± 0,26	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	76	5,67 ± 0,22	
N0	47	5,29 ± 0,24	0,232 #
N1	14	6,01 ± 0,61	
N2	13	6,71 ± 0,66	
N3	2	5,55 ± 0,64	
INVASIÓN GANGLIONAR (N) AGRUPADA	76	5,67 ± 0,22	0,080 *
N0, N1	61	5,45 ± 0,23	
N2, N3	15	6,56 ± 0,58	
METÁSTASIS (M)	77	5,55 ± 0,21	
M0	58	5,38 ± 0,24	0,141 *
M1	19	6,08 ± 0,42	

¹Longitud Telomérica Media tumoral; ²Error Estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Al comparar los *Ratios* T/N para las distintas variables clínico-patológicas incluidas en el estudio no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 4.5**).

Tabla 4.5.- Valores medios del *Ratio* T/N, en relación con las variables clínico-patológicas.

	Nº casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ¹)	p
SEXO	132	0,80 ± 0,02	
MUJER	70	0,76 ± 0,03	0,069
HOMBRE	62	0,84 ± 0,03	*
ESTADIO DE DUKES	122	0,79 ± 0,02	
A	17	0,72 ± 0,04	
B	56	0,78 ± 0,03	0,256
C	30	0,86 ± 0,05	#
D	19	0,80 ± 0,04	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	125	0,80 ± 0,02	
COLON DERECHO	37	0,76 ± 0,03	
COLON IZQUIERDO	27	0,74 ± 0,05	0,076
RECTO	61	0,85 ± 0,03	#

¹Error Estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

4.1.1.2. Actividad telomerasa en tejidos colorrectales y variables clínico-patológicas.

La actividad telomerasa se evaluó en los tejidos colorrectales tumorales para las diferentes variables clínico-patológicas consideradas en el estudio (resultados mostrados en la **Tablas 4.6**). Respecto a la localización tumoral, en los tumores originados en el colon derecho se detectó un menor número de casos con actividad telomerasa positiva (56,7%; 29 casos de 51) que en tumores generados en colon izquierdo (81,1%; 30 casos de 37) o en el recto (85,5%; 65 casos de 76). Las diferencias fueron estadísticamente significativas, con un valor de $p = 0,001$ (test Chi-cuadrado).

Tabla 4.6.- Actividad telomerasa en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas.

	N° casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		p *
		NEGATIVA	POSITIVA	
SEXO	172	43	129	
MUJER	86	20	66	0,597
HOMBRE	86	23	63	
ESTADIO DE DUKES	162	41	121	
A	21	3	18	0,518
B	66	16	50	
C	44	12	32	
D	31	10	21	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	164	40	124	
COLON DERECHO	51	22	29	0,001
COLON IZQUIERDO	37	7	30	
RECTO	76	11	65	

*Test Chi-cuadrado.

En tumores de gran extensión hacia capas internas (T3 y T4) se detectó una reactivación de la enzima en el 60% de los casos (38 casos de 63), en comparación con el 100% de casos con actividad telomerasa positiva en tumores sin una invasión tan avanzada (T1 y T2) (13 casos), diferencias que fueron estadísticamente significativas ($p = 0,006$; test Chi-cuadrado) (mostrado en la **Tabla 4.7**)

Tabla 4.7.- Actividad telomerasa en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas.

	N° casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		p *
		NEGATIVA	POSITIVA	
TUMOR PRIMARIO (T)	76	25	51	
T1	2	0	2	0,010
T2	11	0	11	
T3	48	16	32	
T4	15	9	6	
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	76	25	51	
T1, T2	13	0	13	0,006
T3, T4	63	25	38	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	84	27	57	
N0	51	14	37	0,324
N1	17	8	9	
N2	16	5	11	
METÁSTASIS (M)	93	30	63	
M0	62	20	42	1
M1	31	10	21	

*Test Chi-cuadrado.

4.1.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN PACIENTES CON CÁNCER COLORRECTAL (CCR) EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Para conocer el posible efecto que el IMC pueda ejercer sobre la función telomérica en los tejidos colorrectales, se analizaron la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa considerando los diferentes grupos en función de su IMC (normopeso, sobrepeso y obesidad).

Para la LTM, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en relación con el IMC (**Tabla 4.8** mostrada a continuación):

Tabla 4.8.- Valores medios de la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorectales tumorales y no tumorales, en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	N° casos	LTM T ¹ (Media ± EE ³)	p	N° casos	LTM NT ² (Media ± EE ³)	p
IMC⁴	92	5,63 ± 0,21		91	7,53 ± 0,21	
NORMOPESO	27	5,65 ± 0,44	0,433	27	7,32 ± 0,40	0,648
SOBREPESO	39	5,41 ± 0,31	#	36	7,73 ± 0,33	#
OBESIDAD	26	5,95 ± 0,38		28	7,46 ± 0,41	
IMC⁴ AGRUPADO	92	5,63 ± 0,21		91	7,53 ± 0,21	
NORMOPESO	27	5,65 ± 0,44	0,830	27	7,32 ± 0,40	0,458
SOBREPESO Y OBESIDAD	65	5,63 ± 0,24	*	64	7,61 ± 0,26	*
IMC⁴ AGRUPADO	92	5,63 ± 0,21		91	7,53 ± 0,21	
OBESIDAD	26	5,95 ± 0,38	0,210	28	7,46 ± 0,41	0,853
NORMOPESO	66	5,51 ± 0,26	*	63	7,55 ± 0,25	*
Y SOBREPESO						

¹Longitud Telomérica Media tumoral; ²Longitud Telomérica Media no tumoral; ³Error Estándar; ⁴Índice de Masa Corporal; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Los resultados para el *Ratio* T/N (mostrados en la **Tabla 4.9**) indicaron que los pacientes con obesidad tenían valores más elevados ($0,84 \pm 0,05$; media \pm error estándar) que los pacientes con normopeso y sobrepeso ($0,74 \pm 0,03$; media \pm error estándar), con diferencias al límite de la significación estadística ($p = 0,064$; U de Mann-Whitney).

Tabla 4.9.- Valores medios del *Ratio* T/N, en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	N° casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ¹)	p
IMC²	88	0,77 ± 0,02	
NORMOPESO	27	0,77 ± 0,04	0,142
SOBREPESO	35	0,73 ± 0,04	#
OBESIDAD	26	0,84 ± 0,05	
IMC² AGRUPADO	88	0,77 ± 0,02	
NORMOPESO	27	0,77 ± 0,04	0,860
SOBREPESO Y OBESIDAD	61	0,78 ± 0,03	*
IMC² AGRUPADO	88	0,77 ± 0,02	
OBESIDAD	26	0,84 ± 0,05	0,064
NORMOPESO Y SOBREPESO	62	0,74 ± 0,03	*

¹Error Estándar; ²Índice de Masa Corporal; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Los resultados de los análisis de correlación entre la LTM de tejidos colorrectales tumorales y no tumorales en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad se indican en la **Figura 4.4**, con valores de $r = 0,793$ ($p < 0,001$; Rho de Spearman) para pacientes con normopeso, $r = 0,386$ ($p = 0,022$; Rho de Spearman) para pacientes con sobrepeso, y $r = 0,417$ ($p = 0,034$; Rho de Spearman) para pacientes con obesidad.

La actividad telomerasa no mostró diferencias estadísticamente significativas en el número de casos con reactivación de la telomerasa entre los grupos de pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad (**Tabla 4.10**).

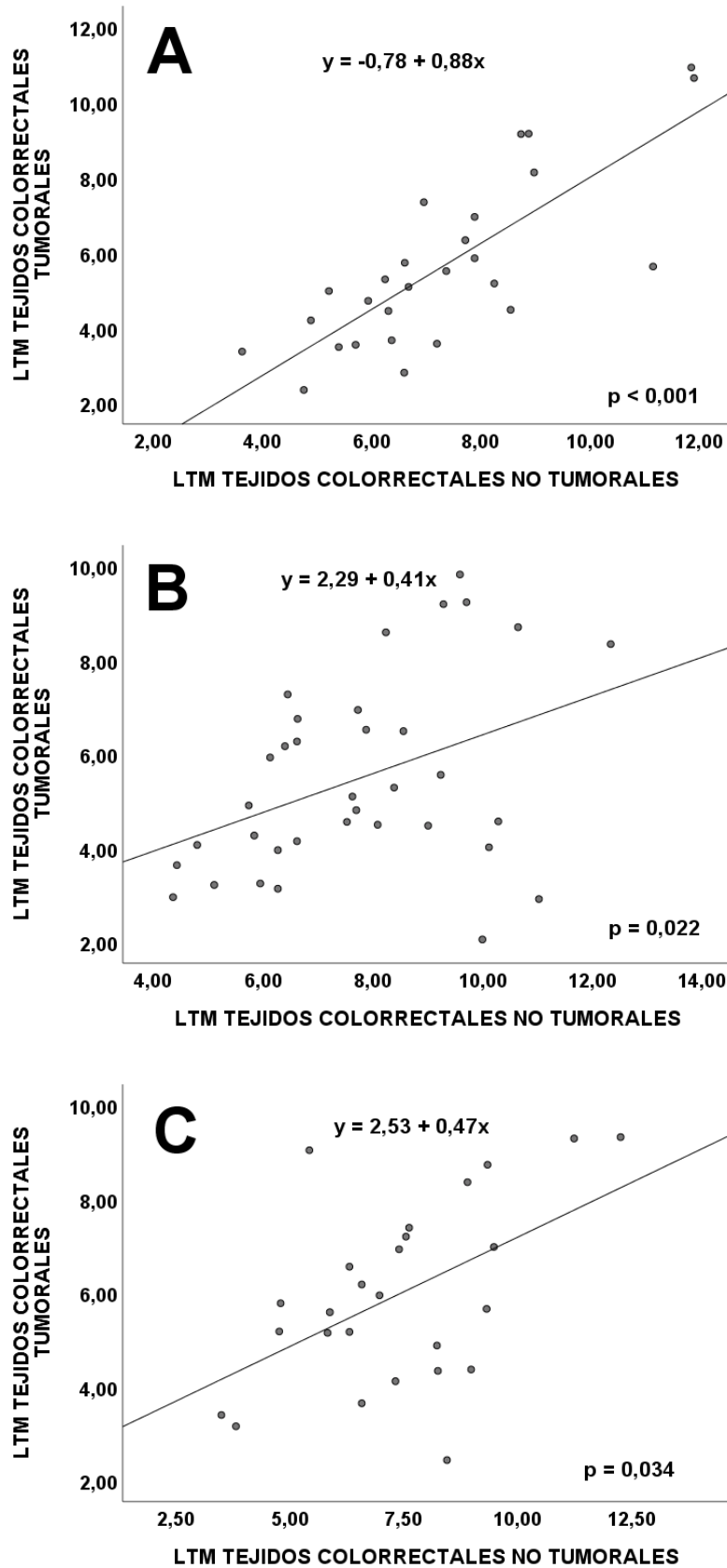


Figura 4.4.- Análisis de correlación entre la Longitud Telomérica Media (LTM) de tejidos colorrectales tumorales y no tumorales en pacientes con normopeso (A), sobrepeso (B) y obesidad (C) afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). N° casos considerados: 27, 35 y 26, respectivamente.

Tabla 4.10.- Actividad Telomerasa en tejidos colorrectales tumorales, en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	N° casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		p *
		NEGATIVA	POSITIVA	
IMC¹	113	32	81	
NORMOPESO	29	8	21	0,908
SOBREPESO	52	14	38	
OBESIDAD	32	10	22	
IMC¹ AGRUPADO	113	32	81	
NORMOPESO	29	8	21	0,919
SOBREPESO Y OBESIDAD	84	24	60	
IMC¹ AGRUPADO	113	32	81	
OBESIDAD	32	10	22	0,664
NORMOPESO Y SOBREPESO	81	22	59	

¹Índice de Masa Corporal; *test Chi-cuadrado.

4.1.2.1. Longitud telomérica en tejidos de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR) en relación con las variables clínico-patológicas y el Índice de Masa Corporal (IMC).

El estudio del tamaño de los telómeros con respecto al IMC para las diferentes variables clínico-patológicas se llevó a cabo mediante el análisis de la LTM tumoral dentro de cada grupo de pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad.

En tejidos tumorales, las diferencias entre la LTM para las variables clínico-patológicas en función de cada grupo de IMC no fueron estadísticamente significativas (datos mostrados en la **Tabla 4.11**). En pacientes con normopeso, los tumores de estadios avanzados (C y D de Dukes) mostraron una LTM más elevada que los tumores de estadios tempranos (estadios A y B), y también se observó que los tumores originados en colon izquierdo tuvieron una longitud telomérica superior que los de colon derecho o recto, aunque ambas diferencias no alcanzaron valores de significación estadística ($p = 0,084$ y $0,098$; U de Mann Whitney y Kruskal-Wallis, respectivamente).

Tabla 4.11.- Valores medios de la Longitud Telomérica Media (LTM) en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	LTM T ² (Media ± EE ³)	P	Nº casos	LTM T ² (Media ± EE ³)	P	Nº casos	LTM T ² (Media ± EE ³)	P
SEXO	27	5,65 ± 0,44		39	5,41 ± 0,31		26	5,95 ± 0,38	
MUJER	13	5,10 ± 0,58	0,169	19	5,43 ± 0,42	0,555	19	5,66 ± 0,46	0,193
HOMBRE	14	6,16 ± 0,64	*	20	5,39 ± 0,48	*	7	6,76 ± 0,65	*
ESTADIO DE DUKES	27	5,65 ± 0,44		39	5,41 ± 0,31		25	5,99 ± 0,40	
A	4	4,45 ± 0,36		3	3,91 ± 0,39		5	5,28 ± 1,06	
B	12	4,97 ± 0,42	0,353	28	5,41 ± 0,38	0,163	10	6,13 ± 0,58	0,603
C	10	6,95 ± 0,96	#	7	6,29 ± 0,74	#	9	6,09 ± 0,72	#
D	1	5,63		1	3,64		1	7,2	
ESTADIO DE DUKES AGRUPADO	27	5,65 ± 0,44		39	5,41 ± 0,31		25	5,99 ± 0,40	
A, B	16	4,84 ± 0,33	0,084	31	5,27 ± 0,35	0,404	15	5,84 ± 0,51	0,579
C, D	11	6,83 ± 0,88	*	8	5,95 ± 0,72	*	10	6,20 ± 0,66	*
LOCALIZACIÓN TUMORAL	27	5,65 ± 0,44		39	5,41 ± 0,31		25	5,99 ± 0,40	
COLON DERECHO	8	4,56 ± 0,43	0,098	13	5,37 ± 0,45	0,784	8	5,22 ± 0,49	0,333
COLON IZQUIERDO	9	6,88 ± 0,98	#	13	5,01 ± 0,48	#	5	5,89 ± 0,89	#
RECTO	10	5,42 ± 0,61		13	5,84 ± 0,69		12	6,54 ± 0,66	

¹Índice de Masa Corporal; ²Longitud Telomérica Media tumoral; ³Error Estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Los análisis para el *Ratio* T/N tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas para las variables clínico-patológicas en ninguno de los tres grupos de IMC, como se indica en la **Tabla 4.12**.

Tabla 4.12.- Valores medios del *Ratio* T/N, en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>RATIO</i> T/N (Media ± EE ²)	P
SEXO	27	0,77 ± 0,04		35	0,73 ± 0,04		26	0,84 ± 0,05	
MUJER	13	0,71 ± 0,05	0,133	18	0,74 ± 0,06	0,644	19	0,80 ± 0,05	0,470
HOMBRE	14	0,82 ± 0,05	*	17	0,71 ± 0,05	*	7	0,96 ± 0,13	*
ESTADIO DE DUKES	27	0,77 ± 0,04		35	0,73 ± 0,04		25	0,84 ± 0,06	
A	4	0,75 ± 0,05	0,545	3	0,62 ± 0,01	0,371	5	0,75 ± 0,08	0,710
B	12	0,76 ± 0,05	#	27	0,71 ± 0,05	#	10	0,85 ± 0,06	#
C	10	0,80 ± 0,06		4	0,89 ± 0,09		9	0,87 ± 0,13	
D	1	0,5		1	0,82		1	0,95	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	27	0,77 ± 0,04		35	0,73 ± 0,04		25	0,84 ± 0,06	
COLON DERECHO	8	0,74 ± 0,05		10	0,75 ± 0,09		8	0,80 ± 0,07	
COLON IZQUIERDO	9	0,78 ± 0,07	0,906	12	0,62 ± 0,06	0,124	5	0,80 ± 0,11	0,776
RECTO	10	0,77 ± 0,06	#	13	0,80 ± 0,04	#	12	0,88 ± 0,10	#

¹Índice de Masa Corporal; ²Error Estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

4.1.2.2. Actividad telomerasa en tejidos de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR) en relación con las variables clínico-patológicas y el Índice de Masa Corporal (IMC).

La actividad telomerasa también fue estudiada para las diferentes variables clínico-patológicas en relación con el IMC, analizándose dentro de cada grupo de pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad. Los resultados se recogen en la **Tabla 4.13**.

En la población de pacientes con sobrepeso, se detectó un menor número de casos con actividad telomerasa positiva en tumores originados en el colon derecho frente a los de colon izquierdo o recto: 52,6% de reactivación (10 casos de 19) para tumores originados en colon derecho; 93,8% (15 casos de 16) para los de colon izquierdo, y 76,5% (13 casos de 17) para tumores de recto ($p = 0,022$; test Chi-cuadrado). En pacientes con obesidad, se observó que los tumores con un origen en el recto reactivaban en un porcentaje superior la telomerasa (87,5%; 14 casos de 16) en comparación con los de colon derecho (50%; 5 casos de 10) o izquierdo (40%; 2 casos de 5), con diferencias que también fueron estadísticamente significativas ($p = 0,048$; test Chi-cuadrado).

Tabla 4.13.- Actividad telomerasa en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO				IMC ¹ SOBREPESO				IMC ¹ OBESIDAD			
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		P *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		P *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		P *
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
SEXO	29	8	21		52	14	38		32	10	22	
MUJER	14	4	10	0,909	25	6	19	0,647	20	7	13	0,555
HOMBRE	15	4	11		27	8	19		12	3	9	
ESTADIO DE DUKES	29	8	21		52	14	38		31	10	21	
A	5	1	4		5	0	5		5	0	5	
B	11	3	8	0,436	34	8	26	0,122	11	5	6	0,352
C	10	2	8		9	5	4		12	4	8	
D	3	2	1		4	1	3		3	1	2	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	29	8	21		52	14	38		31	10	21	
COLON DERECHO	9	4	5		19	9	10		10	5	5	
COLON IZQUIERDO	9	3	6	0,191	16	1	15	0,022	5	3	2	0,048
RECTO	11	1	10		17	4	13		16	2	14	

¹Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

En la **Tabla 4.14** se incluyen los resultados obtenidos para la actividad telomerasa en relación con el IMC para las variables de tumor primario (T), invasión ganglionar (N) y metástasis (M). Para los pacientes con sobrepeso se detectó que los tejidos tumorales reactivaron la telomerasa en un 87% de los casos (20 casos de 23) en el caso de tumores sin invasión ganglionar (N0), en comparación con una reactivación en el 33% (2 casos de 6) y 60% (3 casos de 5) de los casos en tumores con invasión ganglionar (tipo N1 y N2, respectivamente). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,023$; test Chi-cuadrado).

Por su parte, en pacientes con obesidad se detectó un mayor porcentaje de reactivación de la enzima telomerasa en tumores con poca invasión hacia tejidos cercanos (T1 y T2) (100%; 4 casos totales) en comparación con tumores de elevada invasión (T3 y T4) (35,7%; 5 casos de 14), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre sí y con un valor de $p = 0,023$ (test Chi-cuadrado). También, en pacientes con obesidad, los tumores con invasión ganglionar (N2) reactivaron en una proporción mayor la enzima telomerasa, detectándose un 100% de casos con actividad telomerasa positiva (4 casos), frente a los tumores con menor grado de invasión ganglionar (N0 y N1) (41,2%; 7 casos de 17) ($p = 0,034$; test Chi-cuadrado). Todos estos resultados se indican en la **Tabla 4.14**.

Tabla 4.14.- Actividad telomerasa en tejidos colorrectales tumorales, en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA	p *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA	p *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA	p *
TUMOR PRIMARIO (T)	19	7	12	32	8	24	18	9	9
T1	-	-	-	1	0	1	1	0	1
T2	4	0	0,225	3	0	3	3	0	3
T3	11	5		23	5	18	8	5	3
T4	4	2		5	3	2	6	4	2
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	19	7	12	32	8	24	18	9	9
T1, T2	4	0	0,086	4	0	4	4	0	4
T3, T4	15	7		28	8	20	14	9	5
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	19	7	12	32	8	24	18	9	9
T4	4	2	0,539	5	3	2	6	4	2
T1, T2, T3	15	5		27	5	22	12	5	7
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	20	7	13	34	9	25	21	10	11
N0	14	5	0,478	23	3	20	12	6	6
N1	2	0		6	4	2	5	4	1
N2	4	2		5	2	3	4	0	4
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	20	7	13	34	9	25	21	10	11
AGRUPADA	16	5	11	29	7	22	17	10	7
N0, N1	4	2	0,482	5	2	3	4	0	4
N2	4	2		5	2	3	4	0	4
METÁSTASIS (M)	20	7	13	31	8	23	17	9	8
M0	17	5	0,212	27	7	20	14	8	6
M1	3	2		4	1	3	3	1	2

¹Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

4.1.3. ESTUDIOS PRONÓSTICO EN PACIENTES AFECTADOS DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR) EN RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA E ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Las curvas de supervivencia referentes a los estudios pronóstico incluidos en esta Tesis, para un total de 140 pacientes analizados, se expresaron en base al Intervalo Libre de Enfermedad (ILE), haciendo referencia al número de meses que transcurre desde la cirugía hasta la aparición de recidivas (tiempo de seguimiento medio de 60 meses). Aquellos pacientes que no recidivaron durante dicho periodo o con los que se perdió el contacto antes del intervalo de tiempo establecido, fueron censurados. Por su parte, los sujetos con cánceres en estadio D o fallecidos durante el periodo postoperatorio se excluyeron de los estudios.

La identificación del posible papel que la longitud telomérica puede tener como factor pronóstico en el CCR es uno de los objetivos principales de esta tesis. Comenzando con la LTM de los tejidos tumorales, el primer paso fue calcular un punto de corte que dividiese a la población en dos subgrupos con diferente pronóstico clínico. A través de la aplicación *Cutoff Finder*, este punto de corte se situó en un valor medio de LTM de 6,5 kb, generándose así dos poblaciones con diferencias estadísticamente significativas en cuanto al pronóstico clínico: los pacientes con tumores con una LTM tumoral inferior a 6,5 kb tuvieron una mejor evolución clínica de la enfermedad que los pacientes con telómeros tumorales más largos, con un valor de $p = 0,002$ (Log-Rank). Para este estudio de supervivencia se consideraron 110 pacientes: en el subgrupo de pacientes con una LTM tumoral inferior a 6,5 kb (73 pacientes) se observaron 3 casos que recidivaron, en comparación con el subgrupo con tumores de LTM tumoral igual o superior a 6,5 kb (36 pacientes), que tuvo 8 casos de recurrencia tumoral. Las curvas de supervivencia son las representadas en la **Figura 4.5**.

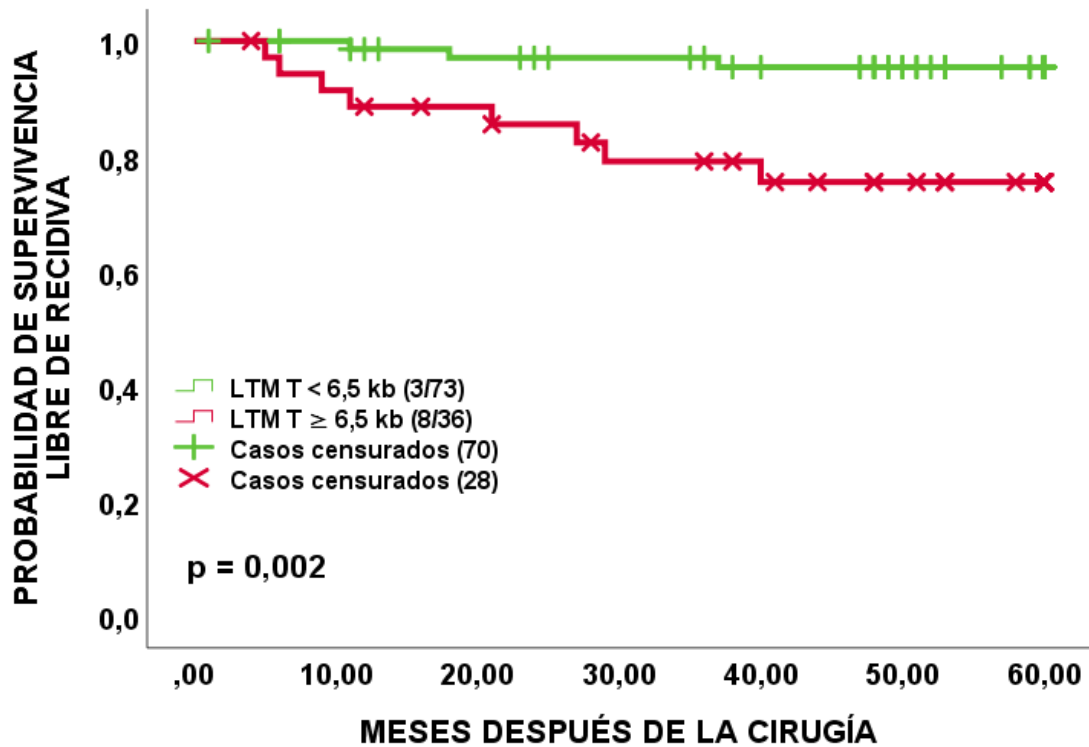


Figura 4.5.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media Tumoral (LTM T) de tejidos colorrectales en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Para comprobar si estas diferencias en el pronóstico son independientes de otras variables clínico-patológicas relacionadas con la progresión de la enfermedad, como puede ser el estadio de Dukes (el análisis univariable indicó una asociación entre el estadio de Dukes y el pronóstico clínico de los pacientes, con un valor de $p < 0,001$), se realizó el análisis multivariable de Cox (recogido en la **Tabla 4.15**), el cual confirmó que la mejora en la evolución del CCR de pacientes con una LTM tumoral inferior a 6,5 kb es independiente del estadio de Dukes, protegiendo hasta casi 5 veces de la recidiva ($RR = 0,220$) a aquellos pacientes con tumores de dicho tamaño telomérico ($p = 0,026$; Regresión de Cox).

Tabla 4.15.- Análisis multivariable de Cox considerando el estadio de Dukes y la Longitud Telomérica Media Tumoral (LTM T) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	p	RR*	IC**
Estadio de Dukes (A y B vs. C)	0,015	0,047	0,006 – 0,370
LTM T ¹ (< 6,5 kb vs. ≥ 6,5 kb)	0,026	0,022	0,058 – 0,833

*Riesgo Relativo; **Intervalo de Confianza; ¹Longitud Telomérica Media tumoral.

A continuación, se procedió al estudio de la posible implicación que los tejidos colorectales no tumorales pueden tener en la evolución del CCR. Se calculó un punto de corte crítico para la LTM no tumoral que generase dos subpoblaciones con pronóstico clínico diverso, registrándose un valor de 7,1 kb: aquellos pacientes con una LTM no tumoral inferior a 7,1 kb tuvieron una mejor evolución clínica que los pacientes con valores de LTM no tumoral iguales o superiores, diferencias que fueron estadísticamente significativa ($p = 0,009$; Log-Rank). Para este estudio, se analizaron 104 pacientes, dentro de los cuales el subgrupo con una LTM no tumoral inferior a 7,1 kb (49 pacientes) sólo tuvo 1 caso de recidiva tumoral, y en el subgrupo con LTM no tumoral igual o superior a 7,1 kb (55 pacientes) se identificaron 9 eventos de recaída de la enfermedad (**Figura 4.6**).

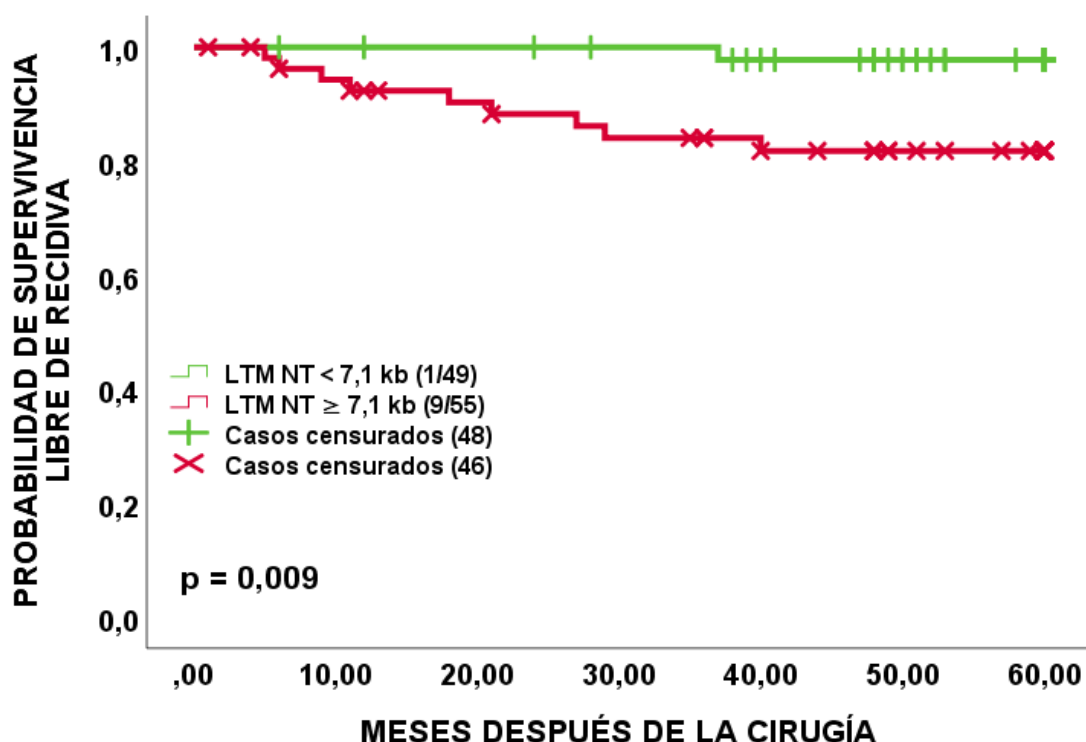


Figura 4.6.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media No Tumoral (LTM NT) de tejidos colorrectales en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).
Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

El análisis multivariable de Cox demostró que los telómeros de tejidos colorrectales no tumorales más acortados (LTM no tumoral inferior a 7,1 kb) confieren al paciente un mejor pronóstico independientemente del estadio de Dukes del tumor, otorgando una protección frente a la recidiva de hasta casi 10 veces (RR = 0,111) (p = 0,038; Regresión de Cox) (**Tabla 4.16**).

Tabla 4.16.- Análisis multivariable de Cox considerando el estadio de Dukes y la Longitud Telomérica Media No Tumoral (LTM NT) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	p	RR*	IC**
Estadio de Dukes (A y B vs. C)	0,009	0,039	0,005 – 0,312
LTM NT ¹ (< 7,1 kb vs. ≥ 7,1 kb)	0,038	0,111	0,014 – 0,882

*Riesgo Relativo; **Intervalo de Confianza; ¹Longitud Telomérica Media no tumoral.

Los estudios pronóstico para la actividad telomerasa, representados en la **Figura 4.7**, revelaron una evolución clínica similar entre las subpoblaciones de pacientes con tumores que reactivaron o no la actividad telomerasa, sin diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,873$; Log-Rank): se evaluaron un total de 127 pacientes, en los cuales el subgrupo de pacientes con tumores sin actividad telomerasa (30 individuos) mostró 4 casos de recaída tumoral, y en el subgrupo de pacientes con tumores con actividad telomerasa positiva (97 pacientes) se detectaron 12 eventos de recidiva.

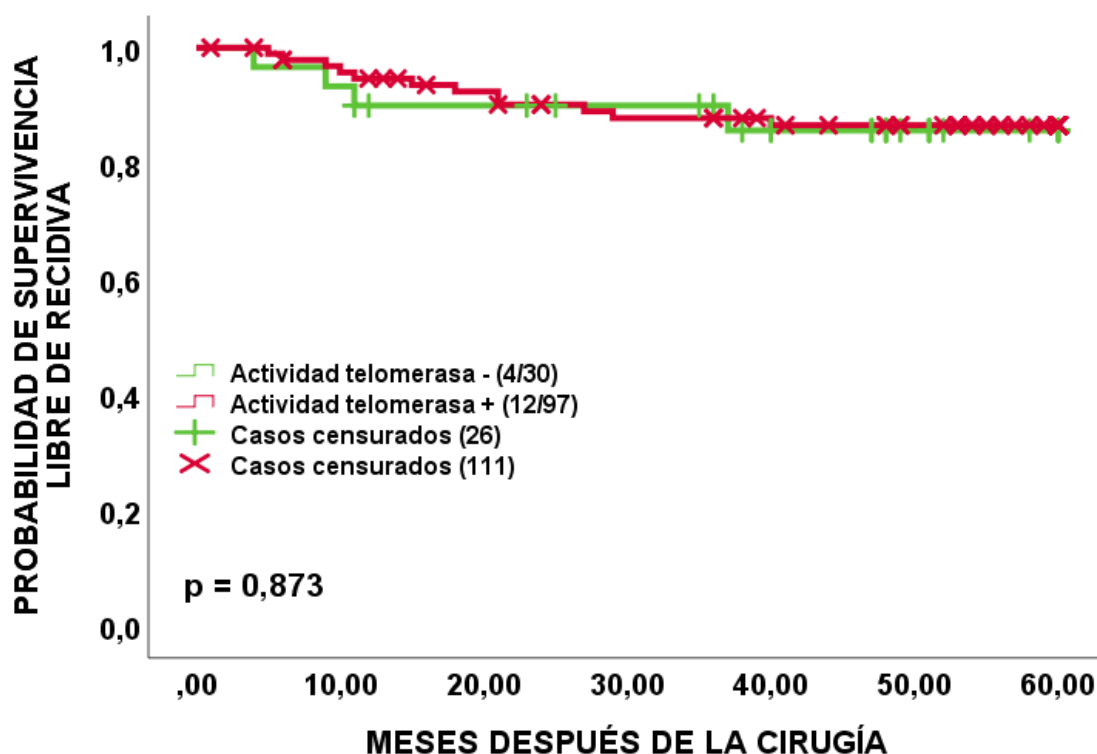


Figura 4.7.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la actividad telomerasa en tejidos tumorales en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

La implicación del IMC en el pronóstico clínico también fue evaluada en este trabajo. Para ello, se compararon entre sí los tres grupos establecidos para el IMC. Las curvas de supervivencia que compararon los tres grupos de IMC, representadas en la **Figura 4.8**, no indicaron diferencias significativas en el pronóstico clínico entre los tres subgrupos analizados ($p = 0,892$; Log-Rank). Para este análisis se incluyeron 110 pacientes: el subgrupo de pacientes con normopeso (30 pacientes) mostró 3 casos de recidiva, en el

subgrupo de pacientes con sobrepeso (49 pacientes) se detectaron 5 eventos de recaída, y en el subgrupo de pacientes con obesidad (31 pacientes) se observaron 4 casos de recurrencia tumoral.

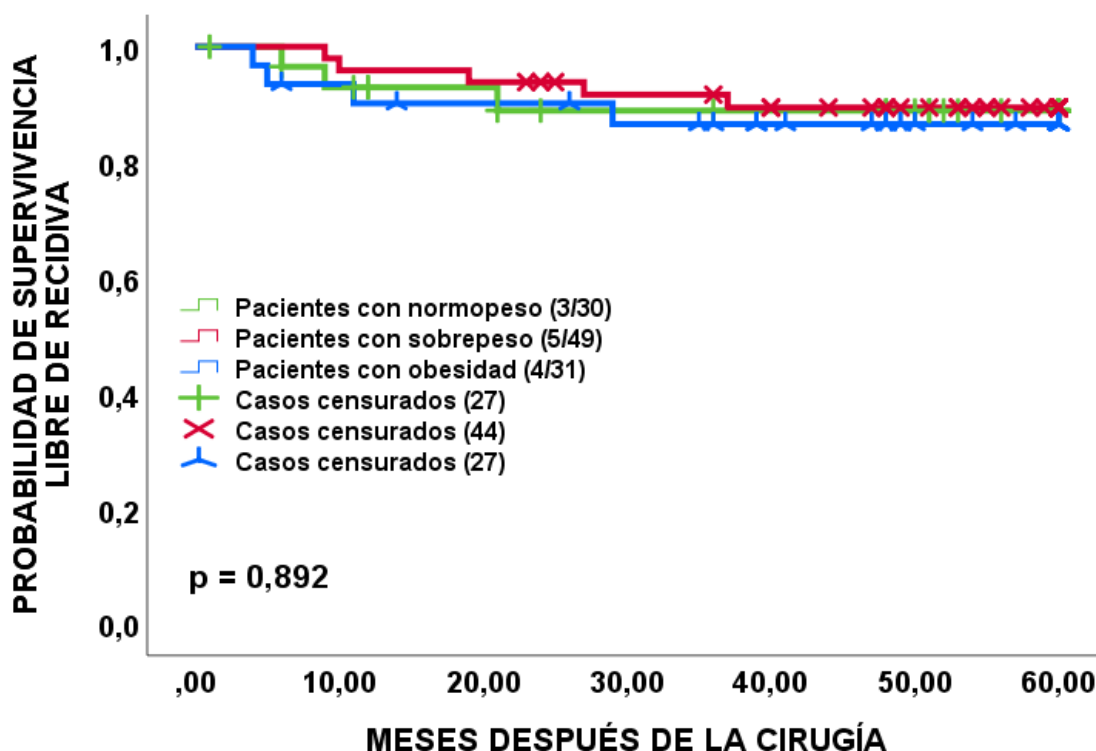


Figura 4.8.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Para identificar un posible valor de IMC que permitiese identificar grupos de pacientes con pronóstico clínico distinto, se procedió a calcular el punto de corte óptimo que generase dos subpoblaciones con una evolución clínica diferente, a través de la aplicación *Cutoff Finder*. Este punto de corte se localizó en un valor de IMC de 31,85 kg/m², indicando que aquellos pacientes con un IMC inferior tuvieron un mejor pronóstico clínico que los pacientes con valores de IMC iguales o superiores, con diferencias estadísticamente significativa ($p = 0,041$; Log-Rank). En el análisis se consideraron 110 individuos, identificándose en el subgrupo de pacientes con IMC inferior a 31,85 kg/m² (99 individuos) hasta 9 casos de recaída de la enfermedad, frente a los 3 casos de recidiva que se detectaron en el subgrupo de pacientes con un IMC igual o superior a 31,85 kg/m² (11 individuos) (**Figura 4.9**, a continuación).

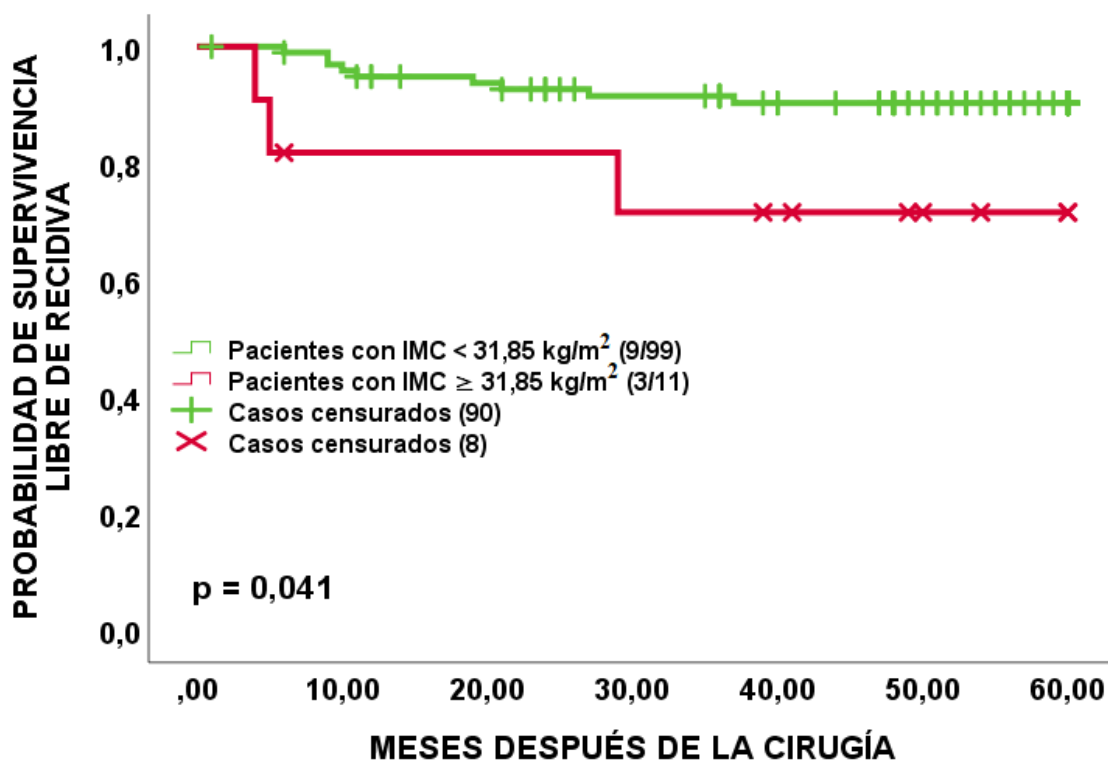


Figura 4.9.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando un Índice de Masa Corporal (IMC) de 31,85 kg/m² en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Sin embargo, el análisis multivariable de Cox no permitió establecer al IMC como un factor de pronóstico independiente del estadio de Dukes, ya que se obtuvo un valor de $p = 0,085$ (regresión de Cox), (**Tabla 4.17**).

Tabla 4.17.- Análisis multivariable de Cox considerando el estadio de Dukes y el Índice de Masa Corporal (IMC) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	p	RR*	IC**
Estadio de Dukes (A y B vs. C)	0,007	0,037	0,005 – 0,290
IMC ¹ (< 31,85 kg/m ² vs. ≥ 31,85 kg/m ²)	0,085	0,314	0,084 – 1,17

*Riesgo Relativo; **Intervalo de Confianza; ¹Índice de Masa Corporal.

Seguidamente se procedió a analizar el papel del IMC en el pronóstico clínico en función del sexo de los pacientes. En varones (representado en la **Figura 4.10**), un valor de IMC inferior a 31,85 kg/m² se relacionó con un mejor pronóstico clínico que valores

de IMC iguales o superiores ($p = 0,026$; Log-Rank). Este estudio de supervivencia incluyó a 50 pacientes varones, con 4 casos de recidiva tumoral en el subgrupo de pacientes con IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$ (45 individuos), y 2 eventos de recaída en el subgrupo con IMC igual o superior a $31,85 \text{ kg/m}^2$ (5 individuos).

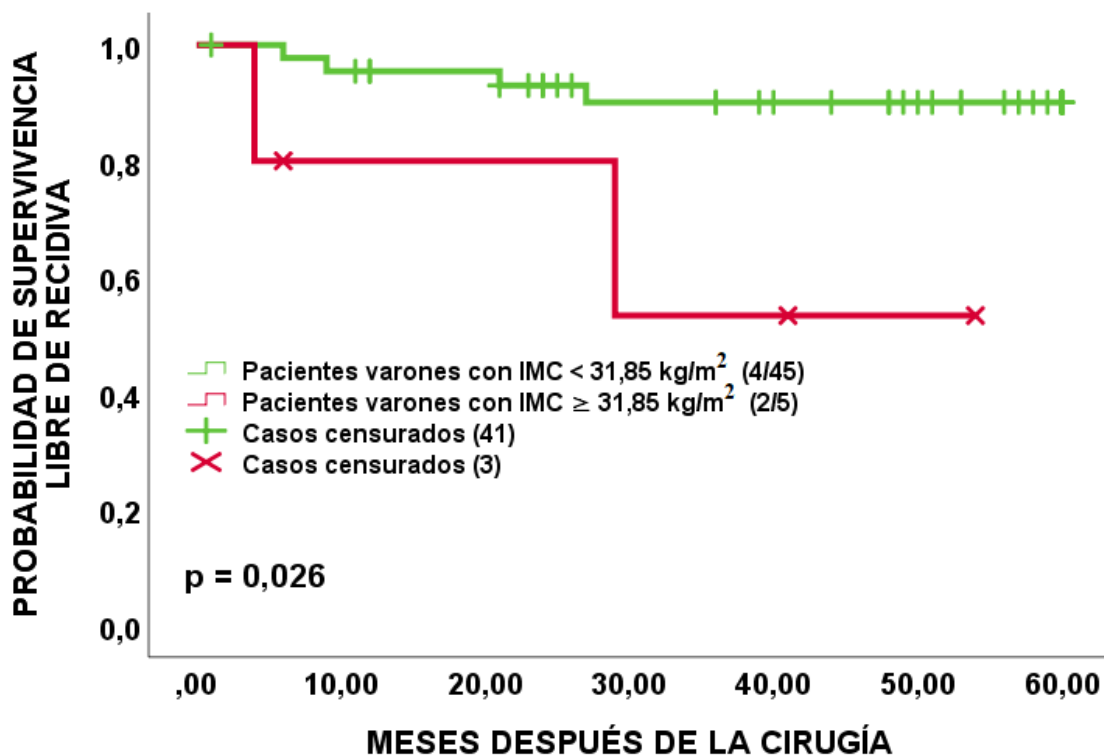


Figura 4.10.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) de $31,85 \text{ kg/m}^2$ en pacientes varones afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).
Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

En el grupo de pacientes varones, el análisis multivariable de Cox indicó que el IMC no es factor pronóstico independiente del estadio Dukes para el pronóstico del CCR ($p = 0,377$; regresión de Cox), como se muestra en la **Tabla 4.18**.

Tabla 4.18.- Análisis multivariable de Cox considerando el estadio de Dukes y el Índice de Masa Corporal (IMC) en pacientes varones afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	p	RR*	IC**
Estadio de Dukes (A y B vs. C)	0,140	0,106	0,011 – 0,976
IMC ¹ (< 31,85 kg/m ² vs. ≥ 31,85 kg/m ²)	0,377	0,452	0,078 – 2,630

*Riesgo Relativo; **Intervalo de Confianza; ¹Índice de Masa Corporal.

En mujeres, el desarrollo de la enfermedad no mostró diferencias estadísticamente significativas para un valor de IMC inferior o superior a 31,85 kg/m² (p = 0,529; Log-Rank). Este análisis contó con 60 pacientes mujeres, con 5 casos de recurrencia tumoral en el subgrupo de pacientes con IMC inferior a 31,85 kg/m² (54 pacientes), frente a un único evento de recidiva en el subgrupo de pacientes con IMC igual o superior (6 pacientes). Las curvas de supervivencia se indican en la **Figura 4.11**:

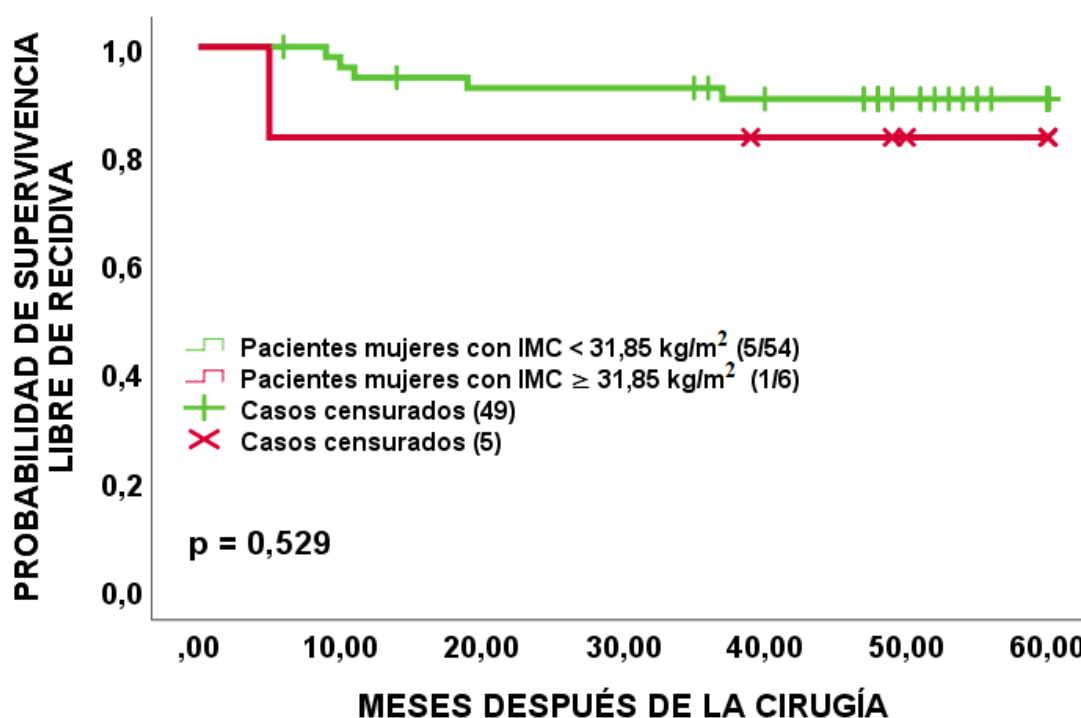


Figura 4.11.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) de 31,85 kg/m² en pacientes mujeres afectadas de Cáncer Colorrectal (CCR).

Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Una vez identificado el valor de IMC que confiere distinta evolución de la enfermedad, se procedió a analizar si el papel protector que los telómeros cortos otorgaban, tanto en los tejidos colorrectales tumorales como en los no tumorales, se mantenía dentro de pacientes con IMC inferior e igual o superior a 31,85 kg/m². Considerando individuos con IMC inferior a 31,85 kg/m², el acortamiento telomérico tumoral (LTM tumoral inferior a 6,5 kb) siguió relacionándose con una mejor evolución clínica, con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,026$; Log-Rank). En este estudio de supervivencia fueron incluidos 79 pacientes: el subgrupo de pacientes con LTM tumoral inferior a 6,5 kb (57 pacientes) sólo tuvo 2 eventos de recaída tumoral, frente a 4 casos de recidiva registrados en el subgrupo con LTM tumorales superiores (22 pacientes). Estos resultados se indican en la **Figura 4.12**:

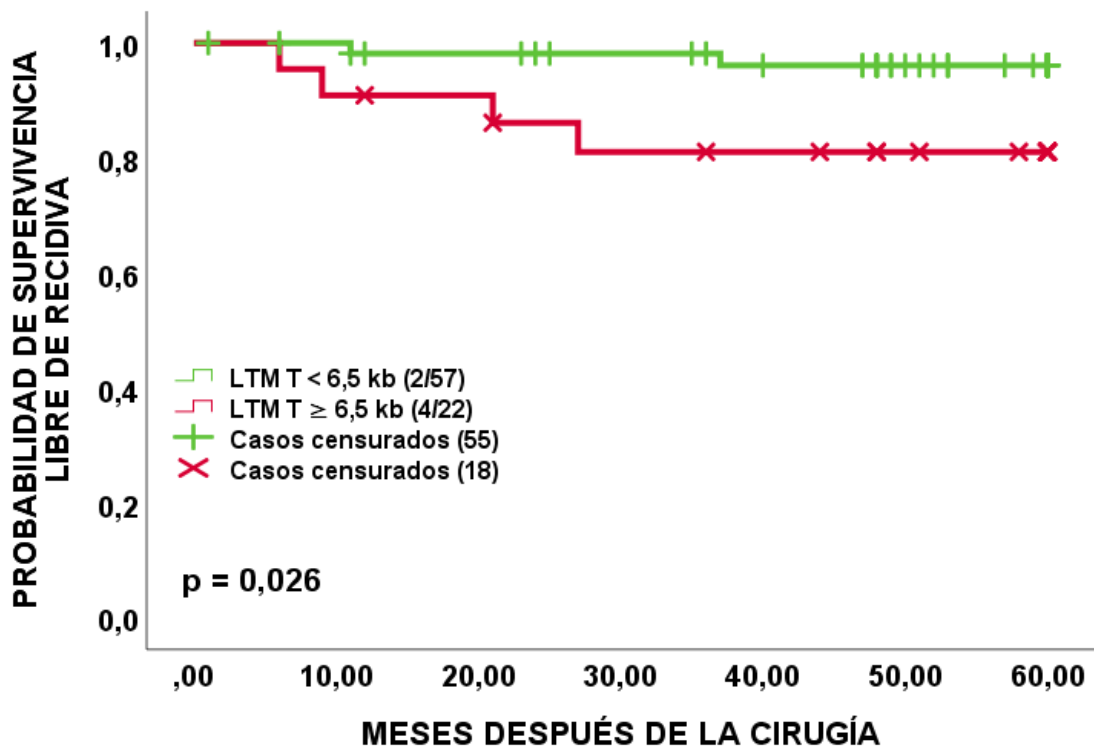


Figura 4.12.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media Tumoral (LTM T) de tejidos colorrectales en pacientes con Índice de Masa Corporal (IMC) inferior a 31,85 kg/m² afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

En este grupo de pacientes, el análisis multivariable de Cox mostró que una LTM tumoral inferior a 6,5 kb es un factor pronóstico independiente del estadio de Dukes,

proporcionando una protección de más de 6 veces frente a la recaída tumoral que telómeros más largos ($p = 0,037$; regresión de Cox) (**Tabla 4.19**):

Tabla 4.19.- Análisis multivariable de Cox considerando el estadio de Dukes y la Longitud Telomérica Media Tumoral (LTM T) en pacientes con IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$, afectados de Cáncer Colo-rectal (CCR).

	p	RR*	IC**
Estadio de Dukes (A y B vs. C)	0,043	0,062	0,007 – 0,544
LTM T ¹ (< 6,5 kb vs. $\geq 6,5$ kb)	0,037	0,160	0,029 – 0,893

*Riesgo Relativo; **Intervalo de Confianza; ¹Longitud Telomérica Media tumoral.

En el mismo grupo de pacientes (IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$), las dos subpoblaciones resultantes de la aplicación del punto de corte obtenido en la LTM no tumoral (7,1 kb) no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre sí con respecto a la evolución clínica de la enfermedad ($p = 0,105$; Log-Rank). Se consideraron 78 pacientes, con un solo caso de recidiva en el subgrupo de LTM no tumoral inferior a 7,1 kb (36 pacientes), y 5 casos de recurrencia en el subgrupo de pacientes con LTM no tumoral igual o superior a 7,1 kb (42 pacientes). Las curvas de supervivencia se muestran en la **Figura 4.13**:

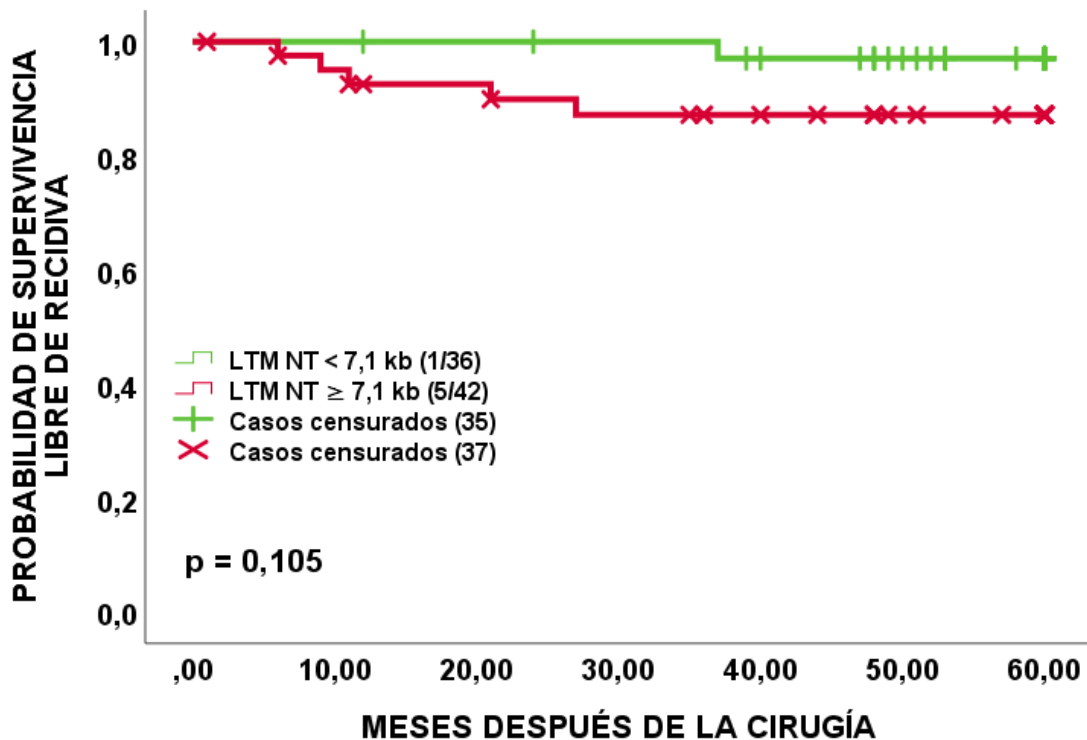


Figura 4.13.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media No Tumoral (LTM NT) de los tejidos colorrectales en pacientes con Índice de Masa Corporal (IMC) inferior a 31,85 kg/m² en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Para la población con IMC igual o superior a 31,85 kg/m², ninguno de los puntos de corte obtenidos respecto a la LTM tumoral (6,5 kb) y no tumoral (7,1 kb) permitieron detectar subpoblaciones con diferencias estadísticamente significativas en el pronóstico clínico ($p = 0,157$ para LTM tumoral y $p = 0,295$ para LTM no tumoral; Log-Rank).

En el estudio de la LTM tumoral de tejidos colorrectales se analizaron un total de 8 pacientes, sin ningún caso de recidiva en el subgrupo de pacientes con una LTM tumoral inferior a 6,5 kb (4 pacientes), y 2 eventos de recaída de la enfermedad en el subgrupo con una LTM mayor (4 pacientes), tal y como se representa en la **Figura 4.14:**

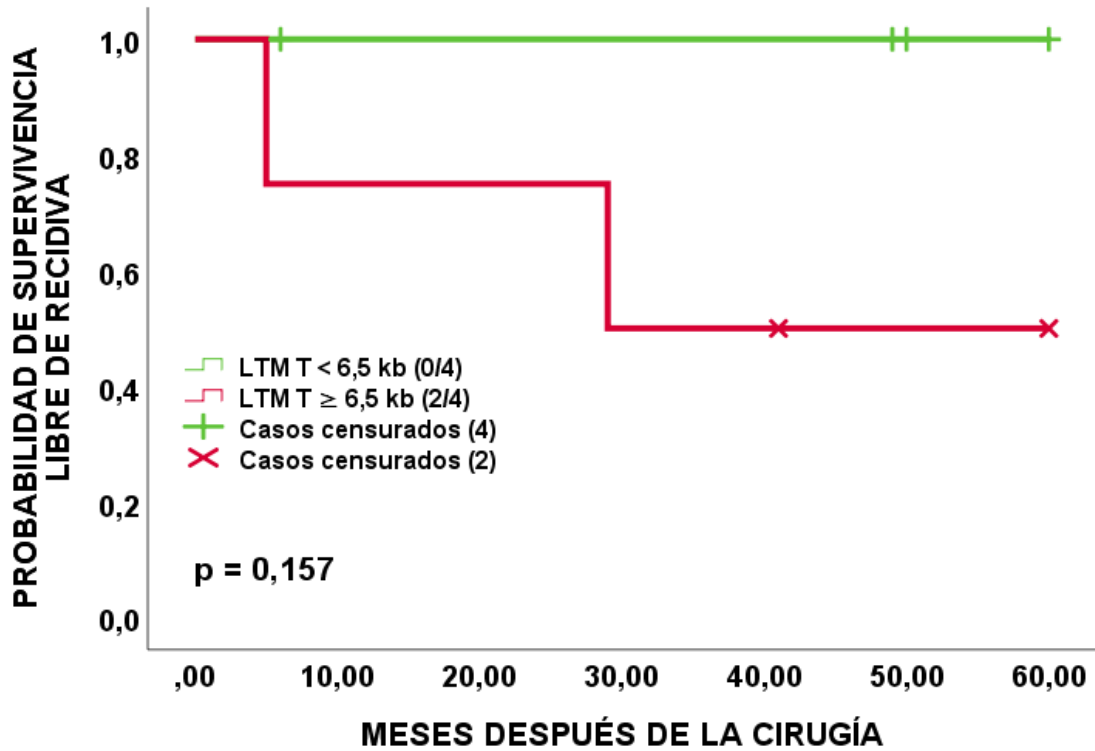


Figura 4.14.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media Tumoral (LTM T) de tejidos colorrectales en pacientes con Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 31,85 kg/m² afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Para la LTM no tumoral, los estudios de supervivencia en pacientes con IMC igual o superior a 31,85 kg/m² incluyeron 8 pacientes, sin ningún caso de recidiva en el subgrupo de pacientes con LTM no tumoral inferior a 7,1 kb (3 pacientes), y 2 casos de recurrencia en el subgrupo con LTM no tumoral igual o superior a 7,1 kb (5 pacientes) (**Figura 4.15**).

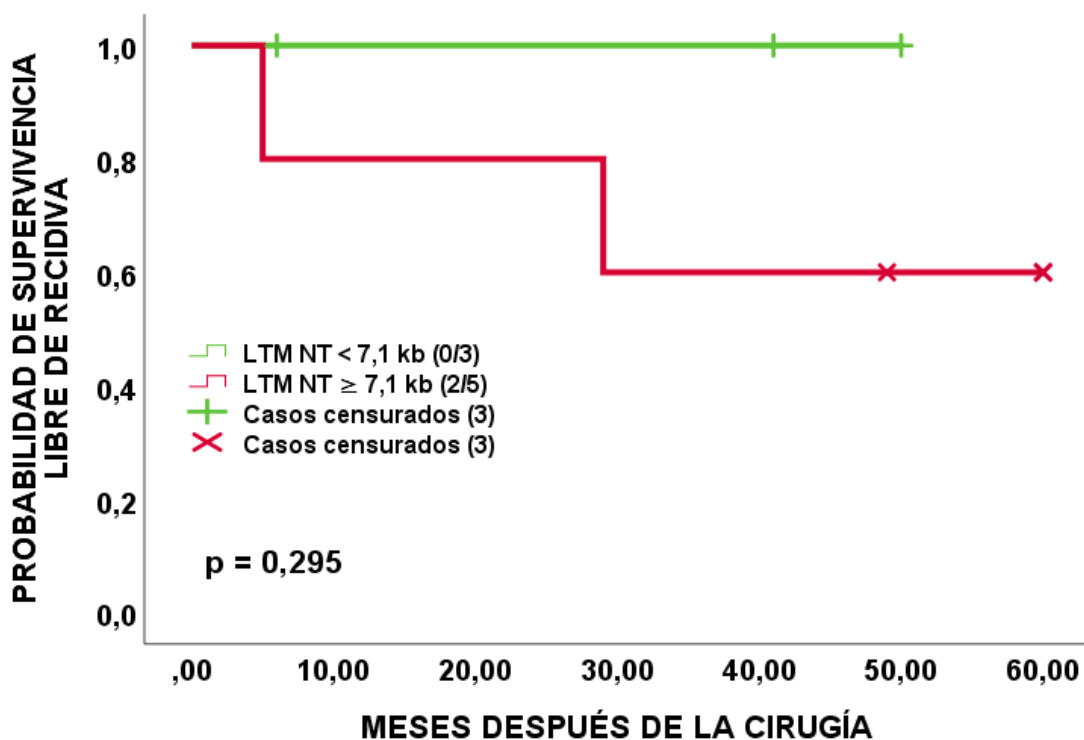


Figura 4.15.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la Longitud Telomérica Media No Tumoral (LTM NT) de tejidos colorrectales en pacientes con Índice de Masa Corporal (IMC) igual o superior a 31,85 kg/m² afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

4.2. FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES Y SUBCUTÁNEOS DE INDIVIDUOS CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL. RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL

4.2.1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) DE INDIVIDUOS CON Y SIN CÁNCER COLORRECTAL

De forma similar al análisis de los tejidos colorrectales, la evaluación de la función telomérica en los tejidos adiposos se llevó a cabo mediante el estudio de la longitud telomérica y de la actividad telomerasa, en los tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) de la población total incluida en el trabajo.

Para el *Ratio* T/S, los datos obtenidos fueron similares entre los dos tejidos que se comparan, mostrando unos valores de media \pm error estándar de $0,93 \pm 0,05$ en los TAV (126 casos) y $0,92 \pm 0,05$ en los TAS (118 casos) ($p = 0,752$; test de Wilcoxon). Los resultados del estudio de correlación realizado entre los *Ratios* T/S de TAV y los TAS, para un total de 111 casos, se muestran en la **Figura 4.16** ($r = 0,470$, $p < 0,001$; Rho de Spearman).

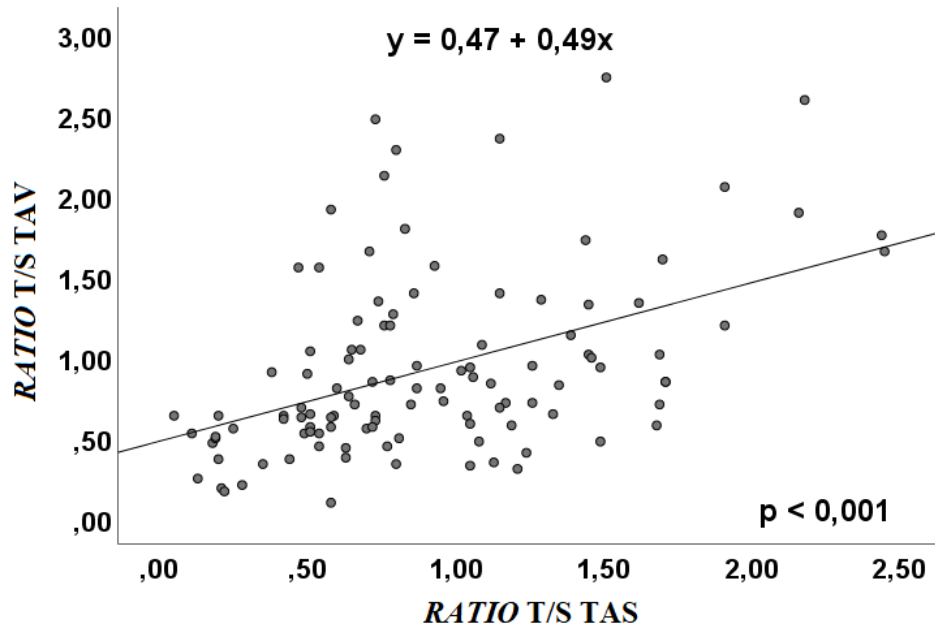


Figura 4.16.- Análisis de correlación entre el *Ratio* T/S de los tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS). N° casos considerados: 111.

Los estudios de correlación entre el *Ratio* T/S y la edad en el total de la población analizada para tejidos adiposos indicaron un valor de $r = 0,031$ ($p = 0,733$; Rho de Spearman) para TAV (123 casos) y un valor de $r = -0,021$ ($p = 0,820$; Rho de Spearman) para TAS (115 casos).

El análisis de la actividad telomerasa se realizó en un total de 148 muestras para TAV y para TAS. En el primer caso se observó una reactivación de la actividad telomerasa en el 20,3% de las muestras analizadas (30 casos con actividad telomerasa positiva de 148 casos totales), frente a una reactivación de la actividad telomerasa del 10,1% en el grupo de TAS (15 casos con actividad telomerasa positiva de 148 casos totales).

A continuación, se procedió al análisis del *Ratio* T/S en los casos con actividad telomerasa positiva y negativa en ambos tipos de tejido adiposo, sin observarse en ninguno de los tejidos adiposos estudiados diferencias estadísticamente significativas para la actividad telomerasa ($p = 0,061$ para TAV y $p = 0,367$ para TAS; U de Mann-Whitney) (**Tabla 4.20**).

Tabla 4.20.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con la actividad telomerasa.

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ³)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ³)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	115	0,92 \pm 0,05		112	0,94 \pm 0,05	
NEGATIVA	88	0,96 \pm 0,06	0,061	97	0,92 \pm 0,05	0,484
POSITIVA	27	0,77 \pm 0,10		15	1,04 \pm 0,14	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; *U de Mann-Whitney.

4.2.2. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) EN RELACIÓN CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

Atendiendo a los resultados obtenidos para el *Ratio* T/S, observamos que los TAS de individuos con normopeso presentaron un *Ratio* T/S superior ($1,21 \pm 0,16$; media \pm error estándar) al encontrado en los mismos tejidos de individuos con mayor valor de IMC ($0,89 \pm 0,05$; media \pm error estándar), como se detalla en la **Tabla 4.21**, siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,046$; U de Mann-Whitney). Por su parte, en los TAV no se detectaron diferencias significativas para los valores de *Ratio* T/S entre los tres grupos de clasificación de IMC.

Tabla 4.21.- Valores medios del *Ratio* T/S de los tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p
IMC⁴	126	0,93 ± 0,05		118	0,92 ± 0,05	
NORMOPESO	14	1,05 ± 0,20	0,813	14	1,21 ± 0,16	0,129
SOBREPESO	50	0,92 ± 0,07	#	45	0,90 ± 0,09	#
OBESIDAD	62	0,91 ± 0,08		59	0,87 ± 0,06	
IMC⁴ AGRUPADO	126	0,93 ± 0,05		118	0,92 ± 0,05	
NORMOPESO	14	1,05 ± 0,20	0,574	14	1,21 ± 0,16	0,046
SOBREPESO Y OBESIDAD	112	0,91 ± 0,06	*	104	0,89 ± 0,05	*
IMC⁴ AGRUPADO	126	0,93 ± 0,05		118	0,92 ± 0,05	
OBESIDAD	62	0,91 ± 0,08	0,626	59	0,87 ± 0,06	0,675
NORMOPESO Y SOBREPESO	64	0,95 ± 0,07	*	59	0,98 ± 0,08	*

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; ⁴Índice de Masa Corporal; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Los análisis de correlación para *Ratios* T/S entre TAV y TAS indicaron una correlación positiva tanto en el grupo de individuos con sobrepeso (45 casos analizados) como en el grupo de individuos con obesidad (53 casos analizados), con un valor de coeficiente de correlación de $r = 0,467$ en el primer grupo y $r = 0,436$ en el segundo grupo ($p = 0,001$, en ambos casos) (**Figura 4.17**).

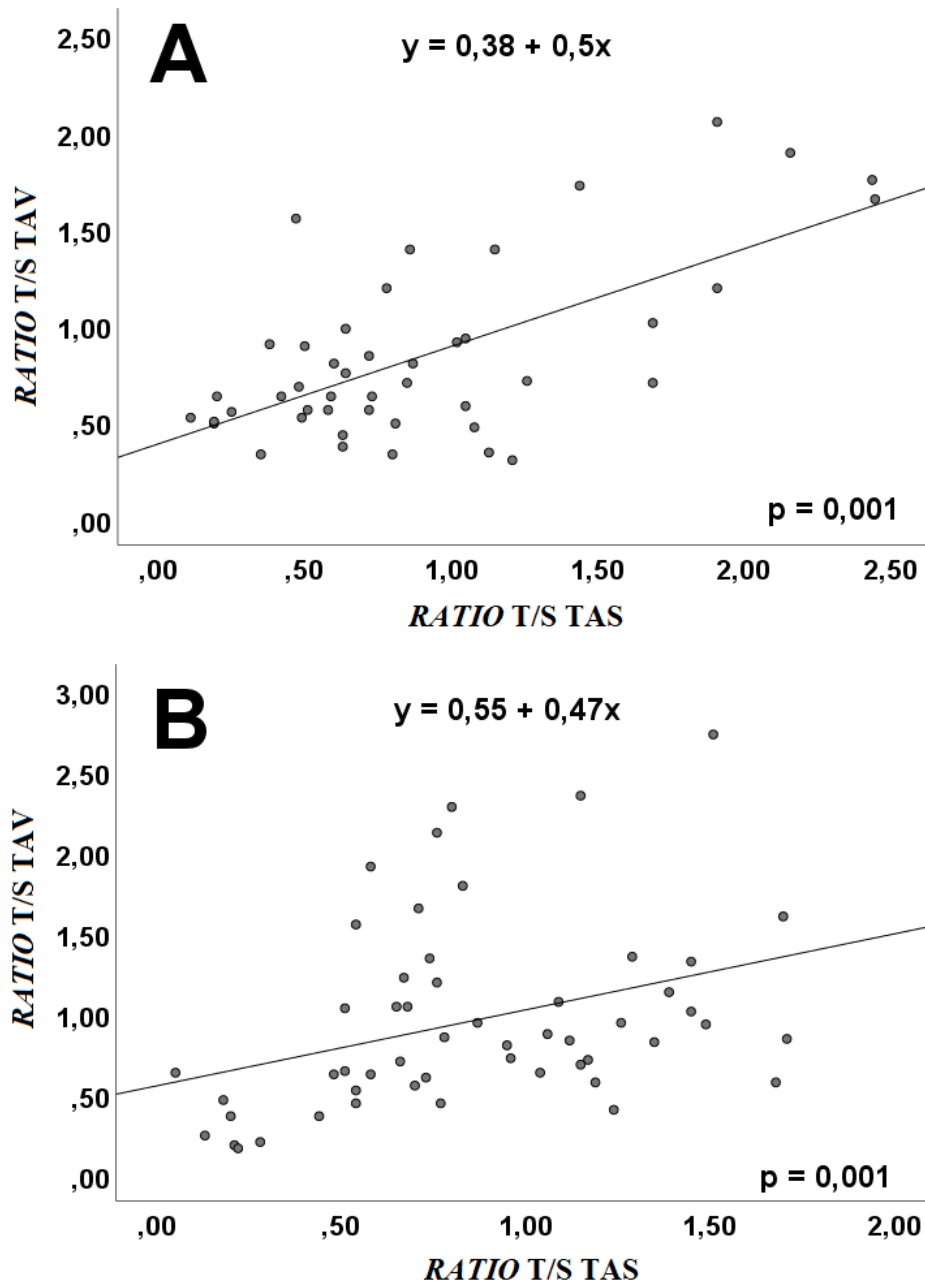


Figura 4.17.- Análisis de correlación entre el *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) en el grupo de individuos con sobrepeso (A) y obesidad (B). N° casos considerados: 45 y 53, respectivamente.

La actividad telomerasa también se estudió en ambos tejidos adiposos para los distintos grupos de IMC (**Tabla 4.22**). Los TAV de individuos con obesidad reactivaron la telomerasa en menor proporción (12,6%; 11 de 87 casos) que los individuos con normopeso (20%; 3 de 15 casos) y sobrepeso (34,8%; 16 de 46 casos), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,010$; test Chi-cuadrado). Las diferencias

encontradas para los TAS, por su parte, no fueron estadísticamente significativas para la reactivación de la telomerasa entre los grupos de IMC estudiados.

Tabla 4.22.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC).

IMC ⁴	TAV ¹			p *	TAS ²			p *
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA			Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
	148	118	30		148	133	15	
NORMOPESO	15	12	3	0,010	16	16	0	0,078
SOBREPESO	46	30	16		44	37	8	
OBESIDAD	87	76	11		87	80	7	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Actividad telomerasa; ⁴Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

Cuando se comparó el *Ratio* T/S en función de la reactivación de la actividad telomerasa, los resultados no indicaron diferencia alguna para ninguno de los dos tejidos adiposos estudiados (indicado en las **Tablas 4.23** y **4.24**).

Tabla 4.23.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) y con la actividad telomerasa.

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *	Nº caso	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	13	1,11 ± 0,21		43	0,90 ± 0,08		59	0,89 ± 0,08	
NEGATIVA	11	1,19 ± 0,24	0,236	28	0,96 ± 0,10	0,165	49	0,91 ± 0,08	0,317
POSITIVA	2	0,66 ± 0,19		15	0,78 ± 0,12		10	0,78 ± 0,20	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.24.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) y con la actividad telomerasa.

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº	<i>Ratio</i> T/S	p	Nº	<i>Ratio</i> T/S	p	Nº	<i>Ratio</i> T/S	p
	casos	(Media ± EE ²)	*	casos	(Media ± EE ²)	*	casos	(Media ± EE ²)	*
ACTIVIDAD TELOMERASA	14	1,21 ± 0,16		40	0,92 ± 0,09		58	0,89 ± 0,06	
NEGATIVA	14	1,21 ± 0,16	-	32	0,88 ± 0,10	0,710	51	0,87 ± 0,06	0,424
POSITIVA	-	-		8	1,06 ± 0,23		7	1,01 ± 0,16	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

4.2.3. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS), EN RELACIÓN CON EL DESARROLLO DE CÁNCER COLORRECTAL (CCR)

Para estudiar una posible relación entre la función telomérica en TAV y TAS y el desarrollo de Cáncer Colorrectal, se compararon la longitud telomérica relativa y la actividad telomerasa de ambos tejidos entre los grupos de individuos diagnosticados y no diagnosticados de este tipo tumoral. Los resultados para el *Ratio* T/S, mostrados en la **Figura 4.18**, indicaron una asociación significativa entre el desarrollo de CCR y el mantenimiento telomérico en tejidos adiposos: los TAV de pacientes diagnosticados de CCR tuvieron unos valores medios de *Ratio* T/S de $1,08 \pm 0,08$ (media ± error estándar), frente a valores medios de $0,77 \pm 0,06$ (media ± error estándar) en el grupo de individuos sin CCR ($p = 0,007$; U de Mann-Whitney). En los TAS, los valores medios del *Ratio* T/S fueron de $1,07 \pm 0,07$ (media ± error estándar) en pacientes con CCR, y de $0,75 \pm 0,06$ (media ± error estándar) en individuos sin CCR ($p = 0,003$; U de Mann-Whitney).

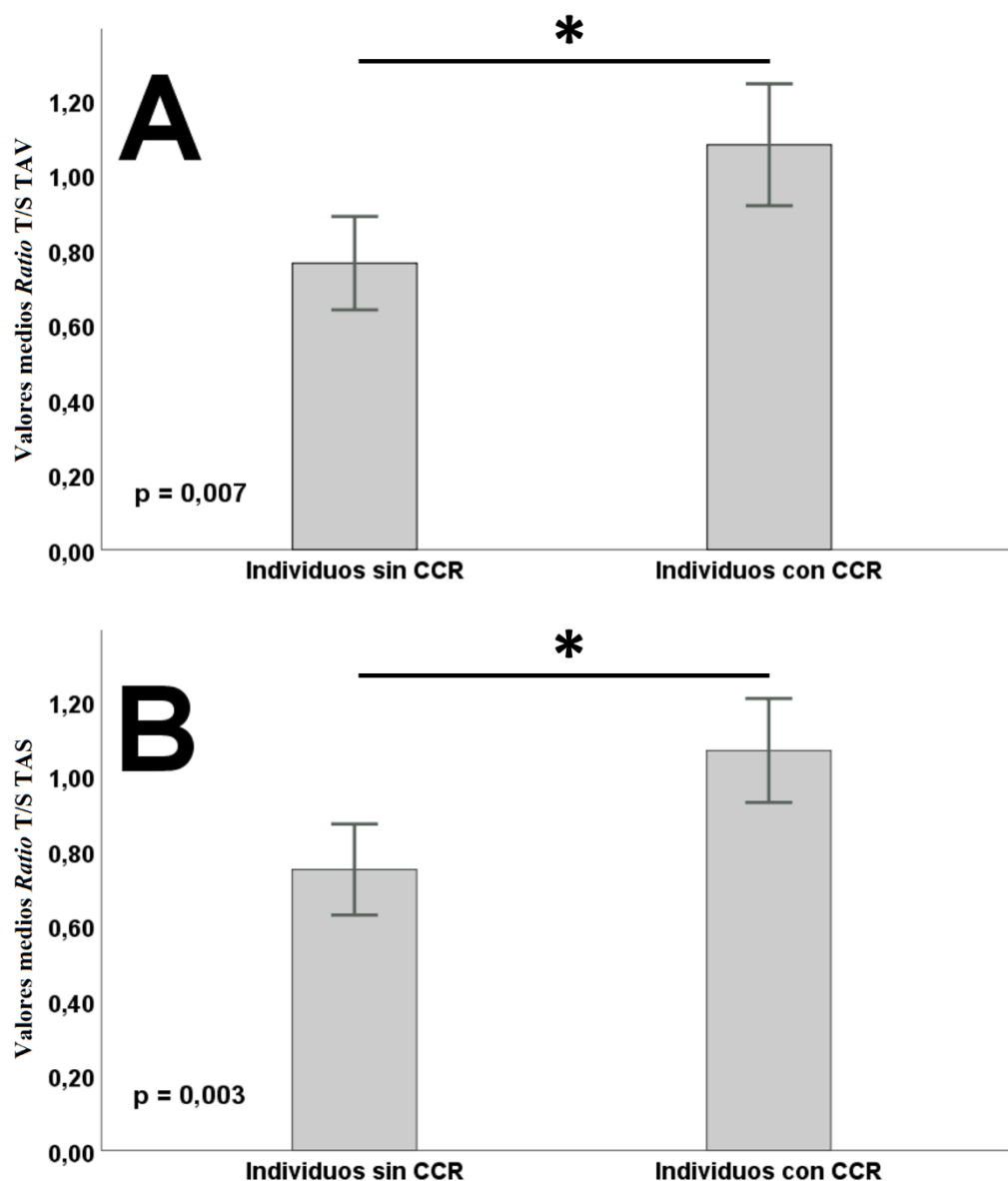


Figura 4.18.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) (A) y subcutáneos (TAS) (B) de individuos con y sin Cáncer Colorrectal (CCR).

Los análisis de correlación, representados en la **Figura 4.19**, demostraron una asociación significativa entre los valores medios del *Ratio* T/S en los TAV y en los TAS, tanto en el grupo de pacientes afectados de CCR (61 pacientes) como en el grupo de pacientes sin CCR (50 pacientes), con coeficientes de correlación de $r = 0,485$ en el primer caso y $r = 0,416$ en el segundo ($p < 0,001$ y $p = 0,003$, respectivamente; Rho de Spearman).

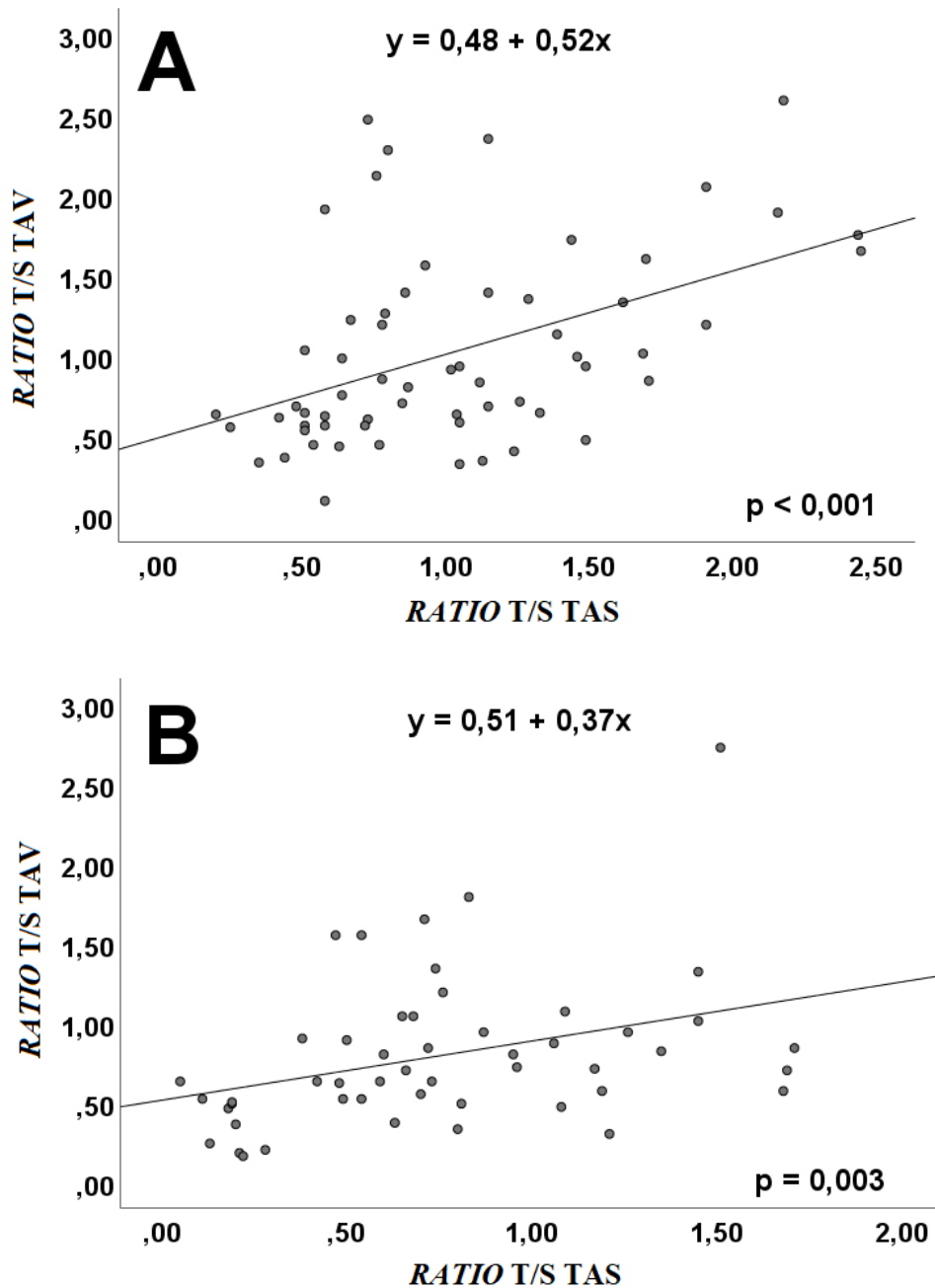


Figura 4.19.- Análisis de correlación entre el *Ratio* T/S de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en individuos con (A) y sin (B) Cáncer Colorrectal (CCR). N° casos considerados: 61 y 50, respectivamente.

Los estudios de correlación entre el *Ratio* T/S y la edad en la población de pacientes con CCR mostraron un valor de $r = -0,108$ ($p = 0,390$; Rho de Spearman) para TAV (66 casos) y un valor de $r = -0,185$ ($p = 0,140$; Rho de Spearman) para TAS (65 casos). Para la población de individuos sin CCR, los estudios de correlación indicaron un valor de $r =$

-0,055 ($p = 0,686$; Rho de Spearman) para TAV (57 casos), y un valor de $r = -0,143$ ($p = 0,323$; Rho de Spearman) para TAS (50 casos).

Para la actividad telomerasa, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tejidos adiposos de individuos con y sin CCR (indicado en la **Tabla 4.25**).

Tabla 4.25.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con Cáncer Colorrectal (CCR).

	Nº casos	TAV ¹		p *	Nº casos	TAS ²		p *
		ACTIVIDAD TELOMERASA				ACTIVIDAD TELOMERASA		
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
CCR³	148	118	30		148	133	15	
NO	81	64	17	0,811	80	73	7	0,545
SI	67	54	13		68	60	8	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Cáncer Colorrectal; *Test Chi-cuadrado.

El estudio de la función telomérica en los TAV y en los TAS en relación con la reactivación de la telomerasa, en individuos con y sin CCR, se presenta en las **Tablas 4.26** y **4.27**. En pacientes con CCR, tal y como se muestra en la **Tabla 4.26**, ninguno de los dos tejidos adiposos mostró diferencias estadísticamente significativas para la longitud telomérica relativa según los datos de actividad telomerasa. En individuos sin CCR, tampoco se detectaron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los dos tejidos adiposos en relación con el *Ratio* T/S para la reactivación de la telomerasa (**Tabla 4.27**).

Tabla 4.26.- Valores medios del *Ratio T/S* en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con la actividad telomerasa en pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio T/S</i> (Media ± EE ³)	p *	Nº casos	<i>Ratio T/S</i> (Media ± EE ³)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	60	1,07 ± 0,08		63	1,07 ± 0,07	
NEGATIVA	48	1,09 ± 0,09	0,432	55	1,03 ± 0,08	0,101
POSITIVA	12	0,97 ± 0,19		8	1,35 ± 0,19	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.27.- Valores medios del *Ratio T/S* en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con la actividad telomerasa en individuos sin Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio T/S</i> (Media ± EE ³)	p *	Nº casos	<i>Ratio T/S</i> (Media ± EE ³)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	55	0,75 ± 0,07		49	0,77 ± 0,06	
NEGATIVA	40	0,81 ± 0,08	0,148	42	0,79 ± 0,07	0,548
POSITIVA	15	0,61 ± 0,09		7	0,68 ± 0,11	

¹Tejido adiposo visceral; ²Tejido adiposo subcutáneo; ³Error estándar; ⁴Actividad telomerasa; *U de Mann-Whitney.

4.2.3.1. Longitud telomérica relativa en los tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) y variables clínico-patológicas en pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR).

El siguiente paso consistió en analizar posibles variaciones en la longitud telomérica relativa de los tejidos adiposos procedentes de pacientes afectados de CCR, considerando las variables clínico-patológicas recogidas en el estudio (presentado en las **Tablas 4.28** y **4.29**).

Como se puede observar en la **Tabla 4.29**, los TAS de pacientes con tumores de alta invasión (T4) presentaron telómeros significativamente más cortos ($0,76 \pm 0,12$; media ± error estándar) que los TAS de pacientes que desarrollaron tumores menos invasivos (T1,

T2 y T3), con valores medios del *Ratio* T/S de $1,14 \pm 0,08$ (media \pm error estándar) ($p = 0,013$; U de Mann-Whitney).

Tabla 4.28.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas, en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ³)	p	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ³)	p
SEXO	66	1,08 \pm 0,08		65	1,07 \pm 0,07	
MUJER	28	1,14 \pm 0,13	0,721 *	26	0,93 \pm 0,09	0,168 *
HOMBRE	38	1,04 \pm 0,10		39	1,16 \pm 0,10	
ESTADIO DE DUKES	64	1,05 \pm 0,08		64	1,07 \pm 0,07	
A	10	1,10 \pm 0,24	0,283 #	8	1,21 \pm 0,25	0,731 #
B	30	1,17 \pm 0,12		31	1,08 \pm 0,11	
C	15	1,01 \pm 0,17		17	1,08 \pm 0,12	
D	8	0,65 \pm 0,12		8	0,86 \pm 0,12	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	66	1,08 \pm 0,08		65	1,07 \pm 0,07	
COLON DERECHO	20	0,93 \pm 0,16	0,086 #	21	1,08 \pm 0,14	0,727 #
COLON IZQUIERDO	16	1,02 \pm 0,17		17	1,00 \pm 0,13	
RECTO	30	1,21 \pm 0,11		27	1,10 \pm 0,10	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Tabla 4.29.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas, en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p
TUMOR PRIMARIO (T)	65	1,06 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
T1	5	1,14 ± 0,38	0,887 #	6	1,43 ± 0,27	0,037 #
T2	15	1,00 ± 0,14		13	0,96 ± 0,15	
T3	33	1,11 ± 0,12		34	1,15 ± 0,10	
T4	11	0,98 ± 0,21		12	0,76 ± 0,12	
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	65	1,06 ± 0,08	0,437	65	1,07 ± 0,07	0,013
T4	12	0,98 ± 0,21	*	12	0,76 ± 0,12	*
T1, T2, T3	54	1,08 ± 0,09		54	1,14 ± 0,08	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	66	1,08 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
N0	42	1,13 ± 0,10	0,540 #	41	1,10 ± 0,10	0,433 #
N1	16	1,06 ± 0,19		16	0,90 ± 0,08	
N2	8	0,86 ± 0,22		8	1,23 ± 0,22	
METÁSTASIS (M)	66	1,08 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
M0	58	1,14 ± 0,09	0,080 *	57	1,10 ± 0,08	0,343 *
M1	8	0,65 ± 0,12		8	0,86 ± 0,12	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

4.2.3.2. Actividad telomerasa en los tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) y variables clínico-patológicas en pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR).

La actividad telomerasa también se evaluó en relación con las distintas variables clínico-patológicas en el grupo de pacientes afectados de CCR (datos presentados en la **Tabla 4.30**). En los TAV, se detectó una mayor reactivación de la telomerasa en hombres (28,9%; 11 de 38 casos) que en mujeres (6,9%, 2 de 29 casos), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,024$; test Chi-cuadrado).

Tabla 4.30.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas, en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			p *	TAS ²			p *
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA			Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
SEXO	67	54	13		68	60	8	
MUJER	29	27	2	0,024	29	25	4	0,654
HOMBRE	38	27	11		39	35	4	
ESTADIO DE DUKES	66	53	13		67	59	8	
A	9	9	0	0,276	9	9	0	0,368
B	33	26	7		33	28	5	
C	16	13	3		17	14	3	
D	8	5	3		8	8	0	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	67	54	13		68	60	8	
COLON DERECHO	22	17	5	0,589	22	19	3	0,521
COLON IZQUIERDO	16	12	4		17	14	3	
RECTO	29	25	4		29	27	2	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; *Test Chi-cuadrado.

4.2.4. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA DE LOS TEJIDOS ADIPOSOS VISCERALES (TAV) Y SUBCUTÁNEOS (TAS) EN RELACIÓN CON LA AFECTACIÓN POR CÁNCER COLORRECTAL (CCR) Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC) DE LOS INDIVIDUOS

El análisis de la longitud telomérica relativa y de la actividad telomerasa se realizó en individuos con y sin CCR considerando los grupos establecidos para el IMC (individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad).

Con el fin de identificar la relación entre el tamaño telomérico, el desarrollo de CCR y el IMC, los estudios para el *Ratio* T/S se realizaron a través de dos abordajes: a) comparación de los *Ratios* T/S de los tejidos adiposos en relación con la presencia o no de tumores colorrectales dentro de los grupos de individuos con normopeso, sobrepeso y

obesidad; y b) comparación de los *Ratios* T/S de los tejidos adiposos en relación con el IMC dentro de los dos grupos de individuos considerados (con y sin CCR).

Los análisis del *Ratio* T/S en relación con la presencia o ausencia de CCR dentro de cada grupo de IMC indicaron que, en individuos con sobrepeso, los TAV y TAS con mayor tamaño telomérico se detectaron en pacientes afectados de CCR; en este caso, los valores medios fueron $1,06 \pm 0,11$ y $1,07 \pm 0,12$ (media \pm error estándar), respectivamente. Sin embargo, en individuos no diagnosticados de CCR, los valores medios registrados fueron $0,72 \pm 0,08$ y $0,65 \pm 0,09$ (media \pm error estándar) para TAV y TAS. Para ambos tejidos adiposos, estas diferencias fueron estadísticamente significativas entre sí ($p = 0,023$ y $p = 0,012$, respectivamente; U de Mann-Whitney). Todos estos resultados se muestran en las **Tablas 4.31** y **4.32**.

Tabla 4.31.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con Cáncer Colorrectal (CCR) en individuos con sobrepeso y obesidad.

	IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *
CCR ³	50	0,91 \pm 0,07		62	0,91 \pm 0,08	
NO	21	0,72 \pm 0,08	0,023	39	0,79 \pm 0,09	0,082
SÍ	29	1,06 \pm 0,11		23	1,12 \pm 0,15	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; ³Cáncer Colorrectal; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.32.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con Cáncer Colorrectal (CCR) en individuos con sobrepeso y obesidad.

	IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *
CCR ³	45	0,90 \pm 0,09		59	0,87 \pm 0,06	
NO	18	0,65 \pm 0,09	0,012	35	0,80 \pm 0,08	0,208
SÍ	27	1,07 \pm 0,12		24	0,97 \pm 0,09	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; ³Cáncer Colorrectal; *U de Mann-Whitney.

Cuando se realizó el estudio considerando los grupos de IMC, los valores medios de los *Ratios* T/S de los dos tipos de tejidos adiposos analizados en este trabajo no mostraron diferencias estadísticamente significativas ni en pacientes afectados de CCR ni en el grupo sin esta patología (datos recogidos en las **Tablas 4.33** y **4.34**).

Tabla 4.33.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) en pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p
IMC⁴	66	1,08 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
NORMOPESO	16	1,06 ± 0,19	0,914 #	16	1,27 ± 0,15	0,258 #
SOBREPESO	27	1,06 ± 0,11		25	1,02 ± 0,13	
OBESIDAD	23	1,12 ± 0,15		24	0,97 ± 0,09	
IMC⁴ AGRUPADO	66	1,08 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
NORMOPESO	16	1,06 ± 0,19	0,681 *	16	1,27 ± 0,15	0,100 *
SOBREPESO Y OBESIDAD	50	1,09 ± 0,09		49	1,00 ± 0,08	
IMC⁴ AGRUPADO	66	1,08 ± 0,08		65	1,07 ± 0,07	
OBESIDAD	23	1,12 ± 0,15	0,941 *	24	0,97 ± 0,09	0,488 *
NORMOPESO Y SOBREPESO	43	1,06 ± 0,10		41	1,12 ± 0,10	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; ⁴Índice de Masa Corporal; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Tabla 4.34.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) en individuos sin Cáncer Colorrectal (CCR).

	TAV ¹			TAS ²		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ³)	p
IMC⁴	61	0,77 ± 0,06		54	0,74 ± 0,06	
SOBREPESO	22	0,72 ± 0,07	0,822	19	0,63 ± 0,09	0,142
OBESIDAD	39	0,79 ± 0,09		35	0,80 ± 0,08	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Error estándar; ⁴Índice de Masa Corporal; *U de Mann-Whitney.

Los análisis de correlación indicaron, únicamente en pacientes afectados de CCR, una correlación positiva entre el *Ratio* T/S de los TAV y TAS en el grupo de pacientes con

sobrepeso, obteniéndose un coeficiente de correlación $r = 0,740$ para un total de 27 casos incluidos en el análisis ($p < 0,001$; Rho de Spearman).

En el grupo de sujetos no afectados de CCR, se detectó una correlación positiva entre los *Ratios* T/S de TAV y TAS únicamente en individuos con obesidad (32 casos) con un coeficiente de correlación $r = 0,496$ ($p = 0,004$; Rho de Spearman). Estas correlaciones se representan en la **Figura 4.20**.

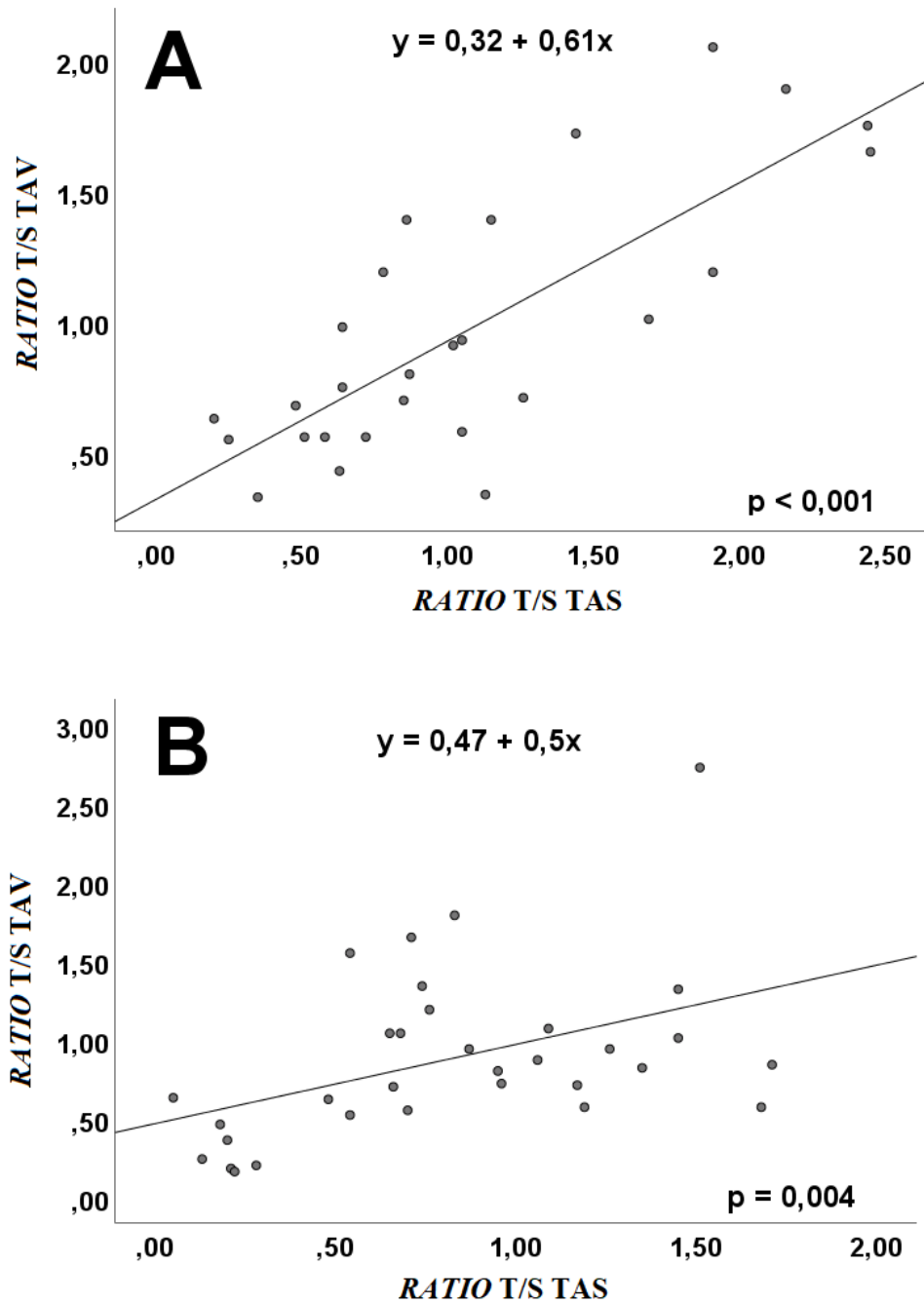


Figura 4.20.- Análisis de correlación entre los *Ratios* T/S de tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) en el grupo de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR) con sobrepeso (A) y en el grupo de sujetos obesos sin Cáncer Colorrectal (CCR) (B). N° casos considerados: 27 y 32, respectivamente.

La actividad telomerasa en ambos tejidos adiposos también se evaluó en relación con la afectación por CCR dentro de cada grupo de IMC (individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad) (Tablas 4.35 y 4.36), y en relación con los grupos de IMC para sujetos con y sin CCR (Tablas 4.37 y 4.38). El análisis de la actividad telomerasa dentro de cada

grupo de IMC reveló que los TAV de individuos con sobrepeso sin CCR registraron un 61,1 % de casos con actividad telomerasa positiva (11 casos de un total de 18), en comparación con el grupo de individuos con sobrepeso y CCR, en el que se detectó un 17,9% de casos con reactivación de la enzima (5 casos de un total de 28). Estas diferencias fueron estadísticamente significativas ($p = 0,003$; test Chi-cuadrado) (**Tabla 4.35**).

Tabla 4.35.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con Cáncer Colorrectal (CCR) en individuos con sobrepeso y obesidad.

	IMC ¹ SOBREPESO			p *	IMC ¹ OBESIDAD			p *
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA			Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
CCR²	46	30	16	0,003	87	76	11	0,156
NO	18	7	11		63	57	6	
SÍ	28	23	5		24	19	5	

¹Índice de Masa Corporal; ²Cáncer Colorrectal; *Test Chi-cuadrado.

Los resultados para los TAS, recogidos en la **Tabla 4.36**, mostraron, en el grupo de sujetos con obesidad, una mayor reactivación de la telomerasa en el grupo de pacientes afectados de CCR, con un 20,8% de casos con actividad telomerasa positiva (5 casos de 24) frente a un 3% de casos detectados en sujetos sin CCR (2 casos de 63), con diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,007$; test Chi-cuadrado).

Tabla 4.36.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneo (TAS), en relación con Cáncer Colorrectal (CCR) en individuos con sobrepeso y obesidad.

	IMC ¹ SOBREPESO			p *	IMC ¹ OBESIDAD			p *
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA			Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA		
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
CCR²	45	37	8	0,112	87	80	7	0,007
NO	17	12	5		63	61	2	
SÍ	28	25	3		24	19	5	

¹Índice de Masa Corporal; ²Cáncer Colorrectal; *Test Chi-cuadrado.

Seguidamente, la actividad telomerasa se analizó con respecto al IMC de individuos con y sin CCR (**Tablas 4.37 y 4.38**). En individuos sin CCR, se observó que los TAV registraron un mayor número de casos con reactivación de la telomerasa en sujetos con sobrepeso (61,1%, 11 casos de 18), al comparar con el grupo de individuos con obesidad (9,5%, 6 casos de 63), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,001$; test Chi-cuadrado). También se identificó, en individuos sin CCR, una mayor reactivación de la enzima telomerasa en los TAS de sujetos con sobrepeso (29,4%, 5 casos de 17) frente a estos mismos tejidos en sujetos con obesidad (3,2%, 2 casos de 63). Estas diferencias también fueron estadísticamente significativas entre sí ($p = 0,001$; test Chi-cuadrado). Todos estos resultados están recogidos en la **Tabla 4.38**:

Tabla 4.37.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) de pacientes con Cáncer Colorrectal (CCR).

	Nº casos	TAV ¹ ACTIVIDAD TELOMERASA		p *	Nº casos	TAS ² ACTIVIDAD TELOMERASA		p *
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
IMC³	67	54	13		68	60	8	
NORMOPESO	15	12	3	0,962	16	16	0	0,131
SOBREPESO	28	23	5		28	25	3	
OBESIDAD	24	19	5		24	19	5	
IMC³ AGRUPADO	67	54	13		68	60	8	
NORMOPESO	15	13	3	0,947	16	16	0	0,095
SOBREPESO Y OBESIDAD	52	42	10		52	44	8	
IMC³ AGRUPADO	67	54	13		68	60	8	
OBESIDAD	24	19	5	0,825	24	19	5	0,086
NORMOPESO Y SOBREPESO	43	35	8		44	41	3	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

Tabla 4.38.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC) de individuos sin Cáncer Colorrectal (CCR).

	Nº casos	TAV ¹ ACTIVIDAD TELOMERASA		p *	Nº casos	TAS ² ACTIVIDAD TELOMERASA		p *
		NEGATIVA	POSITIVA			NEGATIVA	POSITIVA	
IMC ³	81	64	17		80	73	7	
SOBREPESO	18	7	11	< 0,001	17	12	5	0,001
OBESIDAD	63	57	6		63	61	2	

¹Tejidos adiposos viscerales; ²Tejidos adiposos subcutáneos; ³Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

Finalmente, se realizaron los análisis de la longitud telomérica relativa en relación con la actividad telomerasa dentro de cada grupo de IMC, tanto en pacientes afectados de CCR como en el grupo sin dicha patología (**Tablas 4.39, 4.40, 4.41 y 4.42**). En el grupo de pacientes afectados de CCR y con sobrepeso, los TAS que reactivaron la telomerasa tuvieron una mayor longitud telomérica relativa ($1,84 \pm 0,07$; media \pm error estándar) que los TAS sin actividad telomerasa ($0,97 \pm 0,13$; media \pm error estándar), con diferencias estadísticamente significativa ($p = 0,045$; U de Man-Whitney) (**Tabla 4.40**).

Tabla 4.39.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con la actividad telomerasa, en pacientes con normopeso y obesidad afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	13	1,11 \pm 0,21		21	1,07 \pm 0,14	
NEGATIVA	11	1,19 \pm 0,24	0,236	16	1,06 \pm 0,15	0,934
POSITIVA	2	0,66 \pm 0,19		5	1,08 \pm 0,35	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.40.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con la actividad telomerasa, en pacientes con sobrepeso y obesidad afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	25	1,08 ± 0,13		24	0,97 ± 0,09	
NEGATIVA	22	0,97 ± 0,13	0,045	19	0,95 ± 0,10	0,594
POSITIVA	3	1,84 ± 0,07		5	1,06 ± 0,20	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.41.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con la actividad telomerasa, en individuos con sobrepeso y obesidad no afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	17	0,66 ± 0,08		38	0,79 ± 0,09	
NEGATIVA	7	0,64 ± 0,05	0,524	33	0,84 ± 0,10	0,110
POSITIVA	10	0,68 ± 0,12		5	0,47 ± 0,13	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

Tabla 4.42.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con la actividad telomerasa, en individuos con sobrepeso y obesidad no afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	p *
ACTIVIDAD TELOMERASA	15	0,65 ± 0,10		34	0,83 ± 0,08	
NEGATIVA	10	0,68 ± 0,14	0,713	32	0,82 ± 0,08	0,798
POSITIVA	5	0,59 ± 0,08		2	0,90 ± 0,36	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney.

4.2.4.1. Longitud telomérica relativa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) y variables clínico-patológicas en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR), en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC).

El tamaño de los telómeros de los TAV y TAS se evaluó en relación con las distintas variables clínico-patológicas, considerando los grupos de pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad (Tablas 4.43 y 4.44). Para los TAV (datos incluidos en la Tabla 4.43), los análisis indicaron telómeros más cortos en pacientes con sobrepeso afectados de tumores de colon derecho ($0,67 \pm 0,10$; media \pm error estándar), en comparación con pacientes con sobrepeso y tumores de colon izquierdo ($1,27 \pm 0,28$; media \pm error estándar) o recto ($1,20 \pm 0,16$; media \pm error estándar). Las diferencias, en este caso, mostraron significación estadística ($p = 0,047$; Kruskal-Wallis).

Tabla 4.43.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media \pm EE ²)	P
SEXO	14	1,05 \pm 0,20		29	1,06 \pm 0,11		23	1,12 \pm 0,15	
MUJER	8	1,09 \pm 0,26	0,662	11	1,04 \pm 0,21	0,653	9	1,29 \pm 0,26	0,508
HOMBRE	6	1,00 \pm 0,34	*	18	1,07 \pm 0,13	*	14	1,01 \pm 0,18	*
ESTADIO DE DUKES	13	1,01 \pm 0,21		28	1,02 \pm 0,11		23	1,12 \pm 0,15	
A	2	1,81 \pm 0,79		4	1,07 \pm 0,46		4	0,80 \pm 0,14	
B	5	1,21 \pm 0,36	0,175	12	1,17 \pm 0,14	0,442	13	1,15 \pm 0,21	0,874
C	4	0,70 \pm 0,14	#	8	0,93 \pm 0,20	#	4	1,47 \pm 0,50	#
D	2	0,35 \pm 0,26		4	0,71 \pm 0,18		2	0,86 \pm 0,18	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	14	1,05 \pm 0,20		29	1,06 \pm 0,11		23	1,12 \pm 0,15	
COLON DERECHO	6	0,88 \pm 0,36	0,249	8	0,67 \pm 0,10	0,047	6	1,33 \pm 0,34	0,410
COLON IZQUIERDO	3	1,09 \pm 0,69	#	5	1,27 \pm 0,28	#	8	0,85 \pm 0,20	#
RECTO	5	1,23 \pm 0,11		16	1,20 \pm 0,16		9	1,22 \pm 0,26	

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

Tabla 4.44.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P
SEXO	14	1,21 ± 0,16		27	1,07 ± 0,12		24	0,97 ± 0,09	
MUJER	8	1,03 ± 0,17	0,245	9	0,77 ± 0,16	0,054	9	1,01 ± 0,15	0,571
HOMBRE	6	1,47 ± 0,28	*	18	1,23 ± 0,16	*	15	0,95 ± 0,11	*
ESTADIO DE DUKES	13	1,24 ± 0,17		27	1,07 ± 0,12		24	0,97 ± 0,09	
A	1	2,18		3	0,62 ± 0,15		4	1,41 ± 0,32	
B	6	1,22 ± 0,27		12	1,32 ± 0,22		13	0,81 ± 0,10	
C	4	1,39 ± 0,14	0,156	8	0,89 ± 0,22	0,266	5	1,12 ± 0,09	0,093
D	2	0,50 ± 0,08	#	4	1,06 ± 0,10	#	2	0,83 ± 0,32	#
LOCALIZACIÓN TUMORAL	14	1,21 ± 0,16		27	1,07 ± 0,12		24	0,97 ± 0,09	
COLON DERECHO	7	1,28 ± 0,30		8	0,89 ± 0,18		6	1,11 ± 0,24	
COLON IZQUIERDO	3	1,09 ± 0,22	0,971	5	1,35 ± 0,36	0,547	9	0,78 ± 0,11	0,212
RECTO	4	1,20 ± 0,20	#	14	1,08 ± 0,17	#	9	1,07 ± 0,13	#

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

En los TAS, los telómeros de pacientes con normopeso mostraron una menor longitud relativa cuando procedían de pacientes con tumores colorrectales con elevada capacidad para invadir tejidos adyacentes (T4) ($0,63 \pm 0,09$; media ± error estándar), al comparar con telómeros de pacientes con tumores menos invasivos, (T1, T2 y T3) ($1,56 \pm 0,14$; media ± error estándar), mostrando diferencias estadísticamente significativas entre sí ($p = 0,004$; U de Mann-Whitney) (**Tabla 4.45**).

Tabla 4.45.- Valores medios del *Ratio* T/S en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P	Nº casos	<i>Ratio</i> T/S (Media ± EE ²)	P
TUMOR PRIMARIO (T)	14	1,21 ± 0,16		27	1,07 ± 0,12		24	0,97 ± 0,09	
T1	1	2,18		-	-		5	1,28 ± 0,28	
T2	2	1,50 ± 0,71	0,031	8	0,73 ± 0,12	0,150	3	1,24 ± 0,28	0,148
T3	6	1,44 ± 0,10	#	15	1,29 ± 0,18	#	13	0,85 ± 0,08	#
T4	5	0,63 ± 0,09		4	0,96 ± 0,32		3	0,72 ± 0,20	
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	14	1,27 ± 0,15	0,139	27	1,07 ± 0,12	0,111	24	0,97 ± 0,09	0,032
T1, T2	3	1,72 ± 0,47	*	8	0,73 ± 0,12	*	8	1,26 ± 0,19	*
T3, T4	11	1,08 ± 0,14		19	1,22 ± 0,16		16	0,83 ± 0,07	
TUMOR PRIMARIO (T) AGRUPADO	14	1,27 ± 0,15	0,004	27	1,07 ± 0,12	0,517	24	0,97 ± 0,09	0,162
T4	5	0,63 ± 0,09	*	4	0,96 ± 0,32	*	3	0,72 ± 0,20	*
T1, T2, T3	9	1,54 ± 0,16		23	1,10 ± 0,14		21	1,01 ± 0,10	
INVASIÓN GANGLIONAR (N)	14	1,21 ± 0,16		27	1,07 ± 0,12		24	0,97 ± 0,09	
N0	9	1,28 ± 0,21	0,655	15	1,18 ± 0,19	0,263	17	0,95 ± 0,12	0,391
N1	2	0,94 ± 0,52	#	7	0,74 ± 0,07	#	7	1,04 ± 0,11	#
N2	3	1,21 ± 0,33		5	1,24 ± 0,31		-	-	
METÁSTASIS (M)	14	1,21 ± 0,16	0,045	27	1,07 ± 0,13	0,517	24	0,97 ± 0,09	0,530
M0	12	1,33 ± 0,16		23	1,08 ± 0,14		22	0,99 ± 0,09	
M1	2	0,50 ± 0,08	*	4	1,06 ± 0,10	*	2	0,83 ± 0,32	*

¹Índice de Masa Corporal; ²Error estándar; *U de Mann-Whitney; # Kruskal-Wallis.

También en pacientes con normopeso, la longitud telomérica relativa de los TAS resultó inferior en sujetos con tumores metastásicos ($0,50 \pm 0,08$; media \pm error estándar), al comparar con aquellos en los que no se registraron metástasis a distancia en el momento del diagnóstico ($1,33 \pm 0,16$; media \pm error estándar) ($p = 0,045$; U de Mann-Whitney). Asimismo, en los TAS se registró una longitud telomérica relativa inferior en pacientes con obesidad y tumores de invasión superior (T3 y T4) ($0,83 \pm 0,07$; media \pm error estándar), al comparar con el grupo con obesidad y tumores de extensión menor (T1 y T2) ($1,26 \pm 0,19$; media \pm error estándar) ($p = 0,032$; U de Mann-Whitney), resultados mostrados en la **Tabla 4.45**.

4.2.4.2. Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV) y subcutáneos (TAS) y variables clínico-patológicas en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR) en relación con el Índice de Masa Corporal (IMC).

La actividad telomerasa también se evaluó en TAV y TAS de pacientes afectados de CCR (grupos con normopeso, sobrepeso y obesidad), en relación con las variables clínico-patológicas. Las **Tablas 4.46** y **4.47** muestran los resultados obtenidos para los TAV y para los TAS, respectivamente. En el grupo de pacientes con sobrepeso, los TAV mostraron una mayor reactivación de la enzima telomerasa en hombres (29,4%, 5 de 17 casos) que en mujeres (0 de 11 casos), siendo las diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,047$; test Chi-cuadrado) (**Tabla 4.46**).

Tabla 4.46.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos viscerales (TAV), en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ NORMOPESO			IMC ¹ SOBREPESO			IMC ¹ OBESIDAD		
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA POSITIVA	P *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA POSITIVA	P *	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA POSITIVA	P *
SEXO	15	12	3	28	23	5	24	19	5
MUJER	9	8	1	0,292	11	0	9	8	1
HOMBRE	6	4	2	17	12	5	15	11	4
ESTADIO DE DUKES	14	11	3	28	23	5	24	19	5
A	2	2	0	3	3	0	4	4	0
B	7	5	2	0,670	10	3	13	11	2
C	3	2	1	8	8	0	5	3	2
D	2	2	0	4	2	2	2	1	1
LOCALIZACIÓN TUMORAL	15	12	3	28	23	5	24	19	5
COLON DERECHO	7	5	2	9	8	1	6	4	2
COLON IZQUIERDO	2	1	1	0,229	3	2	9	8	1
RECTO	6	6	0	14	12	2	9	7	2

¹Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

Tabla 4.47.- Actividad telomerasa en tejidos adiposos subcutáneos (TAS), en relación con las variables clínico-patológicas en pacientes con sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

	IMC ¹ SOBREPESO		IMC ¹ OBESIDAD		P *
	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA POSITIVA	Nº casos	ACTIVIDAD TELOMERASA NEGATIVA POSITIVA	
SEXO	28	3	24	5	
MUJER	11	1	9	3	0,243
HOMBRE	17	2	15	2	
ESTADIO DE DUKES	28	3	24	5	
A	3	0	4	0	
B	13	3	13	2	0,091
C	8	0	5	3	
D	4	0	2	0	
LOCALIZACIÓN TUMORAL	28	3	24	5	
COLON DERECHO	9	1	6	2	
COLON IZQUIERDO	5	1	9	2	0,578
RECTO	14	1	9	1	

¹Índice de Masa Corporal; *Test Chi-cuadrado.

4.2.5. ESTUDIOS PRONÓSTICO EN RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL (IMC)

De forma similar a los estudios pronóstico en tumores colorrectales, las curvas de supervivencia incluidas en los estudios pronóstico para tejidos adiposos (68 pacientes considerados) han sido expresadas en base al Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) con un tiempo de seguimiento medio de los pacientes de 60 meses, y se han censurado aquellos que durante dicho tiempo no han recidivado o con los que se perdió el contacto. No se incluyen en este estudio los pacientes con tumores en estadios D ni los individuos fallecidos en el periodo postoperatorio.

En primer lugar, se consideran las curvas de supervivencia en relación con los grupos de IMC establecidos (pacientes con normopeso, con sobrepeso y con obesidad; 67 casos) ($p = 0,382$; Log-Rank) (**Figura 4.21**).

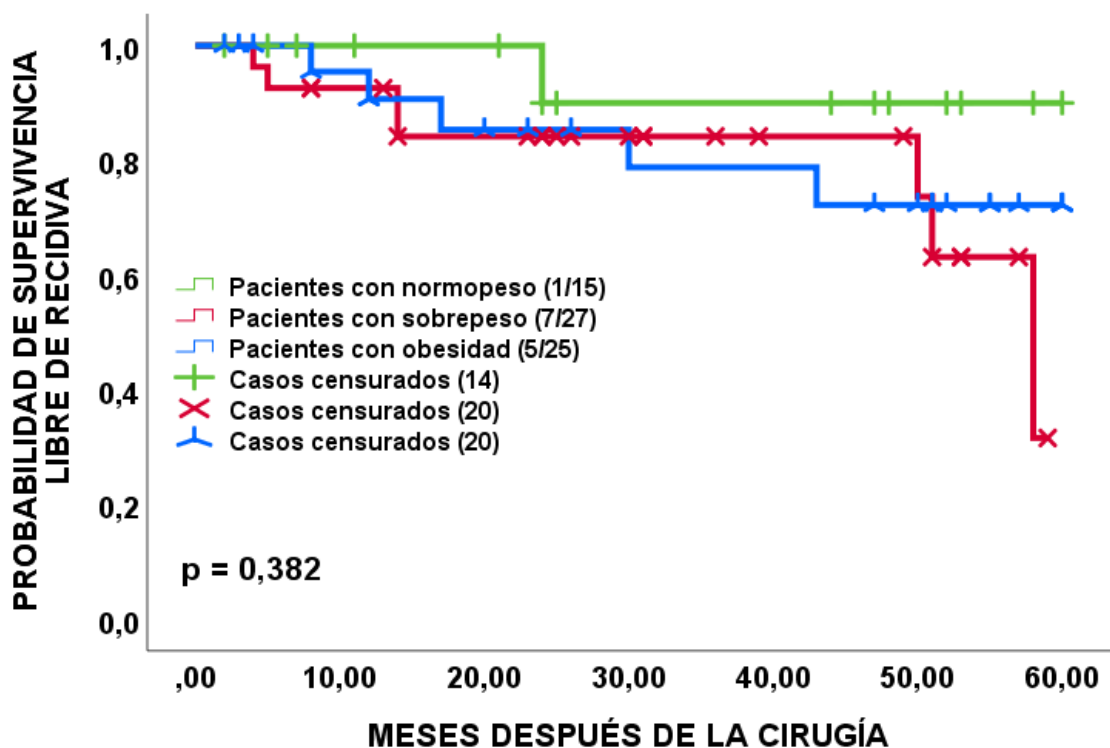


Figura 4.21.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad, afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

La identificación de un posible valor de IMC que permitiese dividir a la población general en dos subgrupos con un pronóstico clínico diferente se realizó mediante la aplicación *Cutoff Finder*, la cual arrojó un valor de IMC para este punto de corte en 27,93 kg/m² (**Figura 4.22**). No obstante, las diferencias en el pronóstico clínico entre ambas subpoblaciones generadas no fueron estadísticamente significativas, con un valor de $p = 0,144$ (Log-Rank). En el estudio participaron 67 pacientes, con 8 casos de recidiva en el subgrupo de pacientes con IMC inferior a 27,93 kg/m² (29 pacientes) y 5 eventos de recurrencia tumoral en el subgrupo de pacientes con IMC igual o superior a 27,93 kg/m² (38 pacientes).

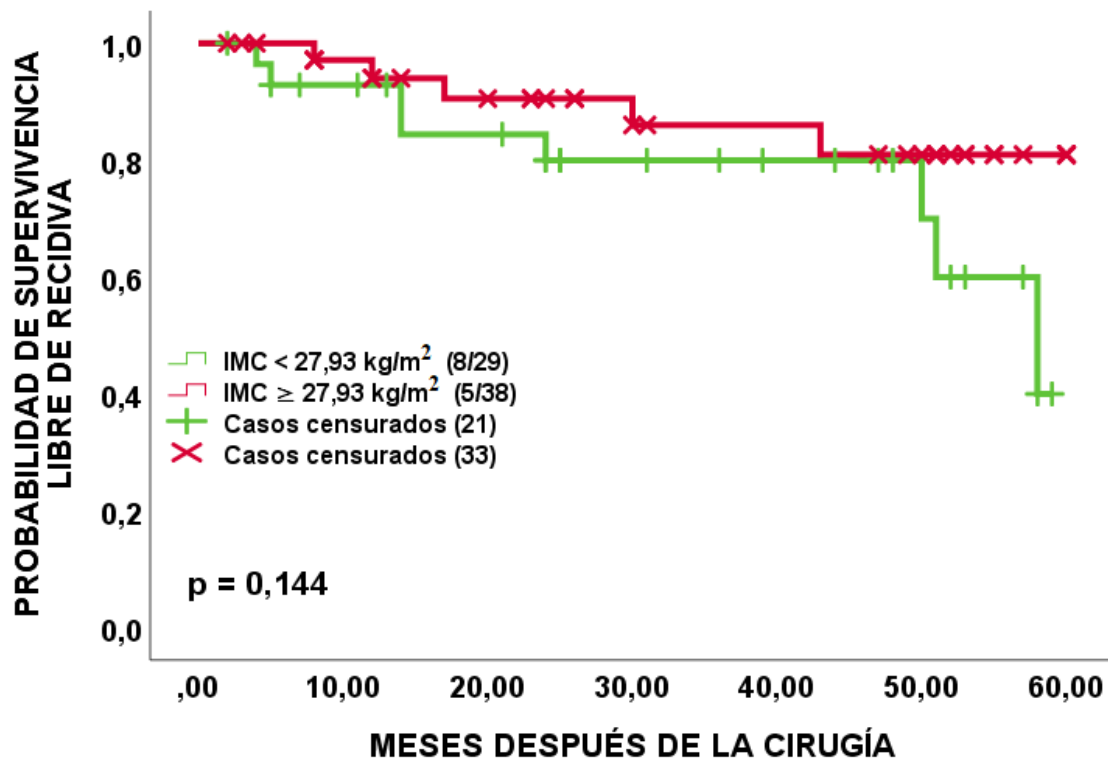


Figura 4.22.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando un valor de Índice de Masa Corporal (IMC) de 27,93 kg/m² en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Seguidamente, se llevó a cabo el estudio de la posible implicación en el pronóstico de los pacientes afectados de CCR de la longitud telomérica relativa de los TAV y de los TAS. Para ello, se calculó un punto de corte para el *Ratio* T/S, tanto para los TAV como

para los TAS, que pudiese permitir la identificación de subpoblaciones con diferente pronóstico clínico.

En el caso de los TAV, dicho punto de corte se detectó para un valor de *Ratio* T/S = 0,84, aunque las dos subpoblaciones generadas considerando dicho valor no mostraron diferencias estadísticamente significativas en cuanto a sus pronósticos clínicos ($p = 0,225$; Log-Rank) (**Figura 4.23**). Para estos estudios de supervivencia se incluyeron 54 pacientes, detectándose 4 casos de recidiva en el subgrupo de pacientes con TAV de *Ratios* T/S inferiores a 0,84 (25 pacientes), y otros 4 eventos de recurrencia de la enfermedad en el subgrupo de pacientes con TAV de *Ratios* T/S iguales o superiores a 0,84 (29 pacientes).

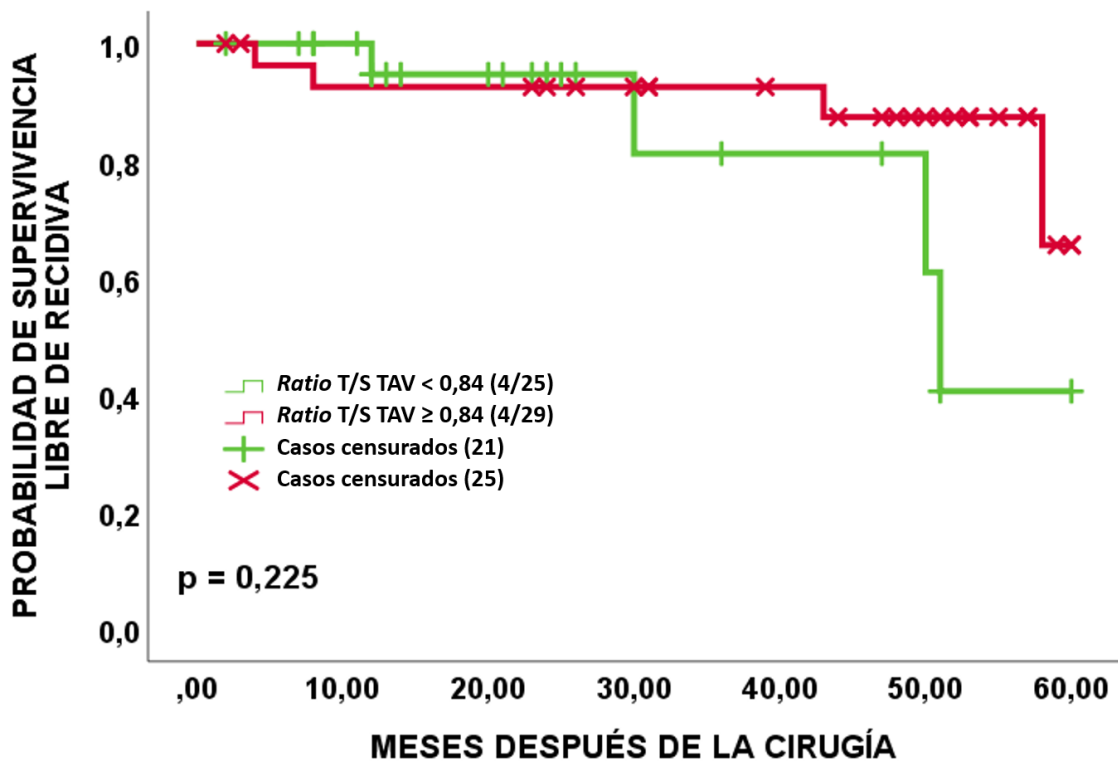


Figura 4.23.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando los *Ratios* T/S de los tejidos adiposos viscerales (TAV) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Para los TAS, el punto de corte se localizó para un valor medio del *Ratio* T/S = 1,13, si bien, tampoco en este caso, las diferencias detectadas resultaron estadísticamente significativas ($p = 0,208$; Log-Rank). En este estudio de supervivencia se incluyeron un total de 54 pacientes, identificándose 6 eventos de recidiva tumoral en el subgrupo de pacientes

con *Ratios* T/S inferiores a 1,13 (32 pacientes) en los TAS, frente a los 3 casos de recidiva tumoral detectados en el subgrupo con *Ratios* T/S iguales o superiores a 1,13 (21 pacientes) en los TAS (**Figura 4.24**).

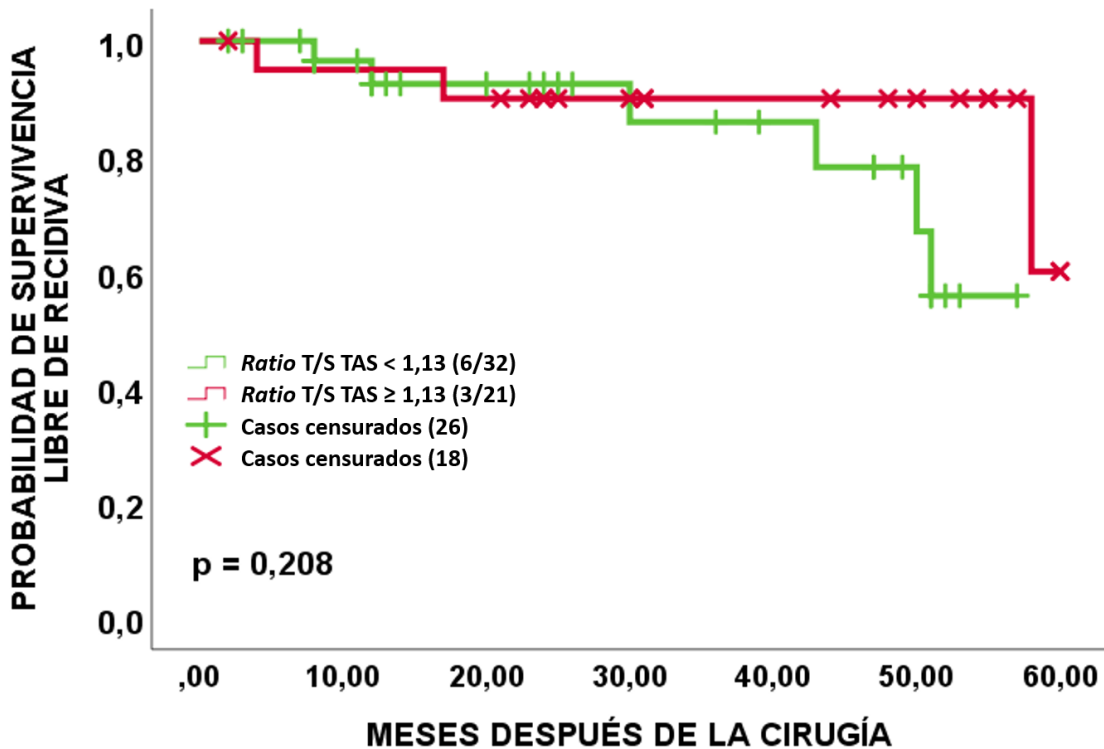


Figura 4.24.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando los *Ratios* T/S de los tejidos adiposos subcutáneos (TAS) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Asimismo, se analizó la posible asociación entre la actividad telomerasa de los dos tipos de tejidos adiposos considerados y la evolución clínica de la enfermedad. Comenzando por los TAV, la actividad telomerasa no se relacionó con el pronóstico clínico de los pacientes incluidos en los protocolos. Como se muestra en la **Figura 4.25**, las diferencias encontradas entre los dos subgrupos de pacientes no mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p = 0,100$; Log-Rank). En este estudio se incluyeron 55 pacientes; en el subgrupo en el que los TAV no mostraron actividad telomerasa (46 casos) se registraron 12 recidivas, frente a ningún caso de recidiva en el subgrupo de TAV positivos para telomerasa (9 casos).

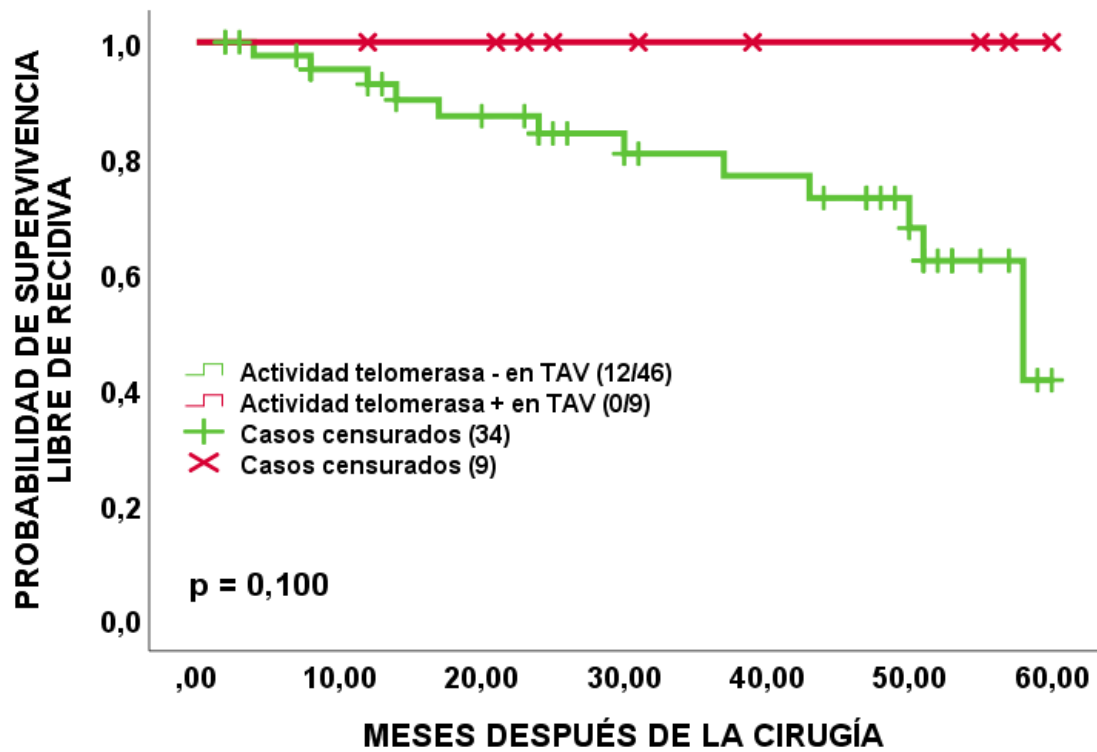


Figura 4.25.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la actividad telomerasa de los tejidos adiposos viscerales (TAV) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR). Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

Considerando los TAS, las diferencias estadísticas para el pronóstico clínico en relación con la actividad telomerasa se situaron al borde de la significación ($p = 0,058$; Log-Rank). En el estudio se incluyeron 56 pacientes, con 9 casos de recidiva tumoral en el subgrupo de pacientes sin actividad telomerasa (49 casos), y 3 eventos de recidiva en el subgrupo de pacientes con actividad telomerasa positiva (7 casos) (curvas de supervivencia representadas en la **Figura 4.26**).

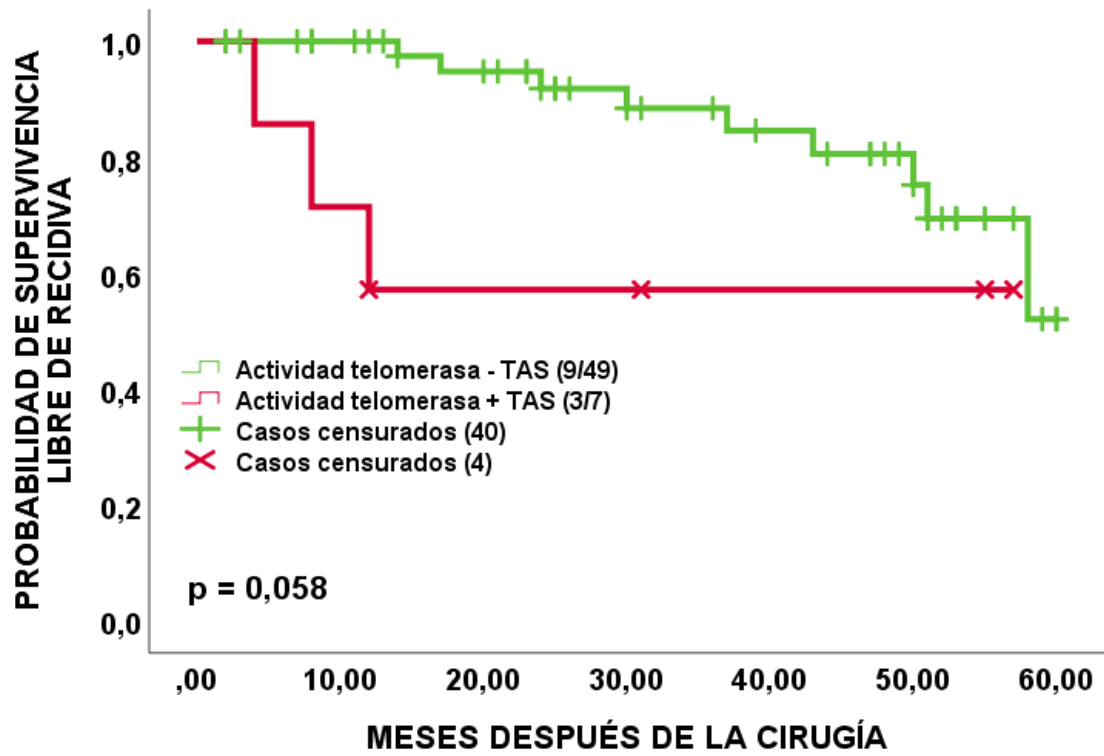


Figura 4.26.- Curvas de supervivencia (Kaplan-Meier) considerando la actividad telomerasa de los tejidos adiposos subcutáneos (TAS) en pacientes afectados de Cáncer Colorrectal (CCR).

Entre paréntesis: n° casos que recidivan/n° casos totales.

5. DISCUSIÓN

5.1. FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TUMORES COLORRECTALES

Cada evento de división celular lleva asociado, por las características funcionales de las moléculas implicadas en este proceso, un acortamiento gradual de los telómeros. Cuando este acortamiento alcanza niveles críticos, se produce la activación de las vías de senescencia y muerte celular (Campis & Robert, 2014; van Deursen, 2014; Childs et al., 2015). Si estos mecanismos de control celular fallan, las células adquirirán un potencial replicativo ilimitado, siendo esta una de las principales características de las células tumorales (Hanahan & Weinberg, 2011; Gruber et al., 2021).

En la población de cánceres colorrectales analizada en esta Tesis, el valor medio de LTM de los tejidos colorrectales tumorales fue inferior al valor detectado en los tejidos no tumorales, con un valor medio para el *Ratio* T/N inferior a 1 ($0,80 \pm 0,02$; media \pm error estándar). El acortamiento telomérico es un evento frecuente en la gran mayoría de los tumores humanos. En 2017 se recopiló información sobre las longitudes teloméricas de 31 tipos de tejidos tumorales y de sus controles no tumorales, observándose que la mayoría de los tumores presentaban un acortamiento telomérico con respecto a sus tejidos control (Barthel et al., 2017). Unos de los tipos tumorales que se abordan en dicho trabajo son los tumores colorrectales, para los que varios estudios han determinado una longitud telomérica tumoral inferior, en comparación con el tejido adyacente no tumoral (Feng et al., 2012; Roger et al., 2013; Balc'h et al., 2017), entre los que se incluyen investigaciones previas de nuestro grupo (Fernández-Marcelo et al., 2012).

Sin embargo, no todos los tumores se caracterizan por una reducción de la longitud telomérica. En ciertos melanomas, varios trabajos entre los años 2014 y 2020 han demostrado el incremento de la longitud telomérica de las células tumorales con respecto al tejido sano (Iles et al., 2014; Rachakonda et al., 2018; Bhattacharjee et al., 2020). Las investigaciones realizadas por los investigadores Ferreira en el año 2019 y Rodríguez un año más tarde también determinaron un incremento en el tamaño telomérico en gliomas en comparación con los telómeros de las muestras control (Rodríguez et al., 2019; Ferreira et al., 2020). Del mismo modo, en tumores colorrectales, el mantenimiento de los telómeros ha sido descrito por diversos autores (Fernández-Rozadilla et al., 2018; Peacock et al., 2018).

La implicación de la disfunción telomérica en el desarrollo de la tumorigénesis se relaciona con el correcto funcionamiento de los factores de senescencia celular, fundamentalmente p53 y p16. En condiciones normales, el acortamiento crítico de los telómeros, que conduce a disfunción telomérica, desencadenará la activación de las vías de senescencia celular, lo cual evitará inestabilidad genómica. Sin embargo, si las moléculas implicadas en senescencia celular no desarrollan correctamente su función, el acortamiento telomérico crítico provocará inestabilidad genómica (**Cosme-Blanco & Chang, 2008; Shay, 2016; Bernal & Tusell, 2018**).

Nuestros resultados, además, indicaron una correlación positiva entre la longitud telomérica de los tejidos tumorales y sus controles no tumorales, como ya se ha demostrado en trabajos previos de nuestro grupo de investigación por parte de la Doctora Fernández-Marcelo (**Fernández-Marcelo et al., 2012; Fernández-Marcelo et al., 2016**), y en investigaciones realizadas por otros autores (**Valls, C. 2011; Balc'h et al., 2017**). La longitud telomérica en ambos tipos de tejidos colorrectales se correlacionó de manera inversa con la edad de los pacientes, poniendo de manifiesto que el tamaño telomérico de los tumores está ligado a los antecedentes del tejido que corresponda y a la íntima relación entre función telomérica y envejecimiento (**Valls-Bautista et al., 2015; Bernadotte et al., 2016; Demanelis et al., 2021**).

La principal estrategia que tienen las células eucariotas para combatir la erosión de los telómeros, asociada a la replicación celular, radica en la activación de la enzima telomerasa (**Blackburn & Collins, 2011**). La reactivación de la telomerasa es un evento frecuente en las células tumorales, lo que les permite mantener unos telómeros con el tamaño suficiente como para evadir los mecanismos de senescencia asociados al acortamiento crítico de los telómeros (**Hanahan & Weinberg, 2011**).

En esta Tesis, el estudio de la actividad telomerasa estableció un porcentaje de reactivación de la enzima en el 75% de las muestras tumorales analizadas, cifra muy cercana a la detectada en trabajos anteriores de nuestro grupo (**Marcelo-Fernández et al., 2012; Marcelo-Fernández et al., 2016**), y en trabajos publicados por otros autores sobre tumores colorrectales (**Ayiomamitis et al., 2014; Jeung et al., 2017**). Los principales factores que desencadenan el proceso de carcinogénesis colorrectal están relacionados con alteraciones genéticas y epigenéticas que incluyen inestabilidad cromosómica, inestabilidad de microsatélites o fenotipo metilador de islas CpG (**Grady & Markowitz, 2015**;

Tomasova et al., 2020). Estas alteraciones pueden afectar a los mecanismos de control que las células tienen para evitar el excesivo acortamiento de los telómeros, dando como resultado poblaciones de células con unos telómeros cada vez más cortos. La escalada de acortamiento telomérico e inestabilidad genómica conduce a una presión selectiva para el mantenimiento de los telómeros, solventado principalmente por la reactivación de la telomerasa (**Ferguson et al., 2015; Guterres & Villanueva, 2020**). Diversas líneas de investigación han intentado dilucidar las causas de la reactivación de la telomerasa en tumores, relacionada fundamentalmente con mutaciones en el promotor de *hTERT* (**Vinagre et al., 2013; Bell et al., 2015; Chiba et al., 2017**), hipermetilación de determinadas regiones del promotor de *hTERT* (**Lee et al., 2019; Miyake et al., 2018**), o con el reordenamiento genético (**Valentijn et al., 2015; Peifer et al., 2015**). También se han publicado varios trabajos que han vinculado la reactivación de la enzima al denominado “efecto de posición de los telómeros” o TPE, responsable de la regulación de diversos genes a través del plegamiento tridimensional de la cromatina (**Kim et al., 2016; Kim & Shay, 2018**).

Sin embargo, los valores medios de LTM en los tejidos tumorales que reactivaron la telomerasa fueron muy similares a los detectados en los tejidos con actividad telomerasa negativa. De esta forma, el mantenimiento de la longitud telomérica, gracias a la reactivación de la telomerasa, permite hacer frente a la inestabilidad genómica generada por el acortamiento telomérico crítico inicial (**Blackburn & Collins, 2011; Hanahan & Weinberg, 2011**). Los experimentos realizados por el grupo de Chiba y cols. demostraron que es el acortamiento telomérico el responsable de la reactivación de la telomerasa (**Chiba et al., 2015**). Se han establecido varias hipótesis acerca de la fase concreta en la que se produce la reactivación de la telomerasa durante el proceso carcinogénico. La reactivación de la telomerasa en las etapas iniciales del proceso tumorigénico sería consecuencia de mutaciones en el promotor de *hTERT* o de mutaciones en moléculas implicadas en el control de la enzima, con lo cual la telomerasa estaría activa desde el inicio del desarrollo tumoral. Esta hipótesis se ha demostrado en la mayoría de leucemias y tumores testiculares (**Kumar et al., 2016**).

Sin embargo, en la mayoría de los tumores sólidos analizados, incluyendo los tumores colorrectales, la telomerasa se reactiva en etapas avanzadas de la progresión tumoral. Concretamente, en el CCR, la telomerasa se reactiva en la transición adenoma-carcinoma (**Baichoo & Boardman, 2014**) (**Kumar et al., 2016**).

En cuanto al estudio de la función telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas, los valores obtenidos para la LTM en tejidos colorrectales tumorales y su relación con las variables clínico-patológicas indicaron que los tumores de estadios más avanzados (estadio C y D de Dukes), así como los tumores con un grado de invasión superior hacia capas adyacentes (T3 y T4), mostraron unas longitudes teloméricas mayores. Los descriptores N y M, que indican invasión ganglionar y metástasis, no mostraron diferencias estadísticamente significativas, aunque la tendencia en el tamaño telomérico sigue la línea de lo observado para el estadio de Dukes. El grupo del investigador Augustine observó que los tumores colorrectales en pacientes con metástasis presentaban telómeros más largos que los tumores procedentes de pacientes con cánceres en estadios más tempranos (**Augustine et al., 2015**). En nuestro grupo de investigación, en estudios previos al incluido en esta Tesis, también se registró dicha tendencia, con un tamaño telomérico inferior para los tumores en estadios A y B de tumores colorrectales en comparación con tumores de estadios más avanzados (**Fernández-Marcelo et al., 2016**).

El inicio del CCR se relaciona con la acumulación de mutaciones que impiden a las células activar los mecanismos de senescencia y muerte celular cuando sus telómeros reducen su tamaño de manera crítica (**Tomasova et al., 2020**). Esta situación sería la responsable de que, en tumores en estadios tempranos (estadios A y B de Dukes), las células tengan unas longitudes teloméricas muy acortadas. Sin embargo, en el caso de los tumores en estadios más avanzados (estadios C y D), las células habrán adquirido, por presión selectiva, la capacidad de mantener el tamaño de sus telómeros, mediante la reactivación de la telomerasa, para poder dividirse de manera indefinida (**Ferguson et al., 2015**).

Nuestros resultados también indicaron un menor tamaño de los telómeros en los tumores de colon derecho, en comparación con los de colon izquierdo y recto, coincidiendo con los resultados publicados por Rampazzo y cols. (**Rampazzo et al., 2010**). Investigaciones precedentes han confirmado que los tumores de colon derecho se vinculan con una mayor carga mutacional, sobre todo en genes relacionados con inestabilidad de microsátelites, metilación de islas CpG y otras mutaciones conductoras (como en el gen *BRAF*), lo que favorecerían que estos tumores acortasen sus telómeros a una velocidad superior en comparación con los tumores de colon izquierdo o de recto (**Shimada et al., 2017**; **Salem et al., 2017**; **Ghidini et al., 2018**).

Las diferencias para la LTM en los tejidos tumorales con respecto al sexo indicaron una tendencia, sin llegar la significación estadística, hacia menores tamaños teloméricos en las mujeres con respecto a los hombres. La bibliografía que relaciona la longitud telomérica y el sexo no concuerda con estas observaciones, puesto que el estudio del tamaño telomérico en ambos sexos ha demostrado que las mujeres tienen telómeros más largos: un meta-análisis realizado en el año 2014 determinó que las mujeres evaluadas tenían unos telómeros aproximadamente 176 pares de bases superiores que los hombres (**Gardner et al., 2014**). Una posible explicación a este evento radica en el menor contenido en repeticiones teloméricas en el cromosoma Y, vinculado con el sexo masculino, por lo que los hombres tendrán unos valores de longitudes teloméricas ligeramente inferiores a las mujeres (**Barrett & Richardson, 2011**).

A pesar de las diferencias observadas para ciertas variables clínico-patológicas en la LTM de los tejidos colorrectales tumorales, los valores medios del *Ratio* T/N no mostraron estas diferencias para ninguna de las variables analizadas. Las diferencias en cuanto al sexo (mayor *Ratio* T/N en hombres) y a la localización tumoral (*Ratio* T/N ligeramente superior en tumores de recto) quedaron cercanas a la significación estadística.

Respecto a la actividad telomerasa, los análisis indicaron una mayor reactivación de la enzima en los tumores de colon izquierdo y recto (actividad telomerasa en el 81% y 86% de las muestras, respectivamente) en comparación con los tumores de colon derecho (57% de casos con actividad telomerasa positiva). Shimada y cols. detectaron un incremento en la tasa de mutación de varios genes involucrados en supresión tumoral, principalmente en los genes *APC* y *TP53*, en tumores de colon izquierdo (**Shimada et al., 2017**). Otro estudio llevado a cabo por el grupo de Jiang, en el año 2020, el cual recopiló información sobre las secuencias de ARN y mutaciones en más de 300 tumores de colon, demostró que, en los tumores originados en el colon izquierdo, las mayores tasas mutacionales afectaban también a los genes *APC* y *TP53* (**Jiang, Y et al., 2020**). Estos descubrimientos permitirían explicar una mayor reactivación de la telomerasa en los tumores de colon izquierdo y recto con respecto a los de colon derecho, ya que las mutaciones en *APC* facilitarían la activación de la vía Wnt- β -catenina (participa en la reactivación de la telomerasa), y un funcionamiento erróneo de p53 impediría activar las vías de senescencia en caso de acortamiento crítico de los telómeros, favoreciéndose la aparición de inestabilidad genómica que podría conducir a la reactivación de la enzima (**Hoffmeyer et al., 2012; Yu et al., 2016; Rampazzo et al., 2017; Jiang, X et al., 2020**).

Si bien para la actividad telomerasa no se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre los tumores colorrectales clasificados en los diversos estadios de Dukes, estas diferencias sí fueron evidentes al considerar el tumor primario (descriptor T), variable asociada al estadio de Dukes. La actividad telomerasa se detectó en una mayor proporción en los tumores con una invasión hacia capas cercanas (T1 y T2) que en tumores que abarcan incluso el peritoneo y otros órganos (T3 y T4). El elevado acortamiento telomérico en las etapas tempranas de la enfermedad citado anteriormente estaría relacionado con este incremento de la actividad telomerasa. En etapas tempranas de la enfermedad, la necesidad de mantener los telómeros, en respuesta al acortamiento exacerbado de estas secuencias teloméricas por la gran capacidad replicativa que muestran las células tumorales, se relacionaría principalmente con la reactivación de la telomerasa (**Guterres & Villanueva, 2020**).

La actividad telomerasa no mostró diferencias según el sexo. Las investigaciones disponibles en la bibliografía actual muestran trabajos que defienden una mayor expresión de la enzima telomerasa en mujeres. La explicación biológica estaría relacionada con la localización de varios genes implicados en dicha actividad enzimática (como el que codifica para la proteína disquerina) en el cromosoma X, y la regulación de telomerasa mediada por los estrógenos (**Nawrot et al., 2004; Bayne et al., 2007; Parry et al., 2011**).

El efecto que tiene el incremento del IMC sobre la función telomérica ha sido plasmado durante los últimos años en diversos trabajos. En ellos se indica la interferencia que el IMC tiene sobre la correcta homeostasis de los telómeros debido al estado de inflamación y estrés oxidativo al que los tejidos de sujetos con IMC elevado están sometidos (**Zannolli et al., 2008; Rode et al., 2014; Carulli et al., 2016; Lin et al., 2021**).

Los valores medios de LTM de las muestras analizadas en esta Tesis, tanto en tejidos colorrectales tumorales como en tejidos no tumorales, no arrojaron diferencias estadísticamente significativas al compararse entre pacientes con normopeso, sobrepeso u obesidad. Sin embargo, al analizar los valores para los *Ratios* T/N entre estos tres grupos, los pacientes con obesidad mostraron un valor de *Ratio* T/N inferior al de los pacientes con normopeso y sobrepeso, con diferencias que rozaron la significación estadística. El incremento del IMC acentúa la erosión de los telómeros debido al aumento de adipocinas y otras moléculas pro-inflamatorias asociadas a dicha condición fisiológica (**Lee et al., 2011; García-Calzón et al., 2014; Barnes et al., 2019**). No obstante, en los tejidos

colorrectales analizados en esta tesis, al proceder de pacientes que han desarrollado algún tipo de cáncer colorrectal, la repercusión del IMC sobre la longitud telomérica no se refleja de manera tan evidente como en individuos sin esta patología. En estos tejidos, el proceso de transformación maligna ejercería un efecto superior sobre el acortamiento telomérico, en comparación con el que pudiese tener el IMC sobre la biología de los telómeros.

Los estudios de correlación para los valores medios de LTM entre los tejidos tumorales y no tumorales también mostraron una asociación positiva en los pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad. Estos resultados ponen de manifiesto, una vez más, la influencia de la historia tisular en la longitud telomérica del tejido tumoral (**Valls-Bautista et al., 2015**): la erosión de las secuencias teloméricas en individuos con sobrepeso y obesidad ocurrirá a nivel sistémico, por lo que tanto los telómeros de los tejidos tumorales como los de los tejidos sanos sufrirán un nivel de acortamiento muy parecido debido al incremento en el IMC.

Por su parte, el número de casos que reactivaron la telomerasa no mostró diferencias estadísticamente significativas entre los pacientes con normopeso, sobrepeso y obesidad. Estos resultados difieren de otros publicados recientemente, ya que varios estudios han identificado una correlación negativa entre los niveles de expresión de esta enzima y el IMC (**Epel et al., 2006; Melk et al., 2014; Kidir et al., 2017**).

En 2004 se estableció, gracias a los descubrimientos de la investigadora Haendeler y cols., que el estrés oxidativo favorece la exportación de la subunidad catalítica de la telomerasa desde el núcleo hacia el citoplasma, impidiendo que la enzima lleve a cabo su función de mantenimiento telomérico (**Haendeler et al., 2004**). Posteriormente, en 2016, dos publicaciones revelaron que la adición de bases nitrogenadas oxidadas durante la elongación de telómeros inducía una finalización prematura del proceso, reduciendo drásticamente la actividad de la telomerasa (**Fouquerel et al., 2016; Aeby et al., 2016**). Por estas razones, el estado de inflamación crónico asociado al incremento del IMC sería el responsable de la reducción de la actividad telomerasa en pacientes con sobrepeso u obesidad (**Carulli et al., 2016; Lin et al., 2021**).

Sin embargo, también existe bibliografía que define un incremento en los niveles de telomerasa en situaciones de inflamación y estrés oxidativo, principalmente en pacientes que padecen síndrome metabólico, como así lo detallan los trabajos de los autores

Rentoukas y Gavia-García (**Rentoukas et al., 2012; Gavia-García et al., 2020**). La modificación que provoca el estrés oxidativo sobre las bases nitrogenadas que componen el ADN pueden favorecer la disrupción de las estructuras de G-cuádruplex que protegen los telómeros, haciendo que estos sean más accesibles para la telomerasa (**Fouquerel et al., 2016; Lee et al., 2017**). Además, se sabe que los individuos con obesidad sufren un incremento en la activación de la vía Wnt/ β -catenina (**Nijhawan et al., 2020; Bagchi et al., 2020**), por lo que los niveles de actividad de la enzima pueden verse aumentados debido a su interacción con esta vía de señalización, como ya han demostrado viarios estudios realizados en líneas celulares (**Hoffmeyer et al., 2012; Liu et al., 2021**).

La relación entre la función telomérica y las diferentes variables clínico-patológicas para cada grupo de pacientes (pacientes con normopeso, pacientes con sobrepeso y pacientes con obesidad) también fue objeto de estudio.

En los tejidos tumorales, los pacientes clasificados en grupos de normopeso, sobrepeso y obesidad no mostraron diferencias estadísticamente significativas entre los valores de LTM de tumores colorrectales para ninguna de las variables clínico-patológicas estudiadas. Cabe destacar una tendencia en el grupo de pacientes con normopeso hacia una mayor longitud telomérica en tumores de estadios avanzados (estadios C y D de Dukes), así como un acortamiento de los telómeros en los tumores de colon derecho con respecto a tumores de colon izquierdo o recto. La explicación para estas observaciones se basaría en el hecho de que los telómeros de tumores de pacientes con normopeso, al no estar sometidos al efecto adverso que tiene el incremento del IMC (principalmente, inflamación crónica), sólo se verán afectados por el proceso carcinogénico (acortamiento crítico de los telómeros y consecuente aumento de la inestabilidad genética) (**Muller et al., 2016; Harada & Morlote, 2020**). Por su parte, los tejidos tumorales procedentes de pacientes con sobrepeso y obesidad tienen asociado un acortamiento telomérico adicional inherente al incremento del IMC (**García-Calzón et al., 2014; Barnes et al., 2019**).

Para el *Ratio* T/N, los datos registrados en relación con las variables clínico-patológicas tampoco mostraron diferencias estadísticamente significativas para ninguno de los 3 grupos de IMC, lo que vuelve a reflejar la influencia del IMC sobre el tamaño telomérico: los tejidos tumorales y no tumorales de pacientes con sobrepeso y obesidad estarán sometidos a un estrés oxidativo y estado proinflamatorio crónico muy similar, propio de un IMC elevado.

Los estudios de actividad telomerasa en tumores, llevados a cabo en relación con las diferentes variables clínico-patológicas, indicaron, con diferencias estadísticamente significativas, un mayor número de casos con actividad telomerasa positiva en el grupo de casos de colon izquierdo o recto, en pacientes con sobrepeso. En individuos con obesidad, los tumores de recto mostraron un mayor número de casos que reactivaron la enzima. Los tumores de colon izquierdo o recto se relacionan con mutaciones en genes supresores de tumores (genes como *APC* o *TP53*) (**Jiang, Y et al., 2020**). Por ello, los tumores en estas localizaciones, sometidos a un acortamiento evidente de sus telómeros, tanto por la división celular incontrolada (consecuencia de la pérdida de control sobre la senescencia) como por la celeridad de dicho acortamiento vinculado a un mayor valor de IMC (**Gielen et al., 2018**), reactivan la telomerasa en mayor proporción como mecanismo de supervivencia (**Grady & Markowitz, 2015**).

Las diferencias en la actividad telomerasa en tumores con distinto estadio de Dukes no fueron estadísticamente significativas, aunque sí se observaron diferencias con relación al grado de invasión local o ganglionar del tumor, tanto en pacientes con sobrepeso como en pacientes con obesidad. Los tumores con menor grado de invasión de capas adyacentes mostraron un mayor número de casos con actividad telomerasa positiva en ambos grupos de pacientes. En pacientes con sobrepeso, el número de casos con actividad telomerasa fue mayor en tumores sin invasión ganglionar, mientras que en pacientes con obesidad se detectó una mayor proporción de reactivación de la enzima en tumores con invasión ganglionar. De nuevo, parece ser que el mayor grado de acortamiento telomérico en tumores que han dado lugar a escasa invasión es el responsable de que las células tengan que reactivar la telomerasa como mecanismo de supervivencia para poder solventar el problema de unos telómeros críticamente acortados (**Akincilar et al., 2016; Tomsova et al., 2020**). En pacientes con obesidad, el ambiente inflamatorio y oxidativo que distingue a esta condición fisiológica podría ser el responsable del mantenimiento de la actividad telomerasa en fases avanzadas de la enfermedad (caracterizadas por situaciones de invasión ganglionar) (**Lee et al., 2017; Bagchi et al., 2020; Liu et al., 2021**).

Debido a su estrecha relación con la activación de las vías de senescencia y muerte celular, la longitud telomérica y la actividad telomerasa se han convertido en unos parámetros potencialmente útiles en el diagnóstico y seguimiento del cáncer. La validez de la función telomérica como herramienta para la predicción del pronóstico en tumores colorectales ha sido objeto de estudio en varios trabajos: Bertorelle analizó la actividad

telomerasa en muestras tumorales de 21 pacientes afectados de CCR, observando una reducción en el Intervalo Libre de Enfermedad (ILE) en aquellos casos con una actividad telomerasa elevada (**Bertorelle et al., 2013**); recientemente, otro estudio, publicado en 2019 y realizado también en individuos afectados de CCR, demostró una reducción de la Supervivencia Global en los pacientes con tumores de mayor longitud telomérica relativa (**Kroupa et al., 2019**). También, nuestro propio grupo de investigación estableció el papel protector que el acortamiento telomérico en el tejido tumoral confiere a los sujetos afectados de CCR (**Fernández-Marcelo et al., 2016**).

Además de analizarse en tumores colorrectales, la función telomérica se ha estudiado como factor pronóstico en tumores que afectan otros tejidos. En 2010, Brems-Eskildsen llevó a cabo un estudio en el que se analizaron muestras tumorales procedentes de 117 pacientes diagnosticados de cáncer de próstata, determinando que los pacientes con tumores que expresaban *hTERT* mostraban un peor pronóstico clínico (reducción del Intervalo Libre de Enfermedad o ILE) (**Brems-Eskildsen et al., 2010**). En cáncer de mama, existen estudios que demuestran que el acortamiento telomérico, tanto en el tejido tumoral como en el tejido no tumoral adyacente, se correlaciona con un pronóstico adverso de la enfermedad (**Zhou et al., 2012; Gay-Bellile et al., 2016**).

En el caso de los tumores de pulmón, en 2014, un estudio que implicó a 164 individuos afectados de cáncer no microcítico de pulmón estableció que los tumores con telómeros largos confieren un mejor pronóstico clínico a los pacientes afectados (**Jeon et al., 2014**). Un año más tarde, en 2015, nuestro grupo de investigación publicó un artículo en el que se establecía que el acortamiento telomérico de los tejidos tumorales reducía el Intervalo Libre de Enfermedad de los pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón (**Fernández-Marcelo et al., 2015**). Con respecto a investigaciones en otros tipos de tumores, trabajos anteriores de nuestro grupo demostraron un peor pronóstico clínico en pacientes afectados de cáncer gástrico para tumores con telómeros acortados (**Pascua et al., 2015**).

Para la población incluida en los estudios pronóstico basados en la longitud telomérica de esta Tesis, un valor de LTM tumoral inferior a 6,5 Kb confirió un mejor pronóstico clínico, reduciendo la probabilidad de recidiva en los pacientes con telómeros tumorales por debajo de este tamaño, independientemente del estadio de Dukes. La bibliografía actual, aparte de los estudios detallados en un párrafo anterior de esta Discusión que avalan

la utilidad de los parámetros de función telomérica en el establecimiento del pronóstico y seguimiento del CCR, recoge otros estudios que no apoyan dicha utilidad. Ese es el caso del trabajo llevado a cabo en 2016 por Suraweera y cols., en el que no se consiguió demostrar ninguna diferencia significativa en el Intervalo Libre de Enfermedad de pacientes afectados de CCR con tumores en los que sus telómeros estaban acortados o en comparación con los que mostraron una longitud mantenida (**Suraweera et al., 2016**).

La realidad es que la función del acortamiento o del mantenimiento de los telómeros en tumores constituye un aspecto muy discutido en la bibliografía actual, con resultados relativamente controvertidos. Así, estudios como los llevados a cabo por Le Balc'h y Ye en 2017 y 2021, respectivamente, indican una tendencia contradictoria a la mostrada en esta Tesis: el acortamiento telomérico en el tejido tumoral reduce la Supervivencia Global y el Intervalo Libre de Enfermedad de los sujetos afectados de CCR (**Balc'h et al., 2017; Ye et al., 2021**).

El papel protector que el acortamiento telomérico tumoral confiere a los pacientes considerados en esta Tesis también se ve apoyado por otras publicaciones. En 2004, Gertler y cols. analizaron un total de 57 CCRs y determinaron que una longitud telomérica tumoral inferior a 5,4 Kb aumentaba la probabilidad de Supervivencia Global en los pacientes (**Gertler et al., 2004**). Valls y cols. observaron que los tumores con un Ratio telomérico inferior a 1 (telómeros de tejidos tumorales más cortos que los telómeros de tejidos no tumorales) reducen de manera significativa la Supervivencia Global de los sujetos afectados de CCR (**Valls et al., 2011**). Cuatro años más tarde, un estudio realizado en 94 pacientes que padecían CCR determinó que los tejidos tumorales de estadios tempranos y sin metástasis tenían los telómeros más cortos que aquellos tumores de etapas más avanzadas (**Mzahma et al., 2015**). Un meta-análisis publicado en 2016 estableció que las longitudes teloméricas elongadas en tumores colorrectales se relacionaban con una reducción en la Supervivencia Global (**Jia & Wang, 2016**). En 2019, Kroupa y cols. analizaron el *Ratio* T/N entre la longitud telomérica relativa del tejido tumoral y el tejido no tumoral, y de nuevo se identificó un mejor pronóstico de la enfermedad para los individuos con telómeros tumorales de *Ratio* inferior a 0,90 (**Kroupa et al., 2019**). En estudios previos de nuestro grupo de investigación, el análisis de la longitud telomérica de tejidos colorrectales, realizado en 101 pacientes, mostró que tamaños inferiores a 6,35 Kb se relacionaban con una mejor evolución clínica (**Fernández-Marcelo et al., 2016**).

El tamaño telomérico en los tejidos colorrectales no tumorales analizados en esta Tesis también tuvo una implicación en el pronóstico de los pacientes afectados de CCR, ya que los sujetos con longitudes teloméricas inferiores a 7,11 Kb mostraron un pronóstico clínico más favorable, independientemente del estadio de Dukes de los cánceres. Estos resultados, una vez más, apoyan la influencia del historial tisular sobre el desarrollo tumoral, en particular del CCR (**Huang et al., 2016; Peacock et al., 2018**).

En cuanto a la actividad telomerasa, nuestros resultados no indican diferencias estadísticamente significativas en relación con el pronóstico clínico de los pacientes incluidos en los diferentes protocolos. En publicaciones previas de nuestro grupo de investigación en otras series de CCR tampoco se detectaron resultados significativos a este respecto, únicamente tendencias hacia un pronóstico clínico más adverso en pacientes con tumores colorrectales que reactivaban la telomerasa (**García-Aranda et al., 2006; Fernández-Marcelo et al., 2016**). Además, en la bibliografía sobre el tema son varias las publicaciones que asocian la reactivación de telomerasa con una peor evolución clínica del CCR. Así, en 2005 se analizó la actividad telomerasa de 103 muestras de tejidos tumorales colorrectales, determinando que los individuos con dicha actividad positiva en tumores tenían una menor Supervivencia Global (**Sanz-Casla et al., 2005**). Dos años más tarde, se publicó un trabajo en el que se mostró que los pacientes afectados de cáncer de recto con un incremento en la actividad telomerasa en tejidos tumorales con respecto a tejidos no tumorales adyacentes (denominado índice de telomerasa) tenían una mayor probabilidad de recidiva y una Supervivencia Global inferior (**Bautista et al., 2007**). En 2011, el trabajo publicado por Kojima reveló que los tumores con actividad telomerasa y sin acortamiento de los telómeros reducían la Supervivencia Global al ser comparados con tumores sin actividad telomerasa (**Kojima et al., 2011**). Bertorelle, en 2013, observó una reducción en el Intervalo Libre de Enfermedad de los pacientes con CCR y altos niveles de expresión de *hTERT* en sus tumores en comparación con sujetos cuyos tumores tenían una menor expresión de este gen (**Bertorelle et al., 2013**).

Además de los estudios descritos en el párrafo anterior que respaldan el efecto negativo de la reactivación de telomerasa sobre el pronóstico clínico del CCR, hay trabajos que indican una mejor evolución clínica en los pacientes con tumores CCRs telomerasa positivos. En 2002 se realizó un estudio en 122 sujetos con tumores colorrectales de estadio II y se observó que los casos con actividad telomerasa positiva se relacionaron con un incremento en el Intervalo Libre de Enfermedad de los pacientes (**Kawanishi-Tabata**

et al., 2002). Por su parte, Safont y su grupo analizaron, en 2011, los niveles de expresión del gen que codifica para la subunidad catalítica de la telomerasa en 48 muestras de tejidos tumorales colorrectales, observando que los tumores con una mayor expresión de este gen conferían un aumento del Intervalo Libre de Enfermedad (**Safont et al., 2011**).

Otro de los parámetros evaluados en los estudios pronóstico establecidos en esta Tesis fue el IMC de los pacientes con CCR. Al compararse el pronóstico entre las subpoblaciones analizadas de individuos con normopeso ($IMC < 25 \text{ kg/m}^2$), individuos con sobrepeso (IMC entre 25 y $29,9 \text{ kg/m}^2$) e individuos con obesidad ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$), no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, al dividir la población en dos subgrupos con un IMC inferior e igual o superior a $31,85 \text{ kg/m}^2$, las diferencias en torno al desarrollo clínico mostraron significación estadística, con una reducción en el Intervalo Libre de Enfermedad en el caso de los pacientes con mayor IMC.

La relación entre el IMC y el pronóstico clínico en el CCR ha sido objeto de numerosos trabajos de investigación en los últimos tiempos. En 2016 se evaluó a más de 2.000 pacientes afectados de CCR, y se determinó que los incluidos en los grupos de sobrepeso y obesidad, únicamente para tumores de estadio I, sufrieron una peor evolución de la enfermedad. Sin embargo, para tumores de estadios III y IV, los resultados fueron los inversos, demostrándose un incremento en la Supervivencia Global en sujetos con un valor de IMC superior a 25 Kg/m^2 (**Kocarnik et al., 2016**). Un estudio realizado en pacientes asiáticos, en el año 2017, puso de manifiesto que los pacientes clasificados como obesos ($IMC \geq 30 \text{ kg/m}^2$) tenían una reducción en su Supervivencia Global (**Wang et al., 2017**). Los resultados de otro estudio retrospectivo llevado a cabo por Sakin 2 años después indicaron que el Intervalo Libre de Enfermedad se reducía significativamente en los individuos afectados de CCR con un IMC superior a 30 kg/m^2 (**Sakin et al., 2019**). En 2020 se publicó un artículo que afirmaba que los pacientes afectados de CCR y categorizados como sujetos con sobrepeso u obesidad tenían un mayor riesgo de recidiva que los pacientes con un IMC inferior. Además, en este estudio se demostró que un valor de IMC inferior a $18,5 \text{ Kg/m}^2$, condición fisiológica denominada como “infrapeso”, también tenía un efecto negativo en la recurrencia y supervivencia (**Hu et al., 2020**).

No obstante, el IMC como factor pronóstico en el desarrollo del CCR, al igual que se ha demostrado con la longitud telomérica y con la actividad telomerasa, no está exento de controversia.

La dualidad de la influencia del IMC sobre el desarrollo del cáncer en general, y sobre el CCR en particular, se debe principalmente a lo que los autores denominan la “paradoja de la obesidad” (*obesity paradox*, en inglés): en los individuos que sufren algún tipo de cáncer, la gráfica que define la supervivencia en función del IMC (individuos con normopeso, sobrepeso u obesidad) adopta una forma de “U” o “J”, lo que indicaría que los sujetos con un IMC elevado podrían verse favorecidos frente al desarrollo del cáncer (Caan & Kroenke, 2017). En la bibliografía actual se pueden encontrar numerosos trabajos que apoyan esta hipótesis, no solamente en pacientes afectados de CCR (Schlesinger et al., 2014; Daniel et al., 2016; Kroenke et al., 2016), sino también en otros tipos de tumores, como los renales, de cabeza y cuello, de próstata o de mama (Hakimi et al., 2013; Alarfi et al., 2017; Grossberg et al., 2016; Martini et al., 2021).

La explicación a esta paradoja resultaría de gran interés para poder comprender las implicaciones clínicas del IMC en el pronóstico de los pacientes con alguna de estas patologías. Hasta la fecha, las razones que justifican este comportamiento se basan en dos conceptos: explicación metodológica y explicación clínica (Lennon et al., 2016). Las explicaciones metodológicas abordan las causas desde el punto de vista del diseño experimental de las investigaciones, como pueden ser el empleo del IMC en lugar de la composición de tejido graso de los pacientes para evaluar su condición fisiológica, elección de los sujetos incluidos en los estudios de forma sesgada, o lo que en la bibliografía se define como “causalidad reversa” (algunos pacientes con un IMC elevado en etapas anteriores al diagnóstico del tumor han podido sufrir una reducción drástica de su peso corporal, debido al avance y desarrollo de la enfermedad, hasta alcanzar valores de normopeso) (González et al., 2014; Renehan et al., 2014). Por su parte, las explicaciones clínicas se basan en la reducción de la agresividad de los tumores y en una mejor respuesta a los tratamientos en pacientes con sobrepeso u obesidad (Sinicrope et al., 2013; Wong et al., 2014).

Debido a la falta de resultados concluyentes que expliquen al verdadero papel del IMC en el pronóstico del CCR, resulta imprescindible continuar desarrollando líneas de investigación que aporten respuestas en este punto.

En los estudios pronóstico establecidos en el presente trabajo también se consideran variables como el sexo de los pacientes. En varones se mantuvieron las diferencias detectadas en relación con el IMC, registrando una mejor evolución de la enfermedad los

sujetos varones con un valor de IMC inferior a 31,85 kg/m². Sin embargo, cuando se analizaron únicamente pacientes de sexo femenino, esas diferencias dejaron de alcanzar la significación estadística.

El comportamiento del IMC en función del sexo se ha estudiado en una amplia variedad de tumores. Un estudio llevado a cabo en 263 pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón concluyó en 2017 que los sujetos varones con un IMC inferior a 18,5 kg/m² sufrían una reducción en su supervivencia, mientras que en mujeres estas diferencias no se observaron (**Kawai et al., 2017**). En ese mismo año, un estudio realizado por el grupo de Kanemasa en pacientes con linfoma difuso de células B grandes mostró que los individuos varones clasificados como normopeso o sobrepeso tuvieron una mejor Supervivencia Global que los pacientes del mismo sexo con valores de IMC superiores o inferiores, sin observarse dichas diferencias al considerar únicamente mujeres (**Kanemasa et al., 2017**). También en 2017, se publicó un trabajo sobre 22 ensayos clínicos que englobaban varios tipos tumorales, entre los que se encontraban tumores de vejiga, riñón, colon o pulmón, en el que se determinó que, únicamente en varones, un valor de IMC > 25 kg/m² tenía un efecto protector en la Supervivencia Global de los pacientes estudiados (**Greenlee et al., 2017**).

Las posibles razones de la influencia del IMC en el pronóstico de pacientes varones afectados de cáncer, y no en mujeres, se refiere principalmente a características biológicas ligadas al sexo: la distribución de grasa corporal en hombres es diferente a la de las mujeres, acumulándose mayores depósitos de grasa visceral en el sexo masculino (**Power & Schulkin, 2008**); los andrógenos y los estrógenos tienen efectos diferentes en el microambiente tumoral (en concreto, los estrógenos tienen un efecto inhibitor en las vías de señalización mediadas por NF-κB) (**Kim, H et al. 2018; Wuidar et al., 2021**); el sistema inmunitario en hombres y mujeres tiene un comportamiento desigual, detectándose en el género femenino un incremento de la respuesta inmunitaria adaptativa (principalmente linfocitos B y T) (**Klein & Flanagan, 2016**); la falta de inactivación de una de las copias del cromosoma X, característico de las células somáticas en mujeres, puede proteger de mutaciones que afectan a genes supresores de tumores (**Dunford et al., 2017**). Estas cualidades fisiológicas asociadas al sexo femenino podrían enmascarar el efecto del IMC sobre el pronóstico clínico del CCR que sí se observa en pacientes varones.

Para finalizar con los estudios pronóstico en la serie de pacientes analizados para tejidos colorrectales, se procedió a determinar si el papel protector del acortamiento telomérico, tanto en los tejidos colorrectales tumorales como en los no tumorales, se mantenía al tener en cuenta el valor del IMC. Los resultados obtenidos en el subgrupo de pacientes con un IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$ indicaron que los telómeros más acortados, en los tejidos colorrectales, se relacionaban con un mejor pronóstico clínico, si bien las diferencias, en este caso, no fueron independientes del estadio tumoral. Cuando se analizó la subpoblación de casos con un IMC igual o superior a $31,85 \text{ kg/m}^2$, las diferencias en el pronóstico clínico dejaron de ser estadísticamente significativas para ambos tejidos colorrectales. Sin embargo, la tendencia observada para un IMC inferior se mantenía, e incluso con mayor intensidad, ya que en el subgrupo de individuos con telómeros tumorales y no tumorales acortados no se detectó ningún caso de recidiva tumoral.

Dado que la subpoblación de pacientes con un IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$, en su mayoría, está conformada por pacientes clasificados como normopeso y sobrepeso, los efectos proinflamatorios crónicos que caracterizan a la tendrán una escasa influencia (Gregor & Hotamisligil, 2011; Choi et al., 2013). Sin embargo, en la subpoblación de individuos con un IMC igual o superior a $31,85 \text{ kg/m}^2$, la protección detectada para el acortamiento telomérico podría verse potenciada, puesto que los pacientes con tumores con mayores longitudes teloméricas tendrían un pronóstico clínico adverso, más acentuado si cabe, como consecuencia de la condición inflamatoria basal que acompaña a la obesidad. No obstante, el reducido número de casos estudiados para este subgrupo de individuos no permite alcanzar conclusiones definitivas a este respecto. Resulta esencial, por tanto, llevar a cabo una investigación más profunda incrementando el número de casos sometido a estudio.

5.2. FUNCIÓN TELOMÉRICA EN TEJIDOS ADIPOSOS, EN RELACIÓN CON EL CÁNCER COLORRECTAL Y CON EL ÍNDICE DE MASA CORPORAL.

Una vez estudiado el comportamiento de la función telomérica y del IMC en los tejidos colorrectales, y su papel en el pronóstico clínico del CCR, la función telomérica se evaluó en la población de tejidos adiposos (TAV y TAS) considerados en esta Tesis.

Desde hace varios años, se ha observado que el tamaño de los telómeros en los TAV y en los TAS es diferente. Las investigaciones realizadas por Lakowa en 2015 señalaron un tamaño telomérico inferior en los TAS con respecto a los TAV, al analizar los tejidos adiposos de 97 pacientes con y sin obesidad (**Lakowa et al., 2015**). El menor tamaño en las secuencias teloméricas en los TAS podría deberse a una mayor tasa de proliferación de las células progenitoras adiposas denominadas células madre derivadas del tejido adiposo (*adipose-derived stem cells* o ASC, en inglés) en los TAS en comparación con las de los TAV, como demostró el grupo de van Harmelen (**Van Harmelen et al., 2004**). Las células progenitoras de los TAS responden mejor a los diferentes factores de crecimiento y diferenciación, lo que les permite tener una mayor capacidad proliferativa que las células progenitoras de los TAV (**Kim et al., 2016**).

Los análisis de longitud telomérica en los TAV y en los TAS llevados a cabo en esta Tesis indicaron telómeros con tamaños muy similares para ambos tejidos, además de detectarse una correlación positiva entre las dos medidas. Esta correlación entre la longitud telomérica en los dos tejidos adiposos investigados se ha observado en otros trabajos, como el de Gurung en el año 2020, en el que se evaluó a más de 90 individuos asiáticos sometidos a cirugía bariátrica (**Gurung et al., 2020**).

Los *Ratios* T/S de los TAV y TAS no se correlacionaron con la edad de la población investigada en nuestro trabajo. Sin embargo, varios autores sí han conseguido demostrar una correlación negativa entre el tamaño telomérico del tejido adiposo y la edad, como ocurre en la mayoría de tejidos: en 2013, se publicó un artículo en el que se estudió el *ratio* de acortamiento telomérico en leucocitos, músculo, piel y tejido adiposo, y todos ellos veían reducida su longitud telomérica cuanto mayor era la edad de los sujetos de los que procedían (**Daniali et al., 2013**). En el mismo año, Wu y cols. examinaron muestras de células madre mesenquimales derivadas de tejido adiposo procedentes de niños, adultos y ancianos, descubriendo que sus longitudes teloméricas se iban acortando al avanzar la edad (**Wu et al., 2013**).

Los resultados para la actividad telomerasa indicaron una reactivación enzimática en el 20,3% de los TAV y en el 10,1% de los TAS analizados. Debido al contenido de células ASC en los tejidos adiposos, es posible detectar niveles de activación de la telomerasa que les permitan realizar sus funciones de renovación y diferenciación celular (**Ogura et al., 2014; Aprile et al., 2021**).

Sin embargo, los TAV y los TAS tienen patrones de expresión génica diferentes, detectándose en los primeros unos mayores niveles de ciertas adipocinas y otras moléculas, como la leptina, adiponectina y citoquinas proinflamatorias (**Ibrahim, 2010**). Estas diferencias moleculares podrían influir en la actividad enzimática de la telomerasa: un estudio realizado en 2011 en pacientes con cáncer de mama desveló que los niveles de leptina circulante se correlacionaban positivamente con la expresión de *hTERT* en el tejido tumoral, indicando una conexión entre ambas moléculas (**Rahmati-Yamchi et al., 2011**). El tratamiento de células de músculo liso vascular con adiponectina estimula la actividad telomerasa y reduce la apoptosis tras ser sometidas a elevadas concentraciones de glucosa (**Cui et al., 2020**). Chung y cols. analizaron los niveles de expresión de *hTERT* en células tratadas simultáneamente con IL-6 y TNF- α (citoquinas proinflamatorias), observando un incremento en la expresión de la subunidad catalítica de la telomerasa, mediado por la activación de la vía de señalización STAT y posterior unión al promotor de *hTERT* (**Chung et al., 2017**).

En nuestro caso, los estudios de longitud telomérica en función de la reactivación de la telomerasa revelaron un comportamiento diferente entre los dos tejidos adiposos sometidos a estudio. En los TAS, los valores de *Ratios* T/S fueron muy semejantes, tanto en presencia como en ausencia de actividad telomerasa. Por su parte, en los TAV se detectó un acortamiento telomérico en los casos con la enzima reactivada, con diferencias cercanas a la significación estadística. Una mayor expresión y liberación de adipocinas y citoquinas proinflamatorias, propio de los TAV, conllevaría una mayor acción oxidativa sobre sus telómeros, reduciendo su tamaño (**Reichert & Stier 2017**). Este mayor acortamiento telomérico sería el desencadenante de la reactivación de la telomerasa por parte de las células progenitoras de los TAV, necesario para renovar el tejido. Referente a los TAS, la menor erosión que sufren sus telómeros por parte de estas moléculas hace que las longitudes teloméricas sean muy similares tanto en ausencia como en presencia de telomerasa. La actividad telomerasa detectada en estos tejidos procederían de la actividad basal de este tipo de células y no por el acortamiento telomérico de las células que integran los TAS (**Minteer et al., 2013; De Francesco et al., 2015**).

Uno de los principales efectos de la obesidad sobre el organismo es el desarrollo de un estado pro-inflamatorio crónico provocado, principalmente, por la ingesta excesiva de nutrientes. La acumulación de estos nutrientes impide que las células del tejido adiposo blanco (especialmente adipocitos) puedan captarlos por completo (principalmente, por el

bloqueo del receptor de insulina), por lo que se activan señales intracelulares relacionadas con una respuesta inflamatoria. Este estado de inflamación se encuentra mediado por diversas citoquinas, como TNF- α o IL-1, que favorecen la llegada y activación de distintas células del sistema inmune (entre las que se encuentran macrófagos y linfocitos T). Esta situación conduce a una fuerte respuesta inflamatoria, que inhibe las funciones metabólicas de las células que componen el tejido adiposo (desarrollando resistencia a insulina) y retroalimenta este ambiente inflamatorio (**Gregor & Hotamisligil, 2011**). Con respecto a las células del sistema inmunitario que participan en este estado de inflamación crónico vinculado con la obesidad, el reclutamiento de los macrófagos hacia estos tejidos adiposos se debe principalmente a tres factores: 1) elevados niveles de citoquinas con un efecto proinflamatorio; 2) aumento de la muerte celular provocada por la hipertrofia de los adipocitos; 3) liberación de ácidos grasos por parte de los adipocitos que mueren, que actúan como antagonistas de moléculas que estimulan la respuesta inflamatoria (**Sun et al., 2011**). Por su parte, otras células del sistema inmunitario, como los linfocitos T CD8⁺, son clave en las primeras etapas de este proceso de inflamación, ya que favorecen la diferenciación y activación del resto de células inmunes (incluidos los macrófagos) (**Nishimura et al., 2009**).

Los datos obtenidos en el estudio de la longitud telomérica considerando los grupos de IMC, con independencia de la afectación por CCR, indican unos valores medios para los *Ratios* T/S similar en los dos tejidos adiposos, con una reducción del tamaño telomérico cuanto mayor fue el IMC. No obstante, es en los TAS donde se observa, con diferencias estadísticamente significativas, una longitud telomérica superior en individuos con normopeso frente a sujetos con sobrepeso y obesidad. Moreno-Navarrete analizó las longitudes teloméricas de más de 70 muestras procedentes de TAS de pacientes con diversos valores de IMCs, obteniéndose una correlación negativa entre el tamaño telomérico y el IMC (**Moreno-Navarrete et al., 2010**). Otro estudio, publicado dos años más tarde, comparó la longitud telomérica relativa (*Ratio* T/S) de los TAV y los TAS entre pacientes obesos y no obesos. En dicho estudio, se descubrió que, en el primer grupo de pacientes, las secuencias teloméricas eran un 23% y un 28% más cortas para los TAV y TAS, respectivamente, en comparación con el grupo control (**Monickaraj et al., 2012**). Más recientemente, en 2020, Gurung analizó las longitudes teloméricas de los TAV y de los TAS de individuos sometidos a cirugía bariátrica, y observó que se correlacionaban negativamente con el IMC de los sujetos (**Gurung et al., 2020**).

Estos hallazgos están en consonancia con los obtenidos en esta Tesis, principalmente en los TAS, y no hacen más que sustentar las diferencias en cuanto a la longitud telomérica de ambos tejidos adiposos. La mayor producción basal de moléculas proinflamatorias que caracteriza a los TAV afectaría de manera muy similar tanto a los tejidos de individuos con normopeso como a los de un IMC superior, haciendo que las diferencias de longitudes teloméricas entre ellos sean menores (**Ibrahim, 2010**). Por su parte, el incremento de la inflamación ligado a un IMC elevado sí tendrá un efecto visible sobre los telómeros de los TAS.

Además, los análisis de correlación para los *Ratios* T/S entre los TAV y TAS en los 3 grupos de IMC evaluados (individuos con normopeso, con sobrepeso y con obesidad) apoyan el efecto erosivo del incremento en el IMC sobre el tamaño de los telómeros. En individuos con normopeso no se detectó correlación entre las longitudes teloméricas de ambos tejidos adiposos, pero sí se observó en sujetos con sobrepeso y con obesidad. En individuos con normopeso, la longitud telomérica entre ambos tejidos adiposos es diferente, consecuencia de un comportamiento metabólico distinto (diferentes niveles de leptina, adiponectina o TNF- α , entre otras moléculas) (**Ibrahim, 2010**). Sin embargo, en individuos con sobrepeso y obesidad, los telómeros de ambos tejidos adiposos sufrirán un efecto similar por parte del ambiente inflamatorio y oxidativo propios de un IMC elevado, permitiendo detectarse una correlación entre el tamaño de sus secuencias teloméricas (**Reichert & Stier, 2017**).

Continuando con la relación entre la función telomérica y el IMC, los resultados para la actividad telomerasa recogidos en esta Tesis mostraron, tanto para los TAV como para los TAS, un incremento en la reactivación de la telomerasa en el grupo de individuos con sobrepeso, reduciéndose en sujetos con obesidad.

La actividad telomerasa detectada en los tejidos adiposos refleja el potencial replicativo que tienen sus células progenitoras. El incremento en el IMC es un factor que reduce la capacidad de adipogénesis y proliferación de las células ASC, lo que se traduce en un aumento en el tiempo de división celular, senescencia prematura y parada del ciclo celular en situaciones de obesidad (**De Girolamo et al., 2013; Oliva-Olivera et al., 2016**). En base a estas observaciones, la detección de actividad telomerasa en los tejidos adiposos irá siendo menor a medida que se incremente el IMC (sujetos obesos).

Finalmente, la longitud telomérica de ambos tejidos adiposos en función de la reactivación de la telomerasa, en individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad, no mostró diferencias estadísticamente significativas. No obstante, el comportamiento fue diferente en presencia o ausencia de actividad telomerasa: los telómeros de los TAV que reactivaron la enzima tuvieron tamaños inferiores, y los TAS con actividad telomerasa mostraron telómeros más largos. De nuevo, el metabolismo pro-inflamatorio de los TAV sería el responsable del acortamiento telomérico y posterior reactivación de la telomerasa para poder renovar dicho tejido (**Ferguson et al., 2015**). Por su parte, los TAS con activación de la enzima y mayor longitud telomérica representarían el proceso fisiológico de expansión del tejido adiposo en respuesta al incremento en el IMC.

Sin embargo, estos resultados no son del todo concluyentes por el reducido número de casos con actividad telomerasa positiva que han podido ser evaluados en los dos tejidos adiposos. Esto hace que sean necesarias futuras investigaciones que contribuyan a clarificar esta hipótesis.

Su clasificación como un tejido “endocrino” coloca al tejido adiposo (más concretamente, el tejido adiposo blanco) en una posición bastante importante en el desarrollo y progresión de numerosos cánceres, incluidos los colorrectales (**Ose et al., 2020**). El tejido adiposo visceral se ha correlacionado con elevados niveles de metabolitos pro-tumorales, como citoquinas inflamatorias, ácido araquidónico o enzimas relacionadas con la síntesis de prostaglandinas (**Liesenfeld et al., 2015**). Por su parte, el tejido adiposo subcutáneo se relaciona con moléculas implicadas en el metabolismo lipídico, como la leptina (**Lee et al., 2016**). La mayor síntesis de moléculas inflamatorias que caracterizan a los TAV se ve favorecida por la infiltración de células del sistema inmune (principalmente, macrófagos) (**Curat et al., 2006; Kralova Lesna et al., 2016**). Además, varios trabajos definen la capacidad de migración de las células ASC hacia las regiones susceptibles de desarrollar el tumor correspondiente, donde promoverán la tumorigénesis (**Zhang et al., 2009; Zhang et al., 2016**). Por todo lo anterior, el tejido adiposo tiene una gran influencia en el inicio y desarrollo del CCR.

Además, los tejidos adiposos, principalmente los TAV, constituyen una gran fuente de factores y moléculas ligados a actividades proinflamatorias y oxidativas, que alcanzarían los tejidos colorrectales (tanto en etapas previas al inicio del tumor, como una vez ya formado) y ejercerían su efecto sobre ellos (**Coelho et al., 2013**). Por su parte, los tejidos

tumorales también serían capaces de liberar sustancias susceptibles de alterar el correcto funcionamiento de otros tejidos no relacionados con el tumor, como podrían ser los tejidos adiposos.

El efecto que el tejido tumoral puede desempeñar en otras regiones distantes se debe a la acción de los llamados “oncosomas”, un tipo de exosoma liberado por células tumorales que contiene factores oncogénicos, capaces de alterar el correcto funcionamiento de las células sanas en tejidos no relacionados con el tumor primario (**Thery, C. 2006; Al-Nedawi et al., 2008**). Existen estudios realizados en las líneas celulares DLD-1, procedentes de adenocarcinomas colorrectales, que han determinado su capacidad de liberar exosomas con altos niveles del factor tisular (TF), favoreciendo el proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, en inglés) en el nicho tumoral (**Garnier et al., 2012**). Demory-Beckler analizó los exosomas liberados por células tumorales de colon deficientes para el gen *KRAS* y detectó que estas microvesículas contenían factores oncogénicos, tales como *KRAS*, *EGFR* o *c-Src* (**Demory Beckler et al., 2013**). Un estudio en el año 2018 reveló que los pacientes afectados de CCR tienen niveles séricos elevados de exosomas que contienen dos mi-ARNs encargados de regular varias vías implicadas en proliferación, angiogénesis y apoptosis, como son el miR-17-5p y el miR-92a-3p (**Fu et al., 2018**).

La explicación a los resultados obtenidos en esta Tesis que relacionan la longitud telomérica y la actividad telomerasa en los dos tejidos adiposos con el CCR necesita la valoración conjunta de ambos aspectos que definen la función telomérica (longitud telomérica relativa y actividad telomerasa). Para los dos tejidos adiposos, la longitud telomérica relativa es superior en los pacientes afectados de CCR, observándose una correlación entre ambos tejidos en individuos con y sin este tipo tumoral. Además, el número de casos con actividad telomerasa positiva en los TAV fue muy similar en individuos con y sin CCR; en los TAS se detectó un mayor número de casos que reactivaron la enzima en pacientes afectados de CCR, aunque sin alcanzar diferencias estadísticamente significativas.

Estas observaciones pueden deberse a factores derivados del tumor, que alcanzan los tejidos adiposos y alteran su funcionamiento telomérico. Dichos factores pueden estar relacionados con el mantenimiento y elongación de los telómeros, principalmente a través de la enzima telomerasa. El análisis de diversas líneas celulares, entre las que se incluían

algunas procedentes de carcinomas colorrectales, demostró que estas eran capaces de liberar al microambiente exosomas que contenían subunidades de la telomerasa con actividad catalítica (hTERT), pudiendo ser captadas por células “aceptoras” y adquirir actividad telomerasa (**Gutkin et al., 2016**). También se ha descubierto en el suero de pacientes con CCR una mayor cuantificación de diversos oncosomas que contienen un tipo de mi-ARN, denominado miR-1246, que favorece la proliferación, migración e invasión de las células tumorales, a través de su interacción con las vías Wnt/ β -catenina o JAK/STATS (**Ogata-Kawata et al., 2014; Cooks et al., 2018; Ghafouri-Fard et al., 2022**). Todas estas moléculas, secretadas al medio a través de oncosomas, podrían ser capaces de alcanzar tejidos distantes, como los TAV y los TAS, y favorecer tanto la reactivación de la telomerasa como la elongación de los telómeros. Esta situación sería la responsable de la detección de un mayor tamaño telomérico y actividad telomerasa en los tejidos adiposos de sujetos afectados de CCR.

A pesar de estos resultados, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas para la longitud telomérica en base a la reactivación o no de la telomerasa, para ninguno de los tejidos adiposos en sujetos con y sin CCR. Por tanto, resulta esencial seguir analizando, en futuras investigaciones, la función telomérica en los tejidos adiposos y su vinculación con el desarrollo de este tipo tumoral.

De nuevo, la posible implicación del tejido adiposo en el desarrollo del CCR hace imprescindible la necesidad de evaluar la función telomérica y su relación con las variables clínico-patológicas de los pacientes afectados por esta patología.

Los estudios de longitud telomérica relativa para los tejidos adiposos analizados en esta Tesis no indicaron diferencias estadísticamente significativas en función del sexo de los pacientes, estadio de Dukes o localización del tumor. Sin embargo, se detectó una menor longitud de los telómeros en los TAS procedentes de pacientes con tumores de elevada invasión local (tumores identificados como T4), en comparación con tumores clasificados como T1, T2 o T3. Diversas moléculas liberadas por el tumor pueden alcanzar el tejido adiposo y activar mecanismos de señalización relacionados con procesos de inflamación, como la vía Wnt/ β -catenina (**Sharma et al., 2017; Houshyar et al., 2018; Ghafouri-Fard et al., 2022**). Si esta situación se mantiene en el tiempo (como ocurrirá con tumores T4, relacionados con etapas más avanzadas), se producirá un mayor acortamiento de las secuencias teloméricas de estos tejidos adiposos.

Esta menor longitud telomérica relativa en los TAS de pacientes con tumores de elevada invasión local también puede explicarse desde el punto de vista de una tasa de replicación diferente por parte de los adipocitos que los componen. Un incremento en la tasa de replicación de las células que componen el TAS aumentaría la síntesis de citoquinas procedentes de ellas, lo que estimularía el desarrollo del cáncer (**Sistigu et al., 2017; Hibino et al., 2021**). Por esta razón, los TAS con telómeros más cortos (debido a un mayor *ratio* de división celular) se relacionarían con tumores con mayor invasión local.

Por su parte, los TAV mostraron una tendencia, pero sin diferencias estadísticamente significativas, hacia unos telómeros más cortos al proceder de individuos con tumores que han dado lugar a metástasis a distancia (M1), en comparación con los TAV de sujetos con tumores de tipo M0. Estas observaciones continúan en la línea de lo establecido para el grado de invasión local (descriptor T), explicado en el párrafo anterior: la presencia de metástasis a distancia (M1) se correlaciona con una etapa más avanzadas de la enfermedad, donde la respuesta inflamatoria ha ido acortando la longitud de los telómeros en los TAV. El acortamiento telomérico en sujetos con tumores metastásicos (M1) podría deberse, de nuevo, a una mayor tasa de replicación de las células que componen este tejido adiposo, capaces de sintetizar y liberar cantidades superiores de factores inflamatorios que favorezcan la metástasis del tumor (**Hibino et al., 2021**).

Prosiguiendo con la función telomérica en los TAV y TAS, la reactivación de la telomerasa para los TAV fue superior en varones, al comparar con el grupo de mujeres, con diferencias estadísticamente significativas. Como ya se ha definido, los estrógenos pueden ejercer un efecto inhibitor sobre la vía NF- κ B, la cual participa en la transcripción del gen *hTERT* (**Chung et al., 2017; Kim et al., 2018; Wuidar et al. 2021**). Esta cualidad de los estrógenos podría ser la responsable de prevenir la reactivación de la enzima telomerasa en los tejidos adiposos de pacientes mujeres con CCR, viéndose influenciado por el aumento, a nivel orgánico, de factores proinflamatorios liberados por el microambiente tumoral. Los pacientes varones no dispondrían de la protección otorgada por los estrógenos, lo que favorecería que sus tejidos adiposos recuperen la actividad telomerasa en mayor proporción que las mujeres.

Para el estadio de Dukes y la localización tumoral, las diferencias en cuanto a la actividad telomerasa para los TAV y los TAS no fueron estadísticamente significativas. El ambiente inflamatorio al que están sometidos los tejidos adiposos de pacientes con CCR,

consecuencia tanto de su propio metabolismo como de la liberación de moléculas por parte del tumor, podría tener efectos contradictorios sobre la reactivación de la telomerasa: inhibición o estimulación de su actividad enzimática (**Fouquerel et al., 2016; Liu et al., 2021**). Por ello, la reactivación de la telomerasa en los TAV y en los TAS no está relacionada con ninguna etapa de la enfermedad, como sí pueda estarlo la longitud telomérica.

El desequilibrio metabólico relacionado con el aumento del IMC es uno de los principales desencadenantes del CCR asociado a la obesidad. Se ha demostrado que el incremento de leptina y la disminución de adiponectina, detectados en los individuos con obesidad, inducen la proliferación, supervivencia e invasividad de las células tumorales de colon a través de la activación de señales mediadas por NF- κ B o STAT3 (**Yoon et al., 2014**).

Los análisis de longitud telomérica relativa para los TAV y TAS, en sujetos con y sin CCR dentro de cada grupo de IMC, mostraron, con diferencias estadísticamente significativas, un acortamiento de los telómeros de ambos tejidos en ausencia de la enfermedad, pero únicamente en pacientes con sobrepeso. No obstante, en los sujetos con obesidad, estas tendencias también se mantuvieron, aunque sin significación estadística. Por su parte, al evaluar las diferencias en la longitud telomérica entre los 3 grupos de IMC, en sujetos con y sin CCR, dichas diferencias no mostraron significación estadística.

Estos datos resultan clave para mantener la teoría que defiende la influencia del microambiente tumoral sobre la biología de los tejidos adiposos analizados: el CCR induce la elongación de los telómeros de ambos tejidos adiposos a través de la liberación de moléculas pro-oncogénicas por parte de las células cancerosas (**Gutkin et al., 2016; Ghafouri-Fard et al., 2022**).

En ausencia de CCR, la inflamación que acompaña al aumento del IMC afectará de forma muy similar a las secuencias teloméricas de los tejidos adiposos de individuos con sobrepeso y obesidad, por lo que las diferencias de tamaño entre ellos serán menos evidentes.

Continuando con los análisis de correlación entre longitudes teloméricas relativas de los TAV y TAS, sólo se detectó una correlación positiva en sujetos con sobrepeso y CCR, y en individuos obesos sin CCR. Desde el punto de vista de su actividad metabólica y proliferativa, el comportamiento desigual que diferencia a los TAV y TAS podría ser el

responsable de esta ausencia de correlación entre sus longitudes teloméricas, ya que los TAS tienen una mayor tasa de replicación y, previsiblemente, telómeros más cortos (**Lakowa et al., 2015**).

El análisis de la actividad telomerasa y el CCR dentro de cada grupo de IMC indicó un comportamiento similar para los dos tejidos adiposos. En individuos clasificados en el grupo de sobrepeso, los dos tejidos adiposos tuvieron un mayor porcentaje de reactivación de la enzima en ausencia de CCR, mientras que, en sujetos con obesidad, la reactivación de la enzima fue superior en ambos tejidos adiposos en el grupo de pacientes afectados de CCR. Al evaluar la actividad telomerasa y el IMC para sujetos con y sin CCR, en pacientes con la enfermedad se detectó una mayor reactivación en los grupos con sobrepeso y obesidad, con diferencias muy cercanas a la significación estadística. Por su parte, en individuos sin CCR, el grupo de sobrepeso mostró una mayor reactivación de la enzima en los dos tejidos adiposos, en comparación con los sujetos con obesidad.

En pacientes afectados por tumores colorrectales, la mayor reactivación de la telomerasa en los tejidos adiposos de pacientes con sobrepeso y obesidad con respecto a los pacientes con normopeso constituye un evento esperado, puesto que el aumento en el IMC inducirá la expansión del tejido adiposo por parte de las células progenitoras que lo componen (**Aprile et al., 2021**). Cabe destacar que esta reactivación de la telomerasa por parte de los tejidos adiposos procedentes de pacientes con sobrepeso y obesidad puede verse potenciada por la influencia del tumor sobre el tejido adiposo, siendo una prueba más de la conexión tejido adiposo-tumor ya comentada con anterioridad en esta Discusión.

Centrando los análisis en los sujetos que no desarrollan CCR, una mayor detección de telomerasa en los TAV y TAS de sujetos con sobrepeso, con respecto a sujetos con obesidad, sería consecuencia del efecto perjudicial que tiene la obesidad sobre la capacidad replicativa de las células ASC encargadas de mantener la homeostasis celular del tejido adiposo, haciendo que activen en menor proporción la telomerasa (**Oliva-Olivera et al., 2017**).

Para terminar con los resultados de función telomérica, la longitud telomérica relativa fue superior, de manera estadísticamente significativa, en los TAS pertenecientes al grupo de pacientes con sobrepeso y CCR que reactivaron la telomerasa. La detección de unas mayores longitudes teloméricas en presencia de la telomerasa activa indicaría la función

biológica que tiene la enzima sobre el mantenimiento de los telómeros (**Blackburn & Collins, 2011**). No obstante, el reducido número de casos de que se dispone con actividad telomerasa activa no es suficiente para observar el comportamiento en el resto de escenarios, lo que implica poder continuar con estas investigaciones para poder aclarar estas observaciones.

Centrando los estudios de función telomérica para las diferentes variables clínico-patológicas en los TAV y TAS, los análisis de longitud telomérica relativa en los TAV no revelaron diferencias estadísticamente significativas entre el sexo de los pacientes o el estadio de Dukes de los tumores, pero sí se detectaron telómeros más cortos en los TAV procedentes de pacientes con tumores de colon derecho. Los telómeros acortados, tanto en los tejidos colorrectales como en los TAV, podrían explicarse por alteraciones genéticas de origen somático que afecten a todas las células del organismo, ya que, como se ha detallado en el análisis de tejidos colorrectales, los tumores de colon derecho se caracterizan por un mayor acortamiento de sus secuencias teloméricas, en comparación con los tumores de colon izquierdo o recto (**Rampazzo et al., 2010**). En el grupo de pacientes con normopeso, los TAV siguen esta línea, aunque sin mostrar diferencias estadísticamente significativas. Estos resultados apoyan la posible explicación genética para ambos casos de acortamiento telomérico. No obstante, en pacientes con obesidad la tendencia se pierde, probablemente enmascarada por el efecto que el ambiente inflamatorio que acompaña a esta condición fisiológica tiene, tanto en la biología telomérica de los TAV como en el propio tejido tumoral (**Kolb et al., 2016**).

Por su parte, los TAS demostraron tener unas longitudes teloméricas superiores en los grupos de pacientes con normopeso y obesidad con tumores colorrectales en estadios tempranos. Estas observaciones indicarían que el IMC no es un parámetro que influya sobre el efecto que pueden tener los tumores colorrectales en los telómeros de los tejidos adiposos (**Sharma et al., 2017; Houschyar et al., 2018**).

Finalmente, el estudio de la función telomérica de los TAV y TAS en relación con las variables clínico-patológicas indicó diferencias estadísticamente significativas para la actividad telomerasa, con un incremento en los TAV de pacientes varones (en mujeres no se detectó ningún caso con la telomerasa reactivada). En pacientes con normopeso y con obesidad también se detectó un número de casos más elevado en hombres con respecto a mujeres, aunque sin ser las diferencias estadísticamente significativas. De nuevo, los

estrógenos evitarían la reactivación de la telomerasa mediante su interferencia con la vía NF- κ B (Chung et al., 2017; Kim, H. 2018; Wuidar et al., 2021). Además, se han publicado trabajos que correlacionan el incremento en el IMC con mayores niveles de producción de estrógenos en mujeres, por lo que, en situaciones de sobrepeso y obesidad, se detectará la influencia de estas hormonas sobre la actividad telomerasa (Schairer et al., 2016).

Por otra parte, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la reactivación de la telomerasa en los TAV y en los TAS, con relación al estadio de Dukes o a la localización tumoral, cuando se consideraron los grupos de pacientes según su IMC. La inflamación que acompaña al aumento del IMC, por su capacidad dual para activar o inhibir a la telomerasa, podría tanto promover como impedir la reactivación de la enzima en las diferentes etapas de la enfermedad e independientemente de la localización anatómica del tumor primario (Fouquerel et al., 2016; Liu et al., 2021).

Para la población incluida en los análisis de tejidos adiposos también se evaluó el papel que tiene el IMC en la evolución del CCR. Aunque no se observaron diferencias estadísticamente significativas para el pronóstico entre la subpoblación de individuos con normopeso, sobrepeso y obesidad, se observó una tendencia muy marcada hacia una ligera mejora en la evolución de la enfermedad en los sujetos clasificados como normopeso y obesos. En esta población, se puede observar lo que ya se ha definido anteriormente como la “paradoja de la obesidad”, que defiende un mejor pronóstico en el desarrollo del cáncer para pacientes con normopeso u obesidad, siendo más perjudiciales valores de IMC intermedios (Caan et al., 2017).

No obstante, para la población incluida en los actuales estudios pronóstico se determinó un valor de IMC de 27,93 kg/m² como aquel que permitió diferenciar dos subpoblaciones con diferente evolución clínica, aunque no de forma estadísticamente significativa. En este caso, los pacientes con un IMC inferior a este valor tienen un peor pronóstico clínico, suceso contrario a lo detectado en la primera parte de esta Tesis, en la que se analizaron tejidos tumorales colorrectales. Los resultados observados en ambas poblaciones son un ejemplo del efecto dual que diversos autores adjudican al IMC en el pronóstico del CCR (Schlesinger et al., 2014; Lee et al., 2015).

Para conocer la posible implicación de la función telomérica de los tejidos adiposos en el desarrollo del CCR, se realizaron los estudios pronóstico en relación con la longitud

telomérica relativa en TAV y TAS. No obstante, ninguno de los valores obtenidos para los dos tejidos adiposos (*Ratios* T/S de 0,84 para TAV y de 1,13 para TAS) permitieron obtener dos subpoblaciones con diferencias estadísticamente significativas en cuanto a la evolución de la enfermedad.

La importancia del tejido adiposo en el pronóstico del CCR ha sido examinada por diferentes autores. En 2008, Moon y cols. analizaron la composición corporal de 161 pacientes afectados de tumores colorrectales y calcularon el *ratio* entre el contenido de TAV y TAS antes de ser sometidos a cirugía de resección. Los resultados indicaron que los pacientes con una mayor proporción de TAV tenían un menor Intervalo Libre de Enfermedad (**Moon et al., 2008**). Otro estudio realizado en varones con CCR y metástasis hepáticas demostró que los afectados de obesidad “central” (composición de tejido adiposo abdominal superior a 94 cm²/m²) tenían incrementadas sus probabilidades de recurrencia tumoral (**van Vledder et al., 2012**). En 2018, un trabajo publicado por el grupo del investigador Black indicó que los pacientes con tumores primarios colorrectales veían reducida su Supervivencia Global cuanto menor era su composición de tejido adiposo subcutáneo, sin observarse estas diferencias en el tejido adiposo visceral (**Black et al., 2017**).

Resulta complejo poder establecer una única causa que explique el comportamiento de la longitud telomérica de los tejidos adiposos en relación con el pronóstico del CCR. Por un lado, la obesidad y el ambiente inflamatorio que la acompaña promoverán una mayor erosión de las secuencias teloméricas en los tejidos adiposos (**Reichert & Stier, 2017**). Debido a esto, un menor valor en el *Ratio* T/S y, por tanto, unos telómeros más cortos, podría relacionarse con un aumento de la adiposidad, que conduciría a un peor pronóstico clínico en individuos afectados de CCR debido al efecto negativo del IMC sobre la progresión de esta enfermedad (**Wang et al., 2017; Hu et al., 2021**).

Por otro lado, aparece un escenario asociado con la obesidad y que influye directamente en el tejido adiposo, como es la infiltración de células del sistema inmunitario en estos tejidos. Este tipo de células es capaz de mantener un tamaño adecuado de sus telómeros ante el gran número de divisiones celulares al que están sometidas, necesario para generar la amplia variedad de clones que reconozcan a los diferentes antígenos y agentes patógenos (**Son et al., 2003; Aubert et al., 2012**). Además, también se debe tener en cuenta la presencia de las células ASC en los tejidos adiposos, ya que se trata de células

progenitoras con un gran contenido en secuencias teloméricas que podrían influir en el tamaño de los telómeros de estos tejidos (**Jeon et al., 2011**).

Por ello, en individuos obesos, se producirá una coexistencia entre una población de células (adipocitos) que han acortado sus telómeros (consecuencia de la acción erosiva del ambiente inflamatorio) y otra población de células (células ASC y células del sistema inmunitario que han sido movilizadas) capaces de mantener un tamaño adecuado de sus secuencias teloméricas, haciendo que el tamaño telomérico global del tejido adiposo no se vea alterado.

Por último, los estudios pronóstico con respecto a la actividad telomerasa en los TAV y TAS indicaron efectos opuestos. En los primeros, el subgrupo de pacientes con reactivación de la enzima no mostró ningún evento de recidiva tumoral, por lo que los pacientes considerados mostraron un pronóstico más favorable, aunque sin diferencias estadísticamente significativas. Sin embargo, en el subgrupo de individuos con actividad telomerasa positiva en sus TAS se detectó un mayor número de recidivas tumorales, teniendo la ausencia de telomerasa un papel protector, aunque de nuevo las diferencias quedaron al límite de la significación estadística.

La transición desde la condición de normopeso hacia un estado de obesidad es un proceso que implica la expansión del tejido adiposo, necesaria para poder compensar el exceso de nutrientes que esta transición conlleva. En condiciones de obesidad, la plasticidad del tejido adiposo se vuelve cada vez menor debido a que sus células progenitoras pierden la capacidad de proliferación y diferenciación (**Heilbronn et al., 2004**), con responsables como TNF- α o la vía Wnt (**Cawthorn & Sethi, 2008; Christodoulides et al., 2009**). Sin embargo, los TAV y los TAS no responden de la misma manera a la obesidad. En 2012, Macotela y cols. demostraron que los TAS tiene una mayor capacidad de expansión debido a una respuesta más eficaz de sus células progenitoras a los diferentes factores de crecimiento que los TAV (**Macotela et al., 2012**). Esta característica explicaría los resultados obtenidos por el grupo de Joe: el principal mecanismo de expansión de los TAS es la hiperplasia (aumento en el número de células), mientras que en los TAV es la hipertrofia (aumento del tamaño celular) (**Joe et al., 2009**).

Teniendo en cuenta estos datos bibliográficos, los resultados obtenidos en esta Tesis sobre la actividad telomerasa en los tejidos adiposos y el pronóstico del CCR pueden ser explicados considerando la influencia que tiene el IMC y la obesidad en el desarrollo de

esta enfermedad. Los TAV con ausencia de telomerasa corresponderían a pacientes con un mayor IMC, ya que la falta de esta actividad enzimática reflejaría el colapso de este tejido por su menor capacidad de expansión (las células progenitoras han perdido su capacidad de proliferación y, por tanto, no tienen activada la telomerasa). En los TAS, por su parte, el incremento en el IMC se vincularía con una mayor activación de la telomerasa, necesaria para la expansión de este tejido mediante la formación de nuevos adipocitos.

Si bien es cierto que la interpretación de estos resultados se basa en la importancia que tiene la obesidad en el desarrollo del CCR, los estudios pronóstico sobre la actividad telomerasa en los tejidos adiposos también podrían explicar la influencia que pueden tener estos tejidos, más concretamente las células ASC, tanto en la tumorigénesis como en la evolución de la enfermedad.

Se sabe que las células ASC son capaces de promover el crecimiento tumoral y las metástasis a través de la secreción de diferentes factores pro-oncogénicos y quimioquinas como PDGF, VEGF, c-kit, además de contribuir al proceso de transición epitelio-mesénquima (EMT, en inglés) (**Scioli et al., 2019**). Estas células no sólo actúan desde el tejido adiposo, sino que el tumor es capaz de estimular su migración y atraer células ASC hacia las regiones del nicho tumoral (**Stamatopoulos et al., 2019**).

Dado que la actividad telomerasa detectada en los tejidos adiposos de pacientes con CCR se relacionaría con una mayor proliferación y activación de las células ASC, los sujetos que reactivan la telomerasa en sus TAS tendrían un peor pronóstico de la enfermedad debido a una elevada proporción de células ASC en estos tejidos. Sin embargo, de acuerdo con nuestros resultados, la actividad telomerasa en los TAV parece tener un efecto contrario sobre el pronóstico clínico (mejor evolución clínica de los pacientes con la telomerasa reactivada). Las células ASC que componen los TAV y los TAS tienen patrones de expresión génica diferente (**Kim et al., 2016**), pudiendo dar lugar a que el comportamiento de estas células progenitoras en los TAV genere un escenario contrario (inhibición de proliferación tumoral, migración o metástasis). Esta hipótesis explicaría el papel protector aparente de la activación de telomerasa en el TAV y, consecuentemente, de la mayor activación y proliferación de las células ASC asociadas con este tejido adiposo.

Por tanto, la actividad telomerasa en tejidos adiposos puede representar un potencial factor pronóstico a tener en cuenta para futuras investigaciones que relacionen la obesidad y la evolución del CCR.

6. CONCLUSIONES

Conclusiones

1. Los tumores colorrectales acortan significativamente sus secuencias teloméricas, con respecto a los tejidos no tumorales. Asimismo, existe correlación entre la longitud telomérica de los tejidos tumorales y no tumorales, que se mantiene dentro de cada uno de los grupos de IMC considerados (pacientes con normopeso, pacientes con sobrepeso y pacientes con obesidad).
2. Los tumores con menor invasión local (clasificados como tumores T1 y T2), vinculados a estadios de Dukes iniciales, presentan telómeros más cortos y reactivan telomerasa en mayor proporción que los clasificados en los grupos T3 y T4.
3. En pacientes con obesidad, los tumores clasificados como T1 y T2 y los tumores con un grado elevado de invasión ganglionar (N2) reactivan telomerasa en mayor proporción. Este resultado estaría relacionado con una mayor agresividad tumoral en pacientes obesos que desarrollan CCR.
4. Los cánceres colorrectales localizados en el colon derecho muestran en mayor proporción acortamiento telomérico y menor reactivación de la telomerasa, con respecto a otras localizaciones tumorales, siendo los tumores localizados en el recto los que presentan mayor reactivación de la enzima.
5. Los tumores colorrectales con telómeros más cortos confieren un pronóstico clínico más favorable a los individuos afectados, con independencia del estadio de Dukes.
6. Los pacientes varones afectados de CCR que presentan un valor de IMC inferior a $31,85 \text{ kg/m}^2$ tienen un pronóstico clínico más favorable que el grupo con valores de $\text{IMC} \geq 31,85 \text{ kg/m}^2$.
7. Existe una correlación positiva entre la longitud telomérica de los TAV y de los TAS para la población general estudiada.
8. Independientemente de la afectación por CCR, el Índice de Masa Corporal se relaciona de forma inversa con la longitud telomérica de los TAS y con la reactivación de la telomerasa en los TAV.
9. Los TAV y los TAS de pacientes con CCR presentan telómeros más largos, en comparación con los de individuos sin CCR.
10. En individuos obesos, la telomerasa se reactiva en mayor proporción en los TAS de individuos afectados de CCR.

CONCLUSIÓN FINAL

Los resultados de esta Tesis demuestran que la longitud de los telómeros constituye un biomarcador de utilidad en el establecimiento del pronóstico clínico de pacientes afectados de Cáncer Colorrectal y que son sometidos a cirugía de intención curativa. Además, el estado de obesidad confiere una evolución clínica desfavorable, si bien esta influencia se relaciona con el sexo de los sujetos considerados. Estos datos indican la necesidad de llevar a cabo investigaciones adicionales con objeto de analizar, de forma más exhaustiva, el efecto de la obesidad en el curso clínico del Cáncer Colorrectal en el contexto de otros factores individuales.

7. BIBLIOGRAFÍA

- ❖ Abreu, E., Aritonovska, E., Reichenbach, P., Cristofari, G., Culp, B., Terns, R. M., Lingner, J., & Terns, M. P. (2010). TIN2-tethered TPP1 recruits human telomerase to telomeres in vivo. *Molecular and cellular biology*, *30*(12), 2971–2982.
- ❖ Aeby, E., Ahmed, W., Redon, S., Simanis, V., & Lingner, J. (2016). Peroxiredoxin 1 protects telomeres from oxidative damage and preserves telomeric DNA for extension by telomerase. *Cell reports*, *17*(12), 3107–3114.
- ❖ Akincilar, S. C., Unal, B., & Tergaonkar, V. (2016). Reactivation of telomerase in cancer. *Cellular and molecular life science*, *73*(8), 1659–1670.
- ❖ Alarfi, H., Salamoon, M., Kadri, M., Alammar, M., Haykal, M. A., Alseoudi, A., & Youssef, L. A. (2017). The impact of baseline body mass index on clinical outcomes in metastatic breast cancer: a prospective study. *BMC research notes*, *10*(1), 550.
- ❖ Al-Nedawi, K., Meehan, B., Micallef, J., Lhotak, V., May, L., Guha, A., & Rak, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature cell biology*, *10*(5), 619–624.
- ❖ Amiard, S., Doudeau, M., Pinte, S., Poulet, A., Lenain, C., Faivre-Moskalenko, C., Angelov, D., Hug, N., Vindigni, A., Bouvet, P., Paoletti, J., Gilson, E., & Giraud-Panis, M. J. (2007). A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nature structural & molecular biology*, *14*(2), 147–154.
- ❖ Aprile, D., Alessio, N., Demirsoy, I. H., Squillaro, T., Peluso, G., Di Bernardo, G., & Galderisi, U. (2021). MUSE stem cells can be isolated from stromal compartment of mouse bone marrow, adipose tissue, and ear connective tissue: a comparative study of their in vitro properties. *Cells*, *10*(4), 761.
- ❖ Arat, N. Ö., & Griffith, J. D. (2012). Human Rap1 interacts directly with telomeric DNA and regulates TRF2 localization at the telomere. *The Journal of biological chemistry*, *287*(50), 41583–41594.
- ❖ Armando, R. G., Mengual Gomez, D. L., Maggio, J., Sanmartin, M. C., & Gomez, D. E. (2019). Telomeropathies: Etiology, diagnosis, treatment and follow-up. Ethical and legal considerations. *Clinical genetics*, *96*(1), 3–16.
- ❖ Attwooll, C. L., Akpınar, M., & Petrini, J. H. (2009). The mre11 complex and the response to dysfunctional telomeres. *Molecular and cellular biology*, *29*(20), 5540–5551.

- ❖ Aubert, G., Baerlocher, G. M., Vulto, I., Poon, S. S., & Lansdorp, P. M. (2012). Collapse of telomere homeostasis in hematopoietic cells caused by heterozygous mutations in telomerase genes. *PLoS genetics*, 8(5), e1002696.
- ❖ Aubrey, B. J., Strasser, A., & Kelly, G. L. (2016). Tumor-suppressor functions of the tp53 pathway. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*, 6(5), a026062.
- ❖ Augustine, T. A., Baig, M., Sood, A., Budagov, T., Atzmon, G., Mariadason, J. M., Aparo, S., Maitra, R., & Goel, S. (2015). Telomere length is a novel predictive biomarker of sensitivity to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *British journal of cancer*, 112(2), 313–318.
- ❖ Autexier, C., & Lue, N. F. (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annual review of biochemistry*, 75, 493–517.
- ❖ Ayiomamitis, G. D., Notas, G., Zaravinos, A., Zizi-Sermpetzoglou, A., Georgiadou, M., Sfakianaki, O., & Kouroumallis, E. (2014). Differences in telomerase activity between colon and rectal cancer. *Canadian journal of surgery. Journal canadien de chirurgie*, 57(3), 199–208.
- ❖ Bae, N. S., & Baumann, P. (2007). A RAP1/TRF2 complex inhibits nonhomologous end-joining at human telomeric DNA ends. *Molecular cell*, 26(3), 323–334.
- ❖ Bagchi, D. P., Nishii, A., Li, Z., DelProposto, J. B., Corsa, C. A., Mori, H., Hardij, J., Learman, B. S., Lumeng, C. N., & MacDougald, O. A. (2020). Wnt/ β -catenin signaling regulates adipose tissue lipogenesis and adipocyte-specific loss is rigorously defended by neighboring stromal-vascular cells. *Molecular metabolism*, 42, 101078.
- ❖ Baglioni, S., Cantini, G., Poli, G., Francalanci, M., Squecco, R., Di Franco, A., Borgogni, E., Frontera, S., Nesi, G., Liotta, F., Lucchese, M., Perigli, G., Francini, F., Forti, G., Serio, M., & Luconi, M. (2012). Functional differences in visceral and subcutaneous fat pads originate from differences in the adipose stem cell. *PloS one*, 7(5), e36569.
- ❖ Baichoo, E., & Boardman, L. A. (2014). Toward a molecular classification of colorectal cancer: the role of telomere length. *Frontiers in oncology*, 4, 158.
- ❖ Balc'h, E. L., Grandin, N., Demattei, M. V., Guyétant, S., Tallet, A., Pagès, J. C., Ouaiissi, M., Lecomte, T., & Charbonneau, M. (2017). Measurement of telomere length in colorectal cancers for improved molecular diagnosis. *International journal of molecular sciences*, (9), 1871.

- ❖ Banik, S. S., & Counter, C. M. (2004). Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *The Journal of biological chemistry*, 279(50), 51745–51748.
- ❖ Barnes, R. P., Fouquerel, E., & Opresko, P. L. (2019). The impact of oxidative DNA damage and stress on telomere homeostasis. *Mechanisms of ageing and development*, 177, 37–45.
- ❖ Barral, A., & Déjardin, J. (2020). Telomeric chromatin and TERRA. *Journal of molecular biology*, 432(15), 4244–4256.
- ❖ Barrett, E. L., & Richardson, D. S. (2011). Sex differences in telomeres and lifespan. *Aging cell*, 10(6), 913–921.
- ❖ Barthel, F. P., Wei, W., Tang, M., Martinez-Ledesma, E., Hu, X., Amin, S. B., Akdemir, K. C., Seth, S., Song, X., Wang, Q., Lichtenberg, T., Hu, J., Zhang, J., Zheng, S., & Verhaak, R. G. (2017). Systematic analysis of telomere length and somatic alterations in 31 cancer types. *Nature genetics*, 49(3), 349–357.
- ❖ Bautista, C. V., Felis, C. P., Espinet, J. M., García, J. B., & Salas, J. V. (2007). Telomerase activity is a prognostic factor for recurrence and survival in rectal cancer. *Diseases of the colon and rectum*, 50(5), 611–620.
- ❖ Bayne, S., Jones, M. E., Li, H., & Liu, J. P. (2007). Potential roles for estrogen regulation of telomerase activity in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1114, 48–55.
- ❖ Bell, R. J., Rube, H. T., Kreig, A., Mancini, A., Fouse, S. D., Nagarajan, R. P., Choi, S., Hong, C., He, D., Pekmezci, M., Wiencke, J. K., Wrensch, M. R., Chang, S. M., Walsh, K. M., Myong, S., Song, J. S., & Costello, J. F. (2015). Cancer. The transcription factor GABP selectively binds and activates the mutant TERT promoter in cancer. *Science*, 348(6238), 1036–1039.
- ❖ Benarroch-Popivker, D., Pisano, S., Mendez-Bermudez, A., Lototska, L., Kaur, P., Bauwens, S., Djerbi, N., Latrick, C. M., Fraasier, V., Pei, B., Gay, A., Jaune, E., Foucher, K., Cherfils-Vicini, J., Aeby, E., Miron, S., Londoño-Vallejo, A., Ye, J., Le Du, M. H., Wang, H., ... Giraud-Panis, M. J. (2016). TRF2-mediated control of telomere DNA topology as a mechanism for chromosome-end protection. *Molecular cell*, 61(2), 274–286.
- ❖ Bernadotte, A., Mikhelson, V. M., & Spivak, I. M. (2016). Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence. *Aging*, 8(1), 3–11.

- ❖ Bernal, A., & Tusell, L. (2018). Telomeres: implications for cancer development. *International journal of molecular sciences*, *19*(1), 294.
- ❖ Bertorelle, R., Briarava, M., Rampazzo, E., Biasini, L., Agostini, M., Maretto, I., Lonardi, S., Friso, M. L., Mescoli, C., Zagonel, V., Nitti, D., De Rossi, A., & Pucciarelli, S. (2013). Telomerase is an independent prognostic marker of overall survival in patients with colorectal cancer. *British journal of cancer*, *108*(2), 278–284.
- ❖ Bertorelle, R., Rampazzo, E., Pucciarelli, S., Nitti, D., & De Rossi, A. (2014). Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*, *20*(8), 1940–1950.
- ❖ Bhattacharjee, P., Das, A., Giri, A. K., & Bhattacharjee, P. (2020). Epigenetic regulations in alternative telomere lengthening: Understanding the mechanistic insight in arsenic-induced skin cancer patients. *The Science of the total environment*, *704*, 135388.
- ❖ Bisht, K., Smith, E. M., Tesmer, V. M., & Nandakumar, J. (2016). Structural and functional consequences of a disease mutation in the telomere protein TPP1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(46), 13021–13026.
- ❖ Black, D., Mackay, C., Ramsay, G., Hamoodi, Z., Nanthakumaran, S., Park, K., Loudon, M. A., & Richards, C. H. (2017). Prognostic value of computed tomography: measured parameters of body composition in primary operable gastrointestinal cancers. *Annals of surgical oncology*, *24*(8), 2241–2251.
- ❖ Blackburn, E. H., & Collins, K. (2011). Telomerase: an RNP enzyme synthesizes DNA. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *3*(5), a003558.
- ❖ Blackburn, E. H., Greider, C. W., & Szostak, J. W. (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, *Tetrahymena* and yeast to human cancer and aging. *Nature medicine*, *12*(10), 1133–1138.
- ❖ Blin, N., & Stafford, D. W. (1976). A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic acids research*, *3*(9), 2303–2308.
- ❖ Bloom, S. I., Tuluca, A., Ives, S. J., & Reynolds, T. H. (2020). High-fat diet induced obesity and age influence the telomere shelterin complex and telomerase gene expression in mouse adipose tissue. *Physiological reports*, *8*(11), e14461.

- ❖ Bódis, K., & Roden, M. (2018). Energy metabolism of white adipose tissue and insulin resistance in humans. *European journal of clinical investigation*, *48*(11), e13017.
- ❖ Borowsky, J., Dumenil, T., Bettington, M., Pearson, S. A., Bond, C., Fennell, L., Liu, C., McKeone, D., Rosty, C., Brown, I., Walker, N., Leggett, B., & Whitehall, V. (2018). The role of APC in WNT pathway activation in serrated neoplasia. *Modern pathology*, *31*(3), 495–504.
- ❖ Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248-54.
- ❖ Brems-Eskildsen, A. S., Zieger, K., Toldbod, H., Holcomb, C., Higuchi, R., Mansilla, F., Munksgaard, P. P., Borre, M., Ørntoft, T. F., & Dyrskjøt, L. (2010). Prediction and diagnosis of bladder cancer recurrence based on urinary content of hTERT, SENP1, PPP1CA, and MCM5 transcripts. *BMC cancer*, *10*, 646.
- ❖ Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., & de Lange, T. (1997). Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nature genetics*, *17*(2), 231–235.
- ❖ Bruun, J. M., Lihn, A. S., Pedersen, S. B., & Richelsen, B. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 release is higher in visceral than subcutaneous human adipose tissue (AT): implication of macrophages resident in the AT. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *90*(4), 2282–2289.
- ❖ Budczies, J., Klauschen, F., Sinn, B. V., Györfy, B., Schmitt, W. D., Darb-Esfahani, S., & Denkert, C. (2012). Cutoff Finder: a comprehensive and straightforward Web application enabling rapid biomarker cutoff optimization. *PloS one*, *7*(12), e51862.
- ❖ Caan, B. J., & Kroenke, C. H. (2017). Next steps in understanding the obesity paradox in cancer. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *26*(1), 12.
- ❖ Calado, R. T., Yewdell, W. T., Wilkerson, K. L., Regal, J. A., Kajigaya, S., Stratakis, C. A., & Young, N. S. (2009). Sex hormones, acting on the TERT gene, increase telomerase activity in human primary hematopoietic cells. *Blood*, *114*(11), 2236–2243.
- ❖ Campisi, J., & Robert, L. (2014). Cell senescence: role in aging and age-related diseases. *Interdisciplinary topics in gerontology*, *39*, 45–61.

- ❖ Cancer Genome Atlas Network (2012). Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*, 487(7407), 330–337.
- ❖ Carter, G., Patel, R., Apostolatos, A., Murr, M., Cooper, D. R., & Patel, N. A. (2014). Protein kinase C delta (PKC δ) splice variant modulates senescence via hTERT in adipose-derived stem cells. *Stem cell investigation*, 1, 3.
- ❖ Carulli, L., Anzivino, C., Baldelli, E., Zenobii, M. F., Rocchi, M. B., & Bertolotti, M. (2016). Telomere length elongation after weight loss intervention in obese adults. *Molecular genetics and metabolism*, 118(2), 138–142.
- ❖ Castoldi, A., Naffah de Souza, C., Câmara, N. O., & Moraes-Vieira, P. M. (2016). The macrophage switch in obesity development. *Frontiers in immunology*, 6, 637.
- ❖ Cawthon R. M. (2002). Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic acids research*, 30(10), e47.
- ❖ Cawthorn, W. P., & Sethi, J. K. (2008). TNF-alpha and adipocyte biology. *FEBS letters*, 582(1), 117–131.
- ❖ Cen, J., Zhang, H., Liu, Y., Deng, M., Tang, S., Liu, W., & Zhang, Z. (2015). Anti-aging effect of estrogen on telomerase activity in ovariectomised rats - animal model for menopause. *Gynecological endocrinology*, 31(7), 582–585.
- ❖ Cesare, A. J., & Griffith, J. D. (2004). Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Molecular and cellular biology*, 24(22), 9948–9957.
- ❖ Cesare, A. J., & Reddel, R. R. (2010). Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nature reviews. Genetics*, 11(5), 319–330.
- ❖ Chai, W., Ford, L. P., Lenertz, L., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2002). Human Ku70/80 associates physically with telomerase through interaction with hTERT. *The Journal of biological chemistry*, 277(49), 47242–47247.
- ❖ Chan, H., Wang, Y., & Feigon, J. (2017). Progress in human and *Tetrahymena* telomerase structure determination. *Annual review of biophysics*, 46, 199–225.
- ❖ Chang, J. T., Lu, Y. C., Chen, Y. J., Tseng, C. P., Chen, Y. L., Fang, C. W., & Cheng, A. J. (2006). hTERT phosphorylation by PKC is essential for telomerase holoprotein integrity and enzyme activity in head neck cancer cells. *British journal of cancer*, 94(6), 870–878.
- ❖ Chang, W., Dynek, J. N., & Smith, S. (2003). TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes & development*, 17(11), 1328–1333.

- ❖ Chen, D., Liu, S., Ma, H., Liang, X., Ma, H., Yan, X., Yang, B., Wei, J., & Liu, X. (2015). Paracrine factors from adipose-mesenchymal stem cells enhance metastatic capacity through Wnt signaling pathway in a colon cancer cell co-culture model. *Cancer cell international*, *15*, 42.
- ❖ Chen, L., Roake, C. M., Freund, A., Batista, P. J., Tian, S., Yin, Y. A., Gajera, C. R., Lin, S., Lee, B., Pech, M. F., Venteicher, A. S., Das, R., Chang, H. Y., & Artandi, S. E. (2018). An activity switch in human telomerase based on RNA conformation and shaped by TCAB1. *Cell*, *174*(1), 218–230.e13.
- ❖ Chen, X. F., Meng, F. L., & Zhou, J. Q. (2009). Telomere recombination accelerates cellular aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS genetics*, *5*(6), e1000535.
- ❖ Chen, Y., Rai, R., Zhou, Z. R., Kanoh, J., Ribeyre, C., Yang, Y., Zheng, H., Damay, P., Wang, F., Tsujii, H., Hiraoka, Y., Shore, D., Hu, H. Y., Chang, S., & Lei, M. (2011). A conserved motif within RAP1 has diversified roles in telomere protection and regulation in different organisms. *Nature structural & molecular biology*, *18*(2), 213–221.
- ❖ Cheng, Y., Liu, P., Zheng, Q., Gao, G., Yuan, J., Wang, P., Huang, J., Xie, L., Lu, X., Tong, T., Chen, J., Lu, Z., Guan, J., & Wang, G. (2018). Mitochondrial trafficking and processing of telomerase RNA TERC. *Cell reports*, *24*(10), 2589–2595.
- ❖ Chiba, K., Johnson, J. Z., Vogan, J. M., Wagner, T., Boyle, J. M., & Hockemeyer, D. (2015). Cancer-associated TERT promoter mutations abrogate telomerase silencing. *eLife*, *4*, e07918.
- ❖ Chiba, K., Lorbeer, F. K., Shain, A. H., McSwiggen, D. T., Schruf, E., Oh, A., Ryu, J., Darzacq, X., Bastian, B. C., & Hockemeyer, D. (2017). Mutations in the promoter of the telomerase gene TERT contribute to tumorigenesis by a two-step mechanism. *Science*, *357*(6358), 1416–1420.
- ❖ Childs, B. G., Durik, M., Baker, D. J., & van Deursen, J. M. (2015). Cellular senescence in aging and age-related disease: from mechanisms to therapy. *Nature medicine*, *21*(12), 1424–1435.
- ❖ Choi, J., Joseph, L., & Pilote, L. (2013). Obesity and C-reactive protein in various populations: a systematic review and meta-analysis. *Obesity reviews*, *14*(3), 232–244.

- ❖ Christodoulides, C., Lagathu, C., Sethi, J. K., & Vidal-Puig, A. (2009). Adipogenesis and WNT signalling. *Trends in endocrinology and metabolism*, 20(1), 16–24.
- ❖ Chung, J., Khadka, P., & Chung, I. K. (2012). Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *Journal of cell science*, 125(11), 2684–2697.
- ❖ Chung, S. S., Wu, Y., Okobi, Q., Adekoya, D., Atefi, M., Clarke, O., Dutta, P., & Vadgama, J. V. (2017). Proinflammatory cytokines IL-6 and TNF- α increased telomerase activity through NF- κ B/STAT1/STAT3 activation, and withaferin A inhibited the signaling in colorectal cancer cells. *Mediators of inflammation*, 2017, 5958429.
- ❖ Cicconi, A., Rai, R., Xiong, X., Broton, C., Al-Hiyasat, A., Hu, C., Dong, S., Sun, W., Garbarino, J., Bindra, R. S., Schildkraut, C., Chen, Y., & Chang, S. (2020). Microcephalin 1/BRIT1-TRF2 interaction promotes telomere replication and repair, linking telomere dysfunction to primary microcephaly. *Nature communications*, 11(1), 5861.
- ❖ Cleal, K., Jones, R. E., Grimstead, J. W., Hendrickson, E. A., & Baird, D. M. (2019). Chromothripsis during telomere crisis is independent of NHEJ, and consistent with a replicative origin. *Genome research*, 29(5), 737–749.
- ❖ Coelho, M., Oliveira, T., & Fernandes, R. (2013). Biochemistry of adipose tissue: an endocrine organ. *Archives of medical science*, 9(2), 191–200.
- ❖ Cooks, T., Pateras, I. S., Jenkins, L. M., Patel, K. M., Robles, A. I., Morris, J., Forshew, T., Appella, E., Gorgoulis, V. G., & Harris, C. C. (2018). Mutant p53 cancers reprogram macrophages to tumor supporting macrophages via exosomal miR-1246. *Nature communications*, 9(1), 771.
- ❖ Cosme-Blanco, W., & Chang, S. (2008). Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Experimental cell research*, 314(9), 1973–1979.
- ❖ Croteau, D. L., Popuri, V., Opresko, P. L., & Bohr, V. A. (2014). Human RecQ helicases in DNA repair, recombination, and replication. *Annual review of biochemistry*, 83, 519–552.
- ❖ Cui, X. J., Lin, X., Zhong, J. Y., Li, S., He, J. Y., Ni, Y. Q., Zhan, J. K., & Liu, Y. S. (2020). Adiponectin attenuates the premature senescence of vascular smooth

- muscle cells induced by high glucose through mTOR signaling pathway. *Aging medicine*, 3(3), 178–187.
- ❖ Curat, C. A., Wegner, V., Sengenès, C., Miranville, A., Tonus, C., Busse, R., & Bouloumié, A. (2006). Macrophages in human visceral adipose tissue: increased accumulation in obesity and a source of resistin and visfatin. *Diabetologia*, 49(4), 744–747.
 - ❖ Cusanelli, E., Romero, C. A., & Chartrand, P. (2013). Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Molecular cell*, 51(6), 780–791.
 - ❖ Daniali, L., Benetos, A., Susser, E., Kark, J. D., Labat, C., Kimura, M., Desai, K., Granick, M., & Aviv, A. (2013). Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nature communications*, 4, 1597.
 - ❖ Daniel, C. R., Shu, X., Ye, Y., Gu, J., Raju, G. S., Kopetz, S., & Wu, X. (2016). Severe obesity prior to diagnosis limits survival in colorectal cancer patients evaluated at a large cancer centre. *British journal of cancer*, 114(1), 103–109.
 - ❖ Darzacq, X., Kittur, N., Roy, S., Shav-Tal, Y., Singer, R. H., & Meier, U. T. (2006). Stepwise RNP assembly at the site of H/ACA RNA transcription in human cells. *The Journal of cell biology*, 173(2), 207–218.
 - ❖ Davoli, T., & de Lange, T. (2012). Telomere-driven tetraploidization occurs in human cells undergoing crisis and promotes transformation of mouse cells. *Cancer cell*, 21(6), 765–776.
 - ❖ De Francesco, F., Ricci, G., D'Andrea, F., Nicoletti, G. F., & Ferraro, G. A. (2015). Human adipose stem cells: from bench to bedside. *Tissue engineering. Part B, Reviews*, 21(6), 572–584.
 - ❖ De Girolamo, L., Stanco, D., Salvatori, L., Coroniti, G., Arrigoni, E., Silecchia, G., Russo, M. A., Niada, S., Petrangeli, E., & Brini, A. T. (2013). Stemness and osteogenic and adipogenic potential are differently impaired in subcutaneous and visceral adipose derived stem cells (ASCs) isolated from obese donors. *International journal of immunopathology and pharmacology*, 26(1 Suppl), 11–21.
 - ❖ de Lange T. (2005). Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes & development*, 19(18), 2100–2110.
 - ❖ Demanelis, K., Jasmine, F., Chen, L. S., Chernoff, M., Tong, L., Delgado, D., Zhang, C., Shinkle, J., Sabarinathan, M., Lin, H., Ramirez, E., Oliva, M., Kim-Hellmuth, S., Stranger, B. E., Lai, T. P., Aviv, A., Ardlie, K. G., Aguet, F., Ahsan,

- H., GTEx Consortium, ... Pierce, B. L. (2020). Determinants of telomere length across human tissues. *Science*, *369*(6509), eaaz6876.
- ❖ Demory Beckler, M., Higginbotham, J. N., Franklin, J. L., Ham, A. J., Halvey, P. J., Imasuen, I. E., Whitwell, C., Li, M., Liebler, D. C., & Coffey, R. J. (2013). Proteomic analysis of exosomes from mutant KRAS colon cancer cells identifies intercellular transfer of mutant KRAS. *Molecular & cellular proteomics*, *12*(2), 343–355.
 - ❖ Demuth, I., Bradshaw, P. S., Lindner, A., Anders, M., Heinrich, S., Kallenbach, J., Schmelz, K., Digweed, M., Meyn, M. S., & Concannon, P. (2008). Endogenous hSNM1B/Apollo interacts with TRF2 and stimulates ATM in response to ionizing radiation. *DNA repair*, *7*(8), 1192–1201.
 - ❖ Denchi, E. L., & de Lange, T. (2007). Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature*, *448*(7157), 1068–1071.
 - ❖ Deng, Z., Dheekollu, J., Broccoli, D., Dutta, A., & Lieberman, P. M. (2007). The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation. *Current biology*, *17*(22), 1989–1995.
 - ❖ Deng, Z., Norseen, J., Wiedmer, A., Riethman, H., & Lieberman, P. M. (2009). TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres. *Molecular cell*, *35*(4), 403–413.
 - ❖ Di Franco, S., Bianca, P., Sardina, D. S., Turdo, A., Gaggianesi, M., Veschi, V., Nicotra, A., Mangiapane, L. R., Lo Iacono, M., Pillitteri, I., van Hooff, S., Martorana, F., Motta, G., Gulotta, E., Lentini, V. L., Martorana, E., Fiori, M. E., Vieni, S., Bongiorno, M. R., Giannone, G., ... Stassi, G. (2021). Adipose stem cell niche reprograms the colorectal cancer stem cell metastatic machinery. *Nature communications*, *12*(1), 5006.
 - ❖ Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer research*, *71*(7), 2455–2465.
 - ❖ Dokal I. (2011). Dyskeratosis congenita. *Hematology. American Society of Hematology*, *2011*, 480–486.
 - ❖ Dunford, A., Weinstock, D. M., Savova, V., Schumacher, S. E., Cleary, J. P., Yoda, A., Sullivan, T. J., Hess, J. M., Gimelbrant, A. A., Beroukhim, R.,

- Lawrence, M. S., Getz, G., & Lane, A. A. (2017). Tumor-suppressor genes that escape from X-inactivation contribute to cancer sex bias. *Nature genetics*, *49*(1), 10–16.
- ❖ Egan, E. D., & Collins, K. (2010). Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Molecular and cellular biology*, *30*(11), 2775–2786.
 - ❖ el Bouazzaoui, F., Henneman, P., Thijssen, P., Visser, A., Koning, F., Lips, M. A., Janssen, I., Pijl, H., Willems van Dijk, K., & van Harmelen, V. (2014). Adipocyte telomere length associates negatively with adipocyte size, whereas adipose tissue telomere length associates negatively with the extent of fibrosis in severely obese women. *International journal of obesity*, *38*(5), 746–749.
 - ❖ Epel, E. S., Lin, J., Wilhelm, F. H., Wolkowitz, O. M., Cawthon, R., Adler, N. E., Dolbier, C., Mendes, W. B., & Blackburn, E. H. (2006). Cell aging in relation to stress arousal and cardiovascular disease risk factors. *Psychoneuroendocrinology*, *31*(3), 277–287.
 - ❖ Estève, D., Boulet, N., Volat, F., Zakaroff-Girard, A., Ledoux, S., Coupaye, M., Decaunes, P., Belles, C., Gaits-Iacovoni, F., Iacovoni, J. S., Rémaury, A., Castel, B., Ferrara, P., Heymes, C., Lafontan, M., Bouloumié, A., & Galitzky, J. (2015). Human white and brite adipogenesis is supported by MSCA1 and is impaired by immune cells. *Stem cells*, *33*(4), 1277–1291.
 - ❖ Fang, M., Ou, J., Hutchinson, L., & Green, M. R. (2014). The BRAF oncoprotein functions through the transcriptional repressor MAFK to mediate the CpG Island Methylator phenotype. *Molecular cell*, *55*(6), 904–915.
 - ❖ Feldser, D. M., & Greider, C. W. (2007). Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer cell*, *11*(5), 461–469.
 - ❖ Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., & Yu, J. (1995). The RNA component of human telomerase. *Science*, *269*(5228), 1236–1241.
 - ❖ Feng, T. B., Cai, L. M., Qian, K. Q., & Qi, C. J. (2012). Reduced telomere length in colorectal carcinomas. *Asian Pacific journal of cancer prevention*, *13*(2), 443–446.
 - ❖ Ferguson, L. R., Chen, H., Collins, A. R., Connell, M., Damia, G., Dasgupta, S., Malhotra, M., Meeker, A. K., Amedei, A., Amin, A., Ashraf, S. S., Aquilano, K., Azmi, A. S., Bhakta, D., Bilsland, A., Boosani, C. S., Chen, S., Ciriolo, M. R.,

- Fujii, H., Guha, G., ... Maxwell, C. A. (2015). Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Seminars in cancer biology*, 35 (2015), S5–S24.
- ❖ Fernández-Marcelo, T., Gómez, A., Pascua, I., de Juan, C., Head, J., Hernando, F., Jarabo, J. R., Calatayud, J., Torres-García, A. J., & Iniesta, P. (2015). Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 34(1), 78.
 - ❖ Fernández-Marcelo, T., Morán, A., de Juan, C., Pascua, I., Head, J., Gómez, A., Hernando, F., López-Asenjo, J. A., Hernández, S., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A. J., Benito, M., & Iniesta, P. (2012). Differential expression of senescence and cell death factors in non-small cell lung and colorectal tumors showing telomere attrition. *Oncology*, 82(3), 153–164.
 - ❖ Fernández-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., Pascua, I., De Juan, C., Head, J., Torres-García, A. J., & Iniesta, P. (2016). Clinical relevance of telomere status and telomerase activity in colorectal cancer. *PloS one*, 11(2), e0149626.
 - ❖ Fernandez-Rozadilla, C., Kartsonaki, C., Woolley, C., McClellan, M., Whittington, D., Horgan, G., Leedham, S., Kriaucionis, S., East, J., & Tomlinson, I. (2018). Telomere length and genetics are independent colorectal tumour risk factors in an evaluation of biomarkers in normal bowel. *British journal of cancer*, 118(5), 727–732.
 - ❖ Ferreira, M., Sørensen, M. D., Pusch, S., Beier, D., Bouillon, A. S., Kristensen, B. W., Brümmendorf, T. H., Beier, C. P., & Beier, F. (2020). Alternative lengthening of telomeres is the major telomere maintenance mechanism in astrocytoma with isocitrate dehydrogenase 1 mutation. *Journal of neuro-oncology*, 147(1), 1–14.
 - ❖ Fink, L. S., Lerner, C. A., Torres, P. F., & Sell, C. (2010). Ku80 facilitates chromatin binding of the telomere binding protein, TRF2. *Cell cycle*, 9(18), 3798–3806.
 - ❖ Fouquerel, E., Lormand, J., Bose, A., Lee, H. T., Kim, G. S., Li, J., Sobol, R. W., Freudenthal, B. D., Myong, S., & Opresko, P. L. (2016). Oxidative guanine base damage regulates human telomerase activity. *Nature structural & molecular biology*, 23(12), 1092–1100.

- ❖ Frank, A. K., Tran, D. C., Qu, R. W., Stohr, B. A., Segal, D. J., & Xu, L. (2015). The shelterin TIN2 subunit mediates recruitment of telomerase to telomeres. *PLoS genetics*, *11*(7), e1005410.
- ❖ Frescas, D., & de Lange, T. (2014). TRF2-tethered TIN2 can mediate telomere protection by TPP1/POT1. *Molecular and cellular biology*, *34*(7), 1349–1362.
- ❖ Frohnert, C., Hutten, S., Wälde, S., Nath, A., & Kehlenbach, R. H. (2014). Importin 7 and Nup358 promote nuclear import of the protein component of human telomerase. *PloS one*, *9*(2), e88887.
- ❖ Fu, F., Jiang, W., Zhou, L., & Chen, Z. (2018). Circulating exosomal miR-17-5p and miR-92a-3p predict pathologic stage and grade of colorectal cancer. *Translational oncology*, *11*(2), 221–232.
- ❖ García-Aranda, C., de Juan, C., Diaz-López, A., Sánchez-Pernaute, A., Torres, A. J., Diaz-Rubio, E., Balibrea, J. L., Benito, M., & Iniesta, P. (2006). Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer*, *106*(3), 541–551.
- ❖ García-Calzón, S., Moleres, A., Marcos, A., Campoy, C., Moreno, L. A., Azcona-Sanjulián, M. C., Martínez-González, M. A., Martínez, J. A., Zalba, G., Martí, A., & EVASYON Study Group (2014). Telomere length as a biomarker for adiposity changes after a multidisciplinary intervention in overweight/obese adolescents: the EVASYON study. *PloS one*, *9*(2), e89828.
- ❖ Gardner, M., Bann, D., Wiley, L., Cooper, R., Hardy, R., Nitsch, D., Martin-Ruiz, C., Shiels, P., Sayer, A. A., Barbieri, M., Bekaert, S., Bischoff, C., Brooks-Wilson, A., Chen, W., Cooper, C., Christensen, K., De Meyer, T., Deary, I., Der, G., Diez Roux, A., ... Halcyon study team (2014). Gender and telomere length: systematic review and meta-analysis. *Experimental gerontology*, *51*, 15–27.
- ❖ Garnier, D., Magnus, N., Lee, T. H., Bentley, V., Meehan, B., Milsom, C., Montermini, L., Kislinger, T., & Rak, J. (2012). Cancer cells induced to express mesenchymal phenotype release exosome-like extracellular vesicles carrying tissue factor. *The Journal of biological chemistry*, *287*(52), 43565–43572.
- ❖ Gavia-García, G., Rosado-Pérez, J., Aguiñiga-Sánchez, I., Santiago-Osorio, E., & Mendoza-Núñez, V. M. (2020). Effect of *Sechium edule* var. *nigrum spinosum* (Chayote) on telomerase levels and antioxidant capacity in older adults with metabolic syndrome. *Antioxidants*, *9*(7), 634.

- ❖ Gay-Bellile, M., Romero, P., Cayre, A., Véronèse, L., Privat, M., Singh, S., Combes, P., Kwiatkowski, F., Abrial, C., Bignon, Y. J., Vago, P., Penault-Llorca, F., & Tchirkov, A. (2016). ERCC1 and telomere status in breast tumours treated with neoadjuvant chemotherapy and their association with patient prognosis. *The journal of pathology. Clinical research*, 2(4), 234–246.
- ❖ Gazzaniga, F. S., & Blackburn, E. H. (2014). An antiapoptotic role for telomerase RNA in human immune cells independent of telomere integrity or telomerase enzymatic activity. *Blood*, 124(25), 3675–3684.
- ❖ Ge, Z., Li, W., Wang, N., Liu, C., Zhu, Q., Björkholm, M., Gruber, A., & Xu, D. (2010). Chromatin remodeling: recruitment of histone demethylase RBP2 by Mad1 for transcriptional repression of a Myc target gene, telomerase reverse transcriptase. *FASEB journal*, 24(2), 579–586.
- ❖ Gertler, R., Rosenberg, R., Stricker, D., Friederichs, J., Hoos, A., Werner, M., Ulm, K., Holzmann, B., Nekarda, H., & Siewert, J. R. (2004). Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *Journal of clinical oncology*, 22(10), 1807–1814.
- ❖ Ghafouri-Fard, S., Khoshbakht, T., Hussen, B. M., Taheri, M., & Samadian, M. (2022). A review on the role of miR-1246 in the pathoetiology of different cancers. *Frontiers in molecular biosciences*, 8, 771835.
- ❖ Ghidini, M., Petrelli, F., & Tomasello, G. (2018). Right versus left colon cancer: resectable and metastatic disease. *Current treatment options in oncology*, 19(6), 31.
- ❖ Ghosh, A., Saginc, G., Leow, S. C., Khattar, E., Shin, E. M., Yan, T. D., Wong, M., Zhang, Z., Li, G., Sung, W. K., Zhou, J., Chng, W. J., Li, S., Liu, E., & Tergaonkar, V. (2012). Telomerase directly regulates NF- κ B-dependent transcription. *Nature cell biology*, 14(12), 1270–1281.
- ❖ Giardini, M. A., Segatto, M., da Silva, M. S., Nunes, V. S., & Cano, M. I. (2014). Telomere and telomerase biology. *Progress in molecular biology and translational science*, 125, 1-40.
- ❖ Gielen, M., Hageman, G. J., Antoniou, E. E., Nordfjall, K., Mangino, M., Balasubramanyam, M., de Meyer, T., Hendricks, A. E., Giltay, E. J., Hunt, S. C., Nettleton, J. A., Salpea, K. D., Diaz, V. A., Farzaneh-Far, R., Atzmon, G., Harris, S. E., Hou, L., Gilley, D., Hovatta, I., Kark, J. D., ... TELOMAAS group (2018).

- Body mass index is negatively associated with telomere length: a collaborative cross-sectional meta-analysis of 87 observational studies. *The American journal of clinical nutrition*, 108(3), 453–475.
- ❖ Gillis, A. J., Schuller, A. P., & Skordalakes, E. (2008). Structure of the *Tribolium castaneum* telomerase catalytic subunit TERT. *Nature*, 455(7213), 633–637.
 - ❖ Gong, Y., & de Lange, T. (2010). A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signaling at telomeres through RPA exclusion. *Molecular cell*, 40(3), 377–387.
 - ❖ Gonzalez, M. C., Pastore, C. A., Orlandi, S. P., & Heymsfield, S. B. (2014). Obesity paradox in cancer: new insights provided by body composition. *The American journal of clinical nutrition*, 99(5), 999–1005.
 - ❖ Grady, W. M., & Markowitz, S. D. (2015). The molecular pathogenesis of colorectal cancer and its potential application to colorectal cancer screening. *Digestive diseases and sciences*, 60(3), 762–772.
 - ❖ Greenlee, H., Unger, J. M., LeBlanc, M., Ramsey, S., & Hershman, D. L. (2017). Association between body mass index and cancer survival in a pooled analysis of 22 clinical trials. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, 26(1), 21–29.
 - ❖ Gregor, M. F., & Hotamisligil, G. S. (2011). Inflammatory mechanisms in obesity. *Annual review of immunology*, 29, 415–445.
 - ❖ Grossberg, A. J., Chamchod, S., Fuller, C. D., Mohamed, A. S., Heukelom, J., Eichelberger, H., Kantor, M. E., Hutcheson, K. A., Gunn, G. B., Garden, A. S., Frank, S., Phan, J., Beadle, B., Skinner, H. D., Morrison, W. H., & Rosenthal, D. I. (2016). Association of body composition with survival and locoregional control of radiotherapy-treated head and neck squamous cell carcinoma. *JAMA oncology*, 2(6), 782–789.
 - ❖ Gruber, H. J., Semeraro, M. D., Renner, W., & Herrmann, M. (2021). Telomeres and age-related diseases. *Biomedicines*, 9(10), 1335.
 - ❖ Gurung, R. L., M, Y., Moh, A., Dorajoo, R., Liu, S., Liu, J. J., Shabbir, A., So, J., Tan, C. H., Cheng, A., & Lim, S. C. (2020). Correlation of telomere length in adipose tissue and leukocytes and its association with postsurgical weight loss. *Obesity*, 28(12), 2424–2430.
 - ❖ Gustafson, B., & Smith, U. (2012). The WNT inhibitor Dickkopf 1 and bone morphogenetic protein 4 rescue adipogenesis in hypertrophic obesity in humans. *Diabetes*, 61(5), 1217–1224.

- ❖ Guterres, A. N., & Villanueva, J. (2020). Targeting telomerase for cancer therapy. *Oncogene*, *39*(36), 5811–5824.
- ❖ Gutkin, A., Uziel, O., Beery, E., Nordenberg, J., Pinchasi, M., Goldvaser, H., Henick, S., Goldberg, M., & Lahav, M. (2016). Tumor cells derived exosomes contain hTERT mRNA and transform nonmalignant fibroblasts into telomerase positive cells. *Oncotarget*, *7*(37), 59173–59188.
- ❖ Haapaniemi, E., Botla, S., Persson, J., Schmierer, B., & Taipale, J. (2018). CRISPR-Cas9 genome editing induces a p53-mediated DNA damage response. *Nature medicine*, *24*(7), 927–930.
- ❖ Haendeler, J., Hoffmann, J., Diehl, J. F., Vasa, M., Spyridopoulos, I., Zeiher, A. M., & Dimmeler, S. (2004). Antioxidants inhibit nuclear export of telomerase reverse transcriptase and delay replicative senescence of endothelial cells. *Circulation research*, *94*(6), 768–775.
- ❖ Haikarainen, T., Krauss, S., & Lehtio, L. (2014). Tankyrases: structure, function and therapeutic implications in cancer. *Current pharmaceutical design*, *20*(41), 6472–6488.
- ❖ Hakimi, A. A., Furberg, H., Zabor, E. C., Jacobsen, A., Schultz, N., Ciriello, G., Mikkilineni, N., Fiegoli, B., Kim, P. H., Voss, M. H., Shen, H., Laird, P. W., Sander, C., Reuter, V. E., Motzer, R. J., Hsieh, J. J., & Russo, P. (2013). An epidemiologic and genomic investigation into the obesity paradox in renal cell carcinoma. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(24), 1862–1870.
- ❖ Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, *144*(5), 646–674.
- ❖ Harada, S., & Morlote, D. (2020). Molecular pathology of colorectal cancer. *Advances in anatomic pathology*, *27*(1), 20–26.
- ❖ Harman-Boehm, I., Blüher, M., Redel, H., Sion-Vardy, N., Ovadia, S., Avinoach, E., Shai, I., Klötting, N., Stumvoll, M., Bashan, N., & Rudich, A. (2007). Macrophage infiltration into omental versus subcutaneous fat across different populations: effect of regional adiposity and the comorbidities of obesity. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *92*(6), 2240–2247.
- ❖ Hayashi, M. T., Cesare, A. J., Rivera, T., & Karlseder, J. (2015). Cell death during crisis is mediated by mitotic telomere deprotection. *Nature*, *522*(7557), 492–496.
- ❖ Heaphy, C. M., Subhawong, A. P., Hong, S. M., Goggins, M. G., Montgomery, E. A., Gabrielson, E., Netto, G. J., Epstein, J. I., Lotan, T. L., Westra, W. H., Shih,

- I., Iacobuzio-Donahue, C. A., Maitra, A., Li, Q. K., Eberhart, C. G., Taube, J. M., Rakheja, D., Kurman, R. J., Wu, T. C., Roden, R. B., ... Meeker, A. K. (2011). Prevalence of the alternative lengthening of telomeres telomere maintenance mechanism in human cancer subtypes. *The American journal of pathology*, *179*(4), 1608–1615.
- ❖ Heilbronn, L., Smith, S. R., & Ravussin, E. (2004). Failure of fat cell proliferation, mitochondrial function and fat oxidation results in ectopic fat storage, insulin resistance and type II diabetes mellitus. *International journal of obesity and related metabolic disorders*, *28*(Suppl 4), S12–S21.
 - ❖ Henson, J. D., Cao, Y., Huschtscha, L. I., Chang, A. C., Au, A. Y., Pickett, H. A., & Reddel, R. R. (2009). DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nature biotechnology*, *27*(12), 1181–1185.
 - ❖ Hibino, S., Kawazoe, T., Kasahara, H., Itoh, S., Ishimoto, T., Sakata-Yanagimoto, M., & Taniguchi, K. (2021). Inflammation-induced tumorigenesis and metastasis. *International journal of molecular sciences*, *22*(11), 5421.
 - ❖ Ho, A., Wilson, F. R., Peragine, S. L., Jeyanthan, K., Mitchell, T. R., & Zhu, X. D. (2016). TRF1 phosphorylation on T271 modulates telomerase-dependent telomere length maintenance as well as the formation of ALT-associated PML bodies. *Scientific reports*, *6*, 36913.
 - ❖ Hoffmeyer, K., Raggioli, A., Rudloff, S., Anton, R., Hierholzer, A., Del Valle, I., Hein, K., Vogt, R., & Kemler, R. (2012). Wnt/ β -catenin signaling regulates telomerase in stem cells and cancer cells. *Science*, *336*(6088), 1549–1554.
 - ❖ Houshyar, K. S., Chelliah, M. P., Rein, S., Maan, Z. N., Weissenberg, K., Duscher, D., Branski, L. K., & Siemers, F. (2018). Role of Wnt signaling during inflammation and sepsis: A review of the literature. *The International journal of artificial organs*, *41*(5), 247–253.
 - ❖ Hu, C., Rai, R., Huang, C., Broton, C., Long, J., Xu, Y., Xue, J., Lei, M., Chang, S., & Chen, Y. (2017). Structural and functional analyses of the mammalian TIN2-TPP1-TRF2 telomeric complex. *Cell research*, *27*(12), 1485–1502.
 - ❖ Hu, C., Zhang, Q., Jin, X., Zhang, L., Zhang, Y., Zhu, Q., Tang, M., Lyv, G., & Shi, H. (2021). A paradox between preoperative overweight/obesity and change in weight during postoperative chemotherapy and its relationship to survival in stage II and III colorectal cancer patients. *Clinical nutrition*, *40*(4), 2410–2419.

- ❖ Huang, X., Stern, D. F., & Zhao, H. (2016). Transcriptional profiles from paired normal samples offer complementary information on cancer patient survival - evidence from TCGA pan-cancer data. *Scientific reports*, 6, 20567.
- ❖ Huda, N., Tanaka, H., Mendonca, M. S., & Gilley, D. (2009). DNA damage-induced phosphorylation of TRF2 is required for the fast pathway of DNA double-strand break repair. *Molecular and cellular biology*, 29(13), 3597–3604.
- ❖ Ibrahim M. M. (2010). Subcutaneous and visceral adipose tissue: structural and functional differences. *Obesity reviews*, 11(1), 11–18.
- ❖ Ichikawa, Y., Nishimura, Y., Kurumizaka, H., & Shimizu, M. (2015). Nucleosome organization and chromatin dynamics in telomeres. *Biomolecular concepts*, 6(1), 67–75.
- ❖ Iles, M. M., Bishop, D. T., Taylor, J. C., Hayward, N. K., Brossard, M., Cust, A. E., Dunning, A. M., Lee, J. E., Moses, E. K., Akslen, L. A., AMFS Investigators, Andresen, P. A., Avril, M. F., Azizi, E., Scarrà, G. B., Brown, K. M., Dębniak, T., Elder, D. E., Friedman, E., Ghiorzo, P., ... GenoMEL Consortium (2014). The effect on melanoma risk of genes previously associated with telomere length. *Journal of the National Cancer Institute*, 106(10), dju267.
- ❖ Invernizzi, P., Bernuzzi, F., Lleo, A., Pozzoli, V., Bignotto, M., Zermiani, P., Crocignani, A., Battezzati, P. M., Zuin, M., Podda, M., & Raggi, C. (2014). Telomere dysfunction in peripheral blood mononuclear cells from patients with primary biliary cirrhosis. *Digestive and liver disease*, 46(4), 363–368.
- ❖ Jády, B. E., Bertrand, E., & Kiss, T. (2004). Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *The Journal of cell biology*, 164(5), 647–652.
- ❖ Jäger, K., & Walter, M. (2016). Therapeutic targeting of telomerase. *Genes*, 7(7), 39.
- ❖ Jansson, L. I., Hentschel, J., Parks, J. W., Chang, T. R., Lu, C., Baral, R., Bagshaw, C. R., & Stone, M. D. (2019). Telomere DNA G-quadruplex folding within actively extending human telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 116(19), 9350–9359.
- ❖ Jeon, B. G., Kumar, B. M., Kang, E. J., Ock, S. A., Lee, S. L., Kwack, D. O., Byun, J. H., Park, B. W., & Rho, G. J. (2011). Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene

- expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell and tissue research*, 345(1), 149–161.
- ❖ Jeon, H. S., Choi, Y. Y., Choi, J. E., Lee, W. K., Lee, E., Yoo, S. S., Lee, S. Y., Lee, J., Cha, S. I., Kim, C. H., & Park, J. Y. (2014). Telomere length of tumor tissues and survival in patients with early stage non-small cell lung cancer. *Molecular carcinogenesis*, 53(4), 272–279.
 - ❖ Jeong, S. A., Kim, K., Lee, J. H., Cha, J. S., Khadka, P., Cho, H. S., & Chung, I. K. (2015). Akt-mediated phosphorylation increases the binding affinity of hTERT for importin α to promote nuclear translocation. *Journal of cell science*, 128(12), 2287–2301.
 - ❖ Jeung, H. C., Rha, S. Y., Shin, S. J., Ahn, J. B., Park, K. H., Kim, T. S., Kim, J. J., Roh, J. K., & Chung, H. C. (2017). Changes in telomerase activity due to alternative splicing of human telomerase reverse transcriptase in colorectal cancer. *Oncology letters*, 14(2), 2385–2392.
 - ❖ Jia, H., & Wang, Z. (2016). Telomere length as a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer patients. *Cellular physiology and biochemistry*, 38(1), 122–128.
 - ❖ Jiang, X., Wang, L., Xie, S., Chen, Y., Song, S., Lu, Y., & Lu, D. (2020). Long noncoding RNA MEG3 blocks telomerase activity in human liver cancer stem cells epigenetically. *Stem cell research & therapy*, 11(1), 518.
 - ❖ Jiang, Y., Yan, X., Liu, K., Shi, Y., Wang, C., Hu, J., Li, Y., Wu, Q., Xiang, M., & Zhao, R. (2020). Discovering the molecular differences between right- and left-sided colon cancer using machine learning methods. *BMC cancer*, 20(1), 1012.
 - ❖ Joe, A. W., Yi, L., Even, Y., Vogl, A. W., & Rossi, F. M. (2009). Depot-specific differences in adipogenic progenitor abundance and proliferative response to high-fat diet. *Stem cells*, 27(10), 2563–2570.
 - ❖ Jones, K. R., Elmore, L. W., Jackson-Cook, C., Demasters, G., Povirk, L. F., Holt, S. E., & Gewirtz, D. A. (2005). p53-Dependent accelerated senescence induced by ionizing radiation in breast tumour cells. *International journal of radiation biology*, 81(6), 445–458.
 - ❖ Kambara, T., Simms, L. A., Whitehall, V. L., Spring, K. J., Wynter, C. V., Walsh, M. D., Barker, M. A., Arnold, S., McGivern, A., Matsubara, N., Tanaka, N., Higuchi, T., Young, J., Jass, J. R., & Leggett, B. A. (2004). BRAF mutation is

associated with DNA methylation in serrated polyps and cancers of the colorectum. *Gut*, 53(8), 1137–1144.

- ❖ Kanemasa, Y., Shimoyama, T., Sasaki, Y., Tamura, M., Sawada, T., Omuro, Y., Hishima, T., & Maeda, Y. (2018). Analysis of the prognostic value of BMI and the difference in its impact according to age and sex in DLBCL patients. *Hematological oncology*, 36(1), 76–83.
- ❖ Karlseder J. (2003). Telomere repeat binding factors: keeping the ends in check. *Cancer letters*, 194(2), 189–197.
- ❖ Karlseder, J., Hoke, K., Mirzoeva, O. K., Bakkenist, C., Kastan, M. B., Petrini, J. H., & de Lange, T. (2004). The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS biology*, 2(8), E240.
- ❖ Katso, R., Okkenhaug, K., Ahmadi, K., White, S., Timms, J., & Waterfield, M. D. (2001). Cellular function of phosphoinositide 3-kinases: implications for development, homeostasis, and cancer. *Annual review of cell and developmental biology*, 17, 615–675.
- ❖ Kawai, H., Saito, Y., & Suzuki, Y. (2017). Gender differences in the correlation between prognosis and postoperative weight loss in patients with non-small cell lung cancer. *Interactive cardiovascular and thoracic surgery*, 25(2), 272–277.
- ❖ Kawanishi-Tabata, R., Lopez, F., Fratantonio, S., Kim, N., Goldblum, J., Tubbs, R., Elson, P., Lavery, I., Bukowski, R. M., Ganapathi, R., & Ganapathi, M. K. (2002). Telomerase activity in stage II colorectal carcinoma. *Cancer*, 95(9), 1834–1839.
- ❖ Kelleher, C., Kurth, I., & Lingner, J. (2005). Human protection of telomeres 1 (POT1) is a negative regulator of telomerase activity in vitro. *Molecular and cellular biology*, 25(2), 808–818.
- ❖ Kelleher, C., Teixeira, M. T., Förstemann, K., & Lingner, J. (2002). Telomerase: biochemical considerations for enzyme and substrate. *Trends in biochemical sciences*, 27(11), 572–579.
- ❖ Keppler, B. R., Grady, A. T., & Jarstfer, M. B. (2006). The biochemical role of the heat shock protein 90 chaperone complex in establishing human telomerase activity. *The Journal of biological chemistry*, 281(29), 19840–19848.

- ❖ Kidir, V., Aynali, A., Altuntas, A., Inal, S., Aridogan, B., & Sezer, M. T. (2017). Telomerase activity in patients with stage 2-5D chronic kidney disease. *Nefrología*, *37*(6), 592–597.
- ❖ Kim, A. Y., Lee, Y. S., Kim, K. H., Lee, J. H., Lee, H. K., Jang, S. H., Kim, S. E., Lee, G. Y., Lee, J. W., Jung, S. A., Chung, H. Y., Jeong, S., & Kim, J. B. (2010). Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Molecular endocrinology*, *24*(7), 1441–1452.
- ❖ Kim, B., Lee, B., Kim, M. K., Gong, S. P., Park, N. H., Chung, H. H., Kim, H. S., No, J. H., Park, W. Y., Park, A. K., Lim, J. M., & Song, Y. S. (2016). Gene expression profiles of human subcutaneous and visceral adipose-derived stem cells. *Cell biochemistry and function*, *34*(8), 563–571.
- ❖ Kim, H. I., Lim, H., & Moon, A. (2018). Sex differences in cancer: epidemiology, genetics and therapy. *Biomolecules & therapeutics*, *26*(4), 335–342.
- ❖ Kim, N. H., Cha, Y. H., Kang, S. E., Lee, Y., Lee, I., Cha, S. Y., Ryu, J. K., Na, J. M., Park, C., Yoon, H. G., Park, G. J., Yook, J. I., & Kim, H. S. (2013). p53 regulates nuclear GSK-3 levels through miR-34-mediated Axin2 suppression in colorectal cancer cells. *Cell cycle*, *12*(10), 1578–1587.
- ❖ Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., & Shay, J. W. (1994). Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*, *266*(5193), 2011–2015.
- ❖ Kim, W., & Shay, J. W. (2018). Long-range telomere regulation of gene expression: Telomere looping and telomere position effect over long distances (TPE-OLD). *Differentiation*, *99*, 1–9.
- ❖ Kim, W., Ludlow, A. T., Min, J., Robin, J. D., Stadler, G., Mender, I., Lai, T. P., Zhang, N., Wright, W. E., & Shay, J. W. (2016). Regulation of the human telomerase gene TERT by telomere position effect-over long distances (TPE-OLD): Implications for Aging and Cancer. *PLoS biology*, *14*(12), e2000016.
- ❖ Klein, S. L., & Flanagan, K. L. (2016). Sex differences in immune responses. *Nature reviews. Immunology*, *16*(10), 626–638.
- ❖ Kocarnik, J. M., Chan, A. T., Slattery, M. L., Potter, J. D., Meyerhardt, J., Phipps, A., Nan, H., Harrison, T., Rohan, T. E., Qi, L., Hou, L., Caan, B., Kroenke, C. H., Strickler, H., Hayes, R. B., Schoen, R. E., Chong, D. Q., White, E., Berndt, S. I., Peters, U., ... Newcomb, P. A. (2016). Relationship of prediagnostic body mass

- index with survival after colorectal cancer: Stage-specific associations. *International journal of cancer*, 139(5), 1065–1072.
- ❖ Koenen, M., Hill, M. A., Cohen, P., & Sowers, J. R. (2021). Obesity, adipose tissue and vascular dysfunction. *Circulation research*, 128(7), 951–968.
 - ❖ Koh, C. M., Khattar, E., Leow, S. C., Liu, C. Y., Muller, J., Ang, W. X., Li, Y., Franzoso, G., Li, S., Guccione, E., & Tergaonkar, V. (2015). Telomerase regulates MYC-driven oncogenesis independent of its reverse transcriptase activity. *The Journal of clinical investigation*, 125(5), 2109–2122.
 - ❖ Kojima, K., Hiyama, E., Otani, K., Ohtaki, M., Fukuba, I., Fukuda, E., Sueda, T., & Hiyama, K. (2011). Telomerase activation without shortening of telomeric 3'-overhang is a poor prognostic factor in human colorectal cancer. *Cancer science*, 102(2), 330–335.
 - ❖ Kolb, R., Sutterwala, F. S., & Zhang, W. (2016). Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Current opinion in pharmacology*, 29, 77–89.
 - ❖ Kralova Lesna, I., Kralova, A., Cejkova, S., Fronek, J., Petras, M., Sekerkova, A., Thieme, F., Janousek, L., & Poledne, R. (2016). Characterisation and comparison of adipose tissue macrophages from human subcutaneous, visceral and perivascular adipose tissue. *Journal of translational medicine*, 14(1), 208.
 - ❖ Kroenke, C. H., Neugebauer, R., Meyerhardt, J., Prado, C. M., Weltzien, E., Kwan, M. L., Xiao, J., & Caan, B. J. (2016). Analysis of body mass index and mortality in patients with colorectal cancer using causal diagrams. *JAMA oncology*, 2(9), 1137–1145.
 - ❖ Kroenke, C. H., Pletcher, M. J., Lin, J., Blackburn, E., Adler, N., Matthews, K., & Epel, E. (2012). Telomerase, telomere length, and coronary artery calcium in black and white men in the CARDIA study. *Atherosclerosis*, 220(2), 506–512.
 - ❖ Kroupa, M., Rachakonda, S. K., Liska, V., Srinivas, N., Urbanova, M., Jiraskova, K., Schneiderova, M., Vycital, O., Vymetalkova, V., Vodickova, L., Kumar, R., & Vodicka, P. (2019). Relationship of telomere length in colorectal cancer patients with cancer phenotype and patient prognosis. *British journal of cancer*, 121(4), 344–350.
 - ❖ Kulić, A., Plavetić, N. D., Gamulin, S., Jakić-Razumović, J., Vrbanec, D., & Sirotković-Skerlev, M. (2016). Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Medical oncology*, 33(3), 23.

- ❖ Kumar, M., Lechel, A., & Güneş, Ç. (2016). Telomerase: the devil inside. *Genes*, 7(8), 43.
- ❖ Kumari, A., Srinivasan, R., Vasishta, R. K., & Wig, J. D. (2009). Positive regulation of human telomerase reverse transcriptase gene expression and telomerase activity by DNA methylation in pancreatic cancer. *Annals of surgical oncology*, 16(4), 1051–1059.
- ❖ Kushlinskii, N. E., Gershtein, E. S., Nikolaev, A. A., Delektorskaya, V. V., Korotkova, E. A., Dvorova, E. K., & Kostyleva, O. I. (2014). Insulin-like growth factors (IGF), IGF-binding proteins (IGFBP), and vascular endothelial growth factor (VEGF) in blood serum of patients with colorectal cancer. *Bulletin of experimental biology and medicine*, 156(5), 684–688.
- ❖ Lacasa, D., Taleb, S., Keophiphath, M., Miranville, A., & Clement, K. (2007). Macrophage-secreted factors impair human adipogenesis: involvement of proinflammatory state in preadipocytes. *Endocrinology*, 148(2), 868–877.
- ❖ Lakowa, N., Trieu, N., Flehmig, G., Lohmann, T., Schön, M. R., Dietrich, A., Zeplin, P. H., Langer, S., Stumvoll, M., Blüher, M., & Klötting, N. (2015). Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochemical and biophysical research communications*, 457(3), 426–432.
- ❖ Lalonde, M., & Chartrand, P. (2020). TERRA, a multifaceted regulator of telomerase activity at telomeres. *Journal of molecular biology*, 432(15), 4232–4243.
- ❖ Latrick, C. M., & Cech, T. R. (2010). POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation. *The EMBO journal*, 29(5), 924–933.
- ❖ Lee, D. D., Leão, R., Komosa, M., Gallo, M., Zhang, C. H., Lipman, T., Remke, M., Heidari, A., Nunes, N. M., Apolónio, J. D., Price, A. J., De Mello, R. A., Dias, J. S., Huntsman, D., Hermanns, T., Wild, P. J., Vanner, R., Zadeh, G., Karamchandani, J., Das, S., ... Tabori, U. (2019). DNA hypermethylation within TERT promoter upregulates TERT expression in cancer. *The Journal of clinical investigation*, 129(1), 223–229.
- ❖ Lee, H. T., Bose, A., Lee, C. Y., Opresko, P. L., & Myong, S. (2017). Molecular mechanisms by which oxidative DNA damage promotes telomerase activity. *Nucleic acids research*, 45(20), 11752–11765.

- ❖ Lee, J. J., Britton, K. A., Pedley, A., Massaro, J. M., Speliotes, E. K., Murabito, J. M., Hoffmann, U., Ingram, C., Keaney, J. F., Jr, Vasan, R. S., & Fox, C. S. (2016). Adipose tissue depots and their cross-sectional associations with circulating biomarkers of metabolic regulation. *Journal of the American Heart Association*, *5*(5), e002936.
- ❖ Lee, J., Meyerhardt, J. A., Giovannucci, E., & Jeon, J. Y. (2015). Association between body mass index and prognosis of colorectal cancer: a meta-analysis of prospective cohort studies. *PloS one*, *10*(3), e0120706.
- ❖ Lee, M. J., Wu, Y., & Fried, S. K. (2013). Adipose tissue heterogeneity: implication of depot differences in adipose tissue for obesity complications. *Molecular aspects of medicine*, *34*(1), 1–11.
- ❖ Lee, M., Martin, H., Firpo, M. A., & Demerath, E. W. (2011). Inverse association between adiposity and telomere length: The Fels Longitudinal Study. *American journal of human biology*, *23*(1), 100–106.
- ❖ Lei, M., Podell, E. R., & Cech, T. R. (2004). Structure of human POT1 bound to telomeric single-stranded DNA provides a model for chromosome end-protection. *Nature structural & molecular biology*, *11*(12), 1223–1229.
- ❖ Lennon, H., Sperrin, M., Badrick, E., & Renehan, A. G. (2016). The obesity paradox in cancer: a review. *Current oncology reports*, *18*(9), 56.
- ❖ Li, G., Zhang, R., Zhang, X., Shao, S., Hu, F., & Feng, Y. (2020). Human colorectal cancer derived-MSCs promote tumor cells escape from senescence via P53/P21 pathway. *Clinical & translational oncology*, *22*(4), 503–511.
- ❖ Li, J., Chang, J., Tian, J., Ke, J., Zhu, Y., Yang, Y., Gong, Y., Zou, D., Peng, X., Yang, N., Mei, S., Wang, X., Cheng, L., Hu, W., Gong, J., Zhong, R., & Miao, X. (2018). A rare variant P507L in TPP1 interrupts TPP1-TIN2 interaction, influences telomere length, and confers colorectal cancer risk in chinese population. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *27*(9), 1029–1035.
- ❖ Li, Y., Zhou, Q. L., Sun, W., Chandrasekharan, P., Cheng, H. S., Ying, Z., Lakshmanan, M., Raju, A., Tenen, D. G., Cheng, S. Y., Chuang, K. H., Li, J., Prabhakar, S., Li, M., & Tergaonkar, V. (2015). Non-canonical NF- κ B signalling and ETS1/2 cooperatively drive C250T mutant TERT promoter activation. *Nature cell biology*, *17*(10), 1327–1338.
- ❖ Liesenfeld, D. B., Grapov, D., Fahrmann, J. F., Salou, M., Scherer, D., Toth, R., Habermann, N., Böhm, J., Schrotz-King, P., Gigic, B., Schneider, M., Ulrich, A.,

- Herpel, E., Schirmacher, P., Fiehn, O., Lampe, J. W., & Ulrich, C. M. (2015). Metabolomics and transcriptomics identify pathway differences between visceral and subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: the ColoCare study. *The American journal of clinical nutrition*, *102*(2), 433–443.
- ❖ Lin, K. W., & Yan, J. (2008). Endings in the middle: current knowledge of interstitial telomeric sequences. *Mutation research*, *658*(1-2), 95–110.
 - ❖ Lin, L., Qin, K., Chen, D., Lu, C., Chen, W., & Guo, V. Y. (2021). Systematic review and meta-analysis of the association between paediatric obesity and telomere length. *Acta paediatrica*, *110*(10), 2695–2703.
 - ❖ Listerman, I., Sun, J., Gazzaniga, F. S., Lukas, J. L., & Blackburn, E. H. (2013). The major reverse transcriptase-incompetent splice variant of the human telomerase protein inhibits telomerase activity but protects from apoptosis. *Cancer research*, *73*(9), 2817–2828.
 - ❖ Liu, J., Wen, Y., Luo, W., Liu, Y., & Sha, X. (2021). Human amniotic epithelial cells promote the proliferation of human corneal endothelial cells by regulating telomerase activity via the Wnt/ β -catenin pathway. *Current eye research*, *46*(2), 159–167.
 - ❖ Liu, X., Wang, Y., Chang, G., Wang, F., Wang, F., & Geng, X. (2017). Alternative splicing of hTERT Pre-mRNA: a potential strategy for the regulation of telomerase activity. *International journal of molecular sciences*, *18*(3), 567.
 - ❖ Liu, Y., Kao, H. I., & Bambara, R. A. (2004). Flap endonuclease 1: a central component of DNA metabolism. *Annual review of biochemistry*, *73*, 589–615.
 - ❖ Liu, Z., Li, Q., Li, K., Chen, L., Li, W., Hou, M., Liu, T., Yang, J., Lindvall, C., Björkholm, M., Jia, J., & Xu, D. (2013). Telomerase reverse transcriptase promotes epithelial-mesenchymal transition and stem cell-like traits in cancer cells. *Oncogene*, *32*(36), 4203–4213.
 - ❖ Longo, M., Zatterale, F., Naderi, J., Parrillo, L., Formisano, P., Raciti, G. A., Beguinot, F., & Miele, C. (2019). Adipose tissue dysfunction as determinant of obesity-associated metabolic complications. *International journal of molecular sciences*, *20*(9), 2358.
 - ❖ Ly H. (2011). Telomere dynamics in induced pluripotent stem cells: Potentials for human disease modeling. *World journal of stem cells*, *3*(10), 89–95.
 - ❖ Maciejowski, J., Li, Y., Bosco, N., Campbell, P. J., & de Lange, T. (2015). Chromothripsis and kataegis induced by telomere crisis. *Cell*, *163*(7), 1641–1654.

- ❖ Macotella, Y., Emanuelli, B., Mori, M. A., Gesta, S., Schulz, T. J., Tseng, Y. H., & Kahn, C. R. (2012). Intrinsic differences in adipocyte precursor cells from different white fat depots. *Diabetes*, *61*(7), 1691–1699.
- ❖ Maida, Y., Yasukawa, M., Furuuchi, M., Lassmann, T., Possemato, R., Okamoto, N., Kasim, V., Hayashizaki, Y., Hahn, W. C., & Masutomi, K. (2009). An RNA-dependent RNA polymerase formed by TERT and the RMRP RNA. *Nature*, *461*(7261), 230–235.
- ❖ Maida, Y., Yasukawa, M., Okamoto, N., Ohka, S., Kinoshita, K., Totoki, Y., Ito, T. K., Minamino, T., Nakamura, H., Yamaguchi, S., Shibata, T., & Masutomi, K. (2014). Involvement of telomerase reverse transcriptase in heterochromatin maintenance. *Molecular and cellular biology*, *34*(9), 1576–1593.
- ❖ Manandhar, M., Boulware, K. S., & Wood, R. D. (2015). The ERCC1 and ERCC4 (XPF) genes and gene products. *Gene*, *569*(2), 153–161.
- ❖ Mardin, B. R., Drainas, A. P., Waszak, S. M., Weischenfeldt, J., Isokane, M., Stütz, A. M., Raeder, B., Efthymiopoulos, T., Buccitelli, C., Segura-Wang, M., Northcott, P., Pfister, S. M., Lichter, P., Ellenberg, J., & Korbel, J. O. (2015). A cell-based model system links chromothripsis with hyperploidy. *Molecular systems biology*, *11*(9), 828.
- ❖ Martínez, P., Gómez-López, G., Pisano, D. G., Flores, J. M., & Blasco, M. A. (2016). A genetic interaction between RAP1 and telomerase reveals an unanticipated role for RAP1 in telomere maintenance. *Aging cell*, *15*(6), 1113–1125.
- ❖ Martini, A., Shah, Q. N., Waingankar, N., Sfakianos, J. P., Tsao, C. K., Necchi, A., Montorsi, F., Gallagher, E. J., & Galsky, M. D. (2021). The obesity paradox in metastatic castration-resistant prostate cancer. *Prostate cancer and prostatic diseases*, DOI: 10.1038/s41391-021-00418-0 (Epub ahead of print).
- ❖ Mason, M., Schuller, A., & Skordalakes, E. (2011). Telomerase structure function. *Current opinion in structural biology*, *21*(1), 92–100.
- ❖ Mattiussi, M., Tilman, G., Lenglez, S., & Decottignies, A. (2012). Human telomerase represses ROS-dependent cellular responses to Tumor Necrosis Factor- α without affecting NF- κ B activation. *Cellular signalling*, *24*(3), 708–717.
- ❖ McKerlie, M., & Zhu, X. D. (2011). Cyclin B-dependent kinase 1 regulates human TRF1 to modulate the resolution of sister telomeres. *Nature communications*, *2*, 371.

- ❖ McKerlie, M., Walker, J. R., Mitchell, T. R., Wilson, F. R., & Zhu, X. D. (2013). Phosphorylated (pT371)TRF1 is recruited to sites of DNA damage to facilitate homologous recombination and checkpoint activation. *Nucleic acids research*, *41*(22), 10268–10282.
- ❖ Melk, A., Tegtbur, U., Hilfiker-Kleiner, D., Eberhard, J., Saretzki, G., Eulert, C., Kerling, A., Nelius, A. K., Hömme, M., Strunk, D., Berliner, D., Röntgen, P., Kück, M., Bauersachs, J., Hilfiker, A., Haverich, A., Bara, C., & Stiesch, M. (2014). Improvement of biological age by physical activity. *International journal of cardiology*, *176*(3), 1187–1189.
- ❖ Mensenkamp, A. R., Vogelaar, I. P., van Zelst-Stams, W. A., Goossens, M., Ouchene, H., Hendriks-Cornelissen, S. J., Kwint, M. P., Hoogerbrugge, N., Nagtegaal, I. D., & Ligtenberg, M. J. (2014). Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*, *146*(3), 643–646.e8.
- ❖ Minafra, M., Laforgia, R., Sederino, M. G., Fedele, S., Delvecchio, A., Lattarulo, S., Carbotta, G., & Fabiano, G. (2017). Study of the role of telomerase in colorectal cancer: preliminary report and literature review. *Il Giornale di chirurgia*, *38*(5), 213–218.
- ❖ Minteer, D., Marra, K. G., & Rubin, J. P. (2013). Adipose-derived mesenchymal stem cells: biology and potential applications. *Advances in biochemical engineering/biotechnology*, *129*, 59–71.
- ❖ Mir, S. M., Samavarchi Tehrani, S., Goodarzi, G., Jamalpoor, Z., Asadi, J., Khelghati, N., Qujeq, D., & Maniati, M. (2020). Shelterin complex at telomeres: Implications in ageing. *Clinical interventions in aging*, *15*, 827–839.
- ❖ Miyake, Y., Adachi, J. I., Suzuki, T., Mishima, K., Araki, R., Mizuno, R., & Nishikawa, R. (2019). TERT promoter methylation is significantly associated with TERT upregulation and disease progression in pituitary adenomas. *Journal of neuro-oncology*, *141*(1), 131–138.
- ❖ Monickaraj, F., Gokulakrishnan, K., Prabu, P., Sathishkumar, C., Anjana, R. M., Rajkumar, J. S., Mohan, V., & Balasubramanyam, M. (2012). Convergence of adipocyte hypertrophy, telomere shortening and hypoadiponectinemia in obese subjects and in patients with type 2 diabetes. *Clinical biochemistry*, *45*(16-17), 1432–1438.

- ❖ Moon, H. G., Ju, Y. T., Jeong, C. Y., Jung, E. J., Lee, Y. J., Hong, S. C., Ha, W. S., Park, S. T., & Choi, S. K. (2008). Visceral obesity may affect oncologic outcome in patients with colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, *15*(7), 1918–1922.
- ❖ Moravec, M., Wischnewski, H., Bah, A., Hu, Y., Liu, N., Lafranchi, L., King, M. C., & Azzalin, C. M. (2016). TERRA promotes telomerase-mediated telomere elongation in *Schizosaccharomyces pombe*. *EMBO reports*, *17*(7), 999–1012.
- ❖ Moreno-Navarrete, J. M., Ortega, F., Sabater, M., Ricart, W., & Fernández-Real, J. M. (2010). Telomere length of subcutaneous adipose tissue cells is shorter in obese and formerly obese subjects. *International journal of obesity (2005)*, *34*(8), 1345–1348.
- ❖ Muftuoglu, M., Wong, H. K., Imam, S. Z., Wilson, D. M., 3rd, Bohr, V. A., & Opreško, P. L. (2006). Telomere repeat binding factor 2 interacts with base excision repair proteins and stimulates DNA synthesis by DNA polymerase beta. *Cancer research*, *66*(1), 113–124.
- ❖ Mukherjee, S., Firpo, E. J., Wang, Y., & Roberts, J. M. (2011). Separation of telomerase functions by reverse genetics. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(50), E1363–E1371.
- ❖ Müller, M. F., Ibrahim, A. E., & Arends, M. J. (2016). Molecular pathological classification of colorectal cancer. *Virchows Archiv*, *469*(2), 125–134.
- ❖ Muñoz, P., Blanco, R., de Carcer, G., Schoeftner, S., Benetti, R., Flores, J. M., Malumbres, M., & Blasco, M. A. (2009). TRF1 controls telomere length and mitotic fidelity in epithelial homeostasis. *Molecular and cellular biology*, *29*(6), 1608–1625.
- ❖ Mutoh, M., Teraoka, N., Takasu, S., Takahashi, M., Onuma, K., Yamamoto, M., Kubota, N., Iseki, T., Kadowaki, T., Sugimura, T., & Wakabayashi, K. (2011). Loss of adiponectin promotes intestinal carcinogenesis in Min and wild-type mice. *Gastroenterology*, *140*(7), 2000–2008.e20082.
- ❖ Mzahma, R., Kharrat, M., Fetiriche, F., Bouasker, Ben Moussa, M., Ben Safta, Z., Dziri, C., Zaouche, A., & Chaabouni-Bouhamed, H. (2015). The relationship between telomere length and clinicopathologic characteristics in colorectal cancers among Tunisian patients. *Tumour biology*, *36*(11), 8703–8713.

- ❖ Nandakumar, J., Bell, C. F., Weidenfeld, I., Zaug, A. J., Leinwand, L. A., & Cech, T. R. (2012). The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature*, *492*(7428), 285–289.
- ❖ Nassour, J., Radford, R., Correia, A., Fusté, J. M., Schoell, B., Jauch, A., Shaw, R. J., & Karlseder, J. (2019). Autophagic cell death restricts chromosomal instability during replicative crisis. *Nature*, *565*(7741), 659–663.
- ❖ Nassour, J., Schmidt, T. T., & Karlseder, J. (2021). Telomeres and cancer: resolving the paradox. *Annual review of cancer biology*, *5*(1), 59–77.
- ❖ Nawrot, T. S., Staessen, J. A., Gardner, J. P., & Aviv, A. (2004). Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet*, *363*(9408), 507–510.
- ❖ Nguyen, L. H., Goel, A., & Chung, D. C. (2020). Pathways of colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology*, *158*(2), 291–302.
- ❖ Nieman, K. M., Kenny, H. A., Penicka, C. V., Ladanyi, A., Buell-Gutbrod, R., Zillhardt, M. R., Romero, I. L., Carey, M. S., Mills, G. B., Hotamisligil, G. S., Yamada, S. D., Peter, M. E., Gwin, K., & Lengyel, E. (2011). Adipocytes promote ovarian cancer metastasis and provide energy for rapid tumor growth. *Nature medicine*, *17*(11), 1498–1503.
- ❖ Nijhawan, P., Behl, T., Bungau, S., Uddin, M. S., Zengin, G., & Arora, S. (2020). Molecular insights into therapeutic promise of targeting of Wnt/ β -catenin signaling pathway in obesity. *Molecular biology reports*, *47*(10), 8091–8100.
- ❖ Nishida, N., Yokobori, T., Mimori, K., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Ishii, H., Doki, Y., Kuwano, H., & Mori, M. (2011). MicroRNA miR-125b is a prognostic marker in human colorectal cancer. *International journal of oncology*, *38*(5), 1437–1443.
- ❖ Nishimura, S., Manabe, I., Nagasaki, M., Eto, K., Yamashita, H., Ohsugi, M., Otsu, M., Hara, K., Ueki, K., Sugiura, S., Yoshimura, K., Kadowaki, T., & Nagai, R. (2009). CD8⁺ effector T cells contribute to macrophage recruitment and adipose tissue inflammation in obesity. *Nature medicine*, *15*(8), 914–920.
- ❖ Nizami, Z., Deryusheva, S., & Gall, J. G. (2010). The Cajal body and histone locus body. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, *2*(7), a000653.
- ❖ Nowak, J. A., Yurgelun, M. B., Bruce, J. L., Rojas-Rudilla, V., Hall, D. L., Shivdasani, P., Garcia, E. P., Agoston, A. T., Srivastava, A., Ogino, S., Kuo, F. C., Lindeman, N. I., & Dong, F. (2017). Detection of mismatch repair deficiency

- and microsatellite instability in colorectal adenocarcinoma by targeted next-generation sequencing. *The Journal of molecular diagnostics*, 19(1), 84–91.
- ❖ O'Connor, M. S., Safari, A., Xin, H., Liu, D., & Songyang, Z. (2006). A critical role for TPP1 and TIN2 interaction in high-order telomeric complex assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(32), 11874–11879.
 - ❖ Ogata-Kawata, H., Izumiya, M., Kurioka, D., Honma, Y., Yamada, Y., Furuta, K., Gunji, T., Ohta, H., Okamoto, H., Sonoda, H., Watanabe, M., Nakagama, H., Yokota, J., Kohno, T., & Tsuchiya, N. (2014). Circulating exosomal microRNAs as biomarkers of colon cancer. *PloS one*, 9(4), e92921.
 - ❖ Ogunwobi, O. O., & Beales, I. L. (2007). The anti-apoptotic and growth stimulatory actions of leptin in human colon cancer cells involves activation of JNK mitogen activated protein kinase, JAK2 and PI3 kinase/Akt. *International journal of colorectal disease*, 22(4), 401–409.
 - ❖ Ogura, F., Wakao, S., Kuroda, Y., Tsuchiyama, K., Bagheri, M., Heneidi, S., Chazenbalk, G., Aiba, S., & Dezawa, M. (2014). Human adipose tissue possesses a unique population of pluripotent stem cells with nontumorigenic and low telomerase activities: potential implications in regenerative medicine. *Stem cells and development*, 23(7), 717–728.
 - ❖ Oliva-Olivera, W., Coín-Aragüez, L., Lhamyani, S., Clemente-Postigo, M., Torres, J. A., Bernal-López, M. R., El Bekay, R., & Tinahones, F. J. (2017). Adipogenic impairment of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in subjects with metabolic syndrome: possible protective role of FGF2. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 102(2), 478–487.
 - ❖ Opreško, P. L., & Shay, J. W. (2017). Telomere-associated aging disorders. *Ageing research reviews*, 33, 52–66.
 - ❖ Ose, J., Holowatyj, A. N., Nattenmüller, J., Gigic, B., Lin, T., Himbert, C., Habermann, N., Achaintre, D., Scalbert, A., Keski-Rahkonen, P., Böhm, J., Schrotz-King, P., Schneider, M., Ulrich, A., Kampman, E., Weijenberg, M., Gsur, A., Ueland, P. M., Kauczor, H. U., & Ulrich, C. M. (2020). Metabolomics profiling of visceral and abdominal subcutaneous adipose tissue in colorectal cancer patients: results from the ColoCare study. *Cancer causes & control*, 31(8), 723–735.
 - ❖ Panneer Selvam, S., Roth, B. M., Nganga, R., Kim, J., Cooley, M. A., Helke, K., Smith, C. D., & Ogretmen, B. (2018). Balance between senescence and apoptosis

- is regulated by telomere damage-induced association between p16 and caspase-3. *The Journal of biological chemistry*, 293(25), 9784–9800.
- ❖ Parine, N., Varsha, R. & Alanazi, M. (2016). Microsatellite instability in colorectal cancer. *Microsatellite Markers*. DOI: 10.5772/65429.
 - ❖ Park, J., & Scherer, P. E. (2012). Adipocyte-derived endotrophin promotes malignant tumor progression. *The Journal of clinical investigation*, 122(11), 4243–4256.
 - ❖ Park, J., Morley, T. S., Kim, M., Clegg, D. J., & Scherer, P. E. (2014). Obesity and cancer—mechanisms underlying tumour progression and recurrence. *Nature reviews. Endocrinology*, 10(8), 455–465.
 - ❖ Parry, E. M., Alder, J. K., Lee, S. S., Phillips, J. A., 3rd, Loyd, J. E., Duggal, P., & Armanios, M. (2011). Decreased dyskerin levels as a mechanism of telomere shortening in X-linked dyskeratosis congenita. *Journal of medical genetics*, 48(5), 327–333.
 - ❖ Pascua, I., Fernández-Marcelo, T., Sánchez-Pernaute, A., de Juan, C., Head, J., Torres-García, A. J., & Iniesta, P. (2015). Prognostic value of telomere function in gastric cancers with and without microsatellite instability. *European journal of gastroenterology & hepatology*, 27(2), 162–169.
 - ❖ Paull, T. T., & Lee, J. H. (2005). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex and its role as a DNA double-strand break sensor for ATM. *Cell cycle*, 4(6), 737–740.
 - ❖ Peacock, S. D., Massey, T. E., Vanner, S. J., & King, W. D. (2018). Telomere length in the colon is related to colorectal adenoma prevalence. *PloS one*, 13(10), e0205697.
 - ❖ Peifer, M., Hertwig, F., Roels, F., Dreidax, D., Gartlgruber, M., Menon, R., Krämer, A., Roncaioli, J. L., Sand, F., Heuckmann, J. M., Ikram, F., Schmidt, R., Ackermann, S., Engesser, A., Kahlert, Y., Vogel, W., Altmüller, J., Nürnberg, P., Thierry-Mieg, J., Thierry-Mieg, D., ... Fischer, M. (2015). Telomerase activation by genomic rearrangements in high-risk neuroblastoma. *Nature*, 526(7575), 700–704.
 - ❖ Pfaffl M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic acids research*, 29(9), e45.
 - ❖ Pickett, H. A., Cesare, A. J., Johnston, R. L., Neumann, A. A., & Reddel, R. R. (2009). Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *The EMBO journal*, 28(7), 799–809.

- ❖ Pike, A. M., Strong, M. A., Ouyang, J., & Greider, C. W. (2019). TIN2 functions with TPP1/POT1 to stimulate telomerase processivity. *Molecular and cellular biology*, 39(21), e00593-18.
- ❖ Platt, J. M., Ryzkin, P., Wanat, J. J., Donahue, G., Ricketts, M. D., Barrett, S. P., Waters, H. J., Song, S., Chavez, A., Abdallah, K. O., Master, S. R., Wang, L. S., & Johnson, F. B. (2013). Rap1 relocalization contributes to the chromatin-mediated gene expression profile and pace of cell senescence. *Genes & development*, 27(12), 1406–1420.
- ❖ Powell, S. M., Zilz, N., Beazer-Barclay, Y., Bryan, T. M., Hamilton, S. R., Thibodeau, S. N., Vogelstein, B., & Kinzler, K. W. (1992). APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature*, 359(6392), 235–237.
- ❖ Power, M. L., & Schulkin, J. (2008). Sex differences in fat storage, fat metabolism, and the health risks from obesity: possible evolutionary origins. *The British journal of nutrition*, 99(5), 931–940.
- ❖ Pruitt, K., & Der, C. J. (2001). Ras and Rho regulation of the cell cycle and oncogenesis. *Cancer letters*, 171(1), 1–10.
- ❖ Rachakonda, S., Kong, H., Srinivas, N., Garcia-Casado, Z., Requena, C., Fallah, M., Heidenreich, B., Planelles, D., Traves, V., Schadendorf, D., Nagore, E., & Kumar, R. (2018). Telomere length, telomerase reverse transcriptase promoter mutations, and melanoma risk. *Genes, chromosomes & cancer*, 57(11), 564–572.
- ❖ Rahmati-Yamchi, M., Zarghami, N., Rahbani, M., & Montazeri, A. (2011). Plasma leptin, hTERT gene expression, and anthropometric measures in obese and non-obese women with breast cancer. *Breast cancer: basic and clinical research*, 5, 27–35.
- ❖ Rampazzo, E., Bertorelle, R., Serra, L., Terrin, L., Candiotti, C., Pucciarelli, S., Del Bianco, P., Nitti, D., & De Rossi, A. (2010). Relationship between telomere shortening, genetic instability, and site of tumour origin in colorectal cancers. *British journal of cancer*, 102(8), 1300–1305.
- ❖ Rampazzo, E., Bojnik, E., Trentin, L., Bonaldi, L., Del Bianco, P., Frezzato, F., Visentin, A., Facco, M., Semenzato, G., & De Rossi, A. (2017). Role of miR-15a/miR-16-1 and the TP53 axis in regulating telomerase expression in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*, 102(7), e253–e256.

- ❖ Redon, S., Reichenbach, P., & Lingner, J. (2010). The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic acids research*, *38*(17), 5797–5806.
- ❖ Reichert, S., & Stier, A. (2017). Does oxidative stress shorten telomeres in vivo? A review. *Biology letters*, *13*(12), 20170463.
- ❖ Reilly, S. M., & Saltiel, A. R. (2017). Adapting to obesity with adipose tissue inflammation. *Nature reviews. Endocrinology*, *13*(11), 633–643.
- ❖ Renehan, A. G., Crosbie, E. J., & Campbell, P. T. (2014). Re: Prediagnosis body mass index, physical activity, and mortality in endometrial cancer patients. *Journal of the National Cancer Institute*, *106*(2), djt375.
- ❖ Rentoukas, E., Tsarouhas, K., Kaplanis, I., Korou, E., Nikolaou, M., Marathonitis, G., Kokkinou, S., Haliassos, A., Mamalaki, A., Kouretas, D., & Tsitsimpikou, C. (2012). Connection between telomerase activity in PBMC and markers of inflammation and endothelial dysfunction in patients with metabolic syndrome. *PLoS one*, *7*(4), e35739.
- ❖ Rice, C., & Skordalakes, E. (2016). Structure and function of the telomeric CST complex. *Computational and structural biotechnology journal*, *14*, 161–167.
- ❖ Roberts, R., Hodson, L., Dennis, A. L., Neville, M. J., Humphreys, S. M., Harnaden, K. E., Micklem, K. J., & Frayn, K. N. (2009). Markers of de novo lipogenesis in adipose tissue: associations with small adipocytes and insulin sensitivity in humans. *Diabetologia*, *52*(5), 882–890.
- ❖ Rode, L., Nordestgaard, B. G., Weischer, M., & Bojesen, S. E. (2014). Increased body mass index, elevated C-reactive protein, and short telomere length. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, *99*(9), E1671–E1675.
- ❖ Rodriguez, F. J., Graham, M. K., Brosnan-Cashman, J. A., Barber, J. R., Davis, C., Vizcaino, M. A., Palsgrove, D. N., Giannini, C., Pekmezci, M., Dahiya, S., Gokden, M., Noë, M., Wood, L. D., Pratilas, C. A., Morris, C. D., Belzberg, A., Blakeley, J., & Heaphy, C. M. (2019). Telomere alterations in neurofibromatosis type 1-associated solid tumors. *Acta neuropathologica communications*, *7*(1), 139.
- ❖ Roger, L., Jones, R. E., Heppel, N. H., Williams, G. T., Sampson, J. R., & Baird, D. M. (2013). Extensive telomere erosion in the initiation of colorectal adenomas and its association with chromosomal instability. *Journal of the National Cancer Institute*, *105*(16), 1202–1211.

- ❖ Rosenberg, D. W., Yang, S., Pleau, D. C., Greenspan, E. J., Stevens, R. G., Rajan, T. V., Heinen, C. D., Levine, J., Zhou, Y., & O'Brien, M. J. (2007). Mutations in BRAF and KRAS differentially distinguish serrated versus non-serrated hyperplastic aberrant crypt foci in humans. *Cancer research*, *67*(8), 3551–3554.
- ❖ Russo, A., Bazan, V., Iacopetta, B., Kerr, D., Soussi, T., Gebbia, N., & TP53-CRC Collaborative Study Group (2005). The TP53 colorectal cancer international collaborative study on the prognostic and predictive significance of p53 mutation: influence of tumor site, type of mutation, and adjuvant treatment. *Journal of clinical oncology*, *23*(30), 7518–7528.
- ❖ Safont, M. J., Gil, M., Sirera, R., Jantus-Lewintre, E., Sanmartín, E., Gallach, S., Caballero, C., Del Pozo, N., Palomares, E., & Camps, C. (2011). The prognostic value of hTERT expression levels in advanced-stage colorectal cancer patients: a comparison between tissue and serum expression. *Clinical & translational oncology*, *13*(6), 396–400.
- ❖ Sakin, A., Samanci, N. S., Secmeler, S., Arici, S., Can, O., Yasar, N., Geredeli, C., Demir, C., & Cihan, S. (2020). The effect of body mass index on location of recurrence and survival in early-stage colorectal cancer. *Journal of cancer research and therapeutics*, *16*(Supplement), S176–S182.
- ❖ Salahshor, S., & Woodgett, J. R. (2005). The links between axin and carcinogenesis. *Journal of clinical pathology*, *58*(3), 225–236.
- ❖ Salem, M. E., Weinberg, B. A., Xiu, J., El-Deiry, W. S., Hwang, J. J., Gatalica, Z., Philip, P. A., Shields, A. F., Lenz, H. J., & Marshall, J. L. (2017). Comparative molecular analyses of left-sided colon, right-sided colon, and rectal cancers. *Oncotarget*, *8*(49), 86356–86368.
- ❖ Sam S. (2018). Differential effect of subcutaneous abdominal and visceral adipose tissue on cardiometabolic risk. *Hormone molecular biology and clinical investigation*, *33*(1), 1-9.
- ❖ Samassekou, O., Gadji, M., Drouin, R. & Yan, J. (2010). Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Annals of Anatomy*, *192*(5), 284-291.
- ❖ Sambrook, J., Fritsch, E.F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3 Volume Set) (Cold Spring Harbor Laboratory Pr).
- ❖ Sampathi, S., Bhusari, A., Shen, B., & Chai, W. (2009). Human flap endonuclease I is in complex with telomerase and is required for telomerase-mediated telomere maintenance. *The Journal of biological chemistry*, *284*(6), 3682–3690.

- ❖ Samuels, Y., Wang, Z., Bardelli, A., Silliman, N., Ptak, J., Szabo, S., Yan, H., Gazdar, A., Powell, S. M., Riggins, G. J., Willson, J. K., Markowitz, S., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., & Velculescu, V. E. (2004). High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. *Science*, *304*(5670), 554.
- ❖ Sandhu, M. S., Dunger, D. B., & Giovannucci, E. L. (2002). Insulin, insulin-like growth factor-I (IGF-I), IGF binding proteins, their biologic interactions, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, *94*(13), 972–980.
- ❖ Santini, D., Loupakis, F., Vincenzi, B., Floriani, I., Stasi, I., Canestrari, E., Rulli, E., Maltese, P. E., Andreoni, F., Masi, G., Graziano, F., Baldi, G. G., Salvatore, L., Russo, A., Perrone, G., Tommasino, M. R., Magnani, M., Falcone, A., Tonini, G., & Ruzzo, A. (2008). High concordance of KRAS status between primary colorectal tumors and related metastatic sites: implications for clinical practice. *The oncologist*, *13*(12), 1270–1275.
- ❖ Sanz-Casla, M. T., Vidaurreta, M., Sanchez-Rueda, D., Maestro, M. L., Arroyo, M., & Cerdán, F. J. (2005). Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. *Onkologie*, *28*(11), 553–557.
- ❖ Sarek, G., Kotsantis, P., Ruis, P., Van Ly, D., Margalef, P., Borel, V., Zheng, X. F., Flynn, H. R., Snijders, A. P., Chowdhury, D., Cesare, A. J., & Boulton, S. J. (2019). CDK phosphorylation of TRF2 controls t-loop dynamics during the cell cycle. *Nature*, *575*(7783), 523–527.
- ❖ Sarthy, J., Bae, N. S., Scrafford, J., & Baumann, P. (2009). Human RAP1 inhibits non-homologous end joining at telomeres. *The EMBO journal*, *28*(21), 3390–3399.
- ❖ Sasaki, T., & Gilbert, D. M. (2007). The many faces of the origin recognition complex. *Current opinion in cell biology*, *19*(3), 337–343.
- ❖ Sawicki, T., Ruskowska, M., Danielewicz, A., Niedźwiedzka, E., Arłukowicz, T., & Przybyłowicz, K. E. (2021). A review of colorectal cancer in terms of epidemiology, risk factors, development, symptoms and diagnosis. *Cancers*, *13*(9), 2025.
- ❖ Schairer, C., Fuhrman, B. J., Boyd-Morin, J., Genkinger, J. M., Gail, M. H., Hoover, R. N., & Ziegler, R. G. (2016). Quantifying the role of circulating unconjugated estradiol in mediating the body mass index-breast cancer association. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention*, *25*(1), 105–113.

- ❖ Schlesinger, S., Siegert, S., Koch, M., Walter, J., Heits, N., Hinz, S., Jacobs, G., Hampe, J., Schafmayer, C., & Nöthlings, U. (2014). Postdiagnosis body mass index and risk of mortality in colorectal cancer survivors: a prospective study and meta-analysis. *Cancer causes & control*, 25(10), 1407–1418.
- ❖ Schmidt, J. C., & Cech, T. R. (2015). Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation. *Genes & development*, 29(11), 1095–1105.
- ❖ Schmidt, J. C., Zaug, A. J., & Cech, T. R. (2016). Live cell imaging reveals the dynamics of telomerase recruitment to telomeres. *Cell*, 166(5), 1188–1197.e9.
- ❖ Schmiester, M., & Demuth, I. (2017). SNM1B/Apollo in the DNA damage response and telomere maintenance. *Oncotarget*, 8(29), 48398–48409.
- ❖ Schwartz, M. W., Seeley, R. J., Zeltser, L. M., Drewnowski, A., Ravussin, E., Redman, L. M., & Leibel, R. L. (2017). Obesity pathogenesis: an endocrine society scientific statement. *Endocrine reviews*, 38(4), 267–296.
- ❖ Scioli, M. G., Storti, G., D'Amico, F., Gentile, P., Kim, B. S., Cervelli, V., & Orlandi, A. (2019). Adipose-derived stem cells in cancer progression: new perspectives and opportunities. *International journal of molecular sciences*, 20(13), 3296.
- ❖ Shangary, S., Ding, K., Qiu, S., Nikolovska-Coleska, Z., Bauer, J. A., Liu, M., Wang, G., Lu, Y., McEachern, D., Bernard, D., Bradford, C. R., Carey, T. E., & Wang, S. (2008). Reactivation of p53 by a specific MDM2 antagonist (MI-43) leads to p21-mediated cell cycle arrest and selective cell death in colon cancer. *Molecular cancer therapeutics*, 7(6), 1533–1542.
- ❖ Sharma, A., Yang, W. L., Ochani, M., & Wang, P. (2017). Mitigation of sepsis-induced inflammatory responses and organ injury through targeting Wnt/ β -catenin signaling. *Scientific reports*, 7(1), 9235.
- ❖ Shats, I., Milyavsky, M., Tang, X., Stambolsky, P., Erez, N., Brosh, R., Kogan, I., Braunstein, I., Tzukerman, M., Ginsberg, D., & Rotter, V. (2004). p53-dependent down-regulation of telomerase is mediated by p21^{waf1}. *The Journal of biological chemistry*, 279(49), 50976–50985.
- ❖ Shay J. W. (2016). Role of telomeres and telomerase in aging and cancer. *Cancer discovery*, 6(6), 584–593.
- ❖ Shay, J. W., & Wright, W. E. (2011). Role of telomeres and telomerase in cancer. *Seminars in cancer biology*, 21(6), 349–353.

- ❖ Shimada, Y., Kameyama, H., Nagahashi, M., Ichikawa, H., Muneoka, Y., Yagi, R., Tajima, Y., Okamura, T., Nakano, M., Sakata, J., Kobayashi, T., Nogami, H., Maruyama, S., Takii, Y., Hayashida, T., Takaishi, H., Kitagawa, Y., Oki, E., Konishi, T., Ishida, F., ... Wakai, T. (2017). Comprehensive genomic sequencing detects important genetic differences between right-sided and left-sided colorectal cancer. *Oncotarget*, *8*(55), 93567–93579.
- ❖ Singhapol, C., Pal, D., Czapiewski, R., Porika, M., Nelson, G., & Saretzki, G. C. (2013). Mitochondrial telomerase protects cancer cells from nuclear DNA damage and apoptosis. *PLoS one*, *8*(1), e52989.
- ❖ Sinicrope, F. A., Foster, N. R., Yothers, G., Benson, A., Seitz, J. F., Labianca, R., Goldberg, R. M., Degramont, A., O'Connell, M. J., Sargent, D. J., & Adjuvant Colon Cancer Endpoints (ACCENT) Group (2013). Body mass index at diagnosis and survival among colon cancer patients enrolled in clinical trials of adjuvant chemotherapy. *Cancer*, *119*(8), 1528–1536.
- ❖ Sistigu, A., Di Modugno, F., Manic, G., & Nisticò, P. (2017). Deciphering the loop of epithelial-mesenchymal transition, inflammatory cytokines and cancer immunoediting. *Cytokine & growth factor reviews*, *36*, 67–77.
- ❖ Situ, Y., Chung, L., Lee, C. S., & Ho, V. (2019). MRN (MRE11-RAD50-NBS1) complex in human cancer and prognostic implications in colorectal cancer. *International journal of molecular sciences*, *20*(4), 816.
- ❖ Skvortzov, D. A., Rubzova, M. P., Zvereva, M. E., Kiselev, F. L., & Donzova, O. A. (2009). The regulation of telomerase in oncogenesis. *Acta naturae*, *1*(1), 51–67.
- ❖ Smogorzewska, A., van Steensel, B., Bianchi, A., Oelmann, S., Schaefer, M. R., Schnapp, G., & de Lange, T. (2000). Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Molecular and cellular biology*, *20*(5), 1659–1668.
- ❖ Sommer, A., & Royle, N. J. (2020). ALT: A multi-faceted phenomenon. *Genes*, *11*(2), 133.
- ❖ Son, N. H., Joyce, B., Hieatt, A., Chrest, F. J., Yanovski, J., & Weng, N. P. (2003). Stable telomere length and telomerase expression from naïve to memory B-lymphocyte differentiation. *Mechanisms of ageing and development*, *124*(4), 427–432.
- ❖ Soohoo, C. Y., Shi, R., Lee, T. H., Huang, P., Lu, K. P., & Zhou, X. Z. (2011). Telomerase inhibitor PinX1 provides a link between TRF1 and telomerase to

- prevent telomere elongation. *The Journal of biological chemistry*, 286(5), 3894–3906.
- ❖ Spalding, K. L., Arner, E., Westermark, P. O., Bernard, S., Buchholz, B. A., Bergmann, O., Blomqvist, L., Hoffstedt, J., Näslund, E., Britton, T., Concha, H., Hassan, M., Rydén, M., Frisén, J., & Arner, P. (2008). Dynamics of fat cell turnover in humans. *Nature*, 453(7196), 783–787.
 - ❖ Stamatopoulos, A., Stamatopoulos, T., Gamie, Z., Kenanidis, E., Ribeiro, R., Rankin, K. S., Gerrand, C., Dalgarno, K., & Tsiridis, E. (2019). Mesenchymal stromal cells for bone sarcoma treatment: Roadmap to clinical practice. *Journal of bone oncology*, 16, 100231.
 - ❖ Stern, J. L., Zyner, K. G., Pickett, H. A., Cohen, S. B., & Bryan, T. M. (2012). Telomerase recruitment requires both TCAB1 and Cajal bodies independently. *Molecular and cellular biology*, 32(13), 2384–2395.
 - ❖ Sun, K., Kusminski, C. M., & Scherer, P. E. (2011). Adipose tissue remodeling and obesity. *The Journal of clinical investigation*, 121(6), 2094–2101.
 - ❖ Sun, L., Nakajima, S., Teng, Y., Chen, H., Yang, L., Chen, X., Gao, B., Levine, A. S., & Lan, L. (2017). WRN is recruited to damaged telomeres via its RQC domain and tankyrase1-mediated poly-ADP-ribosylation of TRF1. *Nucleic acids research*, 45(7), 3844–3859.
 - ❖ Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA: a cancer journal for clinicians*, 71(3), 209–249.
 - ❖ Suraweera, N., Mouradov, D., Li, S., Jorissen, R. N., Hampson, D., Ghosh, A., Sengupta, N., Thaha, M., Ahmed, S., Kirwan, M., Aleva, F., Propper, D., Feakins, R. M., Vulliamy, T., Elwood, N. J., Tian, P., Ward, R. L., Hawkins, N. J., Xu, Z. Z., Molloy, P. L., ... Sieber, O. M. (2016). Relative telomere lengths in tumor and normal mucosa are related to disease progression and chromosome instability profiles in colorectal cancer. *Oncotarget*, 7(24), 36474–36488.
 - ❖ Theimer, C. A., Jády, B. E., Chim, N., Richard, P., Breece, K. E., Kiss, T., & Feigon, J. (2007). Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Molecular cell*, 27(6), 869–881.

- ❖ Théry, C., Amigorena, S., Raposo, G., & Clayton, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology, Chapter 3*.
- ❖ Toaldo, C., Pizzimenti, S., Cerbone, A., Pettazzoni, P., Menegatti, E., Daniela, B., Minelli, R., Giglioni, B., Dianzani, M. U., Ferretti, C., & Barrera, G. (2010). PPARgamma ligands inhibit telomerase activity and hTERT expression through modulation of the Myc/Mad/Max network in colon cancer cells. *Journal of cellular and molecular medicine, 14(6A)*, 1347–1357.
- ❖ Tomaska, L., McEachern, M. J., & Nosek, J. (2004). Alternatives to telomerase: keeping linear chromosomes via telomeric circles. *FEBS letters, 567(1)*, 142–146.
- ❖ Tomasova, K., Kroupa, M., Forsti, A., Vodicka, P., & Vodickova, L. (2020). Telomere maintenance in interplay with DNA repair in pathogenesis and treatment of colorectal cancer. *Mutagenesis, 35(3)*, 261–271.
- ❖ Tomlinson, R. L., Abreu, E. B., Ziegler, T., Ly, H., Counter, C. M., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2008). Telomerase reverse transcriptase is required for the localization of telomerase RNA to cajal bodies and telomeres in human cancer cells. *Molecular biology of the cell, 19(9)*, 3793–3800.
- ❖ Tong, A. S., Stern, J. L., Sfeir, A., Kartawinata, M., de Lange, T., Zhu, X. D., & Bryan, T. M. (2015). ATM and ATR Signaling regulate the recruitment of human telomerase to telomeres. *Cell reports, 13(8)*, 1633–1646.
- ❖ Turnbull, R. B., Jr, Kyle, K., Watson, F. R., & Spratt, J. (1967). Cancer of the colon: the influence of the no-touch isolation technic on survival rates. *Annals of surgery, 166(3)*, 420–427.
- ❖ Turner, K. J., Vasu, V., & Griffin, D. K. (2019). Telomere biology and human phenotype. *Cells, 8(1)*, 73 1-19.
- ❖ Tycowski, K. T., Shu, M. D., Kukoyi, A., & Steitz, J. A. (2009). A conserved WD40 protein binds the Cajal body localization signal of scaRNP particles. *Molecular cell, 34(1)*, 47–57.
- ❖ Umar, A., Risinger, J. I., Hawk, E. T., & Barrett, J. C. (2004). Testing guidelines for hereditary non-polyposis colorectal cancer. *Nature reviews. Cancer, 4(2)*, 153–158.
- ❖ Valentijn, A. J., Saretzki, G., Tempest, N., Critchley, H. O., & Hapangama, D. K. (2015). Human endometrial epithelial telomerase is important for epithelial

- proliferation and glandular formation with potential implications in endometriosis. *Human reproduction*, 30(12), 2816–2828.
- ❖ Vallarelli, A. F., Rachakonda, P. S., André, J., Heidenreich, B., Riffaud, L., Bensussan, A., Kumar, R., & Dumaz, N. (2016). TERT promoter mutations in melanoma render TERT expression dependent on MAPK pathway activation. *Oncotarget*, 7(33), 53127–53136.
 - ❖ Valls, C., Piñol, C., Reñé, J. M., Buenestado, J., & Viñas, J. (2011). Telomere length is a prognostic factor for overall survival in colorectal cancer. *Colorectal disease*, 13(11), 1265–1272.
 - ❖ Valls-Bautista, C., Piñol-Felis, C., Reñé-Espinet, J. M., Buenestado-García, J., & Viñas-Salas, J. (2012). Telomeric repeat factor 1 protein levels correlates with telomere length in colorectal cancer. *Revista española de enfermedades digestivas*, 104(10), 530–536.
 - ❖ Valls-Bautista, C., Piñol-Felis, C., Reñé-Espinet, J. M., Buenestado-García, J., & Viñas-Salas, J. (2015). In colon cancer, normal colon tissue and blood cells have altered telomere lengths. *Journal of surgical oncology*, 111(7), 899–904.
 - ❖ van Deursen J. M. (2014). The role of senescent cells in ageing. *Nature*, 509(7501), 439–446.
 - ❖ Van Harmelen, V., Röhrig, K., & Hauner, H. (2004). Comparison of proliferation and differentiation capacity of human adipocyte precursor cells from the omental and subcutaneous adipose tissue depot of obese subjects. *Metabolism: clinical and experimental*, 53(5), 632–637.
 - ❖ van Steensel, B., & de Lange, T. (1997). Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature*, 385(6618), 740–743.
 - ❖ van Vledder, M. G., Levolger, S., Ayez, N., Verhoef, C., Tran, T. C., & Ijzermans, J. N. (2012). Body composition and outcome in patients undergoing resection of colorectal liver metastases. *The British journal of surgery*, 99(4), 550–557.
 - ❖ Venteicher, A. S., & Artandi, S. E. (2009). TCAB1: driving telomerase to Cajal bodies. *Cell cycle*, 8(9), 1329–1331.
 - ❖ Venteicher, A. S., Abreu, E. B., Meng, Z., McCann, K. E., Terns, R. M., Veenstra, T. D., Terns, M. P., & Artandi, S. E. (2009). A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science*, 323(5914), 644–648.

- ❖ Venteicher, A. S., Meng, Z., Mason, P. J., Veenstra, T. D., & Artandi, S. E. (2008). Identification of ATPases pontin and reptin as telomerase components essential for holoenzyme assembly. *Cell*, *132*(6), 945–957.
- ❖ Vinagre, J., Almeida, A., Pópulo, H., Batista, R., Lyra, J., Pinto, V., Coelho, R., Celestino, R., Prazeres, H., Lima, L., Melo, M., da Rocha, A. G., Preto, A., Castro, P., Castro, L., Pardal, F., Lopes, J. M., Santos, L. L., Reis, R. M., Cameselle-Teijeiro, J., ... Soares, P. (2013). Frequency of TERT promoter mutations in human cancers. *Nature communications*, *4*, 2185.
- ❖ Vulliamy, T. J., & Dokal, I. (2008). Dyskeratosis congenita: the diverse clinical presentation of mutations in the telomerase complex. *Biochimie*, *90*(1), 122–130.
- ❖ Walker, J. R., Corpina, R. A., & Goldberg, J. (2001). Structure of the Ku heterodimer bound to DNA and its implications for double-strand break repair. *Nature*, *412*(6847), 607–614.
- ❖ Wang, C., Zhao, L., & Lu, S. (2015). Role of TERRA in the regulation of telomere length. *International journal of biological sciences*, *11*(3), 316–323.
- ❖ Wang, D., Chen, J., Chen, H., Duan, Z., Xu, Q., Wei, M., Wang, L., & Zhong, M. (2012). Leptin regulates proliferation and apoptosis of colorectal carcinoma through PI3K/Akt/mTOR signalling pathway. *Journal of biosciences*, *37*(1), 91–101.
- ❖ Wang, N., Khankari, N. K., Cai, H., Li, H. L., Yang, G., Gao, Y. T., Xiang, Y. B., Shu, X. O., & Zheng, W. (2017). Prediagnosis body mass index and waist-hip circumference ratio in association with colorectal cancer survival. *International journal of cancer*, *140*(2), 292–301.
- ❖ Wang, S., Hu, C., & Zhu, J. (2010). Distinct and temporal roles of nucleosomal remodeling and histone deacetylation in the repression of the hTERT gene. *Molecular biology of the cell*, *21*(5), 821–832.
- ❖ Wang, Y., Wang, X., Flores, E. R., Yu, J., & Chang, S. (2016). Dysfunctional telomeres induce p53-dependent and independent apoptosis to compromise cellular proliferation and inhibit tumor formation. *Aging cell*, *15*(4), 646–660.
- ❖ Weisberg, S. P., McCann, D., Desai, M., Rosenbaum, M., Leibel, R. L., & Ferrante, A. W., Jr (2003). Obesity is associated with macrophage accumulation in adipose tissue. *The Journal of clinical investigation*, *112*(12), 1796–1808.
- ❖ Weiser M. R. (2018). AJCC 8th Edition: Colorectal cancer. *Annals of surgical oncology*, *25*(6), 1454–1455.

- ❖ Wong, A. L., Seng, K. Y., Ong, E. M., Wang, L. Z., Oscar, H., Cordero, M. T., Copones, R., Fan, L., Tan, S. H., Goh, B. C., & Lee, S. C. (2014). Body fat composition impacts the hematologic toxicities and pharmacokinetics of doxorubicin in Asian breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment*, *144*(1), 143–152.
- ❖ Wood, J. L., Singh, N., Mer, G., & Chen, J. (2007). MCPH1 functions in an H2AX-dependent but MDC1-independent pathway in response to DNA damage. *The Journal of biological chemistry*, *282*(48), 35416–35423.
- ❖ Wright, W. E., Shay, J. W., & Piatyszek, M. A. (1995). Modifications of a telomeric repeat amplification protocol (TRAP) result in increased reliability, linearity and sensitivity. *Nucleic acids research*, *23*(18), 3794–3795.
- ❖ Wu, P., Takai, H., & de Lange, T. (2012). Telomeric 3' overhangs derive from resection by Exo1 and Apollo and fill-in by POT1b-associated CST. *Cell*, *150*(1), 39–52.
- ❖ Wu, R. A., Upton, H. E., Vogan, J. M., & Collins, K. (2017). Telomerase mechanism of telomere synthesis. *Annual review of biochemistry*, *86*, 439–460.
- ❖ Wu, W., Niklason, L., & Steinbacher, D. M. (2013). The effect of age on human adipose-derived stem cells. *Plastic and reconstructive surgery*, *131*(1), 27–37.
- ❖ Wu, Y., Mitchell, T. R., & Zhu, X. D. (2008). Human XPF controls TRF2 and telomere length maintenance through distinctive mechanisms. *Mechanisms of ageing and development*, *129*(10), 602–610.
- ❖ Wu, Y., Xiao, S., & Zhu, X. D. (2007). MRE11-RAD50-NBS1 and ATM function as co-mediators of TRF1 in telomere length control. *Nature structural & molecular biology*, *14*(9), 832–840.
- ❖ Wueest, S., Rapold, R. A., Rytka, J. M., Schoenle, E. J., & Konrad, D. (2009). Basal lipolysis, not the degree of insulin resistance, differentiates large from small isolated adipocytes in high-fat fed mice. *Diabetologia*, *52*(3), 541–546.
- ❖ Wuidar, V., Gillot, L., Dias Da Silva, I., Lebeau, A., Gallez, A., & Pequeux, C. (2021). Sex-based differences in the tumor microenvironment. *Advances in experimental medicine and biology*, *1329*, 499–533.
- ❖ Xi, P., Zhou, L., Wang, M., Liu, J. P., & Cong, Y. S. (2013). Serine/threonine-protein phosphatase 2A physically interacts with human telomerase reverse transcriptase hTERT and regulates its subcellular distribution. *Journal of cellular biochemistry*, *114*(2), 409–417.

- ❖ Xu, M., Kiselar, J., Whited, T. L., Hernandez-Sanchez, W., & Taylor, D. J. (2019). POT1-TPP1 differentially regulates telomerase via POT1 His266 and as a function of single-stranded telomere DNA length. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(47), 23527–23533.
- ❖ Yang, D., He, Q., Kim, H., Ma, W., & Songyang, Z. (2011). TIN2 protein dyskeratosis congenita missense mutants are defective in association with telomerase. *The Journal of biological chemistry*, *286*(26), 23022–23030.
- ❖ Yaswen, P., MacKenzie, K. L., Keith, W. N., Hentosh, P., Rodier, F., Zhu, J., Firestone, G. L., Matheu, A., Carnero, A., Bilstrand, A., Sundin, T., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Amin, A., Helferich, B., Boosani, C. S., Guha, G., Ciriolo, M. R., ... Yang, X. (2015). Therapeutic targeting of replicative immortality. *Seminars in cancer biology*, *35* Suppl(Suppl), S104–S128.
- ❖ Ye, J. Z., Donigian, J. R., van Overbeek, M., Loayza, D., Luo, Y., Krutchinsky, A. N., Chait, B. T., & de Lange, T. (2004). TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *The Journal of biological chemistry*, *279*(45), 47264–47271.
- ❖ Ye, X., Li, J., Song, C., & Chen, W. (2021). Telomere in colorectal cancer associated with distant metastases and predicted a poor prognosis. *Translational cancer research*, *10*(6), 2906–2917.
- ❖ Yoo, J. E., Park, Y. N., & Oh, B. K. (2014). PinX1, a telomere repeat-binding factor 1 (TRF1)-interacting protein, maintains telomere integrity by modulating TRF1 homeostasis, the process in which human telomerase reverse Transcriptase (hTERT) plays dual roles. *The Journal of biological chemistry*, *289*(10), 6886–6898.
- ❖ Yoon, K. W., Park, S. Y., Kim, J. Y., Lee, S. M., Park, C. H., Cho, S. B., Lee, W. S., Joo, Y. E., Lee, J. H., Kim, H. S., Choi, S. K., & Rew, J. S. (2014). Leptin-induced adhesion and invasion in colorectal cancer cell lines. *Oncology reports*, *31*(6), 2493–2498.
- ❖ Yu, D., Shang, Y., Yuan, J., Ding, S., Luo, S., & Hao, L. (2016). Wnt/ β -Catenin signaling exacerbates keloid cell proliferation by regulating telomerase. *Cellular physiology and biochemistry*, *39*(5), 2001–2013.
- ❖ Zannolli, R., Mohn, A., Buoni, S., Pietrobelli, A., Messina, M., Chiarelli, F., & Miracco, C. (2008). Telomere length and obesity. *Acta paediatrica*, *97*(7), 952–954.

- ❖ Zha, J. M., Di, W. J., Zhu, T., Xie, Y., Yu, J., Liu, J., Chen, P., & Ding, G. (2009). Comparison of gene transcription between subcutaneous and visceral adipose tissue in Chinese adults. *Endocrine journal*, *56*(8), 935–944.
- ❖ Zhang, Q., Kim, N. K., & Feigon, J. (2011). Architecture of human telomerase RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(51), 20325–20332.
- ❖ Zhang, T., Tseng, C., Zhang, Y., Sirin, O., Corn, P. G., Li-Ning-Tapia, E. M., Troncoso, P., Davis, J., Pettaway, C., Ward, J., Frazier, M. L., Logothetis, C., & Kolonin, M. G. (2016). CXCL1 mediates obesity-associated adipose stromal cell trafficking and function in the tumour microenvironment. *Nature communications*, *7*, 11674.
- ❖ Zhang, T., Zhang, Z., Li, F., Hu, Q., Liu, H., Tang, M., Ma, W., Huang, J., Songyang, Z., Rong, Y., Zhang, S., Chen, B. P., & Zhao, Y. (2017). Looping-out mechanism for resolution of replicative stress at telomeres. *EMBO reports*, *18*(8), 1412–1428.
- ❖ Zhang, T., Zhang, Z., Shengzhao, G., Li, X., Liu, H., & Zhao, Y. (2019). Strand break-induced replication fork collapse leads to C-circles, C-overhangs and telomeric recombination. *PLoS genetics*, *15*(2), e1007925.
- ❖ Zhang, Y., Daquinag, A., Traktuev, D. O., Amaya-Manzanares, F., Simmons, P. J., March, K. L., Pasqualini, R., Arap, W., & Kolonin, M. G. (2009). White adipose tissue cells are recruited by experimental tumors and promote cancer progression in mouse models. *Cancer research*, *69*(12), 5259–5266.
- ❖ Zhao, J., Bilsland, A., Jackson, K., & Keith, W. N. (2005). MDM2 negatively regulates the human telomerase RNA gene promoter. *BMC cancer*, *5*, 6.
- ❖ Zheng, Q., Liu, P., Gao, G., Yuan, J., Wang, P., Huang, J., Xie, L., Lu, X., Di, F., Tong, T., Chen, J., Lu, Z., Guan, J., & Wang, G. (2019). Mitochondrion-processed TERC regulates senescence without affecting telomerase activities. *Protein & cell*, *10*(9), 631–648.
- ❖ Zhong, F. L., Batista, L. F., Freund, A., Pech, M. F., Venteicher, A. S., & Artandi, S. E. (2012). TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell*, *150*(3), 481–494.
- ❖ Zhong, F., Savage, S. A., Shkreli, M., Giri, N., Jessop, L., Myers, T., Chen, R., Alter, B. P., & Artandi, S. E. (2011). Disruption of telomerase trafficking by

- TCAB1 mutation causes dyskeratosis congenita. *Genes & development*, 25(1), 11–16.
- ❖ Zhou, S., Lu, J., Li, Y., Chen, C., Cai, Y., Tan, G., Peng, Z., Zhang, Z., Dong, Z., Kang, T., & Tang, F. (2021). Retraction Note: MNAT1 is overexpressed in colorectal cancer and mediates p53 ubiquitin-degradation to promote colorectal cancer malignance. *Journal of experimental & clinical cancer research*, 40(1), 401.
 - ❖ Zhou, X., Meeker, A. K., Makambi, K. H., Kosti, O., Kallakury, B. V., Sidawy, M. K., Loffredo, C. A., & Zheng, Y. L. (2012). Telomere length variation in normal epithelial cells adjacent to tumor: potential biomarker for breast cancer local recurrence. *Carcinogenesis*, 33(1), 113–118.
 - ❖ Zhu, S., Fisher, L. A., Bessho, T., & Peng, A. (2017). Protein phosphatase 1 and phosphatase 1 nuclear targeting subunit-dependent regulation of DNA-dependent protein kinase and non-homologous end joining. *Nucleic acids research*, 45(18), 10583–10594.
 - ❖ Zhu, Y., Tomlinson, R. L., Lukowiak, A. A., Terns, R. M., & Terns, M. P. (2004). Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular biology of the cell*, 15(1), 81–90.
 - ❖ Zimmermann, M., Kibe, T., Kabir, S., & de Lange, T. (2014). TRF1 negotiates TTAGGG repeat-associated replication problems by recruiting the BLM helicase and the TPP1/POT1 repressor of ATR signaling. *Genes & development*, 28(22), 2477–2491.