

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



TESIS DOCTORAL

Análisis del establecimiento de la longitud telomérica durante el desarrollo temprano en los mamíferos

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Celia de Frutos Benítez

Directores

**Alfonso Gutiérrez Adán
Pablo Bermejo Álvarez
Dimitrios Rizos**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA
Departamento de Fisiología (Fisiología Animal)



**ANÁLISIS DEL ESTABLECIMIENTO DE LA
LONGITUD TELOMÉRICA DURANTE EL
DESARROLLO TEMPRANO EN LOS MAMÍFEROS**

Memoria para optar al Título de Doctor por la Universidad Complutense

Presentada por

Celia de Frutos Benítez

Bajo la dirección de los doctores

Alfonso Gutiérrez Adán

Pablo Bermejo Álvarez

Dimitrios Rizos

Madrid, 2015



Los doctores Alfonso Gutiérrez Adán, Investigador Científico de OPI, Dimitrios Rizos, Científico Titular de OPI, y Pablo Bermejo Álvarez, Investigador Ramón y Cajal, del Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria (INIA), hacen constar:

Que la memoria de Tesis Doctoral que lleva por título “**Análisis del establecimiento de la longitud telomérica durante el desarrollo temprano en los mamíferos**” ha sido realizada por Celia de Frutos Benítez en el Departamento de Reproducción Animal del INIA bajo nuestra dirección, y que, tras su revisión, estimamos que reúne los requisitos exigidos para optar al título de Doctor por la Universidad Complutense.

Madrid, a 1 de septiembre de 2015

Fdo.: D. Alfonso Gutiérrez Adán

Fdo.: D. Pablo Bermejo Álvarez

Fdo.: D. Dimitrios Rizos

Los trabajos realizados para la elaboración de la presente Tesis se llevaron a cabo en el Departamento de Reproducción Animal del INIA financiados por los proyectos AGL2009-11358, AGL2009-11810 (Ministerio de Ciencia e Innovación, España) AGL2012-39652-C02-01, AGL2012-37510, AGL2014-58739-R y RYC-2012-10193 (Ministerio de Economía y Competitividad, España).

Celia de Frutos Benítez fue becaria del Programa de Formación de Personal de Investigación del Instituto Nacional de Investigación y Tecnología Agraria y Alimentaria del Ministerio de Economía y Competitividad.

**“La fe engaña a los hombres; pero tiene al menos un mérito:
da brillo a la mirada”**

Rabindranath Tagore

AGRADECIMIENTOS

Gracias a mis directores Dimitrios, Alfonso y Pablo, que de un modo u otro han hecho posible la realización de este trabajo. A Dimitrios, a quien debo parte de mi financiación en los años que he estado en esta casa. A ti te debo, además, buena parte de los conocimientos sobre la producción in vitro de embriones que pongo en práctica en el día a día, y de la cocina griega, que espero también practicar algún día. Gracias también por la experiencia de participar en los experimentos de campo realizados en Irlanda, y por el apoyo que me das en mi nueva aventura. Alfonso, impulsor de casi todas las ideas de esta tesis, gracias por permitirme desarrollar en tu laboratorio todos los experimentos incluidos en esta tesis, así como los no incluidos. Por todo lo aprendido en biología molecular, a veces a la primera, otras veces a base de ensayo y error, y que tan útil resulta en esta etapa de mi vida. A Pablo todo en uno: director, compañero, amigo (o enemigo, según el día), gracias por compartir conmigo tus conocimientos, por las ideas que han hecho posible la publicación de los resultados, por tu guía y correcciones de la tesis, así como por todo el tiempo invertido; y por compatibilizar y separar, como nadie, la ciencia y las cañas del después.

Si en algún centro están los responsables de que este trabajo haya salido adelante, ese es el INIA. Son muchos los que se han ido, pero otros tantos aún permanecen, y de todos ellos me he traído conmigo, a la fría Minnesota, el recuerdo más cálido que conservo.

Empiezo con quien empecé mis primeros experimentos en el laboratorio de bovino. Gracias María por la ayuda prestada en el año que coincidimos, por lo que me enseñaste, y por los buenos ratos de los congresos y salidas fuera del trabajo que te debo. Espero seguir reencontrándonos por los madriles, aunque ahora me quede más lejos. A Carmen, que se quedó poco tiempo, pero no se fue lejos, gracias por tu sincera amistad. A Verónica, por hacer de mi corta estancia en Irlanda algo tan provechoso, tanto fuera como dentro de Lyons. Fue divertido compartir las experiencias con las vacas, como también lo fueron todas las salidas. A Richard, mi

mecánico particular, gracias por las veces que tuviste que abrir el capó de mi viejo vectra, seguro que él también te lo agradece. Y gracias por las largas conversaciones en esos momentos en los que aparezco por el INIA, y que nos ponían al día de nuestras vidas. A Meriem, la última incorporación y con quien me hubiera gustado coincidir más tiempo, gracias por traernos un poquito de Argelia a nuestro mundo y darnos a conocer un poquito del tuyo, por aquí también se te echa de menos. A Carolina, por todo el trabajo de apoyo en el laboratorio. Y continuando con bovino, pero ya en el piso de arriba, gracias Paula porque siempre ha sido un gusto contar con la ayuda de las manos más rápidas produciendo embriones. Y por el tiempo dedicado a mis experimentos. Gracias Yosu, porque contigo no hay día que no salga el sol en el INIA. Y aunque apenas hemos compartido el laboratorio, a todos mis experimentos (y no siempre experimentos) les has aportado una inyección de entusiasmo, cuando no unas manos extra. Espero compartir aún muchos más momentos, que tanto echo de menos, a tu lado.

Muchas gracias a todos mis compañeros del laboratorio de ratones, por todo lo que habéis compartido conmigo en estos años. A los que ya no están; Juande, mis primeros pasos en la micromanipulación los di a tu lado, gracias por todo lo que me enseñaste. Miriam, gracias por estar siempre dispuesta ayudar, por dar siempre el 200 %, y por ser un ejemplo de compañerismo y amistad para mí. Alberto, el hombre con más energía del laboratorio, gracias porque a ti te debemos los desayunos religiosamente cumplidos, y el haber aprendido a bailar, y tantas y tantas risas. Gracias también por enseñarme a manejar el citómetro de flujo y el SCASA. Gracias a Belén, por los sabios consejos que me ha aportado y que me fueron de gran ayuda. Pero si la ausencia de alguien le restaría sal al INIA, esa es la de Ricardo. Y no sólo por los festivales gastrovómitos, la edición de vídeos -no faltos de atrevimiento-, canciones, parecidos razonables y otras tantas y tantas "tonterías" de las que Yosu y tú habéis hecho tradición en el INIA. A ti te agradezco tu compañía y amistad, dentro y fuera; gracias por no perderte una, por enseñarnos la cocina y el pisco peruanos, por las conversaciones absurdas que tanto sentido le daban a los desayunos y comidas, y por todo lo que has aportado a esta tesis. A la pequeña Angy (permíteme la licencia esta vez, haciendo uso de la edad) por haber permitido cerrar, con tu colaboración, el compendio de experimentos que ha resultado en esta tesis. Sin tu ayuda no habría sido posible. Gracias por el esfuerzo invertido, por todos los dolores

de cabeza que pueda haberte provocado, y por el cariño que pones en todo lo que haces. Noelia, gracias por la ayuda en las últimas PCRs. Raúl, el hombre tranquilo, y compañero en la micromanipulación. Gracias por la ayuda en la ICSI, contigo resulta muy fácil trabajar, y te agradezco todos los consejos que me das y todas las experiencias que aún compartes conmigo. A Priscila, por conseguir hacerme jugar al fútbol, que no es poco, y por los momentos que hemos pasado fuera del INIA. Y aunque el mundo celular me quede lejos, sé que siempre se puede contar contigo. A Sandra, gracias por la ayuda prestada en el ratonar con la especie salvaje, de complicado manejo, y por animar las discusiones en los desayunos. A Eva, por prestarme tu mesa, tus pipetas, tu silla y los huecos en la PCR, y por ser un ejemplo de cómo trabajar bien. Gracias, además, por el fin de semana que nos regalaste. A Miguel, por dejarme invadir tu laboratorio, por animar a que todo es posible, por enseñarme a sacar sangre, de la manera en la que a todos nos gustaría aprender. Por enseñarnos a ser respetuosos con el medio ambiente, pero sobre todo, por Radio 3. Gracias a todos aquellos que con su trabajo en el ratonar hacen posible todo nuestro trabajo. A Toñi, a quien debemos que todo esto funcione, por cuidarnos a todos como a la más importante de sus camadas. Pero también a los que a diario han cuidado de nuestros animales: Eva, Victor, Vladi y Paloma.

Y si subir un piso cuesta poco, subir dos ya resulta hasta sano. Gracias Coloma por trabajar hasta tarde tantos días, y por estar dispuesto siempre a escuchar a quien a veces sólo necesitaba salir al exterior. Gracias por la confianza depositada, por compartir conmigo tu manera de ver este mundo, por ser a veces mi vía de escape, y siempre un ejemplo como persona.

Gracias a todos aquellos que por periodos más o menos breves nos han aportado aires nuevos. To Daniela, with whom we shared an unforgettable weekend in Italy, thanks for inviting us to your house and for the great moments you gave us. A Eka, por abrirnos las puertas de tu casa y de tu Universidad, por hacerme perder la memoria, y por enseñarme que una tortilla con cebolla puede estar buena, aunque aún no conozca la receta secreta. Gracias a Ana, por tu inagotable sonrisa. Gracias a Erika, Bladimir, Diogo, Aline, Paula, Rommel y Veerle. Gracias a Roser, por tu simpatía, espero volver a coincidir contigo.

Por último, gracias a todo el personal del Departamento de Reproducción Animal del INIA por la ayuda que me hayan prestado, y por los ratos de charlas que hemos podido compartir. Mención especial a Julio de la Fuente, porque siempre estaba dispuesto con muy buen humor a compartir contigo todas sus experiencias, que a veces, hasta te arreglaban la vida. Estoy segura de que tu ausencia está presente aún en el INIA.

Y porque todo esto empezó en una ciudad llamada Gijón, no puedo olvidarme de los que me abrieron la puerta al mundo de la ciencia, ni de aquellos a los que he conocido en mis estancias durante los años del INIA, y que han contribuido a la experiencia que ahora tengo.

A Enrique, gracias por darme la llave que me permitió entrar en este mundo. De mi año en el Serida, gracias a todos ellos aquellos que me hicieron pasar buenos ratos en el corto periodo que pasé allí, son más de los que voy a nombrar. Gracias a Carmen, a la que siempre consideraré una amiga y una guía, por abrirme la puerta de tu casa, y por permitirme contar contigo. Porque tú, junto con Nieves, me enseñasteis lo que era un embrión bovino y siempre os recordaré por eso. Aida, mi primera compañera de laboratorio y a quien llevaría conmigo en la mochila en cada una de mis nuevas aventuras profesionales. Gracias por lo que me enseñaste, por haber sido de las mejores compañeras de laboratorio que he tenido, tal vez por ser la primera, o tal vez porque tienes la capacidad de hacer que trabajar contigo sea tan fácil como hacer pan juntos.

Thanks to Dr. Karl Schellander and Dr. Dawit Tesfaye for inviting me to their Institute at the University of Bonn, and to the team in the lab of the Forschungsstation Frankenforst: Michael Höelker, Franca Rings and Eva Held, for the time we shared there.

To Pat Lonergan, thanks for giving me the opportunity to visit Lyons Farm where I learned all about field experiences. Thanks to Pat Duffy for your lessons on ultrasonography, and Eric, for offering me the opportunity to help you with your

sheep. Thanks to Nora and Jerry for hosting me in their home and allowing me to learn about the marvelous Irish character.

Gracias a Pablo Ross, por acogerme en su laboratorio durante mi estancia en Davis y darme la oportunidad de empezar una línea de trabajo nueva para mí. Mi estancia en Davis me abrió el camino para llegar al lugar que ocupo ahora, y eso te lo debo a tí. Thanks to James, the best lab manager I ever met, for your patience and useful help with every coming foreigner, sometimes impossible to understand. A Vicente, por permitirme continuar con el trabajo que iniciaste y a Luis, por la asesoría en el mundo de la reproducción bovina. Gracias Juan por tu simpatía y compañerismo. Janina, gracias por tu entusiasmo contagioso y la buena energía que transmites. A Marcela, mi uruguayaya favorita, por los buenos momentos que me has dado dentro y fuera del laboratorio y por tu amistad. Y sobre todo, por casarte con un Minnesotano, y permitirme acompañarte en un día tan especial.

Ya fuera del mundo de la ciencia, pero no por ello menos importantes, me gustaría agradecer a aquellos a los que durante estos años he tenido de algún modo abandonados, y que siempre te hacen sentir que las verdaderas amistades no se resienten por el paso del tiempo, o la distancia. Nombraré a los que más tiempo les debo. Gracias a Marta y Oswaldo, a Miriam, Bárbara y Ana (ahora que estás más cerca, deberíamos encontrar el modo de probar que la distancia es relativa y que 2000 Km no es excusa para no verse). Y a mi veganzoniense número 1, Marta, tú sabes que siempre te llevo conmigo, porque cuando uno entra en tu mundo no quiere dejarlo nunca atrás.

Y por último, quiero dar las gracias a las personas más importantes de mi vida. A mi kafkiana familia, a quien os debo lo que soy, lo bueno y lo no tan bueno, y hasta donde he llegado. Gracias mamá por haber sabido y logrado compatibilizar dos trabajos con el tercero de criar a unos hijos. Gracias por perdonar, y seguir aún perdonando, las ausencias. Gracias a mi padre, que nos dejó por un mes para luego regresar más cerca, como en un intento de hacernos comprender, o tal vez de aprender, las cosas por las que de verdad merece la pena luchar. Sin tu ayuda no

habría estudiado una carrera, y no estaría hoy aquí. Gracias al peque de la familia, por las visitas a última hora del día, por echarnos de menos, por todas las veces que me has ayudado, y por seguir presente en la distancia.

A Celia y Jose Antonio, por hacerme sentir parte de la familia, y hacer fácil lo difícil. A Julio, a quien quiero agradecer que, con todo lo que hemos vivido, nunca me haya sacado de su vida. Tú mejor que nadie sabes lo que hay de ti en esta tesis, y te agradezco toda la ayuda, profesional y emocional, que me has dado. Gracias por ser un referente de la perfecta combinación de la excelencia con la humildad y humanidad, y por ser un ejemplo cada día de a lo que puede uno llegar a fuerza de tesón y pasión. A ti te debo el sol de California, y la adaptación a las temperaturas de -20°C de la fría Minnesota. Gracias por tu inagotable sentido del humor (no siempre oportuno, pero siempre reparador), incluso en mis peores horas de las mañanas; por tu capacidad para hacerme reír incluso cuando me exasperas, por tu habilidad para matarme de hambre, aun dejándome siempre el plato mejor, por tu empeño infatigable en hacerme entender que un mundo distinto es posible, y por todas esas cosas que han convertido una deuda a saldar en un regalo diario.

A Julio
A mis padres

Índice

ÍNDICE

Lista de Abreviaturas	vii
Lista de Figuras y Tablas	ix
Resumen	xi
Summary	xvii
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	1
1. Perspectiva histórica	3
1.1. La búsqueda de la eterna juventud	4
1.2. De la inmortalidad celular al descubrimiento de los telómeros	6
2. El problema de la replicación terminal	12
2.1. El origen del problema del final cromosómico	12
2.2. Mecanismo molecular del problema de la replicación terminal	12
3. Funciones de los telómeros en los mamíferos	15
3.1. Mantenimiento de la estabilidad genómica y cromosómica	15
3.2. Papel estructural de los telómeros	19
4. Importancia de la biología telomérica en la salud humana: telómeros en la intersección del cáncer y envejecimiento	22
5. Mecanismos de elongación telomérica en los mamíferos	27
5.1. La telomerasa: una transcriptasa inversa con autonomía propia	28
5.2. Mecanismo alternativo de elongación telomérica (ALT)	33
6. Factores que regulan la longitud telomérica: actores de la homeostasis telomérica	40
6.1. La telomerasa	40
6.2. Proteínas teloméricas	43
6.3. Función de los cuádruples G en la regulación de la longitud telomérica ..	44
6.4. Regulación epigenética de la longitud telomérica	45
6.5. TERRA (ARN que contiene repeticiones teloméricas)	46
6.6. Regulación negativa de la longitud telomérica por recortamiento telomérico.....	48

7. Métodos de análisis de la longitud telomérica	49
8. Elongación telomérica durante el desarrollo preimplantacional	52
9. Determinantes de la longitud telomérica en los mamíferos. Efecto de la edad paterna sobre la longitud telomérica de la descendencia	54
JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	57
1. Justificación	59
2. Objetivos	60
MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Técnicas empleadas por objetivo	65
2. Material y métodos	67
2.1 Obtención de muestras de tejidos para la evaluación de la LT	67
2.2 Extracción del ADN genómico de tejidos para el estudio de la longitud telomérica durante el envejecimiento y la LT de la descendencia de machos de distinta LT	68
2.3 Producción de embriones de ratón	68
2.4 Microinyección pronuclear	72
2.5 Plásmidos empleados en la microinyección pronuclear para la sobreexpresión de <i>Tert</i> , <i>Terc</i> y <i>Zscan4</i>	75
2.6 Recogida y preparación de muestras de espermatozoides, ovocitos y embriones para la determinación de la LT	77
2.7 Determinación de la longitud telomérica relativa mediante PCR en tiempo real	79
2.8 Determinación de la longitud telomérica absoluta en ovocitos, cigotos y embriones de dos células	81
2.9 Análisis de la expresión relativa de <i>Terc</i> , <i>Tert</i> y <i>Zscan4</i> en el desarrollo preimplantacional	82
2.10 Análisis estadístico	85
RESUTADOS	87
1. Experimento 1	87
1.1. Dinámica de la longitud telomérica durante el envejecimiento	87

1.2. Dinámica de la longitud telomérica durante el desarrollo preimplantacional del embrión de ratón	91
2. Experimento 2	92
2.1. Análisis de los perfiles de expresión génica de la telomerasa y <i>Zscan4</i> en el ratón durante el desarrollo preimplantacional	92
2.2. Efecto de la sobreexpresión de <i>Tert</i> y <i>Terc</i> sobre la LT relativa del blastocisto	94
2.3. Efecto de la sobreexpresión de <i>Zscan4</i> durante el desarrollo preimplantacional sobre la LT relativa del blastocisto	96
3. Experimento 3	98
3.1. Longitud telomérica relativa en espermatozoides, descendencia y embriones <i>Mus musculus</i> y <i>Mus spretus</i>	98
3.2. Efecto de la longitud telomérica del espermatozoide en la LT de cigotos y embriones de 2 células	100
3.3. Longitud telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones procedentes de padres <i>Mus musculus</i> jóvenes y viejos	102
DISCUSIÓN	105
CONCLUSIONES	111
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	115

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ADNcs	ADN de cadena simple
ADNdc	ADN de doble cadena
ADNt	ADN telomérico
AGE	Activación del genoma embrionario
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATM	Vía <i>Ataxia telangectasia mutated Kinsasa</i>
ATR	Vía <i>ataxia telangectasia and Rad3 related kinasa</i>
ALT	Mecanismo alternativo de elongación telomérica (<i>Alternative lengthening of telomeres</i>)
BSA	Albúmina sérica bovina (<i>Bovine serum albumina</i>)
Ct	Ciclo umbral (<i>Cycle threshold</i>)
DC	Disqueratosis congénica
DDR	Respuesta al daño celular (<i>Damage direct repair</i>)
DNMT1	ADN metil transferasa I (<i>DNA methyl transferase I</i>)
DSB	Roturas de ADN de doble cadena (<i>Double stranded breaks</i>)
ESC	Célula madre - troncal - embrionaria (<i>Embryonic stem cell</i>)
ERO	Especies reactivas de oxígeno
F1	Primera generación filial
FISH	Hibridación <i>in situ</i> fluorescente (<i>Fluorescent in situ hybridation</i>)
FIV	Fecundación <i>in vitro</i>
HDR	Reparación por homología directa (<i>Homologous directed repair</i>)
hCG	Gonadotropina coriónica humana (<i>Human corionic gonadotrophin</i>)
HJ	<i>Holliday Juntion</i>
HTF	Fluido tubular humano (<i>Human tubular fluid</i>)
iPS cells	Células madre pluripotenciales inducidas (<i>Induced pluripotent stem cells</i>)
LT	Longitud telomérica
LTR	Longitud telomérica relativa
MII	Metafase II
NHEJ	Unión de extremos no homólogos (<i>Non homologous end joining</i>)

nt	Nucleótido
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<i>Polymerase chain reaction</i>)
qPCR	PCR cuantitativa
pb	Pares de bases
PI	Profase I
RH	Recombinación homóloga
RNP	Ribonucleoproteína
RT	Retrotranscriptasa
RTEC	Repeticiones teloméricas extracromosómicas
TERC	Componente ARN de la telomerasa (<i>Telomerase RNA component</i>)
TERT	Componente transcriptasa inversa de la telomerasa (<i>Telomerase reverse transcriptase</i>)
TERRA	ARN que contiene repeticiones teloméricas (<i>Telomeric repeat RNA</i>)
TRF1	Factor de unión a las repeticiones teloméricas 1 (<i>Telomere repeat binding factor 1</i>)
TRF2	Factor de unión a las repeticiones teloméricas 2 (<i>Telomere repeat binding factor 2</i>)
T-SCE	Intercambio telomérico de cromátidas hermanas (<i>Telomere somatic chain exchange</i>)
WT	Fenotipo salvaje (<i>Wildtype</i>)

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.	Número de publicaciones anuales que contienen los términos “telomere” o “telomerase” en el título, resumen o palabras clave desde el año 1988 hasta el año 2014.....	11
Figura 2	El problema de la replicación terminal.....	14
Figura 3.	Representación esquemática de los mecanismos de ALT propuestos.....	37
Figura 4.	Representación esquemática de los diferentes moldes para ALT.....	38
Figura 5.	Extracción de ovocitos y cigotos del tracto reproductivo de la hembra.	69
Figura 6.	Extracción de espermatozoides del aparato reproductor masculino.....	71
Figura 7.	Imagen del equipo de micromanipulación utilizado para la microinyección.....	73
Figura 8.	Detalle de un embrión de ratón en estadio pronuclear.....	74
Figura 9.	Cámara de micromanipulación y herramientas para la inyección.....	74
Figura 10.	Representación esquemática del plásmido empleado para sobreexpresar de forma transitoria los componentes de la telomerasa <i>Tert</i> y <i>Terc</i>	76
Figura 11.	Representación esquemática del plásmido empleado para sobreexpresar de forma transitoria <i>Zscan4</i>	77
Figura 12.	Ovocitos de ratón tras la fecundación <i>in vitro</i> y activación partenogenética.....	80
Figura 13.	Valores medios del Ct de las repeticiones teloméricas \pm error estándar tras normalizar frente al valor más bajo.....	83
Figura 14.	Dinámica de la longitud telomérica durante el envejecimiento en tejidos de la especie <i>Mus musculus</i> y la F1 del híbrido <i>Mus musculus</i> x <i>Mus spretus</i>	90
Figura 15.	Longitud telomérica relativa en la especie <i>Mus musculus</i> durante el desarrollo preimplantacional.....	87

Figura 16.	Abundancia relativa del ARNm de los componentes de la telomerasa <i>Terc</i> (A) y <i>Tert</i> (B) durante el desarrollo preimplantacional del ratón....	93
Figura 17.	Abundancia relativa del ARNm de <i>Zscan4</i> durante el desarrollo preimplantacional del ratón.....	93
Figura 18.	Efecto de la sobreexpresión de la telomerasa sobre la LT del blastocisto de ratón.....	91
Figura 19.	Efecto de la sobreexpresión de <i>Zscan4</i> sobre la LT del blastocisto de ratón.....	97
Figura 20.	Longitud telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones <i>Mus musculus</i> y <i>Mus spretus</i>	99
Figura 21.	(A) Cuantificación absoluta de ADN genómico en muestras de 2 ovocitos, 2 cigotos o 1 embrión de 2 células de <i>Mus musculus</i> ; (B) Longitud telomérica absoluta en embriones obtenidos por fecundación <i>in vitro</i> con espermatozoides con telómeros largos (<i>Mus musculus</i>) o cortos (<i>Mus spretus</i>), o por activación partenogenética; (B) Longitud telomérica relativa en ovocitos y espermatozoides <i>Mus musculus</i>	101
Figura 22.	Longitud telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones procedentes de padres <i>Mus musculus</i> jóvenes y viejos.....	103

TABLAS

Tabla 1.	Secuencia de los cebadores empleados y tamaño de amplicón obtenido en la qPCR utilizada para la determinación de la longitud telomérica.....	82
Tabla 2.	Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño de amplicón de la qPCR utilizada para el análisis de la abundancia del ARNm de <i>Terc</i> , <i>Tert</i> y <i>Zscan4</i>	86

Resumen

RESUMEN

Los telómeros se encuentran en el foco de atención de muchas investigaciones por su papel en el mantenimiento de la integridad cromosómica y su implicación en procesos como el envejecimiento, el cáncer y la regeneración tisular. En ausencia de mecanismos compensatorios, el ADN telomérico sufre un acortamiento progresivo en cada división celular debido a la incapacidad de las ADN polimerasas convencionales de replicar el extremo 5' de los cromosomas. La telomerasa, una ribonucleoproteína con actividad transcriptasa inversa (componente TERT), compensa el acortamiento telomérico sintetizando las secuencias teloméricas *de novo* en el extremo 3' de los cromosomas utilizando como molde una molécula de ARN asociada (componente TERC). La mayoría de los tipos celulares presentan una actividad telomerasa limitada, acortándose los telómeros en cada división mitótica. Por ello, la actividad de la telomerasa y el acortamiento telomérico son factores limitantes en la esperanza de vida de los mamíferos, mientras que el acortamiento de los telómeros contribuye al envejecimiento limitando la regeneración tisular. Durante el desarrollo embrionario los telómeros se alargan, quedando determinadas las reservas teloméricas con las que contará el recién nacido. Por este motivo, el estudio de la dinámica de la elongación telomérica y su regulación durante el desarrollo embrionario temprano en mamíferos es de gran interés debido a las implicaciones que la longitud telomérica (LT) del recién nacido tiene en las etapas posteriores del desarrollo.

La PCR cuantitativa (qPCR) es un método idóneo de análisis de la LT en embriones debido a la poca cantidad de ADN disponible, y a que la especial conformación de la cromatina puede comprometer la fiabilidad de otras técnicas de análisis. Por ello hemos escogido la técnica de qPCR para la realización de este estudio. En el primer experimento hemos validado la técnica mediante el estudio de la dinámica de la LT durante el envejecimiento en el ratón de laboratorio (*Mus musculus*) y el híbrido de la especie *Mus spretus*, que presenta telómeros más cortos. La PCR cuantitativa detectó los cambios de LT que ocurren durante el envejecimiento en los tejidos cardíaco, renal, cerebral, testicular y ovárico. Se ha evaluado también la aplicabilidad de la técnica cuando se dispone de pequeñas cantidades de ADN mediante el análisis de la LT en gametos y en el embrión preimplantacional, observando que la LT aumenta en el estadio de dos células y en la transición de

mórula a blastocisto, coincidiendo con los fenómenos de recombinación y con el aumento de la actividad telomerasa, respectivamente, descritos por otros autores.

Conocida la dinámica de la LT durante el desarrollo temprano, hemos evaluado la expresión endógena durante el desarrollo preimplantacional de los componentes de la telomerasa (*Terc* y *Tert*) así como del gen *Zscan4* que, por su implicación en la elongación telomérica en *stem cells*, podría estar relacionado con la elongación telomérica observada en la primera división embrionaria del ratón. Como experimento preliminar hemos evaluado la dinámica de expresión de estos tres genes durante el desarrollo preimplantacional. A continuación hemos estudiado el efecto de la sobreexpresión exógena de los componentes de la telomerasa y *Zscan4*, mediada por la inyección de plásmidos circulares en el pronúcleo del ratón, sobre la LT del embrión preimplantacional, demostrando que no es suficiente para elongar los telómeros por encima del valor esperado. Aunque los mecanismos que determinan la LT propia de cada especie se desconocen, el ratón de laboratorio presenta una longitud telomérica excepcionalmente larga comparada con la de otras especies, lo que podría determinar que sus telómeros no sean susceptibles de ser elongados artificialmente en esta etapa del desarrollo.

Finalmente, hemos evaluado el papel de un componente no genético sobre la LT en mamíferos. Aunque la herencia materna y paterna han sido descritas, la mayoría de los estudios describen una mayor correlación entre la LT paterna y la LT de la descendencia. Además, en la especie humana la LT de la descendencia se ha relacionado con la edad del padre; los hijos de padres viejos tienen telómeros más largos que los hijos de padres jóvenes, y la presencia de telómeros más largos en los espermatozoides de padres viejos ha sido propuesta como un potencial mecanismo que explicaría este hallazgo. Con el objetivo de aportar una explicación molecular a este fenómeno, hemos analizado si la elongación telomérica dependiente de recombinación que se ha descrito en el cigoto depende de la LT del espermatozoide. Para ello hemos empleado dos modelos que presentan dimorfismo en la longitud telomérica de sus espermatozoides (*Mus musculus* vs. *Mus spretus*, y *Mus musculus* jóvenes vs. *Mus musculus* viejos). Observamos que la LT del espermatozoide es mayor que la del ovocito y que, al contrario que en la especie humana, la LT del espermatozoide disminuye con la edad. La LT de los embriones producidos por fecundación *in vitro* con espermatozoides con LT larga (*Mus musculus*) fue

significativamente superior a los producidos con espermatozoides con LT corta (*Mus spretus*) o sin espermatozoides, por activación partenogenética. Las diferencias aparecieron en el estadio de 2 células y se mantuvieron a lo largo del desarrollo preimplantacional y en la descendencia. De forma similar, en el modelo *Mus musculus* joven vs. *Mus musculus* viejo, tanto los embriones producidos con espermatozoides de LT corta (machos viejos) como la descendencia de estos machos, presentaron una LT menor a la de los embriones/descendencia de machos jóvenes. Estos resultados sugieren que la LT del espermatozoide es un factor determinante de la LT del recién nacido debido a su papel en la elongación telomérica en el estadio el cigoto, que depende de mecanismos de recombinación.

Summary

SUMMARY

Telomeres focus the attention of numerous studies due to their roles in chromosome integrity maintenance and processes such as aging, cancer or tissue regeneration. In the absence of compensatory mechanisms, telomeric DNA suffers from progressive shortening on each cell division due to conventional polymerases being unable to replicate the 5' chromosome ends. Telomerase, a ribonucleoprotein with reverse transcriptase activity (TERT component) compensate telomere shortening by *de novo* synthesis of telomeric sequences on the 3' chromosome end, using an associated RNA molecule (TERC component) as template. Most cell types present a limited telomerase activity, so telomeres shorten in each mitotic cell division. For this reason, telomerase activity and telomere shortening restrict live expectancy in mammals, and telomere shortening promotes aging limiting tissue regeneration. Telomeres elongate during embryo development, which determines the telomere reserves in the newborn. Thus, the study of telomere elongation dynamics and its regulation during early embryo development in mammals holds a great interest, given to the consequences of the newborn telomere length (TL) on latter developmental stages.

Quantitative PCR (qPCR) is an ideal method for TL analysis in embryos, as the DNA amount is scarce and the special chromatin conformation may compromise the reliability of other analytical techniques. For these reasons, we have chosen qPCR to perform this study. In the first experiment, we have validated the technique by studying TL dynamics during aging in the laboratory mouse (*Mus musculus*) and the hybrid of the species *Mus spretus*, exhibiting a shorter TL. Quantitative PCR detected changes linked to aging in cardiac, renal, cerebral, testicular and ovarian tissues. The application of the technique to small amounts of DNA was also tested by the analysis of TL in gametes and preimplantational embryos. TL increased at the 2-cell stage and in the morula to blastocyst transition, concomitant to recombination phenomena and the increase of telomerase activity, respectively, previously described by others.

Once known the dynamics of TL during early development, we evaluated the endogenous expression of telomerase components (*Terc* and *Tert*) and *Zscan4* during preimplantation development. *Zscan4* is involved in telomere elongation in stem cells, so we hypothesized that it could be involved in the telomere elongation observed in

Summary

the first embryonic division in mouse. As a preliminary experiment we have evaluated the expression patterns of these three genes during preimplantation development. After that, we have studied the effect of the exogenous overexpression of the two telomerase components and *Zscan4*, mediated by the injection of circular plasmids in the mouse pronucleus, over the TL of the preimplantation embryo, reporting that it is not enough to elongate telomeres over the expected value. Although mechanisms determining the species-specific TL remain unknown, the laboratory mouse exhibit exceptionally large telomeres compared with other species, which could determine that telomeres are not able to be elongated artificially at this developmental stage.

Finally, we have evaluated the role of a non-genetic component on the mammalian TL. Although maternal and paternal inheritance have been described, most studies illustrate a greater correlation between paternal TL and offspring TL. Besides, offspring TL in humans have been related with paternal age; the offspring fathered by old men display longer telomeres than that fathered by young men. The presence of longer telomeres in the spermatozoa from older fathers has been proposed as a potential mechanism to explain this finding. Aiming to provide a molecular explanation to this phenomenon, we have determined whether the recombination-dependent telomere elongation occurring at the zygote stage depends on spermatozoa TL. For this aim we have used two models differing in their spermatozoa TL (*Mus musculus* vs. *Mus spretus*, and young *Mus musculus* vs. old *Mus musculus*). We have observed that TL is greater in spermatozoa than in oocytes and that, contrary to the situation observed in humans, spermatozoa TL shortens with age. Embryos produced by *in vitro* fertilization with spermatozoa with long TL (*Mus musculus*) displayed a longer TL than those produced with spermatozoa with short telomeres (*Mus spretus*) or without spermatozoa, by parthenogenetic activation. The differences arose at the two-cell stage, being maintained during preimplantational development and in the offspring. In a similar manner, in the model young *Mus musculus* vs. old *Mus musculus*, embryos and offspring derived from spermatozoa with short telomeres (old males) exhibited a shorter TL than the embryos and offspring fathered by young males. These results suggest that spermatozoa TL is a determining factor on newborn TL due to its role during the recombination-mediated telomere length occurring at the zygote stage.

Revisión Bibliográfica



Las edades y la muerte
Baldung Grien, Hans

1. PERSPECTIVA HISTÓRICA

*“Death takes place because a worn-out tissue cannot
forever renew itself, and because a capacity for
increase by means of cell division is not everlasting
but finite”*

A. Weismann. Clarendon. Oxford, 1881.

Con esta afirmación August Weismann, profesor de Zoología de la Universidad de Freiburg (en la ciudad de Freiburg im Breisgau, Alemania), dio origen en 1881 a la Citogerontología (o la ciencia del envejecimiento celular). Su ponencia titulada “*Über die Dauer des Lebens*” (La Duración de la Vida), dirigida a la Asociación de Naturalistas Alemanes, supondría el primer intento de explicar el envejecimiento y la muerte “natural” (entendida como aquella no causada por accidente u otro factor externo), a excepción de una nota sobre la evolución del envejecimiento escrita por A.R. Wallace que aparece mencionada por el editor en el libro de Weismann de 1891 (Weismann 1891). Weismann falleció en 1914 y, por diversas razones, su trabajo en el envejecimiento celular no alcanzó el merecido reconocimiento (Kirkwood y Cremer 1982).

1.1. La búsqueda de la Eterna Juventud

El anhelo de la eterna juventud ha existido en el hombre desde tiempos inmemoriales. Desde la antigüedad hasta nuestros días el hombre ha buscado el poder de la inmortalidad, búsqueda que ha motivado la aparición de mitos y leyendas en distintas culturas y en distintos momentos a lo largo de toda la historia de la humanidad. Mitos como el del “elixir de la vida” (buscado por alquimistas, magos y hechiceros), el “río de la inmortalidad” (de origen semítico), o la “fuente de la eterna juventud” (presente en la cultura griega, hebrea y romana) no son más que un reflejo de la negación del hombre a resignarse a envejecer.

La inmortalidad ha estado siempre ligada a las deidades y la religión. Hebe (o su equivalente en la mitología romana, Juventas) aparece en la mitología griega como la personificación de la juventud. Era una divinidad con el poder de rejuvenecer a los ancianos. La mitología china cuenta cómo el pueblo chino ofrecía sacrificios al dios de la longevidad, Cheu-Sing, encargado de custodiar la vida de los humanos fijando la fecha de fallecimiento de los mortales, y que procuraba juventud a aquellos que se lo rogaran. A pesar de sus diferencias en otros aspectos, la mayor parte de las religiones de todo el mundo (mayoritarias como el Hinduismo, el Judaísmo, el Budismo, el Islamismo o el Cristianismo, otras menos extendidas como el Zoroastrismo) tienen en común la creencia en un alma inmortal que, tras la muerte, continúa viviendo de alguna forma. La inmortalidad para los creyentes supone la continuación de la vida

más allá de la muerte, si bien la forma que esta vida adopta puede variar desde una vida eterna individual (en religiones abrahámicas como el Cristianismo y el Islam) hasta la reencarnación, doctrina que profesan religiones orientales dhármicas como el Hinduismo y el Budismo, y en las que el perfeccionamiento progresivo es posible a través del paso por vidas sucesivas.

La inmortalidad como concepto aparece ya mencionada en textos escritos hace al menos 3500 años (Hayflick 2000). Con el desarrollo de la ciencia hoy podemos dibujar un cuadro más preciso y verídico de lo que es la vida y de sus límites. Si bien la ciencia no puede aspirar al hallazgo de la clave de la inmortalidad, sí puede al menos retrasar el deterioro físico y orgánico al que se ven sometidos los seres vivos con el transcurso del tiempo. Resulta indiscutible el acentuado interés que la comunidad científica manifiesta por el estudio de métodos que permitan prolongar la vitalidad física propia de la juventud y con ello aumentar la longevidad. En las últimas décadas la ingeniería biológica ha invertido grandes cantidades de dinero para lograr avances significativos en la cura de enfermedades y el retraso de la vejez. Entre los grandes experimentos de nuestro siglo se encuentran sin duda los estudios de ADN que permiten reparar el genoma humano, la clonación de órganos que puedan sustituir aquellos dañados, el uso de células madre y la crioconservación de embriones (fuente de células madre) con fines terapéuticos. Por otra parte, la industria farmacéutica del envejecimiento ha encontrado siempre un público que justifique su inversión económica. Según la OMS, entre 2000 y 2050 la población mundial mayor de 60 años se triplicará y pasará de 600 millones a 2000 millones, un cambio demográfico resultado del aumento de la esperanza de vida y la disminución de la tasa de fecundidad y con importantes consecuencias en la salud pública. En su informe de 2013: *Priority Medicines for Europe and the World Update Report*, la OMS insta a la industria farmacéutica a que enfoque sus esfuerzos en el desarrollo de nuevos tratamientos que se ajusten a este cambio demográfico (Kaplan *et al.* 2013). En la carrera contra el envejecimiento numerosos empresarios han apostado por la investigación. **Human Longevity**, empresa cofundada por Craig Venter (científico responsable de la decodificación del genoma humano en 2003), **Calico**, empresa fundada por Larry Page (cofundador y CEO del buscador *Google*), **Life Length**, de la que es cofundadora la investigadora española María Blasco, la empresa biotecnológica **Regeneron Pharmaceuticals**, así como miembros de la **Global**

Coalition on Aging (Bayer, Pfizer, Novartis, Bank of America...) son ejemplos de empresas y entidades que han dirigido su punto de mira al proceso del envejecimiento y enfermedades asociadas (Román 2014), como prueba de que cuando en las sociedades desarrolladas la población mayor de 65 años supera en número a la menor de 15 años (Kaplan *et al.* 2013), la vejez es negocio.

1.2. De la inmortalidad celular al descubrimiento de los telómeros

La inmortalidad celular

En su “*Aufsätze über Vererbung und verwandte biologische Fragen*” (*Essays upon heredity and kindred biological problems*) (Weismann 1889; 1891; 1892a; 1892b) Weismann no había aportado evidencias experimentales para su teoría sobre el envejecimiento (Kirkwood y Cremer 1982), por lo que su concepto cayó en el olvido en parte por los trabajos posteriores de Carrel (Carrel 1912), Premio Nobel en 1912, y su colaborador Ebeling (Ebeling 1913), Premio Nobel en 1913, quienes desafiaron su teoría al sugerir que todas las células explantadas en cultivo eran inmortales, y que la ausencia de replicación continuada se debía a la ignorancia de cómo cultivar adecuadamente esas células (Shay y Wright 2000). Basándose en sus trabajos en fibroblastos de corazón del pollo, llevados a cabo en el Rockefeller Institute de Nueva York, afirmaron que los habían mantenido creciendo de manera continuada durante 34 años (Carrel y Ebeling 1921). En palabras de Carrel, el envejecimiento es “*an attribute of the multicellular body as a whole*” (un atributo del cuerpo multicelular como un todo) (revisado en Witkowski 1980). En virtud de esto, para Carrel y Ebeling, el envejecimiento no sería el resultado de los eventos producidos dentro de las células a nivel individual, sino que resultaría de las interacciones fisiológicas entre células sólo cuando están organizadas en tejidos u órganos (Hayflick 1997).

No es de extrañar que la idea de que las células de los vertebrados pudieran dividirse indefinidamente en cultivo generara un marcado y sostenido interés, tanto a nivel popular como científico (Hayflick 1989; Kirkwood y Cremer 1982; Louis 1977; Witkowski 1980), ni que la teoría del envejecimiento de Weismann, cuyo punto de vista sobre la evolución del envejecimiento llegaría a ser severamente criticado por Medawer en 1952 (Kirkwood y Cremer 1982; Medawer 1952), fuera prácticamente ignorada por la comunidad científica. Muchos trabajos de varios laboratorios

emergieron entonces apoyando esta interpretación. Describían poblaciones celulares de otras especies, incluida la humana, que tenían una habilidad sorprendente de proliferar, aparentemente, de forma indefinida. Sin embargo, las observaciones de Carrel nunca pudieron ser confirmadas experimentalmente por otros científicos (Hayflick 1997).

El Límite de Hayflick

Aunque la muerte de las células en cultivo ya había sido observada en 1907 con la aparición del primer cultivo tisular aceptado de forma generalizada (Harrison 1907), no fue hasta 1961 cuando el concepto de inmortalidad celular descrito por Carrel fue abandonado. Paul Moorhead y Leonard Hayflick observaron que los fibroblastos humanos derivados de la piel en cultivo detenían su división tras 40 o 50 divisiones, momento en el que entraban en senescencia replicativa (Hayflick y Moorhead 1961). Con esto demostraron la capacidad de replicación finita de los fibroblastos normales humanos, fenómeno que fue interpretado como un envejecimiento a nivel celular, desmontando con ello lo que Witkowski llamó “*the Myth of Immortal Normal Chick Cell*” (el mito de la célula del pollo normal inmortal) de Alexis Carrel (Hayflick 1997; 2000; Witkowski 1979; 1980; 1985).

Se habló entonces de la existencia de un mecanismo de conteo celular por el que las propias células guardaban memoria de su historial replicativo (Hayflick 1965; Hayflick y Moorhead 1961). Tras las evidencias mostradas empleando técnicas de enucleación se concluyó que este “replicómetro” (Hayflick 1998; 2000) residía en el núcleo (Muggleton-Harris y Hayflick 1976; Wright y Hayflick 1975). En 1974 Sir Frank Macfarlane Burnet acuñó el término “Límite de Hayflick” para hacer referencia al descubrimiento de Hayflick de que las células normales tienen una capacidad de replicación finita, en oposición a las células cancerígenas, usualmente inmortales (Burnet 1974).

Descubrimiento de los telómeros

Sin ninguna relación con los estudios llevados a cabo en el campo de la inmortalidad celular, en 1938 Herman Muller y Barbara McClintock, dos investigadores que trabajaban de forma independiente en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) y en el maíz (*Zea mays*), respectivamente, habían llegado

a la conclusión común de que el final de los cromosomas no presentaba características de las clásicas roturas cromosómicas, sino que tenía propiedades especiales que los protegían de fusiones terminales (McClintock 1938; 1941; 1942; Muller y Herskowitz 1954; Muller 1938). Estas estructuras en el extremo de los cromosomas fueron llamadas por Muller telómeros (del griego *telos*, final, y *meros*, parte). También se observó que el final de los cromosomas se anclaba a la envoltura nuclear en algunas especies (Shay y Wright 2000).

A pesar de la importancia de este hallazgo, no se conocía su composición y estructura, ni cómo ejercían este papel de protección de la integridad del ADN. Por aquel entonces no se había descrito la estructura tridimensional del ADN, pues es durante la primera mitad del siglo XX cuando los estudios de científicos como Friedrich Miescher, quien identificó el ADN (Miescher 2003; Wolf 2003), Phoebus Levene (Levene 1919), Erwin Chargaff (Chargaff 1950) y Linus Pauling (Pauling y Corey 1953a; Pauling y Corey 1953b), fueron poco a poco revelando la estructura y composición del ADN. Estos descubrimientos permitieron en 1953 a James Watson y Francis Crick, combinando algunos trabajos cruciales en cristalografía de rayos X de Rosalind Franklin y Maurice Wilkins (Franklin y Gosling 1953; Wilkins *et al.* 1951; Wilkins *et al.* 1953), proponer la estructura de doble hélice del ADN (Watson y Crick 1953b). Por tal descubrimiento recibieron, junto a Maurice Wilkins (pues Rosalind Franklin habría fallecido cuatro años antes), el Premio Nobel en 1962. Hoy en día se conoce que los telómeros se componen de complejos ADN-proteínas que estabilizan el final de los cromosomas e impiden que sean reconocidos como roturas de ADN de doble cadena (Gilson y Ségal-Bendirdjian 2010).

Encontrando el vínculo entre los telómeros y el Límite de Hayflick

El investigador ruso Alexey Olovnikov fue el primero en relacionar el final de los cromosomas con la detención del ciclo celular descrita por Leonard Hayflick en 1961 (Olovnikov 1971; 1973). La teoría de la “Marginotomía del ADN”, tal como Olovnikov la denominó, fue propuesta para explicar la limitación en el potencial de división de los clones de las células somáticas normales debido al acortamiento de la “réplica” de ADN con respecto a su “molde” durante la división celular. Este fenómeno no había sido considerado en el clásico modelo de replicación del ADN (Watson y Crick 1953a). El término “*The end replication problem*”, como más tarde

lo denominaría James Watson (Watson 1972) (y así pasaría a la historia), haría referencia a la incapacidad de los cromosomas lineales de replicar su extremo 3', viéndose, como consecuencia, acortados con cada ciclo mitótico.

La primera identificación de la secuencia telomérica

Olovnikov había razonado que era improbable que en cada división celular se perdiese información genética vital contenida en el ADN y que, por tanto, los telómeros podrían consistir en secuencias nucleotídicas repetidas sin información genética [referidas por Olovnikov como telogenes (Olovnikov 1973)]. Estas secuencias ejercerían un papel de “buffer” o protección de la información contenida en los genes, y su longitud determinaría el número de rondas posibles de replicación del ADN (Hayflick 2000; Olovnikov 1971; 1996). Sin embargo, la primera identificación de la secuencia telomérica no se llevaría a cabo hasta que Elisabeth Blackburn y Joseph Gal descubrieran en 1978 la secuencia telomérica del protozoo ciliado *Tetrahymena thermophila* (TTGGG) (Blackburn y Gall 1978). Diez años después Robert Moyzis y colaboradores revelarían que los telómeros de las células humanas están formados por la repetición de la secuencia TTAGGG (Moyzis *et al.* 1988).

El descubrimiento de la telomerasa

Si el acortamiento telomérico limitaba la capacidad proliferativa de las células normales, tal como fue descrito por Olovnikov, debía existir un mecanismo que solventara este problema en las células con capacidad indefinida de crecer, como las células tumorales. La solución a dicho interrogante la aportaron Carol Greider y Elisabeth Blackburn con su descubrimiento de la transcriptasa inversa responsable de sintetizar y elongar los telómeros, la telomerasa, inicialmente denominada *telomere terminal transferase* (Greider *et al.* 1985; 1987). Posteriormente, Elizabeth Blackburn y Jack Szostak, utilizando técnicas de ingeniería genética, transfectaron en levaduras plásmidos lineales formados por la unión de los fragmentos finales del ADN ribosomal de *Tetrahymena* en ambos extremos de un plásmido lineal de levadura. Tras varias generaciones observaron que los plásmidos se mantenían estables, demostrado con ello el papel de los telómeros en el mantenimiento de la integridad de los cromosomas a lo largo de las generaciones. El reconocimiento por parte de las

levaduras de los telómeros del protozoo *Tetrahymena* sugería, además, que la función de los telómeros se había conservado en la evolución de las células eucariotas (Szostak y Blackburn 1982). Esta enzima fue posteriormente encontrada en extractos de líneas celulares inmortales y en la mayoría de los tumores (Kim y others 1994; Morin 1989).

A finales de los 80 los estudios en ciliados permitieron la identificación de la subunidad ARN de la telomerasa (TERC) (Greider y Blackburn 1989), hallazgo que fue reconocido con la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 2009. Diversos estudios de mutaciones en su secuencia CAACCCCAA dieron lugar a una enzima que sintetizaba las repeticiones teloméricas alteradas, lo que confirmaba la hipótesis de la existencia de un molde para su síntesis (Yu y Blackburn 1991; Yu *et al.* 1990). El gen que codifica la subunidad catalítica, TERT, se descubrió 6 años más tarde (Lingner *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 1997). Este hallazgo permitió evaluar el papel de la telomerasa en la inmortalización celular (Bodnar and others 1998), así como la realización de los análisis estructurales que han permitido que actualmente se conozca con bastante detalle las funciones de las distintas subunidades de la telomerasa (Sandin y Rhodes 2014).

Todos estos descubrimientos iniciales en investigación fundamental sentaron la base para el desarrollo posterior de la investigación aplicada. Desde entonces, la creciente atención de la comunidad científica puesta en la investigación de la biología de los telómeros y la telomerasa (Figura 1) ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos que subyacen al proceso de envejecimiento, las enfermedades asociadas al envejecimiento y el cáncer.

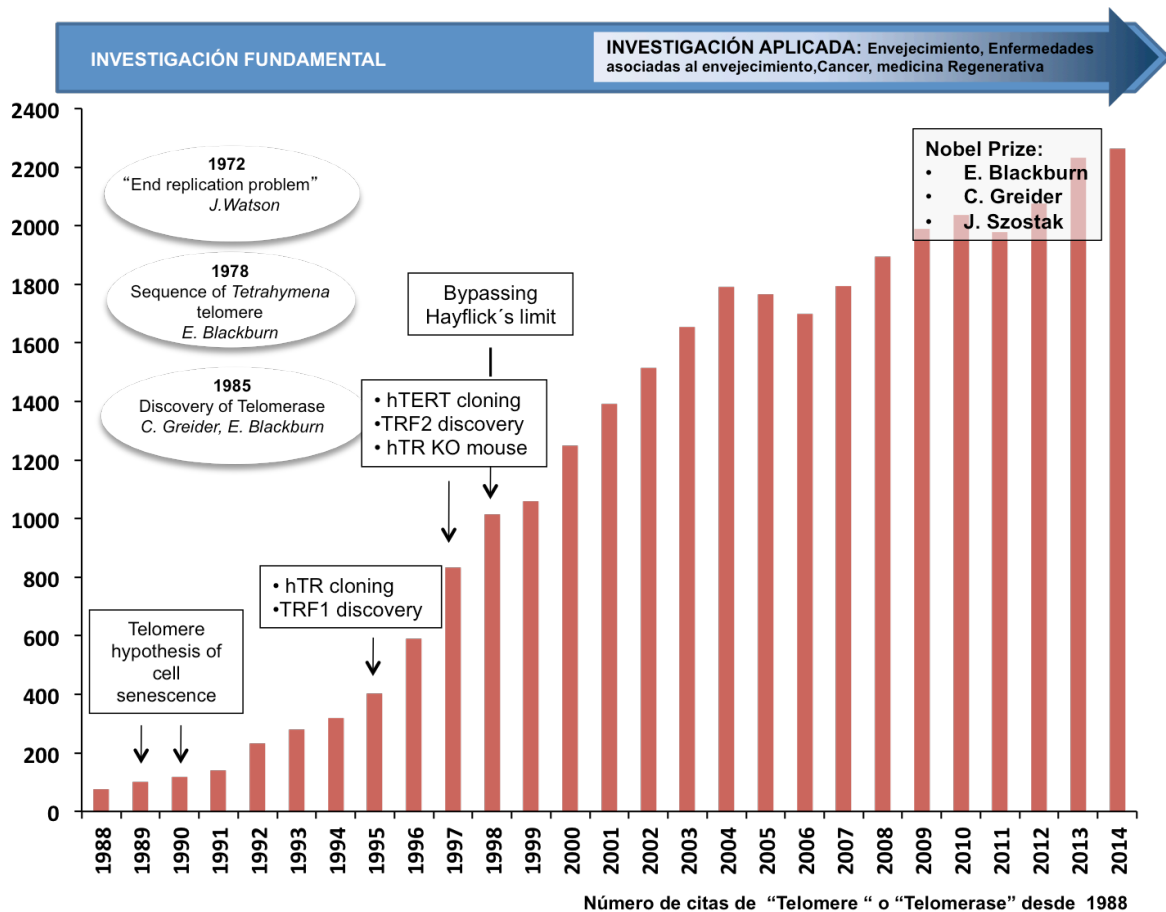


Figura 1. Número de publicaciones anuales que contienen los términos “telomere” o “telomerase” en el título, resumen o palabras clave desde el año 1988 hasta el año 2014, reflejo del creciente interés de la comunidad científica en la biología telomérica (fuente: Scopus). Adaptado de Gilson y Ségal-Bendirdjian 2010.

2. EL PROBLEMA DE LA REPLICACIÓN TERMINAL

2.1. El origen del problema del final cromosómico

Para explicar el origen de la Teoría de la Marginotomía de A. Olovnikov es preciso remontarse al otoño de 1966, cuando al entrar en el suburbano en Moscú Olovnikov encontró una explicación a la limitada capacidad de proliferación celular:

“I heard the deep roar of an approaching train coming out from the tunnel into the station itself. I imagined the DNA polymerase to be the train moving along the tunnel that I imagined to be the DNA molecule. I thought that this polymerase cannot begin to copy from the very beginning because there is a dead zone between the front end of the polymerase molecule and its catalytic center. This is analogous to the dead zone between the front end of a subway car standing at the beginning of the subway platform and the nearest entrance door to the first car” (Hayflick 2000; Olovnikov 1971b; 1996).

No fue hasta el año 1971 en que Olovnikov describió en una publicación en lengua rusa el “*DNA end-underreplication problem*” como la incompleta replicación de la doble hélice de ADN, dándole a este fenómeno el nombre de “*marginotomy*” (Olovnikov 1971b). James Watson, de manera independiente, sugirió posteriormente una hipótesis similar para explicar el mismo problema (Watson 1972). La evidencia experimental de que el acortamiento de los telómeros explicaba el límite de Hayflick vendría de la mano de Harley y colaboradores años después, en 1990 (Harley *et al.* 1990). La primera pista sobre la posible existencia de un acortamiento de la longitud telomérica (LT) en el hombre habría aparecido ya en 1986, cuando se demostró que la longitud de los telómeros no era la misma en todos los tejidos (Cooke y Smith 1986).

2.2. Mecanismo molecular del problema de la replicación terminal

Durante la replicación celular la molécula de ADN lineal de los cromosomas de los eucariotas sufre un acortamiento de sus telómeros con cada mitosis (estimado en 100 pares de bases en los humanos) debido a la propia naturaleza del proceso. En los organismos eucariotas la replicación del ADN es semiconservativa, esto es, se

lleva a cabo copiando la cadena de ADN parental, como originalmente fue sugerido por Watson y Crick en 1953 en su famosa publicación en la revista *Nature* (Watson y Crick 1953a; 1953b). Para ello, durante la replicación, la doble cadena de ADN se separa, quedando una de ellas orientada en sentido 5'-3' y otra en el sentido inverso. La enzima responsable de la síntesis de nuevas cadenas de ADN, la ADN polimerasa, actúa únicamente en sentido 5'-3' valiéndose de una pequeña secuencia de oligonucleótidos de ARN (cebador) a partir de la cual inicia la replicación. La cadena así sintetizada (hebra adelantada, líder o conductora; en inglés *leading strand*) se origina de forma continua hasta el final de la hebra molde. El problema de la replicación surge en la cadena complementaria, orientada en sentido 3'-5'. En este caso, la nueva cadena (hebra rezagada o retrasada; en inglés *lagging strand*) ha de ser sintetizada por la enzima en fragmentos pequeños y discontinuos (fragmentos de Okazaki). Posteriormente, los cebadores de ARN se reemplazan por ADN y los fragmentos son unidos por una ligasa. Para reemplazar el cebador de ARN es necesaria la presencia de ADN corriente arriba (hacia el extremo 5') del cebador. Es por ello que el cebador situado en la posición 5' no puede ser reemplazado y, por tanto, la ADN polimerasa es incapaz de replicar el extremo 3' de la hebra molde, acortándose la secuencia en cada ciclo mitótico (Figura 2).

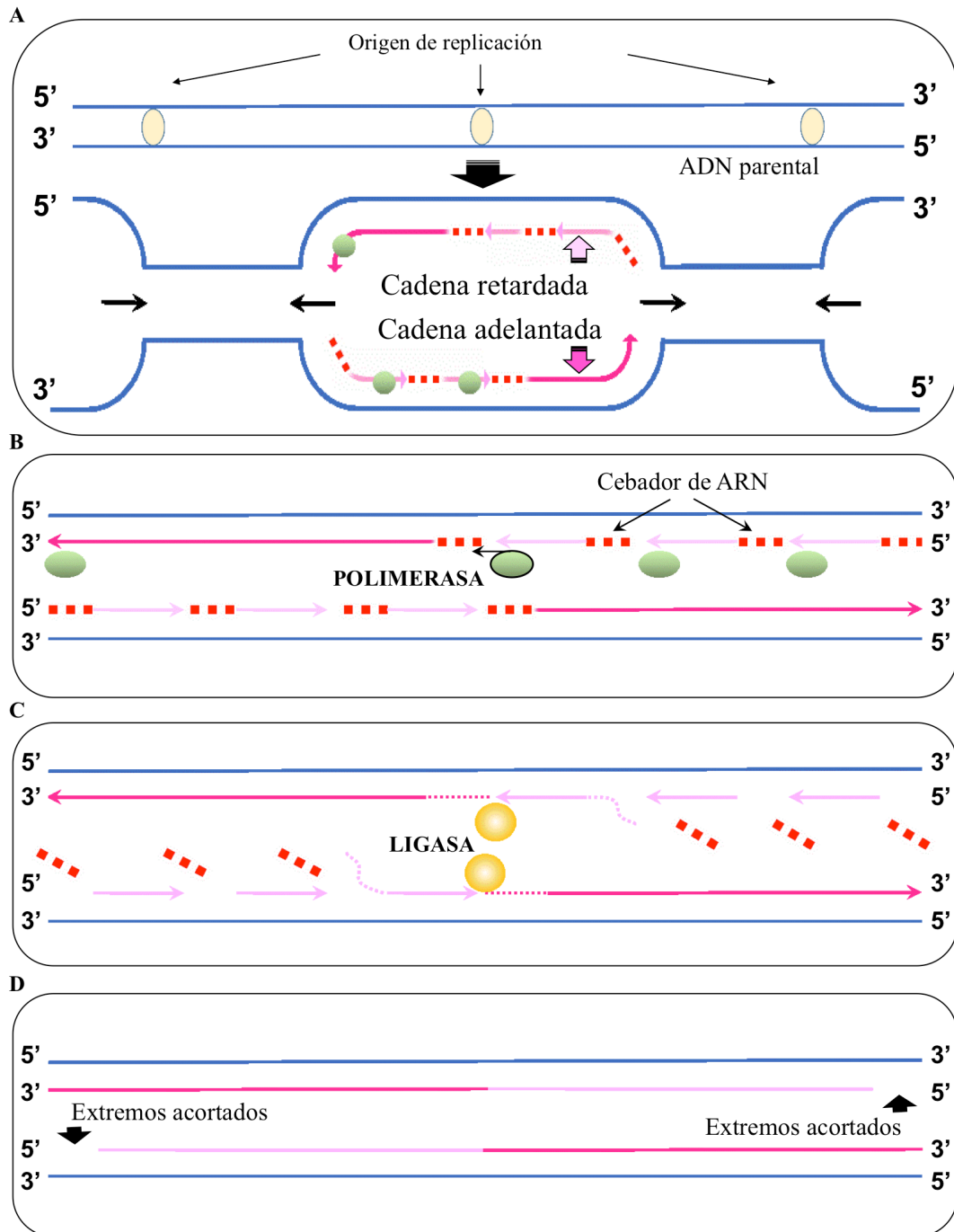


Figura 2. El problema de la replicación terminal. (A) Durante la replicación del ADN las cadenas se separan dando lugar a dos hebras orientadas en sentidos opuestos. (B) La polimerasa de ADN actúa en sentido 5'-3', valiéndose de unos cebadores de ARN, y dando lugar a dos hebras: adelantada (sintetizada de forma continua) y retardada (sintetizada en fragmentos de Okazaki). (C) Los cebadores de ARN son reemplazados por ADN, y los fragmentos unidos a través de una ligasa. (D) La polimerasa de ADN no puede replicar el extremo 3' de la hebra molde al no poder reemplazar el cebador de ARN del extremo 5' en la hebra naciente; por ello los extremos se acortan tras la replicación. Adaptado de Toftgad 2014.

3. FUNCIONES DE LOS TELÓMEROS EN MAMIFEROS

3.1. Mantenimiento de la estabilidad genómica y cromosómica

Como se ha mencionado anteriormente, el final del cromosoma lineal de las células eucariotas presenta dos problemas: el problema de la “replicación” terminal y el problema de la “protección” del final cromosómico. Los extremos de los cromosomas se han adaptado desde el punto de vista genético y estructural para facilitar la protección de la información contenida en los genes y evitar la formación de aberraciones cromosómicas. Así, la longitud de las repeticiones teloméricas compensa el problema de replicación terminal, mientras que la estructura secundaria de los telómeros asegura la protección del extremo libre telomérico.

El papel de los telómeros en el mantenimiento de la estabilidad cromosómica fue propuesto hace unos 70 años (McClintock 1939). En 1938 Bárbara McClintock se dio cuenta de que cuando las plantas habían sido irradiadas con rayos X sus cromosomas se veían involucrados en ciclos espontáneos de rotura-fusión-formación de puentes (McClintock 1938). Este hallazgo fundamentó la hipótesis de que las fusiones cromosómicas aberrantes se romperían en las divisiones celulares posteriores conduciendo a una distribución desigual y aleatoria del material genético en las células hijas. Los telómeros disfuncionales que pierden su capacidad de protección del final cromosómico conducen a la formación de estos ciclos de rotura y fusión descritos por McClintock, lo que sugiere que la pérdida de protección puede ser base de inestabilidad genómica en mamíferos (O'Sullivan y Karlseder 2010).

3.1.2. Papel de la longitud telomérica en la protección del final de los cromosomas

El problema de replicación terminal daría lugar a la pérdida de secuencias génicas de no existir los telómeros (Hackett *et al.* 2001), que son los que sufren el acortamiento en su secuencia. Así, la longitud telomérica inicial y la tasa de acortamiento telomérico asociada a la replicación determinarían que la célula somática pueda sufrir un número de divisiones definidas antes de que sus telómeros lleguen a ser críticamente cortos y pierdan su capacidad protectora, estimulando con

ello la activación de los puntos de control que determinan la entrada de la célula en un irreversible arresto mitótico (conocido como senescencia replicativa) o muerte celular (apoptosis) (Maser y DePinho 2002; O'Sullivan y Karlseder 2010; Siderakis y Tarsounas 2007). Estos mecanismos limitan la vida replicativa de las células individuales (Allsopp *et al.* 1992) y, probablemente, de algunos compartimentos celulares en los organismos, representando por tanto, al mismo tiempo, un mecanismo de supresión tumoral que evita la inmortalización de la célula (Bechter *et al.* 2004b; O'Sullivan y Karlseder 2010) y restringe la proliferación de células envejecidas con acumulación de mutaciones precancerosas. El coste adicional de estos límites intrínsecos a la proliferación celular en tejidos somáticos humanos es la pérdida de capacidad regenerativa, lo que contribuye al envejecimiento celular y orgánico (Cesare y Karlseder 2012).

Son muchos los estudios que han demostrado que un excesivo acortamiento de los telómeros resulta en inestabilidad cromosómica en las células somáticas (Hande *et al.* 1999; Hemann *et al.* 2001; Lee *et al.* 1998). Esta hipótesis ha sido demostrada formalmente en el ratón deficiente a la subunidad ARN de la telomerasa, en el que la pérdida de secuencias teloméricas en sucesivas generaciones conduce a fusiones terminales, anormalidades cromosómicas y al desarrollo de aneuploidías (Blasco *et al.* 1997). Sin embargo, la longitud telomérica no es el único determinante del potencial proliferativo de la célula (O'Sullivan y Karlseder 2010) y se desconoce la longitud telomérica mínima necesaria para que los telómeros pierdan su función protectora. La longitud y el acortamiento telomérico a menudo han sido considerados un indicativo no sólo del historial replicativo de la célula (número de veces que se ha dividido) sino también del número de veces que se espera pueda dividirse (Blackburn 2000). De esta manera, la senescencia replicativa provocada por el acortamiento telomérico apoyaría la “hipótesis telomérica del envejecimiento celular” (Harley *et al.* 1992), según la cual los telómeros actuarían en la célula como un “reloj” mitótico que cuenta el número de veces que se ha dividido; pero la relación que existe entre la capacidad proliferativa de la célula y la LT es mucho más compleja. La teoría del reloj mitótico es aplicable experimentalmente, por ejemplo, a las células en cultivo cuando no hay actividad telomerasa, y al modelo de ratón nulo a la telomerasa, el cual muestra un acortamiento telomérico progresivo (Blackburn 2000). Sin embargo, una LT críticamente corta no implica necesariamente el arresto mitótico, ya que una telomerasa enzimáticamente

competente puede ejercer un papel protector, como se ha visto en células humanas y en levaduras (Blackburn 2000). En este sentido, el acortamiento telomérico es tan solo un factor de los numerosos factores estresantes celulares que pueden desencadenar el arresto mitótico irreversible observado en el fenotipo senescente (Coppé *et al.* 2010).

Por otra parte, la función protectora de los telómeros no sólo se puede perder cuando se acortan hasta una longitud crítica, también cuando pierden la capacidad de proteger su estructura final de actividades celulares como las de las nucleasas o proteínas de reparación de roturas de ADN, incluso a pesar de una longitud telomérica suficientemente larga (O'Sullivan y Karlseder 2010). De este modo, las alteraciones en el correcto funcionamiento del complejo *shelterin* también causan senescencia dependiente de los telómeros independientemente de la longitud telomérica (Karlseder *et al.* 2002; Martínez y Blasco 2010)].

3.1.3. “Uncapping” telomérico e inestabilidad genómica

Aunque el problema de la protección del final de los cromosomas se descubrió cuando Muller y McClintock observaron las diferencias entre el comportamiento de los extremos de cromosomas rotos y los extremos naturales de los cromosomas (los telómeros), no fue hasta los años 80 cuando, tras la revelación de los principios de la respuesta celular al daño de ADN, los mecanismos que daban lugar a esta protección telomérica pudieron llegar a ser comprendidos (de Lange 2009). Szostak y colaboradores observaron que el ADN lineal introducido en células eucariotas resultaba inestable porque los extremos del ADN se recombinaban con el genoma (Orr-Weaver *et al.* 1981). Hoy sabemos que esto sucede porque el ADN lineal es víctima de las vías de reparación de ADN que actúan en los cromosomas rotos: reparación por homología directa (*homology-directed repair*: HDR) o unión de extremos no homólogos (*nonhomologous end joining*: NHEJ). La célula cuenta con mecanismos que activan cascadas de señalización que resultan en la detección de estos fragmentos de ADN lineal, degradación enzimática o reparación de los mismos, detención del ciclo celular y/o muerte celular. Si la maquinaria de reparación falla, una repuesta inapropiada a las roturas de ADN resultaría en una distribución desigual del material genético durante la división celular, inestabilidad genómica y, eventualmente, desarrollo de malignidades (de Lange 2009).

El final natural de los cromosomas lineales se asemeja a las roturas de ADN y además los telómeros cuentan con una región de ADN de cadena simple (ADNcs) (de Lange 2009). Estas propiedades les hacen susceptibles de activar las dos vías de señalización que alertan sobre la existencia de roturas de ADN de doble cadena (ADNdc) (DSBs por sus siglas en inglés): (i) ATM (*ataxia telangectasia mutated kinase pathway*) y (ii) ATR (*ataxia telangectasia and Rad3 related kinase pathway*). La activación de estas vías conduciría a la detención del ciclo celular evitando con ello una mayor erosión (d'Adda di Fagagna *et al.* 2003; d'Adda di Fagagna *et al.* 2004; Reaper *et al.* 2004). Además de evitar el bloqueo celular mediado por ATR y ATM, se debe evitar la activación de la maquinaria de reparación de DSBs via HDR o NHEJ. En las células mamíferas la solución al problema de la protección del final cromosómico implica por tanto escapar a los posibles efectos perjudiciales de estas cuatro vías diferentes, pues los fallos en evadir estas respuestas resultarían en la detención del ciclo celular (bajo el control de las vías ATM y/o ATR), fusiones cromosómicas finales (un producto de NHEJ), o intercambio de secuencias (mediado por HDR) que impliquen a dos telómeros o a un telómero y a otra parte del genoma (de Lange 2009).

En los telómeros de los mamíferos el secuestro del extremo libre 3' terminal a través de la estructura en bucles T impide que sean reconocidos como roturas de ADN (Griffith *et al.* 1999). Las proteínas teloméricas, y los factores con los que interactúan, crean un ambiente en el final del cromosoma que inhibe los mecanismos de reparación celular.

El ejemplo más notable de cómo las proteínas teloméricas contribuyen a la función de *capping* o protección de los telómeros lo aporta la eliminación de la proteína TRF2, el factor de protección de los telómeros sobre el que recae la represión de la vía ATM kinasa (Celli y de Lange 2005; Karlseder *et al.* 1999; van Steensel *et al.* 1998). Las células con telómeros deficientes en TRF2 ven detenido su ciclo celular a través de sobreexpresión de p53 y muestran otros distintivos de la vía de señalización ATM, incluyendo fosforilación de la quinasa Chk2 de la vía ATM (de Lange 2009). En pocas divisiones, los telómeros son reconocidos como roturas de ADN dando lugar a fusiones cromosómicas. Mientras que TRF2 reprime la vía ATM kinasa, POT1 asegura que la vía ATR kinasa no sea activada (Denchi y de Lange 2007). La eliminación de *Pot1* en ratones resulta en la activación de la respuesta a

daño en los telómeros, evidenciado por la presencia de focos o puntos de ADN dañado y fosforilación de la diana de ATR, Chk1 (Guo *et al.* 2007; Hockemeyer *et al.* 2006). TRF2 y POT1 también son fundamentales en el bloqueo de las dos vías de reparación que podrían afectar a los telómeros (HDR y NHEJ) (de Lange 2009) conduciendo a inestabilidad genómica. La vía NHEJ supone una amenaza para los telómeros, pues daría lugar a cromosomas dicéntricos tras la fusión de dos telómeros. Estos cromosomas son inestables en la mitosis, cuando las células segregan sus cromosomas al dividirse. La vía HDR, por otra parte, es origen de deleciones terminales y cambios en la longitud telomérica.

La disfunción telomérica, tanto si es causada por el acortamiento telomérico como por la pérdida de las estructuras que protegen el final del cromosoma, está asociada a inestabilidad genómica, y ésta es el inicio de tumorigénesis (Meeker *et al.* 2004; Perera *et al.* 2008) y envejecimiento prematuro en células en división mitótica.

3.2. Papel estructural de los telómeros

Una de las funciones atribuidas a los telómeros es su participación en la estructura y posicionamiento de los cromosomas en el núcleo. En las células somáticas la distribución de los telómeros en el núcleo y sus asociaciones transitorias dependen del tipo celular y del momento del ciclo celular en el que se encuentren (Dandjinou *et al.* 1999; Gilson *et al.* 1993; Zalenskaya y Zalensky 2002). Los telómeros están involucrados en el reconocimiento y separación de los cromosomas durante la mitosis (Pérez-Morga *et al.* 2001). En las células germinales de los mamíferos, las células precursoras de los gametos de los que depende la propagación de las especies, los telómeros promueven el reconocimiento y alineamiento de cromosomas homólogos en las células meióticas (Scherthan 2007). Los estudios citológicos han evidenciado profundas diferencias en la organización y comportamiento telomérico entre las células somáticas y las células meióticas (Zalenskaya y Zalensky 2002).

En este sentido, la disfunción telomérica parece jugar un papel fundamental en la aparición de aneuploidías, es decir, la ganancia o pérdida de un cromosoma entero, durante la meiosis del ovocito. Esta disfunción podría explicar distintos factores responsables de aneuploidía, como la inapropiada/ausente formación del quiasma

responsable del alineamiento adecuado de los cromosomas homólogos (Lamb *et al.* 2005) o el retraso en la salida de la línea de producción de ovocitos (Henderson y Edwards 1968), y podría relacionar estos factores con la senescencia reproductiva en la mujer (Keefe *et al.* 2006; Treff *et al.* 2011), como se explica a continuación.

3.2.1. Arquitectura telomérica durante la meiosis

La meiosis es un proceso conservado a través de la evolución que consiste en dos divisiones sucesivas que generan células haploides, los gametos. Durante el estadio de leptoteno/zygoteno de la primera profase meiótica se lleva a cabo el apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos, fenómeno único de la meiosis.

Para entender la importancia de los telómeros en la meiosis conviene describir el comportamiento de los telómeros en esta fase. Dos aspectos distintos de este comportamiento son el anclaje de los telómeros a la membrana nuclear y la adquisición de una configuración que se ha llamado *bouquet*. Durante los estadios tempranos de la Profase I (PI) los cromosomas sufren varios cambios: compactación, formación de elementos axiales que definen estructuralmente cada cromosoma homólogo y establecimiento de interacciones entre homólogos que facilitan la recombinación de ADN (Zickler y Kleckner 1998). Es en este periodo cuando se forma el estadio de *bouquet*: los telómeros, entonces anclados a la membrana nuclear, adquieren una configuración polarizada y se agrupan en *clusters* rodeando el centrosoma en mamíferos [o *spindle pole body* (SPB) en *S.pombe*] (Harper *et al.* 2004). Los telómeros permanecen anclados a la membrana nuclear desde el leptoteno hasta el paquiteno, mientras que el ensamblaje del *bouquet* es un fenómeno transitorio que ocurre en la transición del leptoteno al zygoteno (Siderakis y Tarsounas 2007; Zickler y Kleckner 1998). Aunque la formación del *bouquet* es una característica universal de la meiosis, su función precisa se desconoce (Siderakis y Tarsounas 2007).

La correcta localización de los telómeros y la formación del “*bouquet*” son imprescindibles para el apareamiento y recombinación de cromosomas homólogos antes del arresto meiótico (Bass *et al.* 2000; de Lange 1998; Liu *et al.* 2002a; Scherthan *et al.* 2000; Scherthan *et al.* 1996; Tease y Fisher 1998). Esto ha sido

demostrado en *S. pombe*, donde el núcleo en PI sufre un agrandamiento y un movimiento dirigido por el SPB y los telómeros asociados que promueve el apareamiento homólogo y mantiene alineados los cromosomas mientras se da la recombinación (Siderakis y Tarsounas 2007). La formación defectuosa del *bouquet* (por alteración del *clustering* telomérico y su asociación a los SPBs) causada por mutaciones en proteínas esenciales para su formación, como Taz11, conduce a defectos en los procesos de recombinación homóloga. Los análisis genéticos en *Saccharomyces cerevisiae* también indican que la formación de los *clusters* en los telómeros contribuye al alineamiento adecuado de los cromosomas homólogos y al apareamiento sináptico de los telómeros (Rockmill y Roeder 1998; Trelles-Sticken *et al.* 2000). En mamíferos también hay evidencias del papel esencial de los telómeros en esta etapa de la meiosis. Un estudio temprano en espermatoцитos humanos sugirió su implicación directa en el apareamiento de cromosomas homólogos, donde la sinapsis empezaría en los telómeros (Barlow y Hultén 1996). En el modelo de ratón nulo a la telomerasa la pérdida y disfunción telomérica en la cuarta generación conduce a la alteración del huso meiótico y a un alineamiento inapropiado de los cromosomas homólogos (Liu *et al.* 2002a). La disfunción telomérica en ovocitos y espermatozoides en estos ratones se asocia a una sinapsis aberrante y una recombinación defectuosa (Liu *et al.* 2004). Aunque los mecanismos por los que la disfunción telomérica da lugar a estas anomalías no se conocen, parece claro que la integridad del huso y el alineamiento adecuado de los cromosomas homólogos requieren telómeros funcionales que aseguren una segregación equilibrada de los cromosomas durante la división meiótica. En humanos existe además una correlación entre la longitud telomérica del primer y segundo corpúsculo polar (y del embrión antes del estadio de blastocisto) y el desarrollo de aneuploidías (Treff *et al.* 2011). En la mujer los cromosomas meióticos fallan frecuentemente en la segregación dando lugar a aneuploidías (Hassold y Hunt 2001) como causa primaria de fallos en la implantación, retraso en el desarrollo y abortos (Treff *et al.* 2011). Probablemente su alta frecuencia se deba a que los puntos de control para el comportamiento de los cromosomas meióticos en la transición metafase-anafase son menos eficientes en las hembras que en los machos (Hunt *et al.* 1995; LeMaire-Adkins *et al.* 1997), y en el ovocito con respecto a las células mitóticas en general. La fuerte asociación entre la longitud telomérica y el desarrollo de aneuploidías en ovocitos y embriones en división descrita podría ser debida a defectos en la recombinación meiótica (Treff *et*

al. 2011), puesto que es un factor de riesgo para el desarrollo de aneuploidías en humanos (Lamb *et al.* 2005), y a un apareamiento cromosómico anómalo y sinapsis impedida, tal como ha sido observado en los ovocitos de ratón con deficiencia telomérica (Liu *et al.* 2004).

El acortamiento telomérico con la edad en el ovocito apoyaría la teoría telomérica propuesta para explicar la senescencia reproductiva en la mujer (Kalmbach *et al.* 2013; Keefe *et al.* 2005; Keefe *et al.* 2006). Además, la LT del ovocito tiene un valor predictivo de la incidencia de fragmentación citoplasmática en el embrión humano (Keefe *et al.* 2005). Si el acortamiento telomérico precede al desarrollo de aneuploidías, entonces la LT podría representar un marcador muy útil del potencial reproductivo del embrión humano (Treff *et al.* 2011). Sin embargo, no se debe descartar que otros fenómenos no relacionados con los telómeros sean causa de aneuploidías, ni que la disminución de la fertilidad asociada a la edad en la mujer (conocida como senescencia reproductiva) no se deba enteramente a la incidencia de aneuploidías, pues no todos los embriones euploides son viables (Scott *et al.* 2008).

4. IMPORTANCIA DE LA BIOLOGÍA TELOMÉRICA EN LA SALUD: LOS TELÓMEROS EN LA INTERSECCIÓN DEL CÁNCER Y EL ENVEJECIMIENTO

La relevancia de la biología telomérica queda patente en los múltiples trabajos que estudian y ponen de manifiesto la relación entre enfermedad y el mantenimiento de la LT en los humanos (Armanios y Price 2012). Sin embargo, aunque su relación genética y funcional es clara hoy en día (Young 2010), todavía permanecen abiertas muchas cuestiones, especialmente cuando se trata de establecer la relación causal entre disfunción telomérica y enfermedad en ciertos desórdenes regenerativos asociados a la edad.

Los telómeros son esenciales para la estabilidad genómica y su disfunción ha sido implicada en el desarrollo del cáncer y el envejecimiento. La prueba más evidente de su relación con el envejecimiento la presentan una serie de desórdenes de la biología telomérica conocidos como síndromes teloméricos (Armanios y Blackburn 2012), caracterizados por un acortamiento telomérico y que, entre otras características, presentan un fenotipo de envejecimiento prematuro. Disqueratosis congénita (DC) (Mitchell *et al.* 1999), anemia aplásica (Yamaguchi *et al.* 2005) y

fibrosis pulmonar idiopática (Armanios 2012) son ejemplos de algunos de estos desórdenes originados como consecuencia de mutaciones en diversos componentes de la telomerasa, la enzima responsable de sintetizar los telómeros. Otras enfermedades que resultan de mutaciones en genes responsables de los mecanismos de reparación del ADN (ataxia telangiectasia, síndrome de Werner, síndrome de Bloom y anemia de Fanconi) también se caracterizan por un acortamiento telomérico acelerado y envejecimiento prematuro, pues estos genes también están implicados en la homeostasis telomérica. En algunos casos, como en la DC, los pacientes presentan además un incremento en la susceptibilidad al desarrollo de malignidades (Alter *et al.* 2009). A los desórdenes anteriormente citados se suman los numerosos trabajos que han relacionado enfermedades asociadas al envejecimiento y la longitud telomérica (LT) (Cawthon *et al.* 2003): hipertensión (Benetos *et al.* 2001; Jeanclos *et al.* 2000), resistencia a la insulina (Demissie *et al.* 2006; Gardner *et al.* 2005), arteroesclerosis (Benetos *et al.* 2004), infartación miocárdica (Brouillette and others 2003; Brouillette and others 2007), infarto (Fitzpatrick *et al.* 2007), demencia (Panossian *et al.* 2003; von Zglinicki *et al.* 2000) y cáncer.

De acuerdo con la teoría evolucionaria del “soma disponible” (Kirkwood 1977; Kirkwood y Holliday 1979), los mecanismos anticancerígenos y antienvjecimiento han adaptado sus esfuerzos a la esperanza de vida natural de cada especie, de manera que aseguren que la mayoría de los individuos estarán libres de cáncer y de envejecimiento durante el tiempo en el que son útiles o beneficiosos para su especie (Kirkwood y Austad 2000; Serrano y Blasco 2007).

Aunque son muchas las teorías que se han propuesto para explicar el desarrollo del envejecimiento, existe un consenso general sobre su génesis multifactorial, estando provocado tanto por factores intrínsecos como por factores extrínsecos, y además se ve influido por diversas y complejas vías moleculares como son las vías de señalización hormonal, respuesta celular al estrés y procesos metabólicos (Hansen *et al.* 2005; Kenyon 2005). De entre todos los factores, probablemente el más estudiado sea los telómeros. El primer indicio de la conexión entre la LT y el proceso de envejecimiento apareció con la observación de que la longitud telomérica en cultivos primarios de fibroblastos humanos disminuye con la edad del donante (Harley *et al.* 1990) y que el alcance de una LT críticamente corta da lugar a pérdida en la capacidad proliferativa (Harley 1990), fenómeno conocido como

senescencia replicativa. Apoyando el papel de la longitud telomérica en el envejecimiento, el modelo de ratón deficiente en telomerasa muestra un envejecimiento acelerado y su longevidad se ve progresivamente acortada a través de los cruces sucesivos (Blasco *et al.* 1997; Jaskelioff *et al.* 2011; Lee *et al.* 1998; Samper *et al.* 2001).

La senescencia, tanto si es provocada por el acortamiento telomérico como por otro mecanismo no relacionado (Ben-Porath y Weinberg 2005), no sólo contribuye al proceso de envejecimiento, sino que también actúa como una potente barrera antitumoral (Collado y Serrano 2006; Feldser y Greider 2007; González-Suárez *et al.* 2000; Wright y Shay 2001). De acuerdo con esta teoría, los estudios llevados a cabo en el modelo ratón deficiente en TERC (mTERC^{-/-}) demostraron que el acortamiento telomérico limitaba el crecimiento de los tumores cuando dicho modelo era tratado con carcinógenos (González-Suárez *et al.* 2000) o cuando el fondo genético era además deficiente en los supresores tumorales p16 y p19ARF (Greenberg *et al.* 1999). Tanto el cáncer como la longevidad requieren de un potencial proliferativo celular mantenido. Por tanto, aquellos mecanismos que limitan la proliferación celular indefinida proporcionan protección frente al cáncer al mismo tiempo que favorecen el envejecimiento (mecanismos divergentes). Por otra parte, el cáncer y el envejecimiento se caracterizan por la acumulación de daño celular, por lo que los mecanismos que protegen a las células del daño protegen simultáneamente frente al cáncer y el envejecimiento (mecanismos convergentes). El balance global entre estos mecanismos convergentes y divergentes garantiza una vida saludable y libre de cáncer hasta la edad adulta en la mayoría de los individuos (Serrano y Blasco 2007).

Son muchas las evidencias que sugieren que el mantenimiento de la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa son factores limitantes en la esperanza de vida de los organismos, mientras que el acortamiento de los telómeros contribuiría al envejecimiento limitando la regeneración tisular (Tomás-Loba *et al.* 2008). Durante el envejecimiento natural o fisiológico se produce un acortamiento telomérico e incremento de células senescentes tanto en tejidos proliferativos como no proliferativos (Blasco 2007; Flores *et al.* 2008; Jiang *et al.* 2007), debido a que la actividad telomerasa, detectable durante el desarrollo embrionario, se reprime postnatalmente en la mayoría de los tejidos (Collins y Mitchell 2002; Prowse y

Greider 1995). De esta manera, las estrategias de reactivación de la telomerasa llevadas a cabo en el ratón han mostrado recientemente prevenir el acortamiento telomérico asociado a la edad, retrasando el envejecimiento orgánico e incrementando tanto la esperanza de vida saludable como la longevidad (Bernardes de Jesus *et al.* 2012; Jaskelioff *et al.* 2011; Tomás-Loba *et al.* 2008).

El acortamiento telomérico y la activación de DDR (respuesta al daño celular), pueden acontecer tanto en el envejecimiento como en el cáncer (Bernardes de Jesus y Blasco 2013). Los telómeros cortos o desprotegidos son reconocidos como roturas de ADN persistentes o no reparables, lo que provoca respuestas al daño celular persistentes, así como senescencia y/o apoptosis mediada por la proteína p53. Este acortamiento telomérico en conjunción con la inactivación de ciertos genes por acumulación de mutaciones somáticas con la edad conduce a la superación del límite de Hayflick. La proliferación de las células más allá de este límite produce un acortamiento mayor que últimamente resulta en fusiones teloméricas, la formación de puentes anafásicos y roturas cromosómicas con el consiguiente desarrollo de aneuploidías y traslocaciones durante la carcinogénesis temprana (Begus-Nahrman *et al.* 2012). Así, los experimentos llevados a cabo en el modelo de ratón *mTERC*^{-/-} evidenciaron que el acortamiento telomérico podría incrementar la tasa de aparición de tumores espontáneos, sugiriendo un papel dual del acortamiento telomérico y la actividad telomerasa en el inicio y progresión de los tumores (Hackett y Greider 2002). Aunque muchos tumores pueden emerger de células con telómeros cortos e inestabilidad cromosómica, la activación de la telomerasa y el consiguiente mantenimiento de la longitud telomérica son requisitos para la progresión de la mayoría de los tumores (Ding *et al.* 2012). Demostrando el papel que la telomerasa y la longitud telomérica juegan en el desarrollo del cáncer y el envejecimiento, el ratón transgénico que sobreexpresa constitutivamente el componente TERT de la telomerasa muestra un incremento en la salud de los tejidos, aunque su efecto en la esperanza de vida queda enmascarado por el incremento en la incidencia de tumores espontáneos (Artandi *et al.* 2002; González-Suárez *et al.* 2005; González-Suárez *et al.* 2001). Como el cáncer, el envejecimiento se acompaña de la acumulación de daño celular, que en el caso del envejecimiento resulta en la pérdida de capacidad proliferativa y disfunción de los tejidos debido a la pérdida de células funcionales en dichos tejidos o a la acumulación de células dañadas que sobreviven de manera

aberrante (Bernardes de Jesus y Blasco 2013). Probablemente debido a su habilidad para eliminar el daño celular, el modelo de ratón resistente al cáncer que sobreexpresa de forma constitutiva tres supresores tumorales (Sp53/Sp16/SArf) experimenta un retraso en el envejecimiento (García-Cao *et al.* 2002a; Matheu *et al.* 2007; Matheu *et al.* 2004). En un intento de disociar el papel de la telomerasa en el cáncer y el envejecimiento, el equipo de la investigadora María Blasco generó un ratón transgénico para Tert en este fondo genético resistente a tumores (*Sp53/Sp16/SArf/Tg Tert mice*), demostrando que la sobreexpresión de mTERT tiene actividad anti-envejecimiento, y señalaron el mantenimiento de los telómeros como el principal mecanismo que explica esta actividad anti-envejecimiento de Tert (Tomás-Loba *et al.* 2008). Por otra parte, la sobreexpresión de la telomerasa en condiciones de restricción calórica (un segundo escenario que también provee protección frente al cáncer) extiende la vida media en el ratón (Vera *et al.* 2013). Dos estudios recientes demostraron que la activación de la telomerasa en un modelo de ratón con envejecimiento acelerado (Jaskelioff *et al.* 2011) o en un ratón envejecido de manera natural (1 y 2 años de edad) (Bernardes de Jesus *et al.* 2012) es suficiente para retrasar el envejecimiento sin incrementar la incidencia del cáncer, demostrando el papel del acortamiento telomérico en el envejecimiento celular y la modulación de la esperanza de vida.

A pesar de los avances en el entendimiento de la regulación de la telomerasa, los eventos moleculares precisos que conducen a la reactivación de la telomerasa en la tumorigénesis no han sido del todo esclarecidos (Djojotubroto *et al.* 2003). Varios mecanismos involucrados en la oncogénesis como los oncogenes Myc y Wnt (Greider 2012; Hoffmeyer *et al.* 2012; Wu *et al.* 1999), mecanismos que implican *splicing* alternativo y alteraciones epigenéticas (Kyo y Inoue 2002), o mutaciones en el promotor de TERT (Horn *et al.* 2013; Huang *et al.* 2013), incrementan la actividad telomerasa. El valor potencial de las estrategias basadas en el uso de la telomerasa para el tratamiento de desórdenes regenerativos o en terapias anti-envejecimiento reside en su seguridad, por lo que el entendimiento del papel que ejerce la telomerasa en el cáncer y envejecimiento tisular resulta crucial.

5. MECANISMOS DE ELONGACIÓN TELOMÉRICA EN LOS MAMÍFEROS

El problema de replicación terminal acorta los telómeros en cada división celular y los extremos de los cromosomas lineales son además sensibles al daño producido por el estrés oxidativo (Oikawa y Kawanishi 1999). Estos problemas no los sufren los cromosomas circulares ancestrales de la mayoría de los procariotas (como las bacterias) y el ADN de las mitocondrias; sin embargo, los primeros eucariotas tuvieron que adoptar los telómeros como un mecanismo que asegurara el mantenimiento estable del final de sus cromosomas lineales (Eickbush 1997).

La telomerasa es el mecanismo más estudiado para mantener las secuencias terminales, pero no es el único en la escala evolutiva. Muchos bacteriófagos y virus con genomas lineales solventan el problema de manera muy variable (Chan y Blackburn 2004): algunos usan un **intermediario de la replicación** de ADN concatemerizado o circular y los adenovirus utilizan un iniciador proteico (**proteína terminal**) unido covalentemente al extremo 5'. Los poxvirus presentan el final de su ADNdc lineal cerrado covalentemente por un **loop**; el corte controlado de este *hairpin* provee de un grupo 3'OH que es necesario para la replicación del ADN (de Lange 2004). Otras alternativas a la telomerasa también aparecen en los eucariotas, donde el ejemplo más extremo lo encontramos en el orden díptera (*D. melanogaster*) y otros insectos próximos a ellos, que resuelven el problema por **retrotransposición**. Esta vía es análoga a la telomerasa ya que se basa en una transcriptasa inversa que utiliza un extremo 3' como iniciador para la síntesis de ADN utilizando un molde de ARN. La **recombinación** es el principal mecanismo para el mantenimiento telomérico en el mosquito vector de la malaria, *Anopheles gambiae* (Roth *et al.* 1997), y posiblemente el de los ADN lineales mitocondriales de algunas especies de levaduras (Nosek *et al.* 1995). La eliminación de la telomerasa por modificación genética en levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *Kluyveromyces lactis*, dos ejemplos de *budding yeasts*) ha revelado la existencia de métodos alternativos para la extensión de los telómeros como son la **recombinación homóloga** (*S. cerevisiae*) (Kass-Eisler y Greider 2000) y la utilización de pequeños **círculos extracromosómicos** como molde para la adición de las repeticiones teloméricas en el extremo 3' (*K. lactis*) (Natarajan y McEachern 2002).

Los mamíferos cuentan con 2 mecanismos para contrarrestar la pérdida de secuencias teloméricas. La **telomerasa** es el principal factor responsable de extender los telómeros. Alternativamente, algunas células mamíferas disponen de otra vía independiente de la telomerasa y que utiliza mecanismos de recombinación para mantener sus telómeros: **elongación alternativa de los telómeros** (*alternative lengthening of telomeres* o ALT).

5.1. La telomerasa: una transcriptasa inversa con autonomía propia

Se ha sugerido que los eucariotas más tempranos utilizaron una forma primitiva de telómeros en los que la telomerasa no era necesaria para compensar el problema de replicación terminal (de Lange 2004; 2009). Aunque la telomerasa es el principal medio por el que los eucariotas actuales evitan la pérdida de secuencias terminales, los primeros eucariotas pudieron haber existido sin los beneficios de esta ribonucleoproteína o de las proteínas de unión al ADN telomérico (ADNt). El mantenimiento de la estabilidad de los finales cromosómicos podría haberse logrado utilizando estructuras en bucles T, donde la síntesis de repeticiones teloméricas se podría haber generado por factores que estuvieran implicados en la replicación dependiente de recombinación, una forma de replicación del ADN que ya existía antes de la aparición de los primeros eucariotas (de Lange 2004). En un sistema en el que la telomerasa no estuviera presente, ésta podría haberse originado por evolución de los retrotransposones que invadieran el genoma de los eucariotas. De hecho, la subunidad TERT de la telomerasa está relacionada con la enzima que usan muchos retrotransposones y retrovirus. En concreto, la telomerasa parece estar estrechamente relacionada con la transcriptasa inversa de los *non-long-terminal repeat* (non-LTR) *elements*, con la que comparte características funcionales (de Lange 2004). La aparición de la telomerasa trajo consigo ventajas importantes. No sólo resolvía el problema de replicación terminal creando nuevas repeticiones teloméricas donde no existían (síntesis *de novo*), sino que aseguraba la presencia de la misma secuencia en todos los cromosomas, actuando en *cis* y en *trans*. Las proteínas de unión telomérica pudieron evolucionar y con ello conectar los telómeros con otras vías resultando en la regulación precisa de la homeostasis telomérica que existe en los eucariotas actuales, además de permitir distinguir entre los extremos naturales de los cromosomas y el ADN dañado (de Lange 2004; 2009).

5.1.1. Estructura del complejo de la telomerasa

La holoenzima telomerasa (TR), primera responsable del mantenimiento y elongación del extremo 3' de los cromosomas, es una ribonucleoproteína formada por múltiples subunidades entre las que se incluyen la subunidad catalítica transcriptasa inversa (TERT), altamente conservada, la subunidad ARN (TERC o TER), que provee el molde para la síntesis del ADN telomérico, y un *set* de proteínas específicas de cada especie. Estudios *in vitro* han demostrado que TERC y TERT forman parte del núcleo del complejo enzimático activo que es suficiente para la síntesis de las repeticiones teloméricas (Bryan *et al.* 2003; Weinrich *et al.* 1997), mientras que *in vivo* son muchos los factores, implicados en el ensamblaje de la enzima, su actividad y localización, necesarios para el correcto funcionamiento de la holoenzima (Smekalova *et al.* 2012). Un número importante de proteínas accesorias específicas de especie se han descrito con detalle en vertebrados, levaduras (Pfeiffer y Lingner 2013) y ciliados (Witkin y Collins 2004). En los vertebrados, y en particular en humanos, desvelar la estructura de la telomerasa resulta un desafío debido a sus bajos niveles de expresión y a la regulación dependiente del ciclo celular de las subunidades que la componen, a pesar del indiscutible interés que suscita el entendimiento de cómo la estructura afecta a su función (Miracco *et al.* 2014). En los humanos los componentes más estables del complejo enzimático de la telomerasa incluyen TERT, TERC y disquerina [una proteína de unión a ARN que reconoce el motivo *Hinge-hairpin-ACA* (H/ACA)]. Otros componentes potenciales de la telomerasa activa incluyen tres proteínas asociadas a la disquerina conservadas evolutivamente: NOP10, GAR1 y NHP2 (Dragon *et al.* 2000; Fu y Collins 2007; Kiss *et al.* 2006; Pogacíc *et al.* 2000), la proteína EST1A (homólogo a Est1p en levaduras) (Snow *et al.* 2003) y la proteína de localización en los cuerpos de Cajal (implicados en la biogénesis y reciclamiento de las RNPs): WDR79/TCAB1 (Venteicher *et al.* 2009).

La disquerina, una proteína conservada evolutivamente, es el componente más estudiado después de TERT y TERC. En los humanos forma parte de diversos complejos nucleares: los H/ACA snoRNPs, los scaRNPs y la telomerasa activa. TERT, TERC y DYSKERIN son componentes de complejo activo de la telomerasa humana (Cohen *et al.* 2007), y mutaciones en alguno de sus genes son causa en los humanos de un desorden hereditario raro que cursa con alteraciones en los nichos de

stem cells englobadas bajo el nombre común de disqueratosis congénita (DC) (Kirwan y Dokal 2008; Knight *et al.* 2001; Vulliamy *et al.* 2001). El estudio de las mutaciones en el gen *DKC1*, que codifica en los humanos para la proteína disquerina, permitió identificarlo como el responsable de este síndrome ligado al cromosoma X que causaba, entre otros síntomas, envejecimiento prematuro, fallo en la médula ósea, defectos en los reservorios de células troncales e incremento en la susceptibilidad a tumores (Heiss *et al.* 1998). La proteína disquerina participa en parte en la biogénesis de la RNP telomerasa y en la estabilidad de TERC (Bass *et al.* 2000; Cohen *et al.* 2007; Mitchell *et al.* 1999; Mochizuki *et al.* 2004). También se ha demostrado la implicación de otros componentes del complejo de la telomerasa como NOP10, NHP2 (Savage y Bertuch 2010) y TCAB1 (también WDR79 o WRAP53) (Dokal 2011) en el desarrollo de otras formas autosómicas de DC.

Componente transcriptasa inverso (TERT)

La subunidad catalítica de la telomerasa está mucho más conservada entre las distintas especies (en longitud y organización de dominios) en comparación con la subunidad TERC (Sandin y Rhodes 2014). En su estructura se pueden reconocer tres dominios: el dominio de unión al ARN (TRBD), que ha demostrado interactuar con la región CR4/CR5 de TER, el dominio transcriptasa inversa (RT por sus siglas en inglés) y el dominio C-terminal (CTE: *C-terminal extension*), mucho menos conservado. En los mamíferos el dominio central RT está flanqueado por el dominio TEN (*N-terminal extension domain*), con especial afinidad por el ADNcs y que está implicado en el proceso de unión al iniciador, además de facilitar la adición procesiva de las repeticiones teloméricas.

Componente ARN (TERC)

El segundo elemento esencial en el complejo activo de la telomerasa es TERC. Durante muchos años la investigación se ha centrado en el campo de la regulación de TERT al haber sido considerado éste el componente limitante de la actividad telomerasa. Sin embargo, las evidencias demuestran que TERC también es un factor limitante y esencial en la actividad de la enzima y el mantenimiento de los telómeros. Su función no se limita a proveer de un molde para la síntesis de repeticiones teloméricas; sus diferentes componentes participan en la reacción catalítica de la

incorporación de los nucleótidos (Qiao y Cech 2008), median la eficiencia del proceso de translocación (Qiao y Cech 2008), condicionan la asociación de diferentes factores proteicos y el ensamblaje del complejo (Robart y Collins 2010; Robart *et al.* 2010; Theimer y Feigon 2006), juegan un papel clave en el transporte (Cristofari *et al.* 2007; Theimer *et al.* 2007) y regulan la actividad de la telomerasa (Cairney y Keith 2008).

Resulta particularmente interesante que, en oposición a la conservación en longitud y secuencia observada en la subunidad TERT, TERC muestre una gran diversificación evolutiva. La subunidad ARN de la telomerasa tiene un rango de longitud muy divergente entre las especies (desde 147-209 nt en ciliados y 312-559 en vertebrados, hasta los 779-1817 nt de algunas levaduras, siendo el parásito de la enfermedad de la malaria, *Plasmodium falciparum*, quien ostenta el récord en longitud con 2,2 kb). A pesar de las diferencias en longitud y secuencia nucleotídica entre los distintos organismos, su estructura secundaria muestra una elevada similitud, además de contener elementos estructurales muy similares. Todas las TERCs contienen tres elementos importantes para el ciclo catalítico de la RNP: la región molde para la síntesis de las repeticiones teloméricas, el elemento adyacente *pseudoknot* (pseudonudo) -ambos constituyentes del dominio central esencial para la actividad catalítica (Sandin y Rhodes 2014)- y un elemento en forma de *loop* posicionado distalmente (*stem terminus element* o STE) llamado CR4-CR5 (CR: *Conserved Region*) en vertebrados. Estos elementos estructurales de TERC interactúan directamente con TERT (Mitchell y Collins 2000). Las TERCs también contienen motivos que median el plegamiento del ARN, estabilidad, localización y regulación *in vivo*. Los motivos específicos de TERC en vertebrados adoptan un pliegue *hairpin-Hinge-hairpin-ACA* (H/ACA) en su extremo 3' terminal, conservado en los motivos H/ACA de los ARNs nucleolares (snoARNs o *small nucleolas RNAs*) y en los ARNs específicos de los cuerpos de Cajal (scaARNs o *small Cajal body RNAs*), y que son necesarios para su acumulación y el ensamblaje de la enzima (Egan y Collins 2010).

5.1.2. La telomerasa es una enzima procesiva

La actividad telomerasa es regulada durante el ciclo celular y es detectada predominantemente durante las fases S tardía/G2, acoplada a la replicación del ADN telomérico (Marcand *et al.* 2000). Como transcriptasa inversa, la enzima telomerasa

sintetiza una molécula de ADN empleando un molde de ARN. Como el resto de las ADN polimerasas necesita un iniciador, y se vale del extremo libre 3' terminal del telómero para iniciar la síntesis utilizando como molde el componente ARN. La telomerasa, a diferencia de otras RTs, sintetiza un pequeño segmento de su ARN para disociarse después del ADN recién sintetizado y reubicarse nuevamente cerca del iniciador, comenzando con ello un nuevo ciclo de elongación. La procesividad de la telomerasa se define como el número de repeticiones teloméricas sintetizadas antes de la disociación de la enzima (Greider 1991). La habilidad de la telomerasa para utilizar tan sólo una pequeña región de su ARN [8-11 nt en vertebrados (Chen *et al.* 2003)] para su síntesis es inusual y requiere de un mecanismo que facilite la translocación de la enzima, un proceso que implica varios pasos y aún poco conocido (Smekalova *et al.* 2012). Su eficiencia, que depende de varios factores, determina la procesividad de la enzima y varía dependiendo de la especie (Chen y Greider 2003). Así, la telomerasa del ratón y otros miembros de la familia muestra una procesividad significativamente menor que la telomerasa humana (Blasco *et al.* 1995; Prowse *et al.* 1993).

5.1.3. Funciones no canónicas de la telomerasa

La clonación del gen TERT permitió demostrar el papel del acortamiento telomérico en la senescencia celular y la inmortalización celular (Bodnar *et al.* 1998). Debido a su función telomérica, la telomerasa juega un papel crítico en el cáncer, envejecimiento y enfermedades degenerativas. Sin embargo, existen evidencias que demuestran que la función canónica de la telomerasa, es decir, la síntesis de ADN telomérico, no es la única que implica a la enzima en estos procesos. Así, la expresión exógena de TERT en células modificadas o en ratones ha revelado funciones adicionales de la telomerasa en la tumorigénesis (Artandi *et al.* 2002; Canela *et al.* 2004; González-Suárez *et al.* 2001; Stewart *et al.* 2002). Por una parte, TERT afecta a la expresión de genes proliferativos o antiproliferativos, promoviendo el crecimiento celular y proliferación de forma independiente de los telómeros. TERT puede además incrementar la resistencia a los agentes quimioterapéuticos y estímulos proapoptóticos, posiblemente mediante el bloqueo de vía mitocondrial de la muerte celular. Igualmente puede incrementar la adaptación de las células cancerígenas mejorando la actividad mitocondrial y la resistencia a la apoptosis. Por otra parte, TERT contribuye a la estabilización de los telómeros incrementando la vida útil de la

célula sin elongación telomérica, además de modular la estructura de la cromatina y la respuesta a daño de ADN. Para una revisión más detallada consultar (Rubtsova *et al.* 2012) y (Chiodi y Mondello 2012).

5.2. Mecanismo alternativo de elongación telomérica (ALT)

La existencia de un mecanismo independiente de la telomerasa para el mantenimiento de la LT en células que usualmente se valen de la telomerasa se demostró por primera vez en levaduras mutantes nulas para la enzima. Este mecanismo demostró ser dependiente de genes requeridos para la recombinación homóloga (*RAD52*) (Lundblad y Blackburn 1993). Posteriormente se aportaron evidencias de su existencia en eucariotas superiores en trabajos que describían un mantenimiento de la LT en ausencia de actividad telomerasa tanto en líneas celulares humanas immortalizadas (Bryan *et al.* 1997; Bryan *et al.* 1995; Bryan y Reddel 1997; Rogan *et al.* 1995) como en líneas derivadas de ratones deficientes en telomerasa (Hande *et al.* 1999; Rogan *et al.* 1995). Más tarde se demostraron los indicios, anteriormente aportados por Murnane en 1994 (Murnane *et al.* 1994), de la existencia de un mecanismo basado en la recombinación de los telómeros en las células humanas positivas a ALT (ALT+) (Dunham *et al.* 2000). Las características fenotípicas de las líneas que exhibían actividad ALT eran consistentes con la hipótesis de que la copia del ADN telomérico se realizaba por recombinación homóloga. Este mecanismo alternativo no es una condición adquirida derivada del proceso de immortalización *in vitro*, pues los cultivos celulares provenientes de algunos cánceres también demostraron mantener su condición de inmortalidad aun siendo telomerasa-negativos (Kim *et al.* 1994; Murnane *et al.* 1994). Aproximadamente el 85% de los cánceres humanos evaden la senescencia incrementando la actividad telomerasa (Shay y Bacchetti 1997). Del 15% restante, la mayoría son capaces de mantener sus telómeros en ausencia de telomerasa a través de uno o más mecanismos englobados en ALT (Cesare anyd Reddel 2010; Hu *et al.* 2012). ALT se presenta en una amplia variedad de cánceres comunes, como es el cáncer de mama, pero tiende a ser más prevalente en tumores de origen mesenquimático (glioblastoma multiforme, osteosarcomas, algunos tipos de sarcomas de tejidos blandos...), mientras que es relativamente raro en la mayoría de los cánceres derivados del epitelio. La razón podría ser que algunos tejidos epiteliales altamente proliferativos expresan normalmente ciertos niveles de

telomerasa que les permite compensar el acortamiento telomérico derivado de su alta proliferación celular. Esta expresión previa de telomerasa hace más probable que durante la oncogénesis mantengan sus telómeros a través de la sobreexpresión de telomerasa que mediante ALT (Shay *et al.* 2012). Sin embargo, algunos tumores pueden tener tanto actividad ALT como actividad telomerasa (Bryan *et al.* 1997; Costa *et al.* 2006; Henson y Reddel 2010; Johnson *et al.* 2005). En este sentido, se ha hipotetizado que la activación de los mecanismos de ALT podría constituir una respuesta adaptativa de ciertos cánceres resistentes a terapias anti-telomerasa (Bechter *et al.* 2004b; Conomos *et al.* 2013; Hu *et al.* 2012), aunque ciertos experimentos *in vitro* sugieren que la emergencia de actividad ALT ante el uso de inhibidores de la telomerasa es relativamente poco común (Shay *et al.* 2012).

5.2.1. Características fenotípicas de las células ALT+

Los telómeros de las células ALT+ mantienen ciertos atributos canónicos, incluyendo la presencia de secuencias TTAGGG en el ADNdc con un extremo libre rico en G, la presencia del complejo *shelterin* y otras proteínas asociadas a los telómeros, así como la habilidad para formar bucles T. Por otra parte, estas células muestran un número de características inusuales que permiten identificarlas, convirtiéndolas en marcadores útiles de la presencia de actividad ALT, aunque no todas son igualmente específicas de ALT (Cesare y Reddel 2010):

- Abundancia de **repeticiones teloméricas extracromosómicas (ADN RTEC)** (lineal o circular). Este ADN puede tomar múltiples formas: círculos-t de doble cadena (la forma más predominante) (Cesare y Griffith 2004; Wang y others 2004), círculos-C o círculos-G (parcialmente de cadena simple) (Henson *et al.* 2009; Nabetani y Ishikawa 2009), ADN lineal de doble cadena (Ogino *et al.* 1998; Tokutake *et al.* 1998) y complejos-t de ADN de muy alto peso molecular con estructuras probablemente anormales y muy ramificadas (Nabetani y Ishikawa 2009).
- **Heterogeneidad en las longitudes teloméricas.** Presencia de cromosomas con telómeros desde indetectables hasta extremadamente largos (Bryan *et al.* 1997; Bryan *et al.* 1995).

- **Cambios rápidos en la LT.** La distribución de LTs en células ALT+ es dinámica, mostrando los telómeros fluctuaciones individuales en su longitud durante la proliferación celular (Murnane *et al.* 1994; Perrem *et al.* 2001).
- **Elevado nivel de recombinación en los telómeros** (Bechter *et al.* 2004a). La actividad ALT aparece asociada a una elevada frecuencia de eventos de intercambio telomérico entre cromátidas hermanas (T-SCE) (Londoño-Vallejo *et al.* 2004).
- Presencia de **Cuerpos Nucleares PML asociados a ALT (APBs)** (Yeager *et al.* 1999). En las células ALT+ el ADN telomérico (cromosómico o extracromosómico) y proteínas asociadas (complejo *shelterin* y factores de RH como MRN, RAD51 y RAD52, entre otros) se pueden encontrar en una subclase de los Cuerpos Nucleares de la Leucemia Promielocítica (*PML nuclear bodies*, PBNs), denominados por tanto *ALT associated PML bodies* (APBs), el sello característico de las células ALT.

5.2.2. Mecanismos de ALT

A pesar de que generalmente es aceptado que la elongación telomérica en las células ALT+ requiere una etapa de recombinación, el mecanismo molecular por el que elongan los telómeros es todavía incierto. Se han sugerido dos modelos para ello (no mutuamente excluyentes): (1) *Unuequal T-SCE* y (2) Replicación de ADN dependiente de recombinación homóloga (RH) (Cesare y Reddel 2010).

El molde para la síntesis de nuevas repeticiones teloméricas puede ser el telómero de un cromosoma no homólogo (recombinación intertelomérica) (Dunham 2000), secuencias teloméricas del mismo telómero o del telómero de una cromátida hermana (recombinación intratelomérica) (Muntoni 2009), o ADN telomérico extracromosómico (recombinación intertelomérica extracromosómica) (Henson 2002).

(1) *Unuequal T-SCE*:

Las células ALT+ muestran elevadas tasas de eventos de intercambio de ADN telomérico entre cromátidas hermanas (Bechter *et al.* 2004a; Bechter *et al.* 2004b; Londoño-Vallejo *et al.* 2004), referido como *Telomere Sister Chromatid*

Exchange (Figura 3A), y que, como se ha sugerido, resulta en un intercambio desigual conduciendo a la elongación de un telómero junto con el acortamiento del telómero de la cromátida hermana (Bailey *et al.* 2004). Su mecanismo aún se desconoce (Cesare y Reddel 2010).

(2) *Replicación de ADN dependiente de RH:*

Según este modelo, ALT resulta de la síntesis de ADN telomérico nuevo mediada por recombinación utilizando como molde una secuencia telomérica existente en un telómero adyacente (Dunham *et al.* 2000; Henson *et al.* 2002). La inserción de un fragmento de ADN marcador en la secuencia telomérica de las células ALT permitió comprobar que dicha secuencia era copiada de un telómero a otro resultando en un incremento de los telómeros marcados. Acorde con este modelo, la síntesis de ADN da lugar a un incremento neto del ADNt en las células (Figura 3B) (Dunham *et al.* 2000). Dunham y colaboradores habían evidenciado con ello, por primera vez, la existencia de eventos de recombinación interteloméricos en células humanas ALT+.

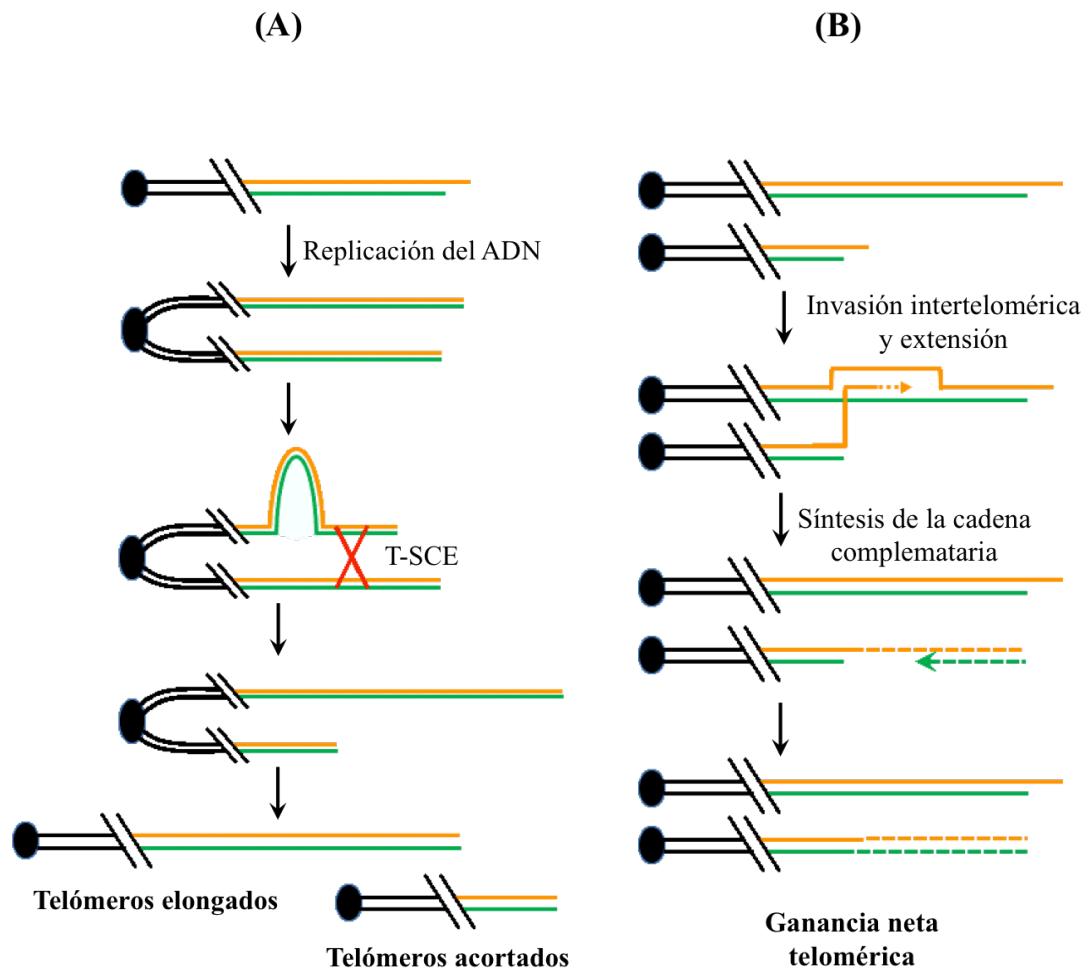


Figura 3. Representación esquemática de los mecanismos de ALT propuestos. (A) Intercambio telomérico entre cromátidas hermanas (*Unuqual T-TSCE*). (B) Replicación del ADN dependiente de RH. Adaptado de Cesare y Reddel 2010.

Sin embargo, en este modelo el molde de ADN no ha de ser necesariamente un telómero de un cromosoma distinto, pudiendo haber más de un mecanismo para ALT (Muntoni *et al.* 2009):

- Copia del ADNt de una cromátida hermana (Intratelomérico entre cromátidas hermanas) (Figura 4A).
- Copia del ADNt a partir de su propia secuencia (Figura 4B). Griffith y colaboradores sugirieron que la estructura en bucles T podría ser utilizada como un mecanismo para elongar los telómeros (Griffith *et al.* 1999).

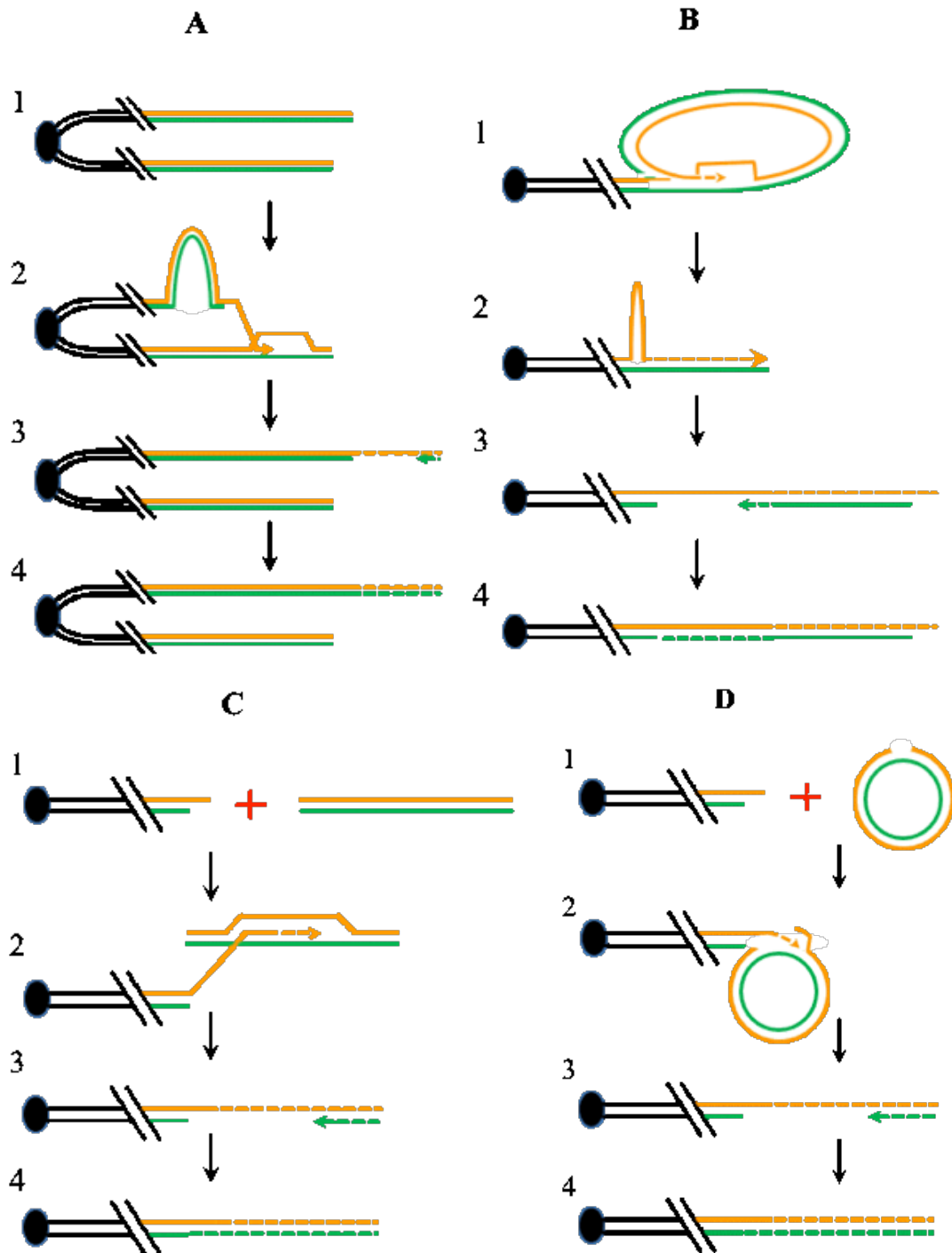


Figura 4. Representación esquemática de los diferentes moldes para ALT. (A) Copia del ADN telomérico de una cromátida hermana. Cromátidas hermanas unidas por el centrómero (1) e invasión telomérica de una cromátida hermana (2). Síntesis de la cadena complementaria (3) y ganancia neta telomérica (4). (B) Duplicación a partir de bucles T. Polimerización del ADN dentro del bucle T (1). Duplicación de la hebra G y posible división de la hebra C (2). Síntesis de la cadena complementaria (3) y ganancia neta telomérica (4). (C) y (D) Síntesis telomérica a partir de fragmentos teloméricos extracromosómicos de ADN RTEC lineal (C) o circular (D). Invasión de la cadena y extensión (2), síntesis de la cadena complementaria (3) y elongación telomérica neta (4). Adaptado de Cesare y Reddel 2010.

La escisión del *loop* del ADN telomérico de los bucles T podría además generar fragmentos extracromosómicos de ADN (ADN RTEC) (lineal o circular) que podrían participar en la elongación de otros telómeros (Henson *et al.* 2002). Aunque esto aún no ha sido demostrado en células mamíferas, la abundancia de ADN RTEC en células ALT+ hace razonable pensar que, de manera análoga a como ocurre con la duplicación del telómero de otro cromosoma, un fragmento de ADN RTEC lineal pueda servir también como molde (Figura 4C). Del mismo modo, los círculos-t (Figura 4D) podrían ejercer de molde para la extensión telomérica mediada por un mecanismo de círculo rodante (*rolling circle mechanism*), como se ha visto en levaduras (Tomaska *et al.* 2009). Los círculos C, que *in vitro* han demostrado ser un potencial sustrato para la amplificación mediante este método de círculo rodante (Henson *et al.* 2009), podrían servir también como sustrato en las células ALT *in vivo*.

5.2.3. ALT en las células mamíferas

Teniendo en cuenta que la mayoría, si no todas, las moléculas implicadas en los mecanismos de ALT están presentes en las células normales (Cesare y Reddel 2010), ¿qué evita que se active este mecanismo en todas las células? La actividad ALT durante el desarrollo del cáncer podría ser considerada como una versión desregulada de un proceso natural en la biología telomérica (Conomos *et al.* 2013). Mecanismos tipo ALT existen en los mamíferos bajo condiciones fisiológicas normales, tal como evidencian los hallazgos observados durante la primera división del embrión de ratón (Liu *et al.* 2007) y más recientemente en algunas células somáticas del ratón (Neumann *et al.* 2013). La actividad ALT podría reflejar el proceso mediante el cual los primeros eucariotas elongaban sus telómeros, siendo los bucles T un posible vestigio de la estructura entonces empleada. Con la aparición de la telomerasa y la adquisición del estricto control que ejerce sobre los telómeros, la represión de los mecanismos de replicación de los telómeros que utilizan esta estructura se convierte en algo esencial para controlar una excesiva extensión telomérica (de Lange 2004). Los mecanismos por los que las células normales evitan mantener sus telómeros mediante ALT se desconocen, aunque los experimentos con linajes celulares híbridos de células normales o telomerasa positivas y células ALT+ han demostrado que la activación de la vía ALT requiere la pérdida de una o más funciones represoras (Perrem *et al.* 1999).

6. FACTORES QUE REGULAN LA LONGITUD TELOMÉRICA: ACTORES DE LA HOMEOSTASIS TELOMÉRICA

La longitud telomérica específica de la especie está determinada por el balance que existe entre los mecanismos de elongación y los de acortamiento (Pickett *et al.* 2011). A pesar de sus actividades opuestas, en ciertos tipos celulares los telómeros se pueden mantener de manera que no exista una ganancia o pérdida neta. La alteración de los niveles de la telomerasa o las actividades de acortamiento telomérico, así como la prevención del acceso de estas actividades a los telómeros, pueden modular este balance resultando en cambios en el equilibrio estacionario de los telómeros.

6.1. La telomerasa

La telomerasa es el elemento central en este escenario, y la diana principal de los mecanismos reguladores positivos y negativos de la longitud telomérica. Su actividad puede ser modulada de una muy amplia variedad de formas: desde regulando los niveles de la enzima (controlando su expresión), su ensamblaje o actividad, hasta controlando su acceso a los extremos de los cromosomas.

6.1.1. Control transcripcional de TERT y TERC y procesamiento de transcritos (*splicing*) alternativo

El control transcripcional de hTERT tiene un papel crucial en la compleja regulación de la actividad enzimática. La represión de la expresión de hTERT en células normales podría controlarse mediante la metilación del promotor y exones en 5' (Renaud *et al.* 2007). La regulación transcripcional del componente ARN tan sólo se conoce parcialmente. El promotor de hTERC es activado por SP1 y reprimido por Sp3, mientras que JNK reprime la actividad del promotor y con ello su expresión, favoreciendo la represión de Sp3 (De Cian *et al.* 2008). Por otro lado, el procesamiento (*splicing*) alternativo del ARN mensajero (específico de tejido, estadio de desarrollo y sexo) es un mecanismo de control de la expresión génica común en los eucariotas superiores. Se han identificado diez variantes de TERT resultado de este procesamiento alternativo en humanos (Hisatomi *et al.* 2003; Kilian *et al.* 1997;

Saebøe-Larssen *et al.* 2006; Ulaner *et al.* 1998; Ulaner *et al.* 2000), lo que sugiere un importante papel de este mecanismo en la regulación de la telomerasa.

6.1.2. Regulación postranscripcional

La regulación de la holoenzima por mecanismos postranscripcionales juega también un papel esencial en la modulación de la actividad telomerasa (Cong *et al.* 2002). Ésta puede ocurrir vía fosforilación reversible de la subunidad catalítica TERT en residuos específicos de serina/treonina o tirosina. El estatus de fosforilación de la telomerasa puede afectar tanto a su estructura como a su localización y actividad enzimática (Aisner *et al.* 2002; Cong *et al.* 2002):

- Elementos responsables de la represión de la telomerasa. La tirosina kinasa c-Abl inhibe la actividad telomerasa a través de su fosforilación (Cong *et al.* 2002; Kharbanda *et al.* 2000; Sawyers *et al.* 1994), mientras que la proteína fosfatasa PP2A ejerce esta misma función inhibidora a través de la desfosforilación de TERT (Avci *et al.* 2007).
- Elementos responsables de la activación de la telomerasa. La kinasa Akt (proteína kinasa B o PKB) aumenta la actividad de la enzima a través de la fosforilación de TERT (Jacinto *et al.* 2006; Kang *et al.* 1999). La proteína kinasa C (PKC), en concreto la PKC α , fosforila tanto TERT como la proteína asociada a la telomerasa hTEP1 (Li *et al.* 1998). Se ha demostrado que la ausencia de fosforilación imposibilita su translocación al núcleo en células cancerígenas de la próstata. La expresión de otras isoenzimas de PKC (β , δ y ζ) se ha correlacionado con una mayor actividad de la telomerasa en células cancerígenas a través de su fosforilación (Chang *et al.* 2006; Yu *et al.* 2001).

6.1.3. Transporte al núcleo de TERT y TERC y ensamblaje de la telomerasa

En el transporte y biogénesis de la telomerasa participan múltiples estructuras nucleares. La hipótesis más probable apunta a que TERT es transportada inicialmente al núcleo, donde el complejo es ensamblado posteriormente. Esto se ve apoyado por

el hecho de que la mayoría del componente TERC (hTERC) (Hiyama *et al.* 2001), así como otros componentes del complejo (p23 y Hsp90) (Forsythe *et al.* 2001), están presentes en el núcleo. Se han identificado varios factores implicados en la translocación al núcleo de TERT, como las proteínas 14-3-3 (Seimiya *et al.* 2000), el factor nuclear NKκB p65 (Akiyama *et al.* 2003) y Shp-2 (Jakob *et al.* 2008). En las células normales, tras su transporte al núcleo desde el citoplasma, TERT es trasladada al nucléolo (Wong *et al.* 2002), mientras que en las células cancerígenas se distribuye mayoritariamente en el nucleoplasma, donde se encuentra su sustrato, los telómeros (Lin *et al.* 2007). Los factores que retienen a la telomerasa en el nucléolo (hPinX1) podrían evitar su interacción con el sustrato en el nucleoplasma, inhibiendo por tanto la actividad telomerasa (Lin *et al.* 2007; Wong *et al.* 2002; Zhou y Lu 2001), mientras que aquellos que mantienen a la telomerasa en el nucleoplasma (nucleolin) la dejan preparada para su traspaso a los telómeros (Khurts *et al.* 2004).

TERC se encuentra durante la mayor parte del ciclo celular en unas estructuras subnucleares conocidas por ser lugares de ensamblaje de las RNPs y de modificación de los ARNs (Cioce y Lamond 2005): los cuerpos de Cajal. Durante la mayor parte del ciclo celular los dos componentes principales de la telomerasa permanecen separados. En la fase S temprana, TERT es translocada al nucléolo, al mismo tiempo que los cuerpos de Cajal (conteniendo el componente TERC) se acumulan en la periferia. Su localización en el nucléolo coincide en el tiempo con TERT, y además actúan como transmisores de la telomerasa a los telómeros en la mitad de la fase S (Jády *et al.* 2006). Algunos dominios y motivos proteicos de la subunidad ARN (como la caja CAB y el motivo H/ACA) (Jády *et al.* 2004; Lukowiak y others 2001) influyen en la translocación de TR a los cuerpos de Cajal y al nucléolo. De forma análoga, un dominio de TERT (*Nucleolar localization domain*, NoLD) (Etheridge *et al.* 2002) es conocido por mediar la translocación nucleolar de TERT.

TERT y TERC son necesarios y suficientes para la actividad telomerasa *in vitro*. Sin embargo, *in vivo*, el complejo de la telomerasa está formado por múltiples proteínas que facilitan su actividad. De la misma manera que ocurre con el transporte al núcleo de la subunidad TERT, el ensamblaje del complejo telomerasa también puede ser regulado durante el ciclo celular, pudiendo ocurrir durante la fase S para luego desensamblarse durante la fase M. La compartimentalización de las dos subunidades previene su unión prematura, manteniéndolas lejos del sustrato, los

telómeros. Aunque se cree que el ensamblaje se lleva a cabo en los cuerpos de Cajal (Armanios y Blackburn 2012), son necesarios más estudios para establecer de qué factores depende (Wojtyla *et al.* 2011).

6.2. Proteínas teloméricas

Actualmente se conoce un elevado número de proteínas de unión a los telómeros que han demostrado jugar un papel crucial en su protección y como reguladoras de la actividad telomerasa. La estructura dinámica del complejo *shelterin*, implicada en la generación de los bucles T, junto con otras proteínas accesorias, controla el acceso de la telomerasa a los cromosomas y la síntesis del ADN telomérico por parte de la telomerasa, actuando principalmente como un regulador negativo (Wojtyla *et al.* 2011).

TRF1 y TRF2, a través de la formación y estabilización de los *T loops*, son las principales proteínas del complejo *shelterin* responsables de este control negativo de la longitud telomérica en mamíferos. Ambas actúan reprimiendo la elongación telomérica actuando en *cis* (Smogorzewska *et al.* 2000). TIN2 es un regulador negativo de la elongación telomérica a través de su interacción con TRF1 (Chiang *et al.* 2004; Kim *et al.* 2003; Kim *et al.* 1999). La proteína hRAP1 ha sido identificada como una proteína que interacciona específicamente con TRF2 (Li *et al.* 2000) y regula negativamente la LT *in vivo* (Li y de Lange 2003; O'Connor *et al.* 2004; Wojtyla *et al.* 2011). Por otra parte, POT1 regula la longitud telomérica y protege los telómeros del daño a ADN, degradación y fusiones cromosómicas (Churikov *et al.* 2006; Loayza y De Lange 2003). Ésta se une directamente al extremo 3' del telómero y a posiciones internas a través de su interacción con TRF1, sirviendo como un transductor del control de la LT de TRF1 (Loayza y De Lange 2003). Además, se asocia también con TPP1, que se ha propuesto como un factor de reclutamiento de POT1 a los telómeros que heterodimeriza con el mismo, mejorando su afinidad por la cadena simple de ADN (Wang *et al.* 2007; Xin *et al.* 2007); este posicionamiento del dímero POT1-TPP1 previene la unión de la telomerasa al extremo de los cromosomas (de Lange 2005).

TPP1 originalmente se describió como un factor de unión entre TRF1 y TRF2 que funcionaba en una vía junto con POT1 como regulador negativo de la LT

dependiente de la telomerasa (Hockemeyer *et al.* 2007). Actualmente se conoce que también actúa como regulador del reclutamiento de la telomerasa, su activación y actividad (Karlseder 2014; Nandakumar *et al.* 2012; Sexton *et al.* 2014) gracias a la interacción de un dominio N-terminal en TPP1 con hTERT (Zhong *et al.* 2012). El complejo POT1-TPP1 alterna entre la inhibición del acceso de la telomerasa, como componente de *shelterin*, y la actuación como un factor de procesividad para la telomerasa durante su extensión (Wang *et al.* 2007; Xin *et al.* 2007).

Otras proteínas no pertenecientes al complejo *shelterin*, y que interaccionan con TRF1 (Tankyrasa 1 y 2, y PINX1), se han identificado también como reguladores negativos de la LT. Así, PINX1 forma complejos estables con la subunidad catalítica de la telomerasa (a través de su dominio TID: *telomerase inhibitory domain*) y TRF1, inhibiendo con ello la actividad de la enzima (Zhou y Lu 2001).

6.3. Función de los cuádruples G en la regulación de la longitud telomérica

La formación de cuádruples G, una estructura helicoidal de ADN que aparece en tramos ricos en nucleótidos de guanina, en el extremo 3' libre del ADN telomérico puede inhibir la actividad telomerasa (Zahler *et al.* 1991). Por una parte, los compuestos que inducen y estabilizan los cuádruples G teloméricos son capaces de desplazar a la telomerasa (Burger *et al.* 2005; Sun *et al.* 1997) y a proteínas de unión al ADNt, como TRF2 y POT1 (Gomez y others 2006a; Gomez *et al.* 2006b; Tahara *et al.* 2006). A su vez, la proteína POT1, responsable de atrapar el extremo libre de ADN telomérico, puede alterar los cuádruples G en los telómeros permitiendo su extensión por la telomerasa (Zaug *et al.* 2005). En este contexto, las moléculas pequeñas que estabilizan los cuádruples G constituyen una vía prometedora para el desarrollo de posibles agentes anticancerígenos (Gaynutdinov *et al.* 2008; Hurley 2001; 2002; Hurley *et al.* 2000; Neidle y Read 2000). Sin embargo, estos agentes que interactúan con el extremo libre 3' terminal son más que simples inhibidores de la actividad telomerasa (Riou 2004). Su actividad anticancerígena también se basa en la alteración de la función de *capping* y el consecuente mantenimiento telomérico. Así, la supresión del crecimiento celular observada por el efecto de estos agentes va asociada al estímulo de la respuesta celular al daño de ADN mediada por *uncapping* telomérico, con la consecuente degradación de extremo libre 3' y deslocalización de

TRF2 y POT1 de los telómeros. Este acortamiento y *uncapping* telomérico provocaría una respuesta a corto plazo de apoptosis/senescencia en las células cancerígenas humanas (Wang *et al.* 2014), justificando así su potencial anticancerígeno.

6.4. Regulación epigenética de la longitud telomérica

En las células mamíferas tanto los telómeros como las regiones subteloméricas adyacentes presentan características de **heterocromatina**. La heterocromatina, en oposición a lo que ocurre en la cromatina abierta, transcripcionalmente activa o **eucromatina**, se considera transcripcionalmente silente. A nivel epigenético, las modificaciones de las proteínas y del ADN que dan lugar a la aparición de la heterocromatina comprenden diversas modificaciones de las histonas, hipermetilación del ADN e incorporación de variantes de histonas (Draskovic y Londono Vallejo 2013).

La metilación del ADN es llevada a cabo por las ADN metiltransferasas (DNMTs). En los mamíferos DNMT1 es responsable de copiar las marcas de metilación durante la replicación, mientras que DNMT3a y DNMT3b son responsables de la metilación *de novo* del ADN (Okano *et al.* 1998). Al carecer de islas CpG, los telómeros no sufren metilación; sin embargo, las regiones subteloméricas de los mamíferos tienen una alta densidad de secuencias CpG que se encuentran altamente metiladas en las células somáticas (Brock *et al.* 1999). Las evidencias mostradas en los estudios en ratón sugieren que la metilación del ADN de las regiones subteloméricas juega un papel importante en la regulación de la LT. La eliminación de DNMT1 o DNMT3a y DNMT3b resulta en una reducción del nivel de metilación en los dominios subteloméricos acompañada de una elongación dramática de los telómeros en células de ratón y un incremento de los eventos de recombinación en los telómeros (Gonzalo *et al.* 2006). Aunque los estudios en ratones sugieren que los mecanismos tipo ALT de mantenimiento telomérico están facilitados por la pérdida de metilación en las regiones subteloméricas, faltan evidencias que demuestren su conservación en humanos (Draskovic y Londono Vallejo 2013).

La pérdida de DNMTs en estas células de ratón no abolió otras marcas típicas de la heterocromatina, como la trimetilación de la H3K9, o la trimetilación de la H4K20 (Gonzalo *et al.* 2006). Los telómeros también cuentan con otras marcas de la

heterocromatina como la reducida acetilación de H3 y H4 y la presencia de la proteína HP1 (Draskovic y Londono Vallejo 2013). Las modificaciones de las histonas también se han relacionado con la regulación de la longitud telomérica en las células mamíferas. Así, la pérdida de la trimetilación de H3K9 y H4K20 en telómeros resulta en una elongación telomérica en células de ratón (García-Cao *et al.* 2002b; García-Cao *et al.* 2004). En los humanos las modificaciones de las histonas presentes en los telómeros son poco conocidas aún, pero un estudio ha confirmado la presencia en células humanas del mismo tipo de marcas de la heterocromatina encontradas en ratones (O'Sullivan *et al.* 2010).

También se ha sugerido que la LT puede autorregularse actuando sobre las marcas epigenéticas: en los telómeros cortos se pierden marcas de heterocromatina creando un contexto favorable a la elongación telomérica, mientras que una elongación telomérica aberrante mediada por deficiencia a Dicer1 o DNMT da lugar a un aumento de la densidad de las marcas heterocromáticas de los telómeros, que impiden una mayor elongación (Schoeftner y Blasco 2009). Los descubrimientos hasta ahora realizados apoyan un modelo en el que el número de repeticiones TTAGGG en los telómeros dirige el estatus epigenético de la heterocromatina en *cis* y ejerce un efecto en *trans* en la estructura de la cromatina de las regiones subteloméricas (Schoeftner y Blasco 2009). En este sentido, el acortamiento de los telómeros es causa del cambio desde un estado inactivo hacia un estatus más “abierto” de la cromatina telomérica, que favorecería la elongación por la telomerasa o por recombinación en los telómeros (Benetti *et al.* 2007).

6.5. TERRA (ARN que contiene repeticiones teloméricas)

Habiéndose considerado a los telómeros transcripcionalmente silentes debido a sus características de heterocromatina, el descubrimiento de que podían ser transcritos activamente a ARN telomérico fue sorprendente (Azzalin y others 2007). Hoy en día se conoce que los telómeros son transcritos de una manera específica de la cadena por una ARN polimerasa tipo II, generando un tipo de ARN largo no codificante (lncARN), ricos en G y de longitud heterogénea, conocidos como TERRA (*Telomeric Repeat containing RNA*) (Azzalin *et al.* 2007; Schoeftner y Blasco 2008).

Varias funciones han sido propuestas para los TERRA, aunque falta mucho por conocer sobre su papel biológico:

- **Función reguladora de la telomerasa:** TERRA son capaces de interactuar con la enzima telomerasa en células mamíferas. La secuencia de TERRA es complementaria al dominio molde de TR, por lo que tiene el potencial de regular negativamente a la enzima (Redon *et al.* 2010). Los experimentos *in vitro* utilizando oligonucleótidos que mimetizan a los TERRA (UUAGGG)₃ sugirieron que TERRA puede inhibir la actividad telomerasa en los humanos (Redon *et al.* 2010; Schoeftner y Blasco 2008). Experimentos en *S. cerevisiae* también demuestran que TERRA regula la actividad telomerasa *in vitro* (Sandell *et al.* 1994) e *in vivo* (Luke y others 2008) actuando como un inhibidor de la telomerasa. TERRA también puede interactuar con TERT de manera independiente de TERC (Cifuentes-Rojas y Shippen 2012).
- **Función estructural:** TERRA interacciona con numerosas proteínas de unión a ARN (López de Silanes *et al.* 2010), promoviendo cambios en las proteínas teloméricas (Flynn *et al.* 2011). En las células mamíferas una fracción de los TERRA se asocia a los telómeros, y estas moléculas se han propuesto como reguladores del mantenimiento de la estructura de los telómeros así como de la formación de la heterocromatina (Arnoult *et al.* 2012; Deng *et al.* 2012). Estudios recientes han demostrado que la elongación telomérica reprime la expresión de TERRA en las células mamíferas, debido a un incremento en la densidad de las marcas de heterocromatina presentes en los telómeros más largos (Arnoult *et al.* 2012). Las evidencias indican además que TERRA puede mediar el intercambio de TBPs (proteínas de unión a los telómeros) de unión a ADNcs durante el ciclo celular, promoviendo el *capping* (o protección) telomérico (Flynn *et al.* 2011).

Aunque los hallazgos anteriores sugieren un papel potencial de TERRA como regulador negativo de la telomerasa, no existen todavía evidencias *in vivo* en mamíferos (Farnung *et al.* 2012), y ciertos experimentos recientes en levaduras sugieren que TERRA podría actuar como regulador positivo de la telomerasa. Esta visión es controvertida porque la inducción de la expresión forzada de TERRA en

levaduras acorta los telómeros de una manera independiente de la telomerasa (Maicher *et al.* 2012; Pfeiffer y Lingner 2012). Sin embargo, la función del TERRA de expresión endógena no quedó esclarecida en estos trabajos y se ha observado que el acortamiento telomérico en levaduras induce la expresión endógena de TERRA (Deng *et al.* 2012), conduciendo a la acumulación de moléculas de TERRA en un foco individual perinuclear (Cusanelli *et al.* 2013). Este último trabajo, basado en la visualización simultánea del ADN telomérico, TERRA y telomerasa, propone un interesante modelo en el que TERRA secuestra y dirige a la telomerasa a aquellos telómeros que más elongación necesitan, lo que explicaría la acción preferencial de la telomerasa en los telómeros cortos (Liu *et al.* 2002b). Estos focos de TERRA no son exclusivos de las levaduras, habiéndose descrito también en los mamíferos (Azzalin *et al.* 2007; Schoeftner y Blasco 2008), en los que se han encontrado en el núcleo de células altamente proliferativas y en una variedad de cánceres (Deng *et al.* 2012). La asociación de las moléculas de TERRA con el final de los cromosomas, por tanto, no es estable, pudiéndose reubicar en otros compartimentos nucleares. Con base en estos hallazgos, se ha propuesto que los TERRA ejercen un papel en la organización espacial de la telomerasa (Cusanelli *et al.* 2013).

6.6. Regulación negativa de la longitud telomérica por recortamiento telomérico

En los mamíferos la pérdida pasiva gradual de secuencia telomérica que ocurre con cada ciclo celular no es el único factor de pérdida telomérica, ya que también existen actividades de degradación activa. Los telómeros excesivamente largos pueden verse sometidos a una rápida pérdida de sus repeticiones por la resolución de los bucles T, un mecanismo que ha sido denominado RDT (*rapid deletion of telomeres*) (Lustig 2003), o “recortamiento telomérico” (*telomere trimming*), haciendo referencia a un fenómeno que evita la delección completa de los telómeros (Pickett *et al.* 2009). La importancia de este mecanismo como medio de control de longitudes teloméricas excesivas queda patente por su conservación en los distintos organismos: levaduras (Lustig 2003), plantas (Watson y Shippen 2007) y mamíferos (Pickett *et al.* 2011). Este recortamiento telomérico puede ser detectado por la presencia de ECTR, predominantemente en forma de círculos-t como resultado probable de la resolución mediada por RH de las *Holliday Junctions* (HJ) de los bucles T (Pickett *et al.* 2011), y fue identificado por primera vez en células

cancerígenas en las que la inducción de un aumento de la actividad telomerasa había elongado artificialmente los telómeros (Pickett *et al.* 2009). En esta línea, la abundancia de círculos-t en las células ALT+ (Wang *et al.* 2004) quizás se deba a eventos de recortamiento telomérico para contrarrestar la elevada elongación mediada por ALT (Cesare y Reddel 2010). Además, en los humanos la presencia de círculos-t ha sido también confirmada en dos tipos celulares en los que existe elongación telomérica mediada por telomerasa: la línea germinal masculina y los linfocitos activados. Estos círculos-t extracromosómicos también se han aislado del riñón, hígado, testículo y cerebro de las especies *Mus musculus castaneus* y *Mus musculus musculus*, donde un mecanismo de recortamiento telomérico podría contribuir al establecimiento de un límite en la LT en un organismo con una elevada expresión de telomerasa (Pickett *et al.* 2011). De acuerdo con esta hipótesis, el recortamiento telomérico ha sido propuesto como un medio para acortar los telómeros, vía resolución de las HJ (*Holliday Junctions*) presentes en los bucles T, cuando la elongación telomérica llevada a cabo por la telomerasa, o por un método alternativo, supera un umbral específico del individuo, y quizás del tejido (Pickett *et al.* 2011).

7. MÉTODOS DE ANÁLISIS DE LA LONGITUD TELOMÉRICA

Los métodos de cuantificación de la longitud telomérica han evolucionado desde los análisis iniciales de poblaciones celulares hacia el análisis de células individuales, con métodos cada vez más automatizados y con mayor sensibilidad, capaces de detectar pequeñas variaciones en LT entre muestras. La elección del método depende en gran medida del tipo de muestra analizada, particularmente de la cantidad de ADN disponible para el análisis, aunque también se tienen en cuenta otros factores como el número de muestras a analizar y la reproducibilidad de la técnica. De entre los distintos métodos de análisis de la longitud telomérica, tres son los más ampliamente extendidos: el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF), la hibridación in situ fluorescente (FISH) y la PCR en tiempo real.

El análisis mediante *Southern blot* de los fragmentos de restricción terminal (TRF) es la técnica que se ha venido usando desde los primeros estudios de longitud telomérica y sigue siendo un método ampliamente utilizado (Vera y Blasco 2012). La técnica consiste en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción, la cual

da lugar a fragmentos de restricción terminal que contienen las repeticiones teloméricas y secuencias subteloméricas de longitud variable. Estos fragmentos de ADN de restricción terminal se separan mediante electroforesis y se hibridan con una sonda marcada (radiactiva o no radiactiva) específica para la secuencia telomérica. El resultado es un bandeo cuyo análisis por densitometría proporciona una estimación de la media del número de repeticiones teloméricas por muestra. El principal problema de esta técnica es que los TRF también incluyen parte de las secuencias subteloméricas.

Los métodos de medida de la LT basados en la hibridación *in situ* fluorescente (FISH) de los telómeros resuelven el problema de la falta de precisión debida a la presencia de secuencias subteloméricas en los TRF (Lansdorp *et al.* 1996). La técnica consiste en la hibridación telomérica con sondas PNA (péptidos sintéticos homólogos al ADN telomérico) fluorescentes, y permite medir la longitud telomérica no sólo en células individuales, sino también a nivel cromosómico. La FISH telomérica cuantitativa en metafases (Q-FISH convencional) es uno de los métodos más precisos y sensibles disponibles (con un límite de detección de 0,15 kb) (Poon *et al.* 1999) para medir telómeros individuales por núcleo en una población celular y, a diferencia del análisis de los TRF que requiere del orden de 10^6 células, la FISH cuantitativa puede realizarse con tan sólo 20 metafases. Sin embargo, al igual que en el análisis de los TRF, se trata de una técnica muy laboriosa y requiere de mucho tiempo para su realización. Su bajo rendimiento (tan sólo se pueden analizar unas pocas muestras al mismo tiempo) es mejorado por una combinación de la técnica de FISH y la técnica de citometría de flujo (*Flow-FISH*). Sin embargo, la técnica de *Flow-FISH* tan sólo proporciona valores de longitud telomérica media por célula. También se ha desarrollado una plataforma automatizada de FISH telomérica cuantitativa de alto rendimiento (HT Q-FISH) que permite el análisis de un elevado número de muestras proporcionando tanto datos de longitud telomérica media como porcentajes de telómeros cortos por célula (a menudo objeto de estudio en los análisis poblacionales humanos) (Canela *et al.* 2007). El principal problema de esta técnica es que depende en gran medida de la eficiencia de hibridación de la sonda a la secuencia telomérica, que puede variar en función de la conformación de la cromatina de la región telomérica. Como la conformación de la cromatina depende del estatus epigenético y durante el desarrollo preimplantacional y la gametogénesis tienen lugar grandes

variaciones en las marcas epigenéticas, este método puede generar cierta controversia. Por ejemplo, los valores de LT del espermatozoide cuantificando los TRF (Baird *et al.* 2006; Kimura *et al.* 2008; Kozik *et al.* 1998; Pickett *et al.* 2011) duplican los obtenidos por qFISH (Turner y Hartshorne 2013).

El análisis de la longitud telomérica mediante PCR cuantitativa (qPCR) es un método ampliamente utilizado cuando se dispone de poca cantidad de ADN, ya que 20 ng de ADN son suficientes para el análisis. A diferencia del análisis de los TRF y en común con la FISH, el fragmento amplificado no incluye la región subtelomérica. En contraste con la FISH, el análisis mediante PCR no requiere células vivas en metafase II y no se ve afectado por la conformación cromatínica de los telómeros. En este sentido, se ha observado que la consistencia de los análisis de la LT en embriones preimplantacionales de ratón entre distintas cepas es mayor mediante qPCR que mediante FISH (Liu *et al.* 2007). Además, es aplicable a estudios a gran escala, pues es un método rápido. Sin embargo, a diferencia de FISH, no permite cuantificar los telómeros individualmente, proporcionando una información de la longitud telomérica media por muestra [una limitación que supera el análisis telomérico mediante el método basado en la PCR de STELA (*Single Telomere Length Analysis*)]. La principal limitación para el desarrollo de una técnica de cuantificación telomérica mediante amplificación por PCR fue la escasa complejidad de la secuencia telomérica, formada por repeticiones de las secuencias TTAGGG y CCCTAA que impedían el diseño de cebadores no complementarios entre sí, un requisito indispensable para evitar la formación de dímeros de oligonucleótidos. Esta limitación fue superada con el diseño de unos cebadores modificados en los que la inclusión de discordancias entre las bases permitió amplificar un producto de PCR libre de productos derivados de la formación de dímeros. Cawthon y colaboradores desarrollaron un método basado en el empleo de estos cebadores para amplificar la secuencia telomérica (T) en paralelo con la amplificación de un gen de referencia de una sola copia (S) (Cawthon 2002). La amplificación del gen S sirve como medida indirecta de la cantidad de ADN presente en la muestra, de modo que el ratio T/S equivale a la cantidad de ADN telomérico relativizada a la cantidad de ADN total presente en la muestra. De este modo, el ratio T/S proporciona una medida relativa de la longitud telomérica media. La qPCR no provee valores absolutos de longitud

telomérica en kb, a menos que se incluya un oligómero estándar de referencia (O'Callaghan y Fenech 2011).

8. ELONGACIÓN TELOMÉRICA DURANTE EL DESARROLLO PREIMPLANTACIONAL

La elongación telomérica que tiene lugar durante el desarrollo preimplantacional desde la formación del cigoto hasta el blastocisto podría determinar las reservas teloméricas del recién nacido (Schaetzlein *et al.* 2004), las cuales ejercen un papel fundamental en el desarrollo postnatal y la salud en la edad adulta. Por ejemplo, la presencia de mutaciones en los componentes de la telomerasa da lugar a un acortamiento telomérico responsable del síndrome de envejecimiento prematuro (Armanios *et al.* 2009). En las familias con diqueratosis congénita el fallo orgánico característico de la enfermedad es más severo y se establece más tempranamente con el paso de sucesivas generaciones debido a un acortamiento telomérico progresivo, un fenómeno conocido como "anticipación génica" (Vulliamy *et al.* 2001). En ratones la herencia de un fenotipo telomérico corto es suficiente para generar los defectos degenerativos del envejecimiento, incluso en presencia de una telomerasa no mutada (*wild-type*) (Armanios *et al.* 2009), que son similares a los encontrados en pacientes con disqueratosis congénita. El acortamiento telomérico natural también se ha asociado a muerte prematura debido a infecciones en la tercera edad (Cawthon *et al.* 2003). En este sentido, el estudio de la elongación telomérica durante el desarrollo preimplantacional resulta muy relevante en el ámbito del origen embrionario de la enfermedad adulta.

La longitud telomérica de los distintos tipos celulares destinados a formar el individuo experimenta una serie de cambios a lo largo del periodo vital, generalmente motivados por la acción de la telomerasa y las actividades de acortamiento telomérico. En las células germinales, precursoras de los gametos, la telomerasa asegura la segregación de la LT a través de un programa de elongación activo y mantenimiento de los telómeros (Achi *et al.* 2000; de Lange *et al.* 1990) que compensa el acortamiento derivado de su intensa proliferación. Aunque existen diferencias entre la gametogénesis masculina y femenina (Siderakis y Tarsounas 2007), ambos sexos experimentan una disminución de la actividad telomerasa en la

línea germinal durante la maduración de los gametos (Achi *et al.* 2000; Eisenhauer *et al.* 1997; Wright *et al.* 1996). Tras la unión de los gametos (singamia) los mecanismos de mantenimiento/elongación de los telómeros son de nuevo imprescindibles para contrarrestar la pérdida de LT motivada por la intensa proliferación celular que acontece durante el desarrollo embrionario y fetal. En este contexto, la LT del ovocito maduro es inferior a la del embrión temprano y la de las células somáticas (Liu *et al.* 2007); por tanto, los mecanismos de regulación de la longitud telomérica durante esta etapa del desarrollo parecen tener una gran influencia en la LT del recién nacido. Dado que el ovocito posee una baja actividad telomerasa, el aumento de la LT mediante esta enzima depende de la telomerasa transcrita por el genoma embrionario. En los mamíferos la transcripción del genoma embrionario comienza poco después de la fecundación tras un proceso que se conoce como transición materno-embrionaria (TME) y que culmina con la reprogramación de la expresión génica, un proceso crítico para el desarrollo embrionario normal. El inicio de la activación del genoma embrionario (AGE) varía dependiendo de la especie (Braude *et al.* 1988; Crosby *et al.* 1988; Frei *et al.* 1989; Jarrell *et al.* 1991; Latham *et al.* 1991), aunque en todas las especies estudiadas la actividad telomerasa permanece baja o ausente en los primeros estadios del desarrollo, anteriores o cercanos a la AGE. Después, en el estadio de mórula, el aumento en la expresión y actividad de la enzima da lugar a una elongación de los telómeros en la transición de mórula a blastocisto en ratones, vacas y humanos (Liu *et al.* 2007; Schaezlein *et al.* 2004; Wright *et al.* 2001). Esta elongación dependiente de la telomerasa alarga los telómeros hasta una longitud definida y se ha sugerido que determina las reservas teloméricas con las que contará el recién nacido, pues los cultivos primarios de células derivadas de embriones de ratón de estadios postimplantacionales no muestran un incremento significativo en la LT (Schaezlein *et al.* 2004).

Pese a su papel determinante en la elongación telomérica durante la transición mórula-blastocisto, la telomerasa no es el único mecanismo que actúa durante el desarrollo temprano embrionario. En el embrión de ratón la primera elongación telomérica ocurre antes del inicio de la expresión de la telomerasa, durante la primera división embrionaria, a través de eventos de recombinación (Liu *et al.* 2007). Durante esta etapa el gen *Zscan4* (*zinc finger and SCAN domain containing 4*), que codifica una proteína con un dominio SCAN y cuatro dominios de dedo de zinc (ZFPs), ejerce

un papel imprescindible para el desarrollo. La expresión de *Zscan4* ha sido relacionada con el mantenimiento de la LT en células madre embrionarias a través de recombinación telomérica (Zalzman *et al.* 2010) de manera independiente de la telomerasa, por lo que podría tener un papel en la elongación telomérica observada durante la primera división embrionaria. Apoyando esta hipótesis, *Zscan4* se expresa únicamente en el embrión de 2 células y en las ESC (*embryonic stem cells*) (Falco *et al.* 2007) y es esencial en la progresión desde el estadio de 2 células al de 4 células, así como durante el subsecuente desarrollo embrionario (Falco *et al.* 2007).

9. DETERMINANTES DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN LOS MAMÍFEROS. EFECTO DE LA EDAD PATERNA SOBRE LA LONGITUD TELOMÉRICA DE LA DESCENDENCIA

Aunque en algunos organismos, como los protozoos ciliados, la LT está definida precisamente, en la mayoría de las especies se mantiene en un rango de tamaño particular, específico de la especie, resultado del equilibrio dinámico entre las actividades de elongación y de acortamiento (Evans y Lundblad 2000). A pesar de que la LT generalmente se mantiene en este rango de tamaño (específico de la especie o cepa), los factores y mecanismos que determinan las diferencias entre las especies no se conocen suficientemente.

En los mamíferos la longitud de los telómeros varía entre las distintas especies desde 10 a 15 kb en los humanos (de Lange *et al.* 1990; Samassekou *et al.* 2010), 12-13 kb en la vaca (Garrels *et al.* 2012; Iqbal *et al.* 2011) y 8-10 kb en cepas de ratón salvajes (Coviello-McLaughlin y Prowse 1997; Hemann y Greider 2000). Las cepas de ratón de laboratorio, por el contrario, tienen la característica de poseer telómeros notablemente largos e hipervariables, con un rango que oscila desde las 30 a las 150 kb (Kipling y Cooke 1990; Starling *et al.* 1990). Esto último no es cierto para las líneas *inbred* establecidas más recientemente y, aunque se desconoce la explicación, el fenómeno ha sido atribuido a la intensiva cría que ocurre en una colonia aislada (Hemann y Greider 2000). Esta característica les confiere cierta protección frente a la deficiencia de telomerasa, pues sus telómeros no llegan a ser críticamente cortos hasta la tercera o cuarta generación del cruce con el ratón nulo a la telomerasa (Vidal-

Cardenas y Greider 2010) y el ratón con ausencia de actividad telomerasa permanece viable hasta al menos 6 generaciones.

Además de las diferencias observadas entre las distintas especies, esta longitud telomérica es heterogénea entre los distintos individuos (Takubo *et al.* 2002), e incluso la longitud media varía entre los distintos órganos y tejidos de un mismo individuo (Takubo *et al.* 2002; Vaziri *et al.* 1994), así como en diferentes tipos celulares del mismo tejido, como por ejemplo en las distintas subpoblaciones de leucocitos (Hoffmann *et al.* 2009; Rufer *et al.* 1999; Rufer *et al.* 1998). La heterogeneidad en LT parece ser una característica también de las células dentro de un mismo tipo celular (Harley *et al.* 1990; Moyzis *et al.* 1988; Rufer *et al.* 2001; Rufer *et al.* 1998; Weng *et al.* 1997) e incluso de los cromosomas dentro de una misma célula (Lansdorp *et al.* 1996; Martens *et al.* 1998; Mayer *et al.* 2006; Samassekou *et al.* 2010; Samassekou *et al.* 2009).

La mayoría de los estudios centrados en la LT en la especie humana han adoptado una perspectiva biomédica y se han llevado a cabo a nivel poblacional. La longitud telomérica ha demostrado tener un elevado componente genético, pero la LT también puede ser considerada como un carácter epigenético (De Meyer *et al.* 2014) y, como tal, altamente influido por factores ambientales, lo que provoca que la heredabilidad de la LT sea inestable. Los estudios epidemiológicos transversales en la especie humana han demostrado que la LT puede ser modulada por factores tales como el estrés oxidativo, la inflamación, el estrés ambiental y los estilos de vida no saludables (Aviv *et al.* 2006; Demissie *et al.* 2006; Epel *et al.* 2004). La base molecular del efecto de esos factores se basa en la regulación de la actividad de la telomerasa mediante metilación del ADN (Guilleret *et al.* 2002) y factores ambientales como cambios en el estilo de vida y manejo del estrés (Ornish *et al.* 2008). Sin embargo, estos factores sólo explican una pequeña fracción de la variación en la LT, y hasta la fecha se desconoce hasta qué extensión el componente epigenético del control de la LT puede ser también heredado meióticamente (de Meyer 2014).

El componente genético de la LT se observó inicialmente en un estudio llevado a cabo en gemelos monocigóticos (Slagboom *et al.* 1994) y se considera el principal mecanismo que explica la variación interindividual en la LT observada en los humanos (De Meyer *et al.* 2007; Lansdorp *et al.* 1996). Las estimaciones de la

heredabilidad de la LT de los distintos estudios se mueven en un rango entre el 36% y el 86% (Andrew *et al.* 2006; Atzmon *et al.* 2010; Jeanclous *et al.* 2000; Njajou *et al.* 2007; Slagboom *et al.* 1994; Vasa-Nicotera *et al.* 2005). Como explicación a este componente genético se han descubierto asociaciones entre polimorfismos (SNPs) en los genes TERT/TERC y la LT (Atzmon *et al.* 2010; Codd *et al.* 2010; Levy *et al.* 2010; Mirabello *et al.* 2010; Rafnar *et al.* 2009; Shen *et al.* 2011; Soerensen *et al.* 2012). Otros *loci* también están implicados en la heredabilidad de la LT (Andrew *et al.* 2006; Mangino *et al.* 2009; Vasa-Nicotera *et al.* 2005).

Los SNPs asociados con la LT se encuentran en *loci* autosómicos que, como tales, están sujetos a una heredabilidad mendeliana, en la que cada haplotipo o alelo ejerce su función independientemente de su origen parental, es decir, de si son heredados por vía materna o paterna. Sin embargo, se ha observado que la heredabilidad de la LT no sigue una equidad parental. Un primer estudio sugirió que la LT era heredada vía materna por un mecanismo ligado al cromosoma X (Nawrot *et al.* 2004), pero el mecanismo ligado al cromosoma X no se ha esclarecido. Un importante número de trabajos posteriores han descrito una mayor correlación entre la LT de la descendencia con la LT de los padres (Njajou *et al.* 2007; Nordfjäll *et al.* 2005; Nordfjäll *et al.* 2010), aunque la influencia del componente materno también ha sido descrita (Broer *et al.* 2013).

El mecanismo por el cual la heredabilidad de la LT no sigue una tendencia completamente mendeliana es desconocido, pero se ha observado que la LT de la descendencia se correlaciona con la edad paterna en poblaciones genéticamente diversas (De Meyer *et al.*, 2007; Eisenberg *et al.*, 2012; Kimura *et al.*, 2008; Prescott *et al.*, 2012; Unryn *et al.*, 2005), un enfoque que excluye el efecto de diferentes haplotipos, dado que las frecuencias de cada haplotipo son similares entre los grupos de distintas edades. En estos casos, el efecto de la edad paterna parece ser mediado por la LT del espermatozoide, pues sus telómeros y los de la descendencia de hombres viejos son más largos que los de hombres jóvenes (Allsopp *et al.*, 1992; Baird *et al.*, 2006; Kimura *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta lo anterior, la LT de un sujeto refleja su composición genética particular, pero también puede venir determinada por la LT de los gametos que dieron lugar al sujeto. Sin embargo, la hipótesis de que la LT del espermatozoide determina la LT de la descendencia actualmente carece de un mecanismo la que apoye.

Justificación y Objetivos

1. JUSTIFICACIÓN

Durante el desarrollo preimplantacional tiene lugar un alargamiento telomérico que puede tener una importancia clave en la edad adulta, ya que se ha sugerido que esta elongación establece la LT del individuo al nacimiento (Schaezlein *et al.* 2004). El estudio de la dinámica y mecanismos de elongación telomérica en estadios preimplantacionales es, por tanto, de gran interés en el ámbito del origen embrionario de la enfermedad adulta, pero la escasa cantidad de muestra presente en estos estadios dificulta su estudio. Debido a su simplicidad, a la posibilidad de trabajar con cantidades moderadas de ADN genómico y a no verse afectada por el estatus epigenético celular, hemos elegido la técnica de PCR cuantitativa (qPCR) para la realización nuestro estudio. En un primer experimento hemos validado la técnica de qPCR para el análisis de la LT mediante la evaluación del acortamiento telomérico asociado al envejecimiento en distintos órganos. En este estudio hemos incluido además el efecto de un cruce de distintas especies de ratón cuyas diferencias en LT son bien conocidas. Por último, como refinamiento de la técnica, hemos aplicado la técnica a embriones preimplantacionales para estudiar la dinámica de la LT durante el desarrollo preimplantacional.

En un segundo experimento hemos evaluado la expresión endógena de dos componentes de la telomerasa (*Tert* y *Terc*) y del gen *Zscan4* durante el desarrollo embrionario preimplantacional del ratón. Tras este análisis hemos estudiado el efecto sobre la elongación telomérica de la sobreexpresión exógena de estos genes durante el desarrollo preimplantacional, sobreexpresión que se ha conseguido mediante la inyección de vectores plasmídicos circulares. La sobreexpresión constitutiva de *Tert* en ratones resistentes al cáncer tiene un efecto antienvjecimiento (Tomás-Loba *et al.* 2008) y el efecto de la sobreexpresión transitoria de la telomerasa en la LT durante el desarrollo preimplantacional ha sido testado en la especie bovina (Garrels *et al.* 2012; Iqbal *et al.* 2011), una especie con telómeros más cortos que los presentes en el ratón, demostrando que los telómeros son elongados en el estadio de blastocisto por encima del valor esperado. En este estudio investigamos si la sobreexpresión transitoria de los dos componentes principales de la telomerasa (*Tert* y *Terc*) también altera la LT del blastocisto en una especie con telómeros muy largos, el ratón de laboratorio. El gen *Zscan4* está implicado en la elongación telomérica independiente de telomerasa en

células troncales embrionarias (ESC) de ratón (Zalzman *et al.* 2010) y, por ello, podría jugar un papel en la elongación telomérica observada en los estadios de división temprana del embrión, en los que no se expresa telomerasa.

Por último, la elongación telomérica que ocurre antes del estadio de mórula, y por tanto antes de la activación de la telomerasa (Liu *et al.* 2007b), parece ocurrir a través de un mecanismo alternativo basado en la recombinación (Bryan *et al.* 1995). Esto aportaría una explicación molecular al efecto de la LT del espermatozoide en la LT del recién nacido, pues los telómeros del espermatozoide podrían actuar como un molde de recombinación para los telómeros del ovocito. Para evaluar esta hipótesis hemos analizado la LT del embrión preimplantacional en dos modelos que muestran dimorfismo en la LT del espermatozoide: 1) Machos *Mus musculus* vs. *Mus spretus* y 2) Machos *Mus musculus* viejos vs. jóvenes.

2. OBJETIVOS

El objetivo principal de esta tesis fue el estudio de la LT y los mecanismos de elongación telomérica durante el desarrollo preimplantacional en el ratón. Para ello se llevaron a cabo los siguientes objetivos específicos:

1. Validación de una técnica de PCR cuantitativa para el análisis de la LT, mediante:
 - 1.1 El estudio de la dinámica de la LT durante el envejecimiento en riñón, corazón, cerebro, testículo y ovario.
 - 1.2 El estudio de la dinámica de la LT durante el desarrollo preimplantacional.
2. Estudio de los mecanismos de elongación telomérica del embrión preimplantacional y evaluación del efecto de la sobreexpresión exógena durante el desarrollo preimplantacional de tres genes implicados en la elongación telomérica sobre la LT del blastocisto:
 - 2.1 Análisis de la expresión génica endógena de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional.

- 2.2 Efecto de la sobreexpresión de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional en la LT embrionaria.
3. Estudio del efecto de la LT del espermatozoide sobre la LT embrionaria y de la descendencia, empleando dos modelos que presentan dimorfismo en la LT espermática (*Mus musculus* vs. *Mus spretus* y *Mus musculus* jóvenes y viejos):
 - 3.1 Análisis de la LT en espermatozoides *Mus musculus* vs. *Mus spretus* y de los embriones y descendencia derivada de la fecundación con ovocitos *Mus musculus*.
 - 3.2 Análisis de la LT en ovocitos, cigotos y embriones de 2 células producidos con espermatozoides con LT larga (*Mus musculus*), corta (*Mus spretus*) o sin espermatozoides, por activación partenogenética.
 - 3.3 Análisis de la LT en ovocitos vs. espermatozoides *Mus musculus*.
 - 3.4 Análisis de la LT en espermatozoides *Mus musculus* jóvenes vs. viejos y de sus embriones y descendencia.

Material y Métodos

1. TÉCNICAS EMPLEADAS POR OBJETIVO

Dado que varias de las técnicas utilizadas en esta tesis doctoral fueron empleadas en distintos experimentos, a continuación se presenta una lista especificando los experimentos en las que fueron utilizadas para describirlas con detalle en el siguiente apartado.

Experimento 1

Objetivo 1.1: Dinámica de la LT en el envejecimiento en riñón, corazón, cerebro, testículo y ovario.

Técnicas empleadas: Obtención de muestras de tejido, extracción de ADN y evaluación de la LT relativa por qPCR.

Objetivo 1.2: Dinámica de la LT durante el desarrollo preimplantacional.

Técnicas empleadas: Extracción y cultivo *in vitro* de embriones de ratón, recogida y preparación de muestras embrionarias, evaluación de la LT relativa por qPCR.

Experimento 2

Objetivo 2.1: Análisis de la expresión génica endógena de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional.

Técnicas empleadas: Extracción y cultivo *in vitro* de embriones de ratón, extracción de ARNm y análisis de la expresión génica mediante qPCR.

Objetivo 2.2: Efecto de la sobreexpresión de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional en la LT embrionaria.

Técnicas empleadas: Obtención de cigotos, subclonación de cDNAs y preparación de vectores, microinyección pronuclear de plásmidos circulares, extracción de ARNm y análisis de la expresión génica mediante qPCR, recogida y preparación de muestras embrionarias, evaluación de la LT relativa por qPCR.

Experimento 3

Objetivo 3.1: Análisis de la LT en espermatozoides *Mus musculus* vs *Mus spretus* y de los embriones y descendencia derivada de la fecundación con ovocitos *Mus musculus*.

Técnicas empleadas: Extracción de ovocitos y espermatozoides, fecundación *in vitro*, obtención de muestras de tejidos y extracción de ADN, recogida y preparación muestras embrionarias y evaluación de la LT relativa por qPCR.

Objetivo 3.2: Análisis de la LT en ovocitos, cigotos y embriones de 2 células producidos con espermatozoides con LT larga (*Mus musculus*), corta (*Mus spretus*) o sin espermatozoides, por activación partenogenética.

Técnicas empleadas: Extracción de ovocitos y espermatozoides, fecundación *in vitro*, activación partenogenética, recogida y preparación de muestras embrionarias y evaluación de la LT absoluta por qPCR.

Objetivo 3.3: Análisis de la LT en ovocitos vs. espermatozoides.

Técnicas empleadas: Extracción de ovocitos y espermatozoides, extracción de ADN de ovocitos y espermatozoides y evaluación de la LT relativa por qPCR.

Objetivo 3.4: Análisis de la LT en espermatozoides *Mus musculus* jóvenes vs. viejos y de sus embriones y descendencia.

Técnicas empleadas: Extracción de ovocitos y espermatozoides, fecundación *in vitro*, recogida y preparación de las muestras, obtención de muestras de tejidos y extracción de ADN, recogida y preparación de muestras embrionarias y evaluación de la LT absoluta y relativa por qPCR.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

Todos los procedimientos experimentales llevados a cabo con ratones fueron previamente aprobados por el comité ético en investigación animal del INIA y llevados a cabo de acuerdo a la *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* de la Sociedad Europea de la Reproducción y a la legislación Europea. Todos los ratones utilizados para la realización de la presente tesis fueron mantenidos en las instalaciones animales del INIA bajo condiciones controladas de temperatura ($23\pm 1^\circ\text{C}$) y humedad, con un fotoperiodo de 14h luz-10h oscuridad, y con acceso libre a agua y comida (Harlan Ibérica, Barcelona, España).

A menos que se especifique lo contrario, todos los reactivos fueron suministrados por la Compañía Sigma Chemical Co. (Poole, RU).

2.1. Obtención de muestras de tejidos para la evaluación de la LT (Experimentos 1 y 3)

Experimento 1

Con el objetivo de evaluar la técnica y validar los resultados en dos modelos independientes, el estudio de la longitud telomérica durante el envejecimiento se llevó a cabo en dos cruces de ratones cuya longitud telomérica difiere: *Mus musculus* puro y hembras *Mus musculus* x machos *Mus spretus*. La elección de la especie *Mus spretus* se basó en su facilidad para cruzarse con las cepas de laboratorio de la especie *Mus musculus*. Para el análisis de la longitud telomérica durante el envejecimiento se mantuvieron en cruce 5 parejas de hembras *Mus musculus* (C57/BL6) de 2 meses de edad y machos *Mus spretus* de 4 meses de edad. Las camadas se destetaron a los 21 días de edad, siendo separadas por sexo. De cada pareja se seleccionó un macho y una hembra de la F1 (*Mus musculus* x *Mus spretus* F1) correspondiente a tres grupos de edad (diez días, cuatro meses y un año). Los mismos grupos de edad y número de animales de cada sexo fueron seleccionados de la F1 del cruce de hembras *Mus musculus* x machos *Mus musculus* (*Mus musculus* x *Mus musculus* F1).

Tras la eutanasia de cinco machos y cinco hembras (de cada uno de los cruces) de los tres grupos de edad (jóvenes: 10 días, adultos jóvenes: 4 meses y adultos viejos: 1 año) se extrajo una biopsia de aproximadamente $2\text{-}4\text{ mm}^3$ de cada tejido analizado

(corazón, riñón, cerebro, ovario y testículos), que fue congelada hasta el análisis. Las muestras de tejidos se extrajeron de la pared del ventrículo izquierdo del corazón, corteza y médula renal, corteza del lóbulo frontal y cuerpo calloso del cerebro, corteza y médula del ovario, y en el caso del testículo la biopsia abarcó desde la túnica albugínea hasta la *rete testis*.

Experimento 3

Con el objeto de evaluar el efecto de la LT del espermatozoide en la LT de la descendencia en el modelo *Mus musculus* vs. *Mus spretus* (Objetivo 2.1) se recogieron muestras de tejido renal post-mortem de cinco machos y cinco hembras adultos *Mus musculus* (C57BL/6J), *Mus spretus* (ESPRET/Ei) e híbridos *Mus spretus* (C57BL/6J x ESPRET/Ei), (en total, 15 machos y 15 hembras), tras lo cual se congelaron y almacenaron hasta su análisis. En el modelo *Mus musculus* jóvenes vs. viejos (Objetivo 3.4) se recogieron muestras de cola de 30 individuos (15 machos y 15 hembras) de 10 días de edad por grupo.

2.2. Extracción del ADN genómico de tejidos para el estudio de la longitud telomérica durante el envejecimiento y la LT de la descendencia de machos de distinta LT (Experimentos 1 y 3)

Las muestras congeladas de tejidos obtenidos según se describe anteriormente se digirieron con 30 µl de una dilución de proteinasa K (1,25 µg/µl) en buffer Tris NaCl EDTA (STE) mediante incubación a 55°C durante una noche. Tras la digestión las muestras se diluyeron en agua libre de ADNasas hasta un volumen final de 300 µl y se obtuvo el ADN mediante extracción por fenol/cloroformo seguida de precipitación con isopropanol. El precipitado resultante se diluyó a una concentración final de 50 ng/µl antes de determinar la LT mediante qPCR.

2.3. Producción de embriones de ratón (Experimentos 1, 2 y 3)

Experimento 1

Los cigotos *Mus musculus* fueron obtenidos de hembras C57CBAF1 (8-10 semanas de edad) superovuladas. El tratamiento hormonal consistió en una inyección

intraperitoneal de 7,5 UI de gonadotropina coriónica equina (Folligon 500, Intervet) seguida una inyección de 7,5 UI de gonadotropina coriónica humana (hCG, Veterin Corion, Equinvest) 48 horas después. Tras el cruce con machos C57CBAF1 de fertilidad probada, las hembras con tapón visible (Figura 5A) fueron eutanasiadas. Los oviductos se extrajeron de la cavidad abdominal (Figura 5B) y se recolectaron los cigotos del ámpula del oviducto en el día 0,5 postcoito (Figura 5C). Tras la eliminación de las células del cúmulo mediante incubación y pipeteo en una solución de hialuronidasa de 300 U.I/ml (Brinster *et al.* 1985), los cigotos se lavaron tres veces en medio M2 antes de la puesta en cultivo en medio KSOM+AA (Millipore) a 37°C en una atmósfera controlada de 5% de CO₂ en aire y humedad saturada. Los ovocitos maduros, en estadio de Metafase II (MII), se recogieron del ámpula del oviducto 18 h post-hCG y las células del cúmulo se eliminaron, siguiendo el mismo procedimiento que en caso de los cigotos, antes de la congelación de las muestras.

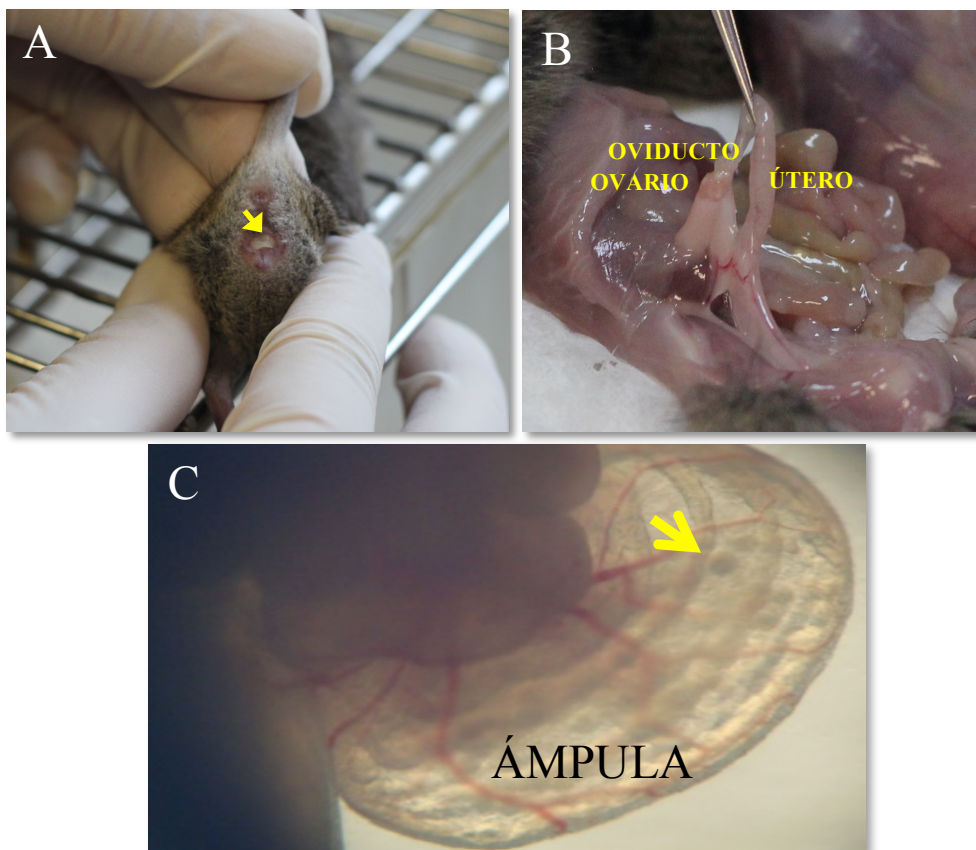


Figura 5. Extracción de ovocitos y cigotos del tracto reproductivo de la hembra. (A) La visualización del tapón vaginal (flecha) como signo de monta permite identificar las hembras cuyos ovocitos han sido fecundados. (B) Extracción de oviducto de la cavidad abdominal. (C) Ámpula conteniendo cigotos (día 0,5 post-coito) u ovocitos (18 h posthCG) (flecha).

Experimento 2

La obtención de embriones para el análisis de la expresión endógena de los genes *Tert*, *Terc* y *Zscan4* (Objetivo 2.1) en la especie *Mus musculus* siguió las mismas pautas descritas en el experimento 1.

Los embriones empleados para la microinyección de plásmidos circulares (Objetivo 2.2) se obtuvieron en el estadio de cigoto, 20 horas después de la inyección de hCG, de los oviductos de hembras superovuladas C57CBAF1 cruzadas con machos C57CBAF1. La superovulación, eliminación de células del cúmulo y puesta en cultivo se llevaron a cabo en las mismas condiciones que el Experimento 1. Los cigotos se cultivaron durante aproximadamente 4 horas, hasta la aparición de dos pronúcleos visibles, momento en el que se llevó a cabo la microinyección.

Experimento 3

Para evaluar el efecto de la LT del espermatozoide sobre la LT de los embriones preimplantacionales se recurrió a la fecundación *in vitro* con el objeto principal de controlar con precisión el tiempo de desarrollo embrionario, un factor crucial para el desarrollo de este experimento. La fecundación *in vitro* se realizó siguiendo el método descrito por Martín-Coello y colaboradores (2008) con alguna modificación. Los espermatozoides se obtuvieron de epidídimos de machos maduros fértiles *Mus musculus* (C57CBAF1) jóvenes (3 meses) o viejos (un año) y de machos *Mus spretus* (Figura 6). Para permitir la dispersión espermática, los espermatozoides fueron preincubados en una gota de 500 μ l de medio HTF (*human tubular fluid*) (Quinn *et al.* 1985) suplementado con 2 mg/ml de albúmina sérica bovina (BSA) y cubierta por aceite mineral durante 15 minutos a 37 °C en una atmósfera saturada de humedad de 5% de CO₂ en aire.

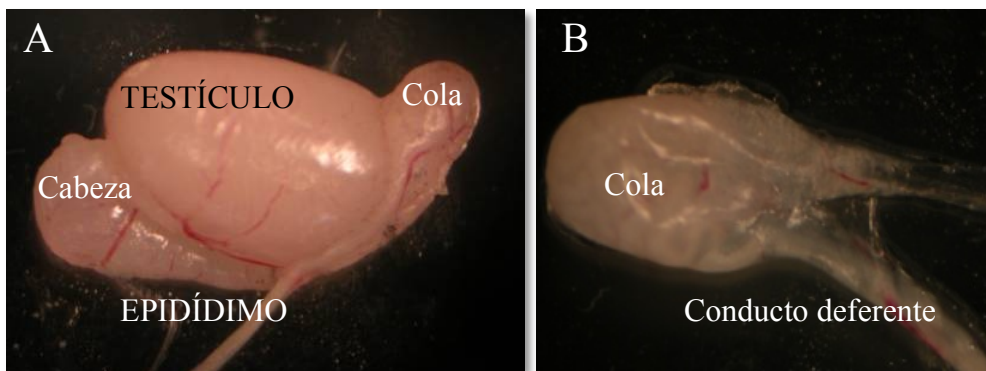


Figura 6. Extracción de espermatozoides del aparato reproductor masculino. (A) Testículo y epidídimo de ratón. (B) Detalle de la cola del epidídimo y comienzo del conducto deferente.

Los complejos cúmulos-ovocitos se obtuvieron de hembras *Mus musculus* C57CBAF1 (8-10 semanas de edad) superovuladas siguiendo el protocolo descrito para el Experimento 1. Los oviductos se extrajeron de la cavidad abdominal y se recuperaron los complejos cúmulos-ovocitos del ápula del oviducto 12 horas post-hCG. Tras su lavado en medio HTF se coincubaron con los espermatozoides en una concentración final de 10^6 espermatozoides/ml en 500 μ l de medio HTF durante 4-5 h a 37 °C en atmósfera saturada de humedad y 5% de CO₂ en aire. Tras la fecundación *in vitro*, las células del cúmulo y los espermatozoides adheridos a la zona pelúcida se eliminaron mecánicamente mediante pipeteo. Los posibles cigotos fueron lavados en medio M2 antes de ponerlos en cultivo en gotas de 30 μ l de medio KSOM+AA (Millipore) en las mismas condiciones atmosféricas.

Los embriones partenogénéticos se obtuvieron mediante la activación de ovocitos maduros recogidos a las 15 h tras la inyección de hCG siguiendo el protocolo descrito en Kishigami y Wakayama (2007). Las células del cúmulo se eliminaron mediante pipeteo en una solución de hialuronidasa. La activación de los ovocitos se llevó a cabo mediante la incubación durante 6 horas en medio KSOM+AA suplementado con SrCl₂ (10 mM), EDTA (2 mM) y citocalasina B (5 μ g/ml) (Kishigami y Wakayama, 2007). Tras su activación, los ovocitos fueron lavados 3 veces antes de cultivarlos en medio KSOM+AA como se ha descrito previamente.

2.4. Microinyección pronuclear (Experimento 2)

Para sobreexpresar los componentes de la telomerasa del ratón *Tert* y *Terc* y del gen *Zscan4* se microinyectaron plásmidos circulares en el pronúcleo de cigotos de ratón. El uso de plásmidos circulares, no linearizados, es un procedimiento no integrativo que consigue una expresión exógena transitoria sin alterar el genoma de la célula hospedadora.

Tanto la pipeta de sujeción (*holding pipette* o *holder*) como la aguja de inyección utilizadas en la micromanipulación fueron fabricadas manualmente utilizando para ello una microforja (*Microforge de Fontbrune BEAUDOIN 5262*) y el estirador de pipetas horizontal (o *puller*) (*Micropipette Puller* modelo P-87, Sutter Instruments), respectivamente.

El equipo de microinyección (Figura 7) estaba formado por un microscopio invertido [*Nikon Eclipse TE300 inverted microscope* (Nikon UK Ltd)] que utiliza el sistema óptico Nomarski (*Óptica de Contraste Interdiferencial* o DIC) y micromanipuladores Narishige (Narishige Inc.). Un microinyector manual con sistema de aceite (*CellTran vario*, Eppendorf) fue utilizado para controlar la presión de la pipeta de sujeción, mientras que la inyección se llevó a cabo con un sistema de aire que utiliza una jeringa de 50 ml para aplicar la presión de inyección. Dos μl de la suspensión a inyectar fueron cargados en las agujas de inyección por el extremo opuesto a la punta para su inyección.

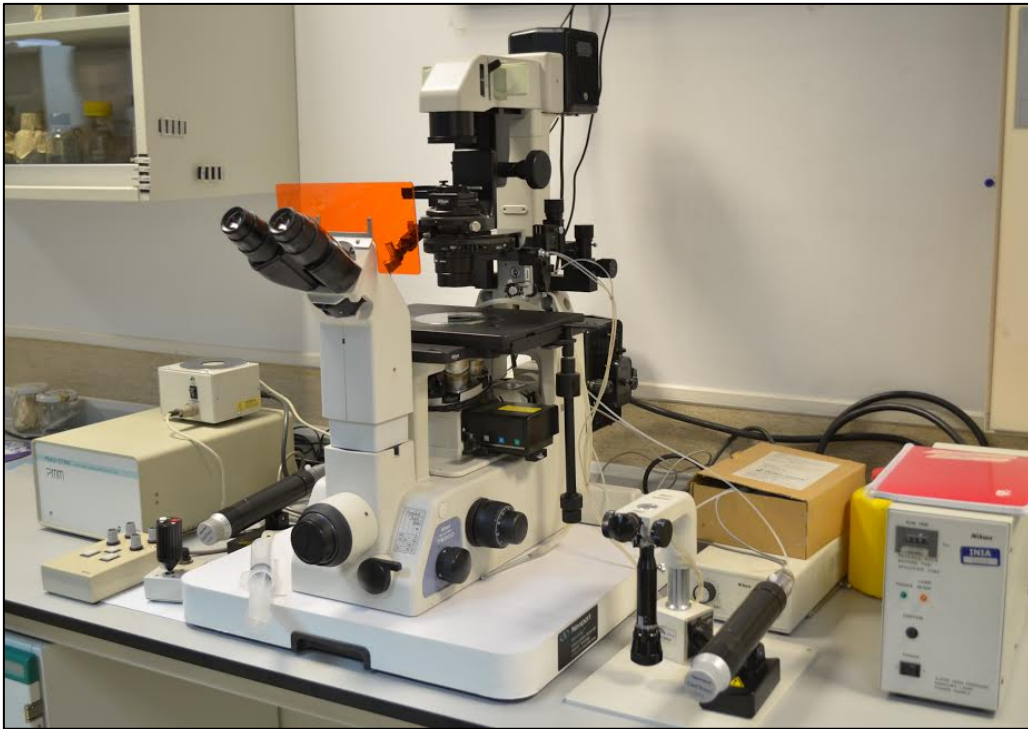


Figura 7. Imagen del equipo de micromanipulación utilizado para la microinyección.

Las construcciones fueron inyectadas en el pronúcleo de los cigotos siguiendo los procedimientos convencionales (Figura 8). Brevemente, los cigotos con dos pronúcleos visibles se transfirieron a la cámara de inyección (Figura 9), que consistió en un portaobjetos excavado en el que se deposita la microgota de medio de micromanipulación (M2) cubierta de aceite mineral. La inyección se llevó a cabo a temperatura ambiente en grupos de 15 embriones. Los cigotos fueron sostenidos individualmente por una pipeta de sujeción roma mientras se inyectó suficiente cantidad de suspensión del plásmido como para aumentar el pronúcleo hasta el doble de su volumen (aproximadamente 1-2 pl de suspensión de ADN). Los embriones se cultivaron en grupos de 30 en medio KSOM+AA hasta el estadio de blastocisto, en el que fueron analizados.



Figura 8. Detalle de un embrión de ratón en estadio pronuclear. El embrión está sujeto con la pipeta de sujeción (izd.). La aguja de inyección (drch.) está posicionada formando un ángulo de 90° con respecto a los corpúsculos polares.

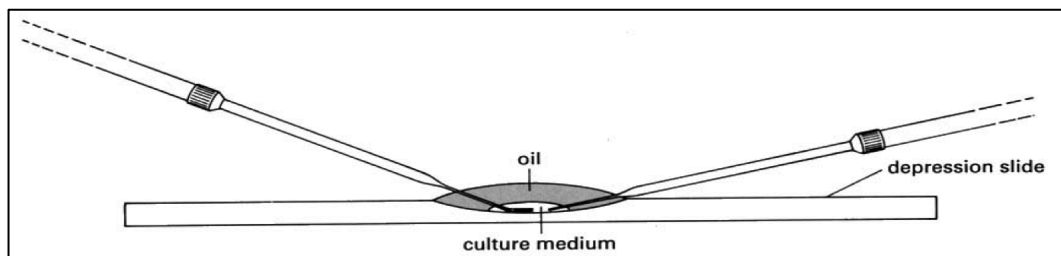


Figura 9. Cámara de micromanipulación y herramientas para la inyección: pipeta de sujeción (izd.) y aguja de inyección (der.) Tomado de Nagy y colaboradores (2003).

2.5. Plásmidos empleados en la microinyección pronuclear para la sobreexpresión de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* (Experimento 2)

Para la expresión exógena de *Tert* y *Terc* (grupos inyectados *Tert* y *Terc*), se generaron dos plásmidos en los que se clonó la secuencia completa de ADNc de *Tert* o *Terc* en el sitio EcoRI del vector pCAGGS (Niwa *et al.* 1991) (Figura 10). Las secuencias insertadas en ese sitio son expresadas bajo el control del promotor sintético CAG. El promotor sintético CAG es ampliamente utilizado en plásmidos de expresión eucariota y está formado por la combinación del elemento potenciador temprano del citomegalovirus (“C”), el promotor, primer exón y primer intrón del gen de la beta-actina de pollo (“A”) y el aceptador de unión del gen de la beta-globina de conejo (“G”).

Para expresar *Zscan4*, se empleó un plásmido comercial (pCMV6-Zscan4c, Origene #MC202042) (Figura 11) que expresa el ADNc de *Zscan4c* bajo el control del promotor de citomegalovirus (CMV) (grupo inyectado *Zscan4*).

Como plásmido control de inyección para los tres experimentos (*Tert*, *Terc* y *Zscan4*) se empleó un plásmido comercial (pEGFP, Clontech) codificante para la proteína verde fluorescente mejorada (eGFP) bajo el control del promotor de citomegalovirus (grupo inyectado eGFP).

Para la inyección pronuclear todos los plásmidos fueron diluidos a una concentración final de 5 ng/μl en buffer de inyección TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 0,1 mM, pH 8).

Los embriones no inyectados fueron utilizados como control del cultivo *in vitro* (grupo control).

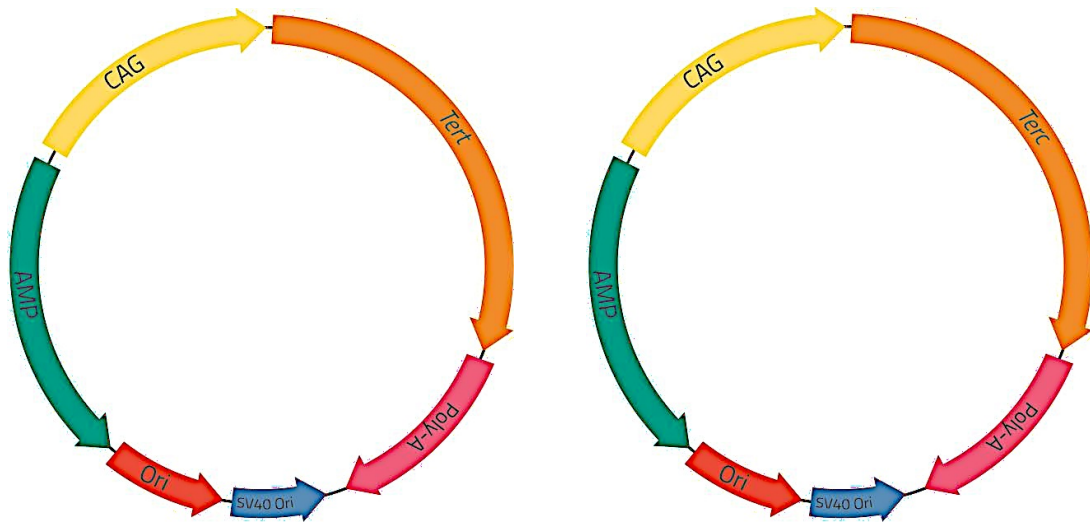


Figura 10. Representación esquemática del plásmido empleado para sobreexpresar de forma transitoria los componentes de la telomerasa *Tert* y *Terc*.

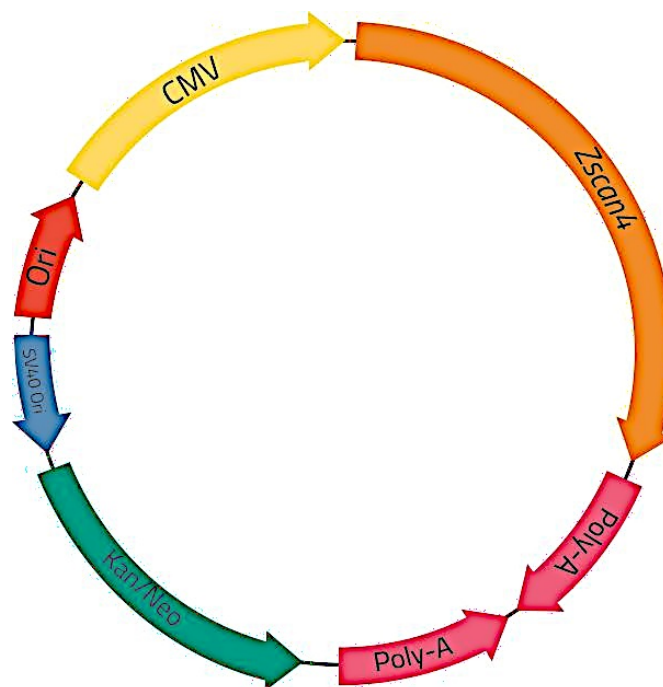


Figura 11. Representación esquemática del plásmido empleado para sobreexpresar de forma transitoria *Zscan4c*.

2.6. Recogida y preparación de muestras de espermatozoides, ovocitos y embriones para la determinación de la LT (Experimentos 1, 2 y 3).

Experimento 1

El análisis de la LT durante el desarrollo preimplantacional del embrión de ratón (Objetivo 1.2) se llevó a cabo en 20 muestras de cada estadio del desarrollo preimplantacional (desde ovocito maduro hasta el estadio de blastocisto). Tanto los ovocitos como los embriones fueron transferidos a una solución ácida Tyrode a 37°C durante 30 segundos con el fin de eliminar la zona pelúcida, eliminando con ello los posibles espermatozoides adheridos e incrementando al mismo tiempo la eficiencia de digestión de la muestra. Los ovocitos/embriones desprovistos de zona pelúcida fueron lavados 3 veces en PBS antes de ser almacenados en tubos Eppendorf de 0,2 ml a -20 °C hasta su análisis. Con el objetivo de mantener un contenido similar en ADN en las diferentes muestras, se compensaron las diferencias en número de células almacenando distinto número de embriones de cada estadio (cigotos:8; embrión de 2 células: 4; embrión de 4 células: 2; embrión de 8 células: 1; mórula: 1 y blastocisto: 1).

Previo análisis de la LT por qPCR, las muestras se digirieron mediante la incubación durante una noche a 55°C con 8 µl de una solución de proteinasa K en agua (100 µg/ml), seguida de la inactivación de la proteinasa K por incubación a 95 °C durante 10 minutos.

Experimento 2

El análisis de la LT (Objetivo 2.2) se llevó a cabo en 20 blastocistos individuales por grupo experimental. La eliminación de la zona pelúcida, congelación de la muestra y la digestión previa a la qPCR se llevaron a cabo de la forma descrita en el Experimento 1.

Experimento 3

La LT relativa en el espermatozoide se determinó en muestras de 5 machos adultos *Mus spretus* y 5 machos adultos *Mus musculus* (Objetivo 3.1). Los espermatozoides procedentes de la cola del epidídimo se recogieron en medio M2. Se determinó la concentración espermática y se congelaron 5×10^6 espermatozoides tras centrifugar las muestras y eliminar el sobrenadante. El mismo procedimiento se siguió para la

valoración de la LT de espermatozoides de 6 machos *Mus musculus* jóvenes (3 meses) y 6 machos *Mus musculus* viejos (1 año) (Objetivo 3.4).

Para comparar la LT relativa entre espermatozoides y ovocitos *Mus musculus* (Objetivo 3.3), se obtuvieron 3 grupos de 50 ovocitos de hembras superovuladas como se ha descrito previamente. La LT de los ovocitos se comparó con la LT de 3 grupos de aproximadamente 200 espermatozoides. El ADN de los espermatozoides y ovocitos se obtuvo tras la digestión de las muestras a 55 °C durante la noche en 30 µL de proteinasa K (1,25 µg/µl) en buffer Tris NaCl EDTA (STE) y 5µL de 0,1M dithiothreitol (DTT), tras lo cual se extrajo el ADN con fenol/cloroformo seguido de precipitación con isopropanol.

Para comparar la LT absoluta en ovocitos, cigotos y embriones de dos células (Objetivo 3.2) se recogieron ovocitos en estadio de MII del ámpula del oviducto a las 18 h tras la inyección de hCG, tras lo cual se eliminaron las células del cúmulo como ya se ha descrito. Los cigotos se identificaron por la presencia de dos pronúcleos visibles (Figura 12) antes de la fase de replicación del ADN (a las 8-10 h tras la FIV y 8 h tras la activación partenogenética), que ocurre entre las 11 y las 18 horas post-inseminación en el cruce C57CBAF1 x CFLP (Nagy *et al.* 2003). Los embriones de dos células se recogieron en el momento de arresto embrionario, 24 horas post-FIV/activación. En todos los casos se eliminó la zona pelúcida como ya se ha descrito. Posteriormente, los ovocitos y embriones se lavaron 3 veces en PBS, y se congelaron en grupos (dos ovocitos o cigotos, o un embrión de dos células) por inmersión directa en nitrógeno líquido en tubos de qPCR de 0,1 ml (Corbett Research, Sydney, Australia), tras lo cual fueron almacenados a -20°C hasta su posterior análisis. La digestión previa a la qPCR se llevó a cabo como en el Experimento 1.

El análisis de la LT relativa en blastocistos *Mus musculus* e híbridos *Mus spretus* (Objetivo 3.1) se llevó a cabo en 20 blastocistos individuales por grupo. La eliminación de la zona pelúcida, congelación de la muestra y la digestión previa a la qPCR se llevó a cabo como en el Experimento 1. Para el estudio de la longitud telomérica en embriones procedentes de machos *Mus musculus* jóvenes y viejos (Objetivo 3.4) se analizó la LT absoluta en 40 embriones de 2 células de cada grupo experimental. Los embriones fueron congelados individualmente tras eliminar la zona pelúcida en tubos de qPCR de 0,1 ml siguiendo el mismo procedimiento descrito para el Objetivo 3.2.

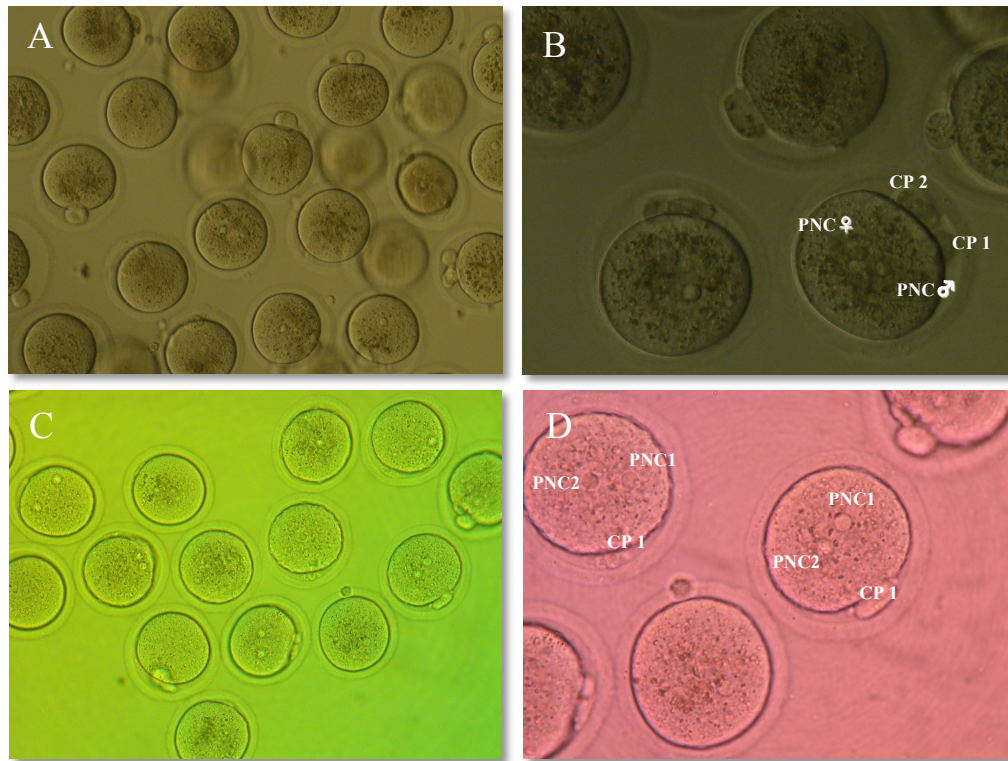


Figura 12. Ovocitos de ratón tras la fecundación *in vitro* y activación partenogénética. (A) Ovocitos fecundados (10 horas post-FIV) tras eliminar las células del cúmulo y espermatozoides adheridos. (B) Detalle del pronúcleo masculino (PNC♂) y femenino (PNC♀) junto con los primer y segundo corpúsculo polar (CP 1 y CP 2). (C) Ovocitos activados partenogénicamente (8 horas post-activación). (D) Detalle de ambos pronúcleos (PNC1 y PNC2) prodecentes del núcleo femenino y primer corpúsculo polar (CP 1).

2.7. Determinación de la longitud telomérica relativa mediante PCR en tiempo real (Experimentos 1, 2 y 3)

El análisis de la LT relativa en muestras de gametos, embriones y tejidos se llevó a cabo mediante el método de PCR en tiempo real descrito previamente (Cawthon 2002), con ciertas modificaciones. El método se basa en la amplificación del ADN telomérico con oligonucleótidos especialmente diseñados. Los valores de las repeticiones teloméricas fueron normalizados frente a la cantidad de ADN presente en la muestra (determinada por la cantidad del gen multicopia *Rn18S*) mediante el método comparativo del Ct. Para el análisis de la LT en ovocitos y espermatozoides se utilizó el gen multicopia *Env4* en lugar de *Rn18S* para normalizar frente a la cantidad de ADN,

debido a que experimentos preliminares produjeron mejores eficiencias de amplificación para este gen a bajas concentraciones de ADN. La secuencia de los oligonucleótidos, el tamaño del fragmento y los números de acceso al GeneBank se muestran en la Tabla 1.

La qPCR se llevó a cabo añadiendo 2 μ l de cada muestra por cada 20 μ l de mezcla de reacción de PCR, conteniendo los oligonucleótidos específicos, utilizando el termociclador Rotorgene 6000 Real Time Cyclyer (Corbett Research, Sydney, Australia). El ciclo de PCR consistió en una primera incubación de 3 minutos a 94 °C seguida de 40 ciclos de 94 °C 10 s, 60 °C 30 s y 72 °C 30 s. El análisis de los datos se realizó mediante el método del ciclo umbral comparativo (Schmittgen y Livak 2008). En este método la fluorescencia es adquirida al final de cada ciclo para determinar el ciclo umbral (*cycle threshold*, Ct), o ciclo por encima del cual la fluorescencia se eleva por encima de la existente en el fondo de cada muestra, y capturándola en la fase logarítmica de la curva de emisión fluorescente. En esta zona una diferencia de un ciclo equivale al doble de cantidad del producto amplificado obtenido en la PCR. En cada muestra, los valores de las repeticiones teloméricas fueron normalizados frente a la cantidad de ADN presente en la muestra (determinada por la cantidad del gen multicopia *Rn18S* o *Env4*) sustrayendo del Ct de las repeticiones teloméricas obtenido para cada una de las muestras, el valor del Ct obtenido para el gen *Rn18S* o *Env4* (dCt). De la misma forma, la longitud telomérica relativa de cada grupo experimental se determinó utilizando el dCt más alto (o lo que es lo mismo, la longitud telomérica más corta) como constante arbitraria para ser sustraída del dCt del resto de las muestras (ddCt), aplicando posteriormente ese valor a la fórmula 2^{-ddCt} . La concentración de ADN de las muestras se determinó de manera que se ajustaran al rango dinámico de la qPCR.

comprobar que este procedimiento daba lugar a la recogida de una cantidad similar de ADN entre las distintas muestras, se recogieron 20 muestras adicionales de ovocitos, cigotos y embriones de 2 células de *Mus musculus* para cuantificar el ADN genómico por qPCR mediante amplificación de la secuencia genómica *Rn18S*. Todo el producto de digestión (8 μ l) se empleó para amplificar la secuencia telomérica o *Rn18S* bajo las mismas condiciones de amplificación descritas para la determinación de la LT relativa. El análisis de los datos se realizó mediante el método del ciclo umbral comparativo (Schmittgen y Livak 2008) como ya se ha descrito. Para facilitar la comparación entre grupos, la longitud telomérica absoluta de cada grupo experimental se determinó utilizando el Ct más alto (o lo que es lo mismo, la longitud telomérica más corta) como constante arbitraria para ser sustraída del Ct del resto de las muestras (dCt), aplicando posteriormente ese valor a la fórmula 2^{-dCt} .

Previo al análisis, se verificó la relación lineal (Figura 13) entre el número de células de una muestra dada y el valor medio del Ct obtenido por qPCR al amplificar las repeticiones teloméricas en 30 muestras con un número conocido de blastómeras (10 muestras con una célula, 10 muestras con 2 células y 10 muestras con 3 células) obtenidas de embriones de 2 células.

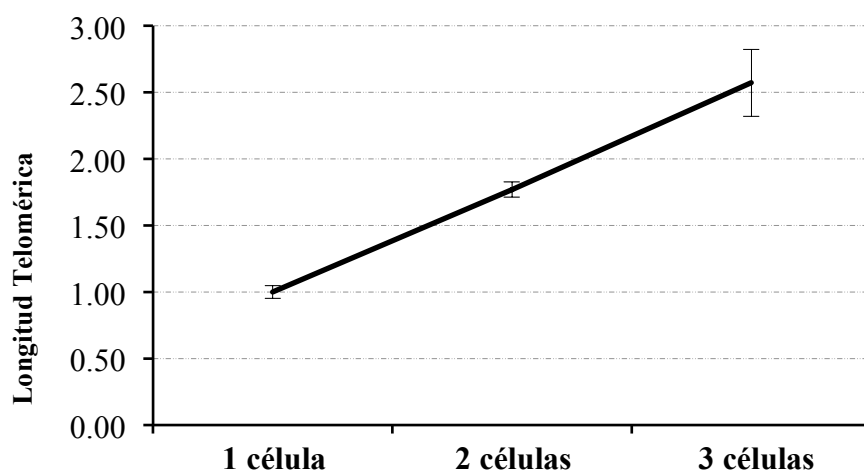


Figura 13. Valores medios del Ct de las repeticiones teloméricas \pm error estándar tras normalizar frente al valor más bajo.

2.9. Análisis de la expresión relativa de *Terc*, *Tert* y *Zscan4* en el embrión preimplantacional (Experimento 2)

Como estudio preliminar (Objetivo 2.1), antes de evaluar el efecto de la expresión exógena de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* sobre la LT del embrión de ratón, se analizó la expresión endógena de estos genes durante el desarrollo preimplantacional en los estadios de ovocito, embrión de 2 células, embrión de 4 células, mórula o blastocisto. Los embriones recogidos en estos estadios se congelaron en grupos de 10 por inmersión directa en nitrógeno líquido y se almacenaron a -80 °C hasta la extracción del ARN. Los procedimientos moleculares realizados para la cuantificación de la abundancia relativa del ARN mensajero (ARNm) se llevaron a cabo siguiendo protocolos previamente descritos (Bermejo-Alvarez *et al.* 2010). El ARN poliadenilado se extrajo de 3 (*Tert/Terc*) y 4 (*Zscan4*) grupos de 10 ovocitos/embriones de cada estadio a analizar mediante el kit de extracción directa de ARNm *Dynabeads® mRNA DIRECT™ Kit* (Dynal Biotech, Oslo, Noruega), siguiendo las instrucciones del fabricante con alguna modificación. Con objeto de compensar las posibles diferencias en el contenido de ARN entre los diferentes estadios a analizar, se añadieron a cada tubo 10 ng del ARN mensajero de la globina del conejo (Sigma R1253) junto con el buffer de lisis (Clemente *et al.* 2009) con el fin de utilizarlo como un estándar exógeno. Inmediatamente tras la extracción del ARN se llevó a cabo la reacción de la transcripción inversa (TI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Bioline, Ecogen, Madrid, España) utilizando cebadores poly(T), cebadores aleatorios (Biotools, España) y la enzima transcriptasa inversa MMLV (*MMLV High Performance Reverse Transcriptase*, Epicentre Biotechnologies) en un volumen total de 40 µl para producir el ADN complementario (ADNc). En un primer paso los tubos de cada muestra se calentaron a 70°C durante 5 minutos con objeto de desnaturalizar la estructura secundaria del ARN y permitir la unión de los cebadores. Tras esta incubación, la mezcla de la reacción de la TI se completó con 100 U.I de transcriptasa inversa MMLV. Tras 10 minutos a 25°C la mezcla se sometió a una incubación de 42°C durante 60 minutos para permitir la transcripción inversa del ARNm, seguido de una incubación de 10 minutos a 70°C para desnaturalizar la enzima.

El efecto de la sobreexpresión temporal de *Terc*, *Tert* y *Zscan4* sobre la LT del blastocisto de ratón se evaluó en tres experimentos independientes mediante la inyección de uno de los plásmidos previamente descritos (Objetivo 2.2). Para ello, se confirmó

previamente la sobreexpresión de los genes en el estadio de blastocisto. En el caso de *Zscan4*, debido a que en condiciones fisiológicas ejercería su posible papel en la elongación telomérica en torno al estadio de dos células (Falco *et al.* 2007), la abundancia del ARNm de *Zscan4* también se analizó en embriones de 2 y 4 células y mórulas. Los embriones inyectados y no inyectados fueron cultivados *in vitro* durante uno (2 células), dos (4 células), tres (mórulas) o cuatro (blastocistos) días. La extracción del ARN poliadenilado y la transcripción inversa se realizaron como se ha descrito anteriormente utilizando tres grupos de 10 embriones por grupo experimental. Los niveles de ARNm de *Tert* y *Terc*, analizados en blastocistos, se relativizaron con respecto a los de la histona H2a.z (*H2afz*), utilizada como control endógeno (o *housekeeping*). Los niveles de ARNm de *Zscan4* se relativizaron al control exógeno globina, debido a que se comparaban distintos estadios.

La cuantificación relativa del ARN mensajero se llevó a cabo mediante la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real, qPCR (*quantitative polymerase chain reaction*). Los experimentos se realizaron con el objeto de contrastar los niveles de cada transcrito a analizar (*Terc*, *Tert* y *Zscan4*) y los niveles del ARN de la globina del conejo o del gen *H2afz* en cada muestra. Para la reacción de la polimerasa, se añadieron 2 μ l de ADNc de cada muestra a la mezcla de qPCR (*Quantimix Easy Sig Kit*, Biotools), la cual contenía la pareja de oligonucleótidos específica para la amplificación de cada transcrito. Para cada gen se realizaron dos repeticiones. La secuencia de los cebadores y el tamaño aproximado de los amplicones generados se muestran en la Tabla 2. Las condiciones de la qPCR fueron optimizadas para conseguir una eficiencia próxima a 1 para cada gen. La cuantificación de los niveles de expresión relativa de cada gen objeto de estudio se llevó a cabo mediante el método del ciclo umbral comparativo ya descrito, normalizando frente al control exógeno, la globina, o al control endógeno, la histona *H2afz*. El valor del dCt se determinó sustrayendo el valor del Ct de la globina o *H2afz* de cada muestra del valor del Ct obtenido para cada gen en la misma muestra. El valor de la muestra con el menor valor de expresión (es decir, con el valor del dCt más alto) fue utilizado como constante arbitraria que se restó a todos del dCt de las restantes muestras. A este valor (ddCt) se le aplicó la fórmula 2^{-ddCt} para determinar la magnitud del cambio en la expresión génica relativa (o *fold change*).

Tabla 2. Secuencia de los oligonucleótidos y tamaño de amplicón de la qPCR utilizada para el análisis de la abundancia del ARNm de *Terc*, *Tert* y *Zscan4*.

Gen	Secuencia de cebadores (5'-3')	Tamaño de fragmento (pb)	Nº de acceso GeneBank.
<i>Tert</i>	F:GGATTGCCACTGGCTCCG R:TGCCTGACCTCCTCTTGTGAC	279	NM_009354.1
<i>Terc</i>	F:AACAAACGTCAGCGCAGGAGC R:GGGACCAGTTCCATTCCTGTCC	207	NR_001579.1
<i>Zscan4</i>	F:CGCCGCACCCATGAGATCATAAC R:ATTGGCGAAAGCGACGGCTAC	160	NM_001013765.2
<i>α-to-θ</i>	F:GCAGCCACGTGTCGAGTAT R:GTGGGACAGGACTTCAAAT	257	X04751
<i>H2afz</i>	F:AGGACGACTAGCCATGGACGTGTG R:CCACCACCAGCAATTGTAGCCTTG	209	NM_016750.2

2.10. Análisis estadístico (Experimentos 1, 2 y 3)

En el estudio de la dinámica telomérica durante el envejecimiento, la asociación entre las variables individuales de los animales muestreados (edad, especie y sexo, excepto en el caso de ovario y testículo) y todas las posibles interacciones y la longitud de sus telómeros fue analizada mediante un ANOVA de tres vías (dos vías en el caso de ovario y testículo) una vez comprobados los supuestos del análisis (independencia de las observaciones, homocedasticidad y normalidad de la variable dependiente para los distintos valores de las covariables) utilizando el programa SPSS V.22. El resto de datos de longitud telomérica y expresión génica se analizaron mediante el análisis de la

Material y Métodos

varianza de una vía seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Holm-Sidak utilizando el paquete estadístico SigmaStat (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

Resultados

RESULTADOS

1. Experimento 1

1.1. Dinámica de la longitud telomérica durante el envejecimiento

El análisis de los datos procedentes de los tejidos corazón y riñón reveló una asociación significativa entre la longitud telomérica y las variables independientes especie ($p < 0,001$) y edad ($p = 0,002$ en el caso del corazón y $p = 0,001$ en el caso del riñón). Los individuos jóvenes presentaron valores más elevados de longitud telomérica que los estimados en las muestras de ratones pertenecientes a las clases adulta y vieja. De igual forma, la especie resultó un factor determinante en la longitud telomérica detectada mediante la técnica de PCR, ya que las muestras de individuos de la especie *Mus musculus* presentaban valores significativamente más elevados que los híbridos de *Mus spretus* (Figura 14). Por otra parte, nuestro análisis no reveló diferencias significativas en la longitud telomérica en función del sexo, ya que las muestras de machos y las de hembras presentaban valores comparables de longitud telomérica, y no se pudo detectar una asociación significativa entre el sexo y ésta ($p = 0,19$ en el corazón y $p = 0,73$ para el riñón). Tampoco las interacciones de segundo o tercer orden resultaron significativas.

En el caso del cerebro las asociaciones detectadas entre las covariables y la longitud telomérica fueron más complejas, ya que el ANOVA de tres vías reveló la existencia de una asociación significativa entre la edad ($p = 0,007$), la especie ($p < 0,001$) y la interacción entre ambos factores ($p = 0,01$) y la longitud telomérica obtenida en las muestras de cerebro (Figura 14). Así, se observó una diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos en los individuos de la especie *Mus musculus* y los híbridos en animales pertenecientes a edades jóvenes ($p < 0,001$) y adultos ($p < 0,001$), siendo estos valores superiores en la especie *Mus musculus*. Sin embargo, ese efecto de la especie analizada no alcanzó la significación en el caso de los viejos, si bien el resultado obtenido está próximo al umbral de significación ($p = 0,063$). Igualmente, la asociación entre la edad del individuo estudiado y la longitud telomérica observada sólo alcanzó la significación estadística en el caso de los individuos de la especie *Mus musculus* ($p < 0,001$), observándose valores superiores en el caso de los animales jóvenes y adultos respecto a los viejos. Por el contrario, no se observaron

Resultados

diferencias significativas en función de la edad en los híbridos de *Mus spretus* ($p=0,25$).

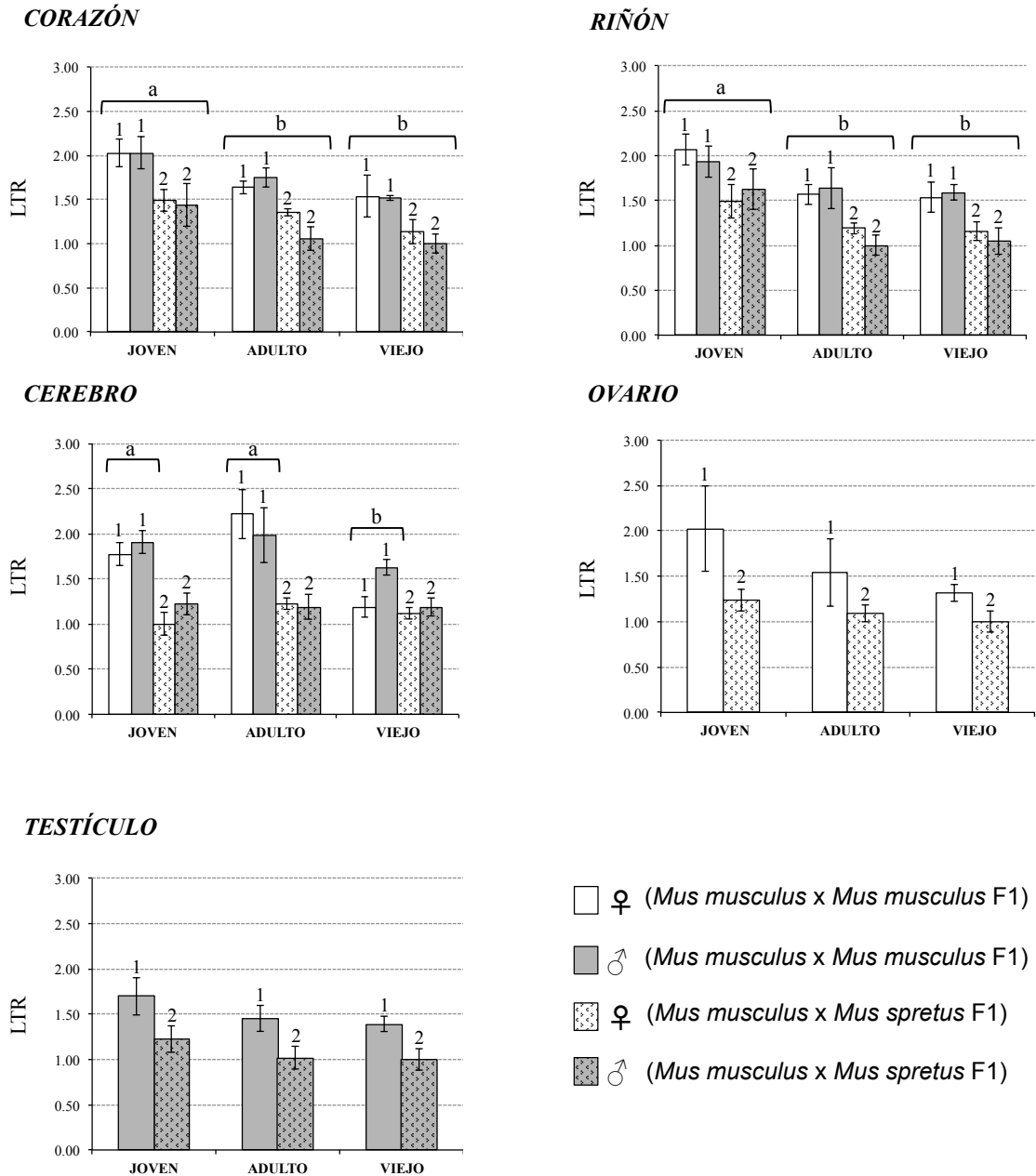


Figura 14. Dinámica de la longitud telomérica durante el envejecimiento en tejidos de la especie *Mus musculus* y la F1 del híbrido *Mus musculus* x *Mus spretus*. La longitud telomérica relativa se muestra como la media \pm e.s.m en función de la edad, especie y sexo de los individuos muestreados ($n=5$ /grupo). Letras distintas indican diferencias significativas en la longitud telomérica en función de la edad. Números distintos indican diferencias significativas en función de la especie ($p<0.05$).

Los resultados obtenidos en el análisis de los tejidos reproductivos fueron equivalentes en el caso del ovario y del testículo. Así, los valores de longitud telomérica se asociaron de manera significativa con la especie del individuo muestreado, presentando los individuos *Mus musculus* valores significativamente mayores que los híbridos de *Mus spretus* ($p=0,013$ y $p=0,002$ en el caso de ovario y testículo respectivamente). En este caso la edad no ejerció un efecto significativo sobre la longitud telomérica obtenida en los individuos jóvenes, adultos o viejos ($p=0,18$ en ovario y $p=0,22$ en testículo) ni tampoco se detectó una interacción significativa entre la edad y la especie ($p=0,80$ y $p=0,96$ para ovario y testículo respectivamente).

1.2. Dinámica de la longitud telomérica durante el desarrollo preimplantacional del embrión de ratón

La longitud telomérica de la especie *Mus musculus* incrementó desde el estadio de ovocito maduro ($1,00\pm 0,07$) hasta el embrión de 2 células ($2,08\pm 0,11$), coincidente con la activación del genoma embrionario (AGE) (Figura 15). Durante las divisiones posteriores, la LT disminuyó progresivamente hasta el estadio de mórula ($1,01\pm 0,13$), a partir del cual se observó un marcado incremento en la LT ($2,60\pm 0,17$), dando lugar a una longitud telomérica en el blastocisto significativamente mayor ($p<0,01$) que la observada en los estadios previos.

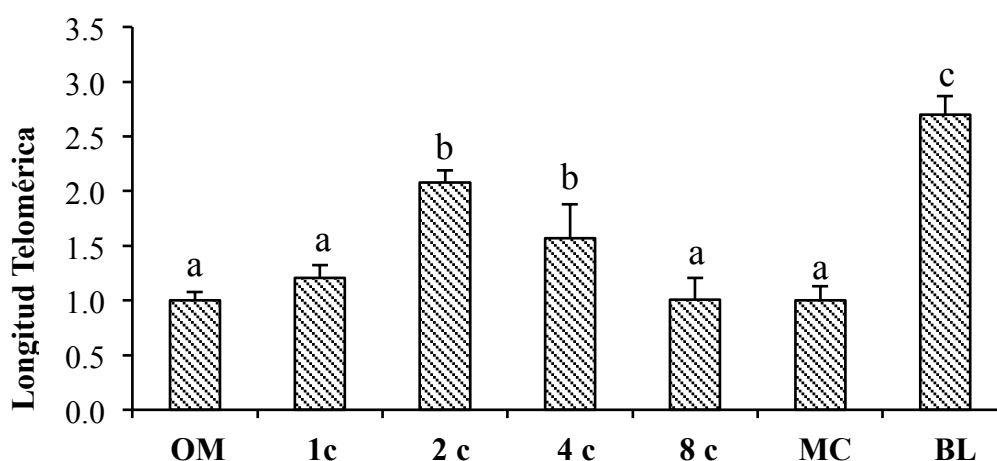


Figura 15. Longitud telomérica relativa en la especie *Mus musculus* durante el desarrollo preimplantacional. OM: ovocito maduro; 1c: embrión de 1 célula; 2c: embrión de 2 células; 4c: embrión de 4 células; 8c: embrión de 8 células; MC: mórula compacta; BL: blastocisto. La figura muestra dos momentos de elongación telomérica, uno coincidente con la activación del genoma del ratón, y el segundo coincidente con la activación de la telomerasa. *a*, *b* y *c* son diferentes con un nivel de significación de $p<0,05$.

2. Experimento 2

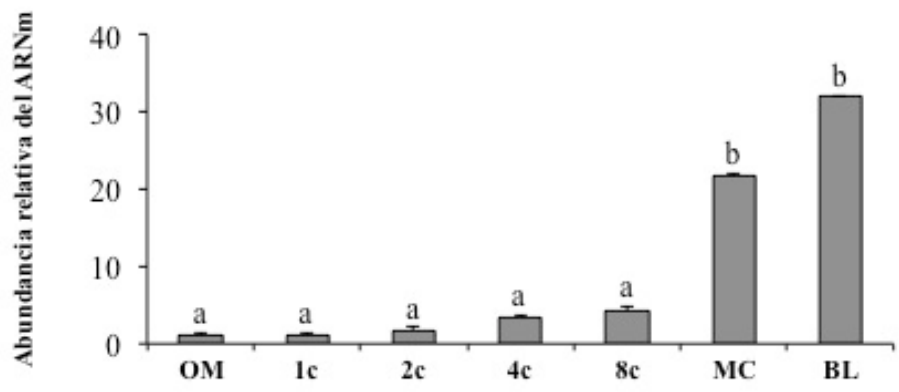
2.1. Análisis de los perfiles de expresión génica de *Tert*, *Terc* y *Zscan4* en el ratón durante el desarrollo preimplantacional.

En el presente experimento se han caracterizado los perfiles de expresión génica de ambos componentes de la enzima telomerasa: la subunidad catalítica (TERT) y el componente ARN de la telomerasa (TERC), durante el desarrollo preimplantacional en el ratón doméstico (*Mus musculus*).

La abundancia relativa de *Terc* incrementó progresivamente a lo largo del desarrollo embrionario con una marcada ($p < 0.01$) regulación al alza en el estadio de mórula (21.74 ± 0.21) y el estadio de blastocisto (31.89 ± 0.17) (Figura 16A). Por otra parte, la abundancia relativa de *Tert* fue significativamente ($p < 0.01$) mayor en el ovocito maduro y el cigoto (6.95 ± 0.15 y 7.17 ± 0.12 , respectivamente) comparado con los estadios posteriores; sin embargo, se observó un incremento gradual en el nivel del transcrito desde el embrión de dos células hasta el estadio de blastocisto (Figura 16B).

Es sabido que la enzima telomerasa no es responsable de la elongación telomérica observada en el estadio temprano del ratón preimplantacional, pues su activación no se da hasta el estadio de mórula (Betts y King 1999; Eisenhauer *et al.* 1997; Wright *et al.* 2001; Wright *et al.* 1996; Xu y Yang 2000). Por este motivo hemos examinado la expresión durante el desarrollo preimplantacional de *Zscan4*, un gen que ha sido implicado en el mantenimiento de la longitud telomérica y estabilidad genómica a largo plazo de las células madre embrionarias de ratón (Zalzman *et al.* 2010). El perfil de expresión de *Zscan4* mostró un pico de expresión en el embrión de 2 células que coincide con el ya descrito previamente en esta especie (Falco *et al.* 2007). La Figura 17 muestra la abundancia relativa del ARNm de *Zscan4* en el embrión de ratón desde el estadio de ovocito al estadio de blastocisto. Su expresión fue marcadamente regulada al alza en el estadio de 2 células, coincidente con la activación del genoma embrionario, mientras que se mostró muy baja o prácticamente indetectable en los restantes estadios.

A



B

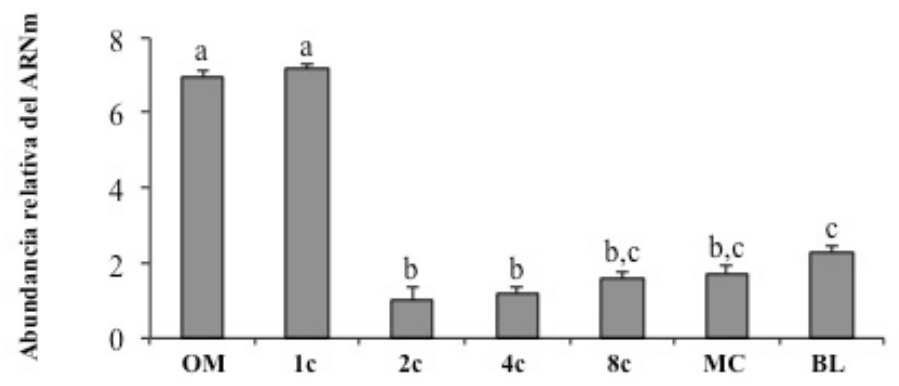


Figura 16. Abundancia relativa del ARNm de los componentes de la telomerasa *Terc* (A) y *Tert* (B) durante el desarrollo preimplantacional del ratón. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.05$).

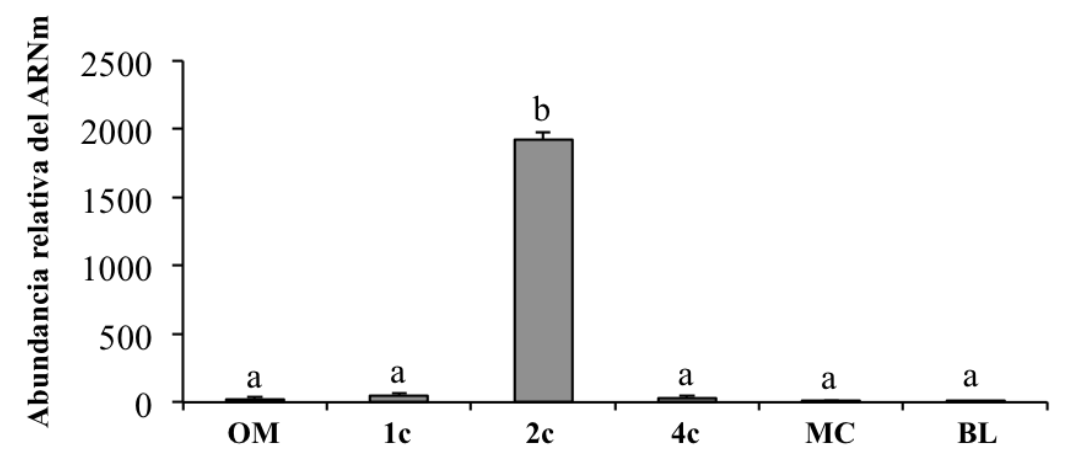


Figura 17. Abundancia relativa del ARNm de *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional del ratón. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.01$).

2.2. Efecto de la sobreexpresión de *Tert* y *Terc* sobre la LT relativa del blastocisto.

Como primer paso para la evaluación de la expresión exógena de *Tert* y *Terc* sobre la elongación telomérica embrionaria, se comprobó que la microinyección de plásmidos en cigotos aumentaba la abundancia relativa del gen expresado por el plásmido. La Figura 18A muestra que la inyección en el pronúcleo del cigoto de ratón de un plásmido que expresa *Tert* da lugar a un incremento en la abundancia relativa del ARNm en el estadio de blastocisto de hasta treinta veces mayor en el grupo inyectado *Tert* (34.05 ± 12) que en los grupos controles inyectado eGFP (3.16 ± 5.6) y no inyectado (1 ± 0.06). Las diferencias entre los grupos controles no fueron significativas, sugiriendo que la técnica de microinyección *per se*, no ejerce un efecto en la expresión de la telomerasa ($p > 0.05$). El posterior análisis de la LT en blastocistos expandidos reveló que esta sobreexpresión no dio lugar a un aumento de la LT en el grupo que sobreexpresó *Tert* (1.01 ± 0.3) comparado con los grupos controles inyectado (1.11 ± 0.4) y no inyectado (1 ± 0.3) (Figura 18B).

El siguiente paso fue testar si la sobreexpresión del componente ARN de la telomerasa da lugar a diferencias en la longitud de los telómeros en el estadio de blastocisto. El mismo vector plasmídico fue utilizado para inducir la expresión exógena de *mTerc*. El análisis de la abundancia del ARNm mostró que la expresión de *Terc* fue regulada al alza en el grupo inyectado *Terc* (1.5 ± 0.11) comparado con los grupos inyectado eGFP (1.06 ± 0.13) y control no inyectado (1 ± 0.04) (Figura 18C), aunque estas diferencias fueron menores que las encontradas en el caso de la inyección de *Tert*. Los resultados del análisis de la LTR se muestran en la Figura 18D. Los embriones del grupo inyectado *Terc* mostraron una LTR similar a la observada en los grupos controles [grupo inyectado eGFP (1.21 ± 0.08) y grupo no inyectado (1.16 ± 0.08)].

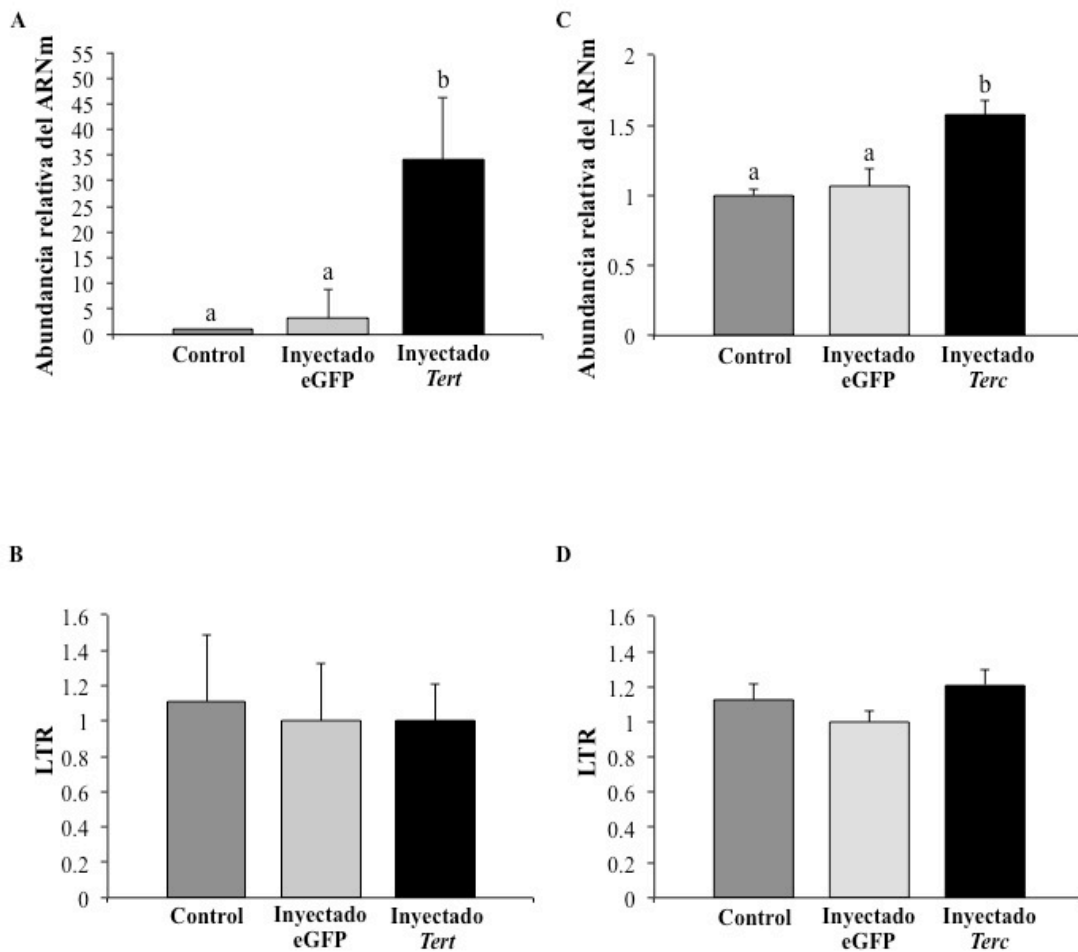


Figura 18. Efecto de la sobreexpresión de la telomerasa sobre la LT del blastocisto de ratón. Abundancia relativa del ARNm de *Tert* (A) y *Terc* (C) en el estadio de blastocisto en los grupos no inyectado (grupo control), control inyectado (inyectado eGFP) y grupo inyectado con *Tert* (inyectado *Tert*). (B) Longitud telomérica relativa (LTR) en el estadio de blastocisto en los grupos control no inyectado, inyectado eGFP e inyectado con *Tert*. (D) Longitud telomérica relativa (LTR) en el estadio de blastocisto en los grupos control, inyectado con eGFP e inyectado *Terc*. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.05$).

2.3. Efecto de la sobreexpresión de *Zscan4* durante el desarrollo preimplantacional sobre la LT relativa del blastocisto

De forma similar a los experimentos anteriores, la eficiente sobreexpresión de *Zscan4* en el grupo inyectado se evaluó mediante análisis de la abundancia relativa del ARNm, en este caso en diversos estadios, desde la activación del genoma embrionario del ratón, coincidiendo con el pico de expresión endógena, hasta el estadio de blastocisto.

La Figura 19A muestra la abundancia relativa del ARNm en el grupo inyectado *Zscan4*, el grupo inyectado eGFP y el grupo control no inyectado desde el estadio de dos células hasta el estadio de blastocisto. Aunque el grupo inyectado con *Zscan4* mostró valores superiores en los niveles de ARNm en el estadio de 2 células, esta diferencia no fue significativa. En el estadio de 4 células y mórula encontramos una abundancia relativa del ARNm de *Zscan4* significativamente mayor ($p \leq 0.001$) en el grupo inyectado *Zscan4* comparado con los grupos controles. Sin embargo, estas diferencias no se observaron en el estadio de blastocisto, estadio en el que la expresión de *Zscan4* fue prácticamente indetectable. El nivel máximo de expresión del plásmido, encontrado en el estadio de 4 células (80.54 ± 19.88) (aproximadamente a las 48 horas tras la inyección), fue significativamente mayor que el valor observado en el estadio de mórula (22.59 ± 3.66), cuando se espera que la expresión temporal del plásmido disminuya debido al efecto de la dilución mediado por las divisiones celulares. En el estadio de blastocisto, no se observaron diferencias en la LTR entre los grupos inyectados control e inyectado con *Zscan4* (Figura 19B).

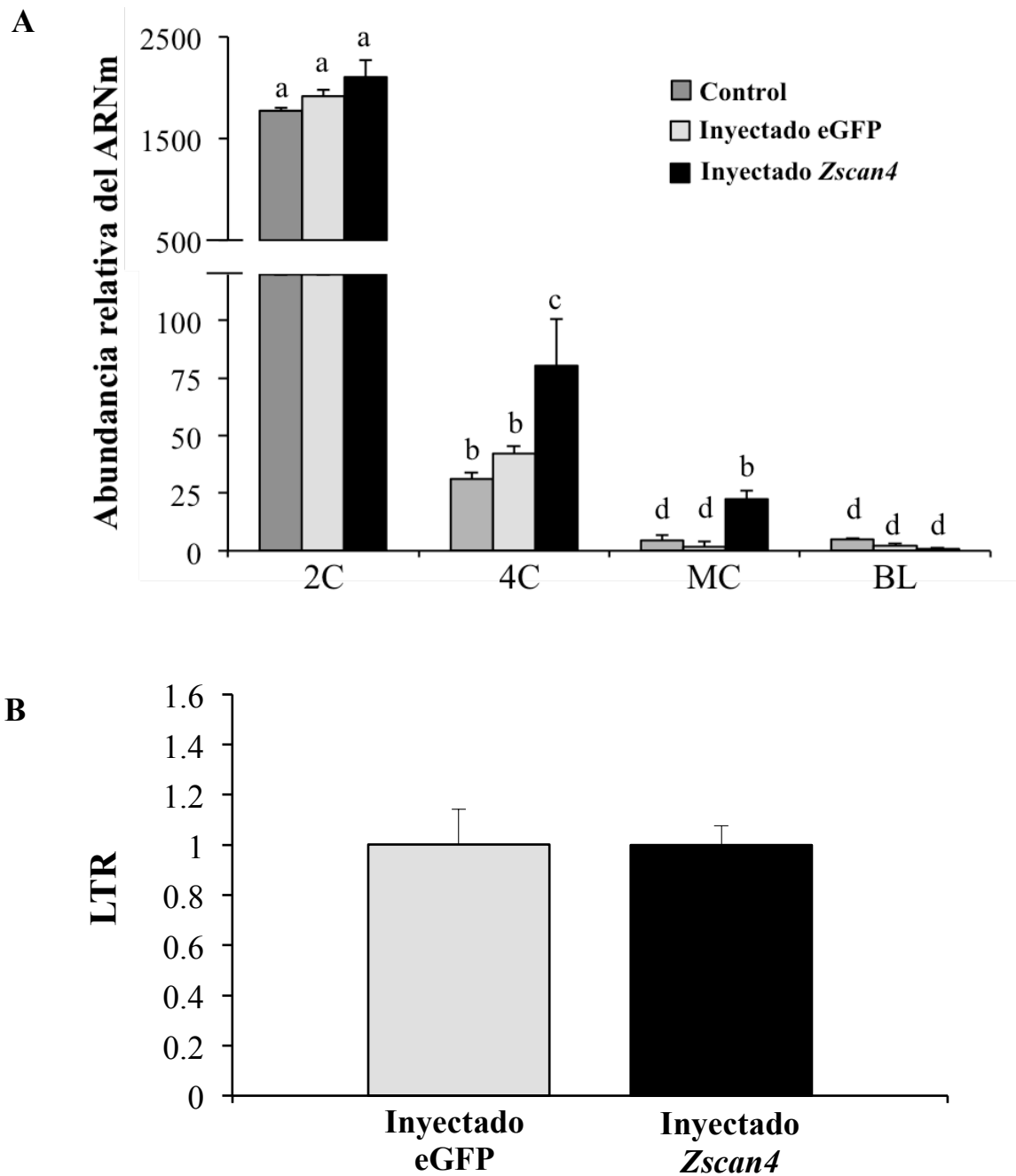


Figura 19. Efecto de la sobreexpresión de *Zscan4* sobre la LT del blastocisto de ratón. (A) Abundancia relativa del ARNm de *Zscan4* en los estadios de 2 células (2C), 4 células (4C), mórula (MC) y blastocisto (BL). (B) Longitud telomérica relativa (LTR) en el estadio de blastocisto en los grupos inyectado con eGFP e inyectado con *Zscan4*. Distintas letras indican diferencias estadísticamente significativas (ANOVA $p < 0.01$).

3. Experimento 3

3.1. Longitud telomérica relativa en espermatozoides, descendencia y embriones *Mus musculus* y *Mus spretus*

Con el fin de utilizar un modelo biológico que presente diferencias sustanciales en la LT de los espermatozoides, los ovocitos de hembras *Mus musculus* fueron fecundados con espermatozoides de dos especies de ratón que presentan un marcado dimorfismo en su LT (*Mus musculus* y *Mus spretus*). Como paso previo determinamos si las bien conocidas diferencias en LTs observadas en las células somáticas entre ambas especies (Kipling y Cooke, 1990; Starling *et al.* 1990) también se presentan en espermatozoides. La LT del espermatozoide fue significativamente mayor en machos *Mus musculus* que en machos *Mus spretus* (Figura 20A). El cruce natural entre machos *Mus spretus* y hembras *Mus musculus* dio lugar a una descendencia con una LT del tejido renal más corta comparada con la LT de la descendencia *Mus musculus* pura de la misma edad, y significativamente mayor que en el caso de *Mus spretus* (Figura 20B). Estas diferencias ya se habían establecido en el estadio de blastocisto (Figura 20C), estadio en el que se cree que la LT es establecida por la expresión de la enzima telomerasa (Schaetzlein *et al.* 2004).

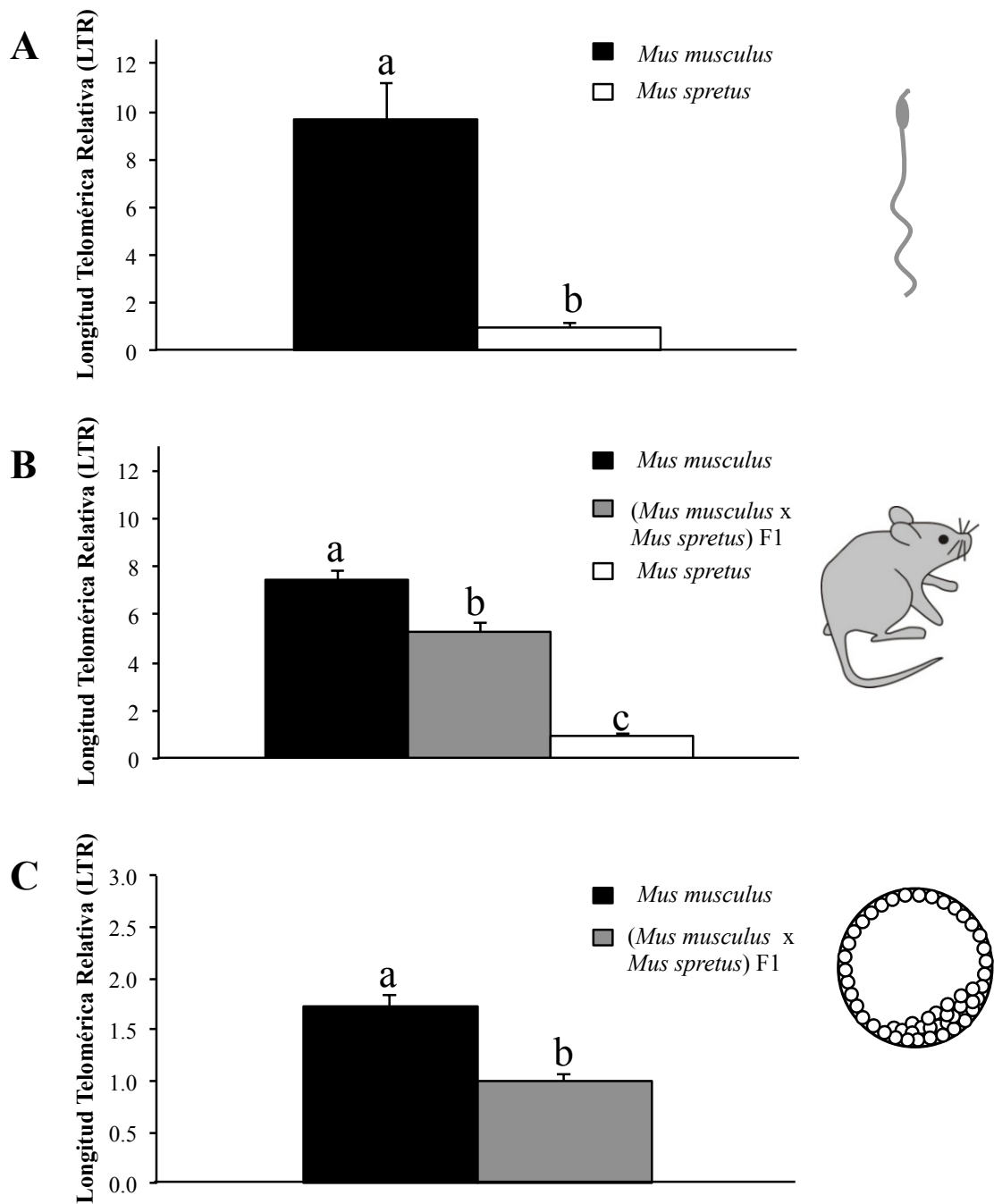


Figura 20. Longitud Telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones *Mus musculus* y *Mus spretus*. (A) Longitud telomérica relativa en espermatozoides; (B) Longitud telomérica relativa en la descendencia; (C) Longitud telomérica relativa en blastocistos. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas basadas en ANOVA ($P \leq 0.05$).

3.2. Efecto de la longitud telomérica del espermatozoide en la LT de cigotos y embriones de 2 células.

Posteriormente determinamos si las diferencias en LT embrionaria observadas tenían lugar mediante un mecanismo independiente de la telomerasa relacionado con la LT de los espermatozoides. Para ello analizamos la LT antes de la activación del genoma embrionario, es decir, antes de la expresión de la telomerasa, en embriones producidos por FIV con espermatozoides con telómeros largos (*Mus musculus*) y con espermatozoides con telómeros cortos (*Mus spretus*), o bien sin espermatozoides, mediante activación partenogenética (embriones diploides cuyo genoma es de origen exclusivamente materno, es decir ovocitario). Debido a que el análisis de la longitud telomérica absoluta requiere cantidades de ADN genómico similares entre los distintos tipos de muestras (ovocitos, cigotos y embriones de dos células), realizamos un experimento preliminar de cuantificación de ADN genómico mediante qPCR de la secuencia genómica *Rn18S*. Los valores normalizados de Ct de *Rn18S* fueron similares entre los disitintos tipos de muestras (Figura 21A), permitiendo, por tanto, el análisis de la longitud telomérica absoluta. La LT incrementó significativamente desde el estadio de ovocito hasta el estadio de cigoto en embriones fecundados con espermatozoides con telómeros largos (*Mus musculus*). Sin embargo, este incremento no se observó en los embriones *Mus musculus* partenogenéticos (producidos sin espermatozoides) o en los embriones producidos por FIV con espermatozoides con telómeros cortos (*Mus spretus*) (Figura 21B). Estos datos sugieren que los telómeros de los espermatozoides de machos *Mus musculus* son mayores que los presentes en los cromosomas del ovocito. Para confirmar esta hipótesis, comparamos la LT relativa ente espermatozoides y ovocitos *Mus musculus*, siendo significativamente mayor en el espermatozoide que en el ovocito (Figura 21C). En el estadio de 2 células se observó un incremento posterior en la LT en los embriones fecundados *Mus musculus*. Por el contrario, los embriones fecundados híbridos mantuvieron la longitud telomérica del ovocito, mientras que el embrión partenogenético incrementó su longitud telomérica, aunque en menor medida que sus homólogos fecundados (Figura 21B).

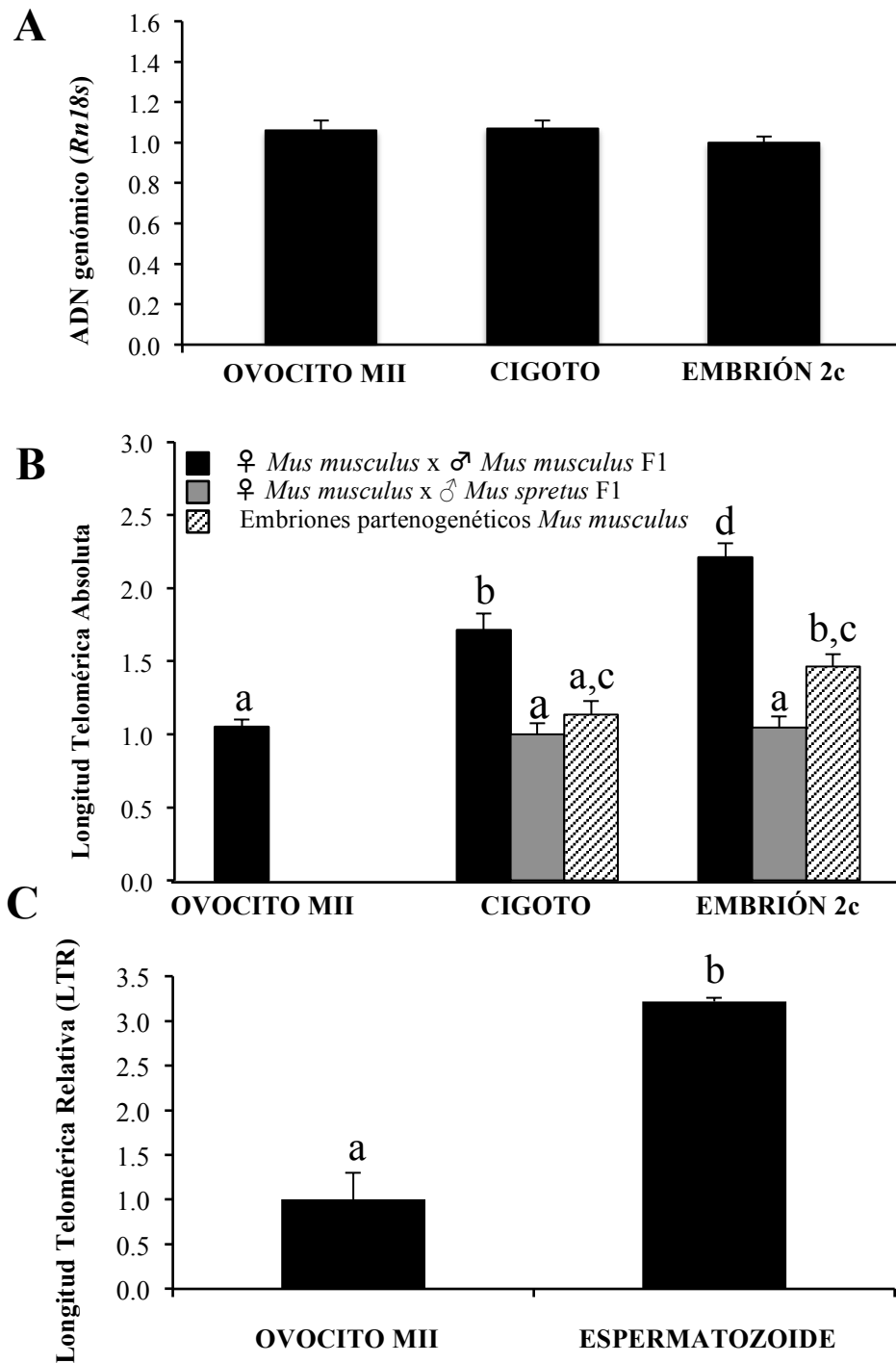


Figura 21. (A) Cuantificación absoluta de ADN genómico en muestras de 2 ovocitos, 2 cigotos o 1 embrión de 2 células de *Mus musculus*; (B) Longitud telomérica absoluta en embriones obtenidos por fecundación *in vitro* con espermatozoides con telómeros largos (*Mus musculus*) o cortos (*Mus spretus*), o por activación partenogenética; (C) Longitud telomérica relativa en ovocitos y espermatozoides *Mus musculus*. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas basadas en ANOVA ($P \leq 0.05$).

3.3. Longitud telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones procedentes de padres *Mus musculus* jóvenes y viejos

Finalmente, buscamos determinar si las pequeñas diferencias en LT que se dan entre ratones *Mus musculus* de diferentes edades juegan un papel en la LT de la descendencia. El análisis de la LT del espermatozoide de ratón obtenido de machos *Mus musculus* de diferentes edades reveló que, contrariamente a lo observado en humanos, la LT del espermatozoide se acorta con la edad (Figura 22A), siguiendo la misma tendencia que las células somáticas. Este resultado nos hizo cuestionarnos si estas diferencias que se dan en el espermatozoide dan lugar a diferencias en la LT de los embriones y la descendencia. La LT fue significativamente mayor en embriones de 2 células procedentes de padres jóvenes comparados con los embriones procedentes de padres viejos (Figura 22B). En coherencia con este resultado, la LT fue significativamente mayor en los recién nacidos de padres jóvenes en relación a los nacidos de padres viejos (Figura 22C).

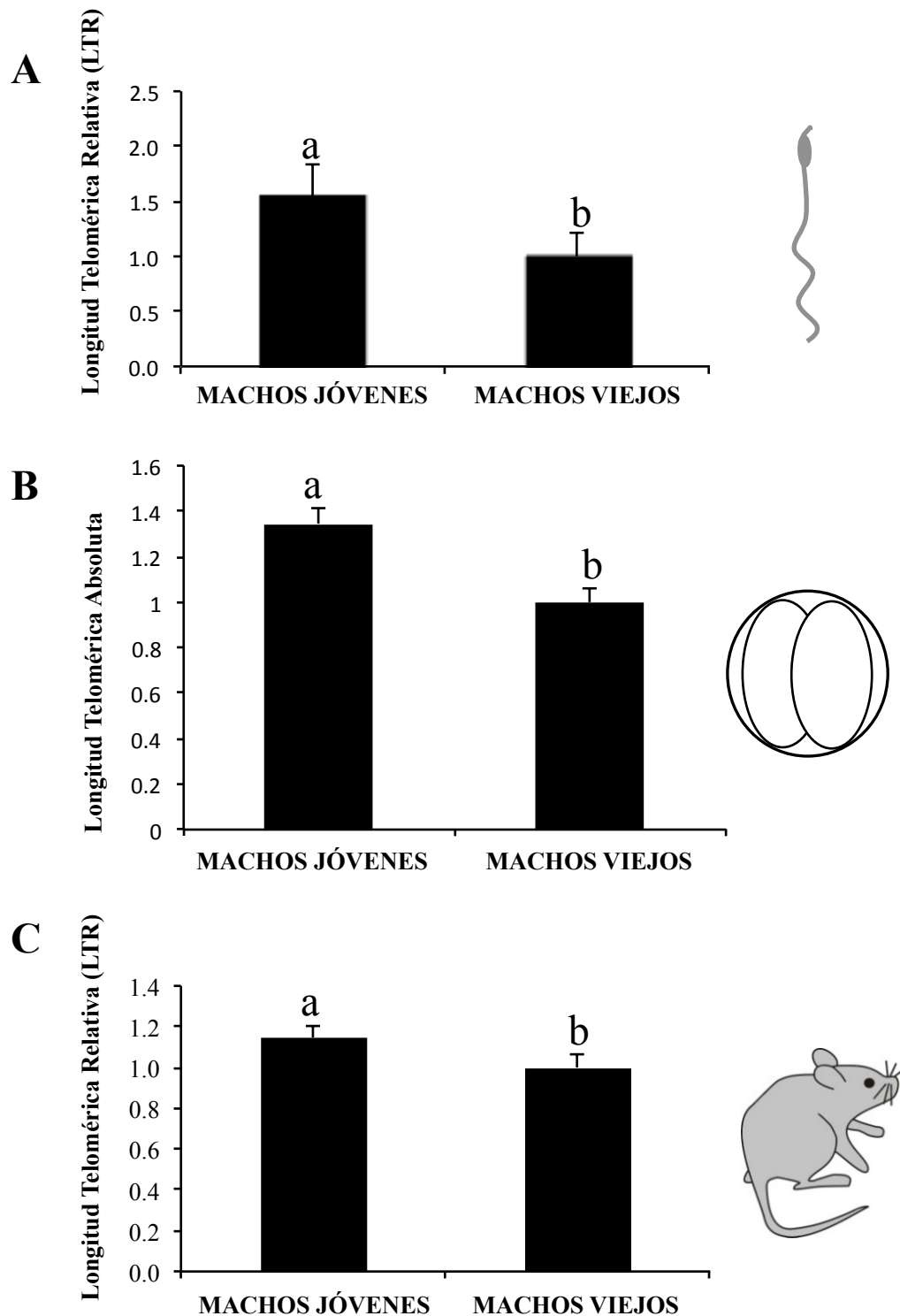


Figura 22. Longitud telomérica en espermatozoides, descendencia y embriones procedentes de padres *Mus musculus* jóvenes y viejos. (A) Longitud telomérica relativa en espermatozoides; (B) Longitud telomérica absoluta en embriones de 2 células; (C) Longitud telomérica relativa en la descendencia. Letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas basadas en ANOVA ($P \leq 0.05$).

Discusión

DISCUSIÓN

Estudio de la LT durante el envejecimiento y el desarrollo preimplantacional del ratón

Con el fin de validar una técnica basada en la PCR para el análisis de la longitud telomérica en tejidos y embriones, en el primer experimento estudiamos la regulación de la longitud telomérica durante el envejecimiento en dos especies de ratón conocidas por diferir en sus longitudes teloméricas: el ratón de laboratorio *Mus musculus*, y la especie salvaje *Mus spretus* (Hemann y Greider, 2000). Durante el desarrollo de la F1 del cruce de ambas especies se produce un sustancial incremento de la LT de la especie con LT más corta (*Mus spretus*), presentando ésta una longitud intermedia entre ambas especies, resultado de la elongación telomérica durante algún momento del desarrollo normal embrionario, fetal y/o postnatal de las células somáticas (Zhu *et al.* 1998). En este sentido, los resultados obtenidos están de acuerdo con las diferencias previamente observadas, validando con ello la metodología empleada.

Por otra parte, se conoce que la longitud telomérica disminuye durante el envejecimiento en ratones y humanos. Sin embargo, también se ha documentado que la disminución es específica del tejido y del tipo celular, siendo más marcada o más consistente en unos tejidos comparados con otros (Cherif *et al.* 2003; Coviello-McLaughlin y Prowse 1997; Hastings *et al.* 2004). En este experimento hemos observado que el corazón y el riñón son los órganos más fiables para determinar la edad mediante la longitud telomérica de los 5 órganos analizados en ambos cruces. Una posible explicación a este hecho puede ser que ambos órganos están formados por una población celular más homogénea (y por tanto más estable en su longitud telomérica) que las gónadas o el cerebro. En esta línea, el corazón ha sido propuesto como el órgano en el que más rápidamente y de forma más consistente disminuyen los telómeros con la edad en roedores (Hastings *et al.* 2004). También, de acuerdo con nuestros resultados, otro estudio en ratas observó una buena correlación entre la LT de biopsias de riñón y la edad en ratas, que no se observó en biopsias de cerebro (Cherif *et al.* 2003).

Las gónadas están compuestas por multitud de tipos celulares, incluyendo células somáticas y germinales en distintos estados de diferenciación. El análisis de la longitud de los TRF en testículo de la especie *Mus spretus* de diferentes edades reveló una disminución no significativa de la longitud a una tasa de 37 pb/mes (Coviello-McLaughlin y Prowse 1997), similar a lo observado en este estudio. Es sabido, además, que durante el proceso de la espermatogénesis ocurren cambios dinámicos en la longitud telomérica (Achi 2000; Tanemura *et al.* 2005). La proporción de estos tipos celulares en el total de la masa gonadal varía con la edad y puede enmascarar la posible variación de la LT en los gametos asociada a la edad. El cerebro es probablemente el órgano más complejo en cuanto a tipos celulares, algunos de los cuales son capaces de expresar telomerasa (Mattson y Klapper 2001) y, por ello, tampoco se puede excluir una variación de la longitud telomérica debida a los cambios en la proporción de tipos celulares que tienen lugar a lo largo del desarrollo (Dennis y Thompson 2013). En este caso, observamos un cambio brusco en la longitud telomérica entre la edad adulta y la senescencia en la especie *Mus musculus*, en claro contraste con la ausencia de diferencias marcadas entre estas dos etapas vitales en los otros órganos estudiados. El metabolismo aeróbico de las células eucariotas produce radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas de oxígeno (ROS). El balance inadecuado ente la producción de ROS y el nivel de antioxidantes conduce a daño celular causado por el estrés oxidativo, consecuencia directa de la acumulación excesiva de ROS (Gandhi y Abramov 2012). Durante el envejecimiento normal, los niveles de estrés oxidativo aumentan. Así, la senescencia en general a menudo se asocia a una desregulación del balance redox que impacta directamente en la acumulación de ROS y los niveles de estrés oxidativo (Campos *et al.* 2014). El cerebro, por motivos anatómicos y metabólicos, es considerado anormalmente sensible al estrés oxidativo (Uttara *et al.* 2009) y la acumulación con la edad de radicales libres de oxígeno y otras especies reactivas, que son causa de erosión de los telómeros, resulta potencialmente tóxico para las neuronas. En este sentido, el desequilibrio entre la homeostasis pro-oxidante y antioxidante y la consecuente generación excesiva de ROS se ha asociado a desórdenes como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, el envejecimiento, y muchos otros desórdenes neuronales (Uttara *et al.* 2009). Esta disminución brusca de la LT del cerebro ligada a la senescencia observada en nuestro estudio puede estar relacionada con la aparición de alteraciones neurológicas como las enfermedades de Alzheimer y

Parkinson (Eitan 2014), aunque la asociación entre la longitud telomérica y estas patologías humanas y la posible extrapolación en ratones es controvertida. En el caso de la patología de Parkinson la asociación no se ha podido demostrar en ratones, ya que el acortamiento telomérico en las células de la sustancia negra en el ratón deficiente a la telomerasa no aumenta la susceptibilidad a la pérdida de dopamina típica de la patología (Oeckl 2014). En el caso del Alzheimer, el modelo de ratón deficiente a telomerasa no sólo no aumenta la incidencia de la enfermedad, sino que ralentiza la formación de la placa amiloide (Rolyan *et al.* 2011).

Los resultados obtenidos en embriones preimplantacionales coinciden con los obtenidos por otros autores en diversas especies. En ratones, bovinos (Liu *et al.* 2007; Schatzlein *et al.* 2004) y humanos (Turner 2010; Wright *et al.* 2001) se ha observado un aumento de la LT en la transición de mórula a blastocisto, que coincide con la expresión de los componentes de la telomerasa (Schatzlein *et al.* 2004). Estudios iniciales en bovinos (Betts y King 1999) y humanos (Wright *et al.* 2001) sugirieron que la telomerasa estaba presente durante todo el desarrollo preimplantacional, pero estudios más recientes basados en metodologías más avanzadas y el empleo de modelos KO han determinado que la actividad telomerasa sólo ejerce su acción a partir del estadio de mórula (Liu *et al.* 2007; Schatzlein *et al.* 2004). Pese a no existir telomerasa en ese periodo, hemos observado un aumento de la LT durante la primera división celular. Este aumento ya ha sido descrito en ratones (Liu *et al.* 2007) y parece deberse a un mecanismo alternativo basado en la recombinación de cromátidas hermanas (Kass-Eisler y Greider 2000).

Mecanismos de elongación telomérica durante el desarrollo preimplantacional

Durante el desarrollo preimplantacional la actividad de la telomerasa es baja, o prácticamente ausente, en los ovocitos maduros y embriones tempranos hasta la fase de mórula (Betts y King 1999; Eisenhauer *et al.* 1997; Wright *et al.* 2001; Xu y Yang 2000), en la que un incremento en su actividad es responsable de la elongación de los telómeros en el blastocisto. Los perfiles de expresión de *Terc* y *Tert* observados en el análisis del segundo experimento son compatibles con la presencia de actividad telomerasa en la transición mórula-blastocisto y con la elongación telomérica observada en esta fase en el experimento 1, y que ha sido descrita previamente en ratón y bovino (Schatzlein *et al.* 2004), y en humanos (Turner *et al.* 2010). Esta

elongación es dependiente de la telomerasa, pues el ratón deficiente en telomerasa no elonga sus telómeros en el blastocisto (Schaetzlein *et al.* 2004; Schaetzlein y Rudolph 2005).

En la especie bovina y en la rata la actividad telomerasa está presente en el ovocito en desarrollo pero disminuye durante el proceso de maduración (Betts y King 1999; Eisenhauer *et al.* 1997). Debido a la ausencia de actividad telomerasa en ovocitos maduros, la abundancia del ARNm de *Tert* observada en los ovocitos y cigotos de ratón de nuestro análisis, antes del inicio de la transcripción del genoma embrionario, resulta sorprendente. El ovocito en proceso de maduración, a partir del estadio de vesícula germinal (VG), es transcripcionalmente inactivo (De La Fuente *et al.* 2004) y regula su maquinaria celular mediante la degradación y protección (fundamentalmente poliadenilación) selectiva de transcritos y mecanismos postranscripcionales (Paynton y Bachvarova 1994). Se conoce que el ARNm de *Tert* está presente en el ovocito desde el estadio de folículo primordial hasta el de folículo de Graff (<https://www.nextbio.com/b/search/ba/TERT>), por lo que nuestro resultado podría deberse a la persistencia de un remanente del transcrito expresado en estadios previos. De acuerdo con nuestro resultado, se ha detectado la presencia del transcrito de *Tert* en ovocitos de ratón en MII (Yamada-Fukunaga *et al.* 2013). El significado biológico de la presencia del ARNm de *Tert* en este estadio es incierto, puesto que en ausencia de *Terc* no puede formar una telomerasa activa (Bryan *et al.* 2003; Weinrich *et al.* 1997). De acuerdo con un posible papel de TERT en funciones distintas de la elongación telomérica, el estudio previamente citado describió una localización citoplasmática de la proteína, contraria a su típica localización nuclear y obviamente incompatible con su función en la elongación de los telómeros cromosómicos (Yamada-Fukunaga *et al.* 2013). Tras el estadio de cigoto la abundancia del transcrito de *Tert* disminuyó drásticamente debido, probablemente, a la degradación del mismo. La degradación de transcritos maternos continúa tras la fecundación del ovocito, de manera que en la mitad del estadio de dos células más del 90% del ARNm materno ha sido degradado, y algunos de ellos han sido degradados rápidamente en pocas horas tras la fecundación (Alizadeh *et al.* 2005).

La sobreexpresión transitoria de la telomerasa durante el desarrollo preimplantacional podría tener un efecto en la LT del embrión al nacimiento que podría reflejarse en el desarrollo posterior del neonato y durante su envejecimiento.

Sin embargo, debido a que el acortamiento telomérico actúa como una barrera frente a la proliferación incontrolada de las células tumorales, la expresión constitutiva del componente transcriptasa inverso (TERT) ha demostrado tener un impacto negativo en el ratón durante su envejecimiento, evidenciado por el incremento en la incidencia de tumores espontáneos (Artandi *et al.* 2002; Canela *et al.* 2004; González-Suárez *et al.* 2001). Cuando la sobreexpresión de TERT tiene lugar en el contexto del ratón transgénico resistente al cáncer, la actividad telomerasa demostró tener un efecto antienvjecimiento (Tomás-Loba *et al.* 2008). Por ello, en este trabajo hemos utilizado como vector de expresión un plásmido circular no integrativo, que tras diluirse como consecuencia de las divisiones celulares permitiría estudiar las implicaciones de aumentar la LT en el estadio de blastocisto en la vida posterior del neonato, sin las consecuencias negativas de la sobreexpresión indefinida en la carcinogénesis. La microinyección de plásmidos en el estadio de cigoto resultó en una eficiente expresión exógena que aumentó significativamente la abundancia de transcritos de *Tert* y *Terc*. Sin embargo, pese a usar el mismo vector base, la sobreexpresión de *Tert* fue mayor, posiblemente debido a la menor cantidad de ARNm endógeno de este transcrito en comparación con *Terc*. En contraste con estudios previos en la especie bovina (Garrels *et al.* 2012; Iqbal *et al.* 2011), la sobreexpresión de los componentes de la telomerasa no resultó en un aumento de la LT del blastocisto de ratón. La diferencia se puede deber a que en bovino los telómeros son significativamente más cortos que los presentes en el ratón, por tanto más susceptibles de ser elongados. La compleja regulación de la actividad telomerasa y de la dinámica de la longitud telomérica en la ontogénesis del individuo podría impedir una excesiva elongación telomérica en una especie con telómeros excepcionalmente largos.

Zscan4 se expresa exclusivamente en el embrión de 2 células y en las células madre embrionarias de ratón, siendo esencial para el desarrollo preimplantacional (Falco *et al.* 2007). En ESCs, *Zscan4* se ha relacionado con el mantenimiento de la LT. La proteína ZSCAN4 colocaliza con los telómeros y se ha sugerido que puede actuar facilitando la recombinación telomérica induciendo mediadores de recombinación homóloga específicos de la meiosis (Zalzman *et al.* 2010). En ESC, *Zscan4* muestra un patrón de expresión heterogéneo, siendo expresado en aproximadamente el 5% de células en un momento dado marcando con ello un estado

transitorio de las ESCs (Zalzman *et al.* 2010), asimilable al estadio de 2 células y que ha sido considerado un "super" estadio de las *stem cells* (Surani y Tischler 2012). Su activación intermitente ha demostrado ser esencial en la habilidad de las ESCs para proliferar ilimitadamente y en el mantenimiento de su estabilidad genómica y de sus telómeros. El perfil de expresión observado durante el desarrollo embrionario de *Zscan4* confirma que su expresión se restringe al estadio de 2 células, coincidente con la reprogramación epigenética del genoma que desemboca en la AGE (Hajkova 2010).

En nuestro estudio hemos sobreexpresado *Zscan4* con la pretensión de aumentar la LT del blastocisto mediante una vía alternativa a la telomerasa. La microinyección del plásmido resultó en un aumento significativo de la cantidad de ARNm de *Zscan4* desde el estadio de 4 células al de mórula, sin tener consecuencias sobre la LT del blastocisto. La ausencia de diferencias en el estadio de 2 células puede deberse a que el nivel de expresión del plásmido en las primeras 24 horas post-inyección fue insuficiente o que el elevado nivel de expresión endógena impide detectar la presencia de transcritos procedentes del plásmido. Por otra parte, dado que sólo hemos analizado la LT en el estadio de blastocisto, desconocemos si la ausencia de diferencias se debe a que *Zscan4* no es capaz de elongar *per se* los telómeros o, si fue capaz de elongarlos, la posterior expresión de telomerasa endógena enmascaró este elongamiento igualando la LT entre los distintos grupos. En cualquier caso, dado que la LT no varió en blastocisto, la estrategia fracasó como método de aumento de la LT de la descendencia. La expresión exógena de *Zscan4* elonga los telómeros en otros sistemas celulares. La disminución de los transcritos de *Zscan4* en ES disminuye la LT impidiendo la proliferación celular, mientras que la inducción de *Zscan4* en éstas rescata el fenotipo proliferativo y promueve la elongación telomérica de manera independiente de la telomerasa (Zalzman *et al.* 2010). Por otra parte, durante la generación de células pluripotenciales inducidas (células iPS), *Zscan4* mejora la calidad de las iPS promoviendo la estabilidad genómica y elongación telomérica a través de mecanismos de recombinación telomérica (Jiang *et al.* 2013).

Papel de la longitud telomérica del espermatozoide en la LT de la descendencia

Los mecanismos dependientes de la telomerasa no pueden explicar la elongación telomérica que ocurre en ausencia de actividad telomerasa (Liu *et al.*

2007) ni el efecto observado de la LT del espermatozoide en la LT de la descendencia. En nuestro estudio describimos que la LT del espermatozoide determina la LT del embrión temprano antes de la expresión de la telomerasa y, por tanto, debido probablemente a un mecanismo alternativo de elongación telomérica (ALT) (Bryan *et al.* 1995), donde los telómeros del espermatozoide podrían actuar como una guía. La dinámica epigenética durante el desarrollo preimplantacional provee un escenario favorable para los mecanismos tipo ALT. Por una parte, los niveles de metilación del genoma del ovocito son sustancialmente más bajos que en las células somáticas (Kobayashi *et al.* 2012; Smith *et al.* 2012). Por otra, tras la fecundación tiene lugar una intensa desmetilación activa del genoma paterno. Ambos fenómenos resultan en una hipometilación del genoma, ideal para la activación de ALT (Gonzalo *et al.* 2006). Debido a que la herencia paterna de la LT ha sido demostrada de manera más consistente que la del lado materno (De Meyer *et al.* 2007; Eisenberg *et al.* 2012; Kimura *et al.* 2008; Njajou *et al.* 2007; Nordfjall *et al.* 2005; Unryn *et al.* 2005), los telómeros del espermatozoide podrían jugar un papel predominante sobre los telómeros del ovocito en los mecanismos de recombinación. Sin embargo, no hay evidencias que demuestren el posible mecanismo de una herencia específica paterna de la LT.

La mayor longitud telomérica del espermatozoide comparada con la del ovocito podría explicar el efecto predominantemente paterno de la heredabilidad telomérica, pues los telómeros heredados por vía paterna podrían ser utilizados para alargar los telómeros más cortos heredados por vía materna mediante ALT. De acuerdo con nuestros resultados, se ha descrito que los telómeros del ovocito son más cortos que los de las células somáticas (Liu *et al.* 2007). Por el contrario, otro estudio en humanos describe mayores longitudes teloméricas en los ovocitos y pronúcleos femeninos comparados con espermatozoides y pronúcleos masculinos (Turner y Hartshorne, 2013). Una posible causa para explicar esta discrepancia es que el análisis de la LT en este último trabajo se realizó mediante qFISH y, por tanto, los resultados pueden haber sido influidos por las diferencias en eficiencias de hibridación debido a la diferente conformación cromatínica en el gameto masculino y el gameto femenino, especialmente teniendo en cuenta que las extensiones metafásicas no se pueden obtener de los gametos y pronúcleos. En apoyo a esta idea, la LT del esperma cuantificado por qFISH (Turner y Hartshorne, 2013) es la mitad que la obtenida por

los análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF) (Baird *et al.* 2006; Kimura *et al.* 2008; Kozik *et al.* 1998; Pickett *et al.* 2011). El resultado de nuestro análisis mostrando una LT más corta en cigotos partenogenéticos –producidos sin espermatozoides- comparados con los fecundados con espermatozoides con telómeros largos (*Mus musculus*) también apoya la hipótesis de una menor LT en el ovocito comparada con la de los espermatozoides. Siguiendo la misma tendencia, otro estudio observó que los telómeros de embriones partenogenéticos eran más cortos que los embriones fecundados *Mus musculus* realizando el análisis por qPCR, mientras que el análisis mediante qFISH mostró resultados inconsistentes que variaban según la cepa de ratón (Liu *et al.* 2007).

El mecanismo preciso por el que los telómeros del espermatozoide juegan un papel directo en la LT embrionaria es aún desconocido. Resulta tentador pensar que los telómeros del espermatozoide pueden servir como molde para la elongación de los telómeros del ovocito durante la singamia, pero un estudio reciente rebate esta hipótesis: utilizando un modelo de ratón transgénico con telómeros marcados, los autores observaron que el marcador se transmitía a la descendencia siguiendo la herencia Mendeliana. Esta observación prueba que los telómeros no son copiados de un cromosoma a su par homólogo en la línea germinal o en el embrión preimplantacional como ocurre en las células somáticas mediante ALT (Neumann *et al.* 2013). Por lo tanto, parece que los mecanismos de ALT que se dan en los embriones tempranos no ocurren interteloméricamente (es decir, copiando un telómero de otro cromosoma), sino intrateloméricamente (es decir, utilizando su propia secuencia como molde) (Muntoni *et al.* 2009). Basándonos en esta observación, nosotros hipotetizamos que los telómeros del espermatozoide podrían servir como guía para determinar la longitud final de los del ovocito más que como un molde para ALT. En nuestros resultados hemos observado que las diferencias en LT en el embrión temprano originadas por diferencias en longitudes teloméricas del espermatozoide se mantienen durante el desarrollo fetal, dando lugar a una descendencia con diferencias en su LT dependiendo de la LT inicial del espermatozoide. Así, la descendencia de padres viejos mostró una menor LT que la descendencia de padres más jóvenes, en consonancia con las diferencias en LT observadas en los espermatozoides y embriones de dos células. De manera similar, la descendencia de machos *Mus spretus* presentó telómeros más cortos que los hijos de

padres *Mus musculus*. Sin embargo, aunque las diferencias observadas en el estadio de dos células entre embriones fecundados con esperma *Mus musculus* o *Mus spretus* sólo pueden ser atribuidas al dimorfismo en la LT del espermatozoide, en este último caso no se puede descartar que las diferencias observadas más tarde, después de la activación de la telomerasa, se hayan visto influidas por posibles diferencias en la actividad o expresión de la enzima entre ambas especies. Como apoyo adicional al papel de la LT del espermatozoide en la LT de la descendencia, un estudio sobre la haploinsuficiencia de TERT en ratones muestra que la restauración de TERT no es capaz de restablecer la LT de la descendencia, sugiriendo que otros factores, como la LT del esperma, determinan la longitud telomérica de la descendencia (Chiang *et al.* 2010).

Conclusiones

- 1) La longitud telomérica determinada por qPCR está inversamente relacionada con la edad en ratones. De los 5 órganos estudiados (riñón, corazón, cerebro, testículo y ovario), el riñón y el corazón son los órganos más fiables para la determinación de la edad mediante la longitud telomérica.
- 2) La longitud telomérica experimenta cambios dinámicos durante el desarrollo preimplantacional del ratón, aumentando entre el cigoto y el embrión de 2 células, disminuyendo a partir del estadio de 4 células, y volviendo a aumentar bruscamente en el estadio de blastocisto, donde supera la longitud telomérica del estadio de 2 células.
- 3) La abundancia relativa de ARNm de los componentes de la telomerasa *Terc* y *Tert* sigue un patrón de expresión distinto hasta el estadio de blastocisto, momento en el que aumenta la expresión de ambos transcritos permitiendo la elongación de los telómeros via telomerasa. *Zscan4* se expresa en el embrión de 2 células, siendo su expresión muy baja o indetectable en el resto de estadios preimplantacionales.
- 4) La microinyección pronuclear de plásmidos circulares codificantes para *Terc*, *Tert* y *Zscan4* en cigotos de ratón produce una sobreexpresión exógena de dichos genes durante el desarrollo preimplantacional. Sin embargo, esta sobreexpresión no tiene consecuencias sobre la longitud telomérica embrionaria. Los mecanismos de regulación de la longitud telomérica y actividad telomerasa podrían inhibir una elongación excesiva en una especie con telómeros excepcionalmente largos.
- 5) La mayor longitud telomérica observada en los espermatozoides con respecto a la de los ovocitos, y en los embriones producidos por fecundación con espermatozoides con telómeros largos con respecto a la de los producidos por activación partenogenética, sugiere que los telómeros del espermatozoide pueden actuar como guía para alargar los telómeros del ovocito.
- 6) En la especie *Mus musculus*, siguiendo una tendencia contraria a la observada en la especie humana, la longitud telomérica del espermatozoide disminuye con la edad.
- 7) La longitud telomérica del espermatozoide es un factor determinante para la longitud telomérica del embrión -antes y después de la activación de la telomerasa- y de la descendencia en ambos modelos estudiados: *Mus musculus* vs. *Mus spretus* y *Mus musculus* jóvenes vs. viejos.

Referencias Bibliográficas

- Achi MV, Ravindranath N, Dym M. 2000. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. *Biol Reprod* 63(2):591-8.
- Aisner DL, Wright WE, Shay JW. 2002. Telomerase regulation: not just flipping the switch. *Curr Opin Genet Dev* 12(1):80-5.
- Akiyama M, Hideshima T, Hayashi T, Tai YT, Mitsiades CS, Mitsiades N, Chauhan D, Richardson P, Munshi NC, Anderson KC. 2003. Nuclear factor-kappaB p65 mediates tumor necrosis factor alpha-induced nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase protein. *Cancer Res* 63(1):18-21.
- Alizadeh Z, Kageyama S, Aoki F. 2005. Degradation of maternal mRNA in mouse embryos: selective degradation of specific mRNAs after fertilization. *Mol Reprod Dev* 72(3):281-90.
- Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. 1992. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21):10114-8.
- Alter BP, Giri N, Savage SA, Rosenberg PS. 2009. Cancer in dyskeratosis congenita. *Blood* 113(26):6549-57.
- Andrew T, Aviv A, Falchi M, Surdulescu GL, Gardner JP, Lu X, Kimura M, Kato BS, Valdes AM, Spector TD. 2006. Mapping genetic loci that determine leukocyte telomere length in a large sample of unselected female sibling pairs. *Am J Hum Genet* 78(3):480-6.
- Armanios M. 2012. Telomerase and idiopathic pulmonary fibrosis. *Mutat Res* 730(1-2):52-8.
- Armanios M, Blackburn EH. 2012. The telomere syndromes. *Nat Rev Genet* 13(10):693-704.
- Armanios M, Alder JK, Parry EM, Karim B, Strong MA, Greider CW. 2009. Short telomeres are sufficient to cause the degenerative defects associated with aging. *Am J Hum Genet* 85(6):823-32.
- Armanios M, Price C. 2012. Telomeres and disease: an overview. *Mutat Res* 730(1-2):1-2.
- Arnoult N, Van Beneden A, Decottignies A. 2012. Telomere length regulates TERRA levels through increased trimethylation of telomeric H3K9 and HP1 α . *Nat Struct Mol Biol* 19(9):948-56.
- Artandi SE, Alson S, Tietze MK, Sharpless NE, Ye S, Greenberg RA, Castrillon DH, Horner JW, Weiler SR, Carrasco RD et al. . 2002. Constitutive telomerase expression promotes mammary carcinomas in aging mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(12):8191-6.
- Atzmon G, Cho M, Cawthon RM, Budagov T, Katz M, Yang X, Siegel G, Bergman A, Huffman DM, Schechter CB et al. . 2010. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: Genetic variation in human telomerase is associated with telomere length in Ashkenazi centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107 Suppl 1:1710-7.
- Avci CB, Sahin F, Gunduz C, Selvi N, Aydin HH, Oktem G, Topcuoglu N, Saydam G. 2007. Protein phosphatase 2A (PP2A) has a potential role in CAPE-induced apoptosis of CCRF-CEM cells via effecting human telomerase reverse transcriptase activity. *Hematology* 12(6):519-25.
- Aviv A, Valdes A, Gardner JP, Swaminathan R, Kimura M, Spector TD. 2006. Menopause modifies the association of leukocyte telomere length with insulin resistance and inflammation. *J Clin Endocrinol Metab* 91(2):635-40.
- Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantuli L, Giulotto E, Lingner J. 2007. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318(5851):798-801.
- Bailey SM, Breneman MA, Goodwin EH. 2004. Frequent recombination in telomeric DNA may extend the proliferative life of telomerase-negative cells. *Nucleic Acids Res* 32(12):3743-51.
- Baird DM, Britt-Compton B, Rowson J, Amso NN, Gregory L, Kipling D. 2006. Telomere instability in the male germline. *Human Molecular Genetics* 15(1): 45-51.
- Barlow AL, Hultén MA. 1996. Combined immunocytogenetic and molecular cytogenetic analysis of meiosis I human spermatocytes. *Chromosome Res* 4(8):562-73.

- Bass HW, Riera-Lizarazu O, Ananiev EV, Bordoli SJ, Rines HW, Phillips RL, Sedat JW, Agard DA, Cande WZ. 2000. Evidence for the coincident initiation of homolog pairing and synapsis during the telomere-clustering (bouquet) stage of meiotic prophase. *J Cell Sci* 113 (Pt 6):1033-42.
- Bechter OE, Shay JW, Wright WE. 2004a. The frequency of homologous recombination in human ALT cells. *Cell Cycle* 3(5):547-9.
- Bechter OE, Zou Y, Walker W, Wright WE, Shay JW. 2004b. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res* 64(10):3444-51.
- Begus-Nahrman Y, Hartmann D, Kraus J, Eshraghi P, Scheffold A, Grieb M, Rasche V, Schirmacher P, Lee HW, Kestler HA et al. . 2012. Transient telomere dysfunction induces chromosomal instability and promotes carcinogenesis. *J Clin Invest* 122(6):2283-8.
- Ben-Porath I, Weinberg RA. 2005. The signals and pathways activating cellular senescence. *Int J Biochem Cell Biol* 37(5):961-76.
- Benetos A, Gardner JP, Zureik M, Labat C, Xiaobin L, Adamopoulos C, Temmar M, Bean KE, Thomas F, Aviv A. 2004. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* 43(2):182-5.
- Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean K, Aviv A. 2001. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37(2 Pt 2):381-5.
- Benetti R, García-Cao M, Blasco MA. 2007. Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nat Genet* 39(2):243-50.
- Bermejo-Alvarez P, Lonergan P, Rizos D, Gutierrez-Adan A. 2010. Low oxygen tension during IVM improves bovine oocyte competence and enhances anaerobic glycolysis. *Reprod Biomed Online* 20(3):341-49.
- Bernardes de Jesus B, Blasco MA. 2013. Telomerase at the intersection of cancer and aging. *Trends Genet* 29(9):513-20.
- Bernardes de Jesus B, Vera E, Schneeberger K, Tejera AM, Ayuso E, Bosch F, Blasco MA. 2012. Telomerase gene therapy in adult and old mice delays aging and increases longevity without increasing cancer. *EMBO Mol Med* 4(8):691-704.
- Betts DH, King WA. 1999. Telomerase activity and telomere detection during early bovine development. *Dev Genet* 25(4): 397-403.
- Blackburn EH. 2000. Telomere states and cell fates. *Nature* 408(6808):53-6.
- Blackburn EH, Gall JG. 1978. A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in Tetrahymena. *J Mol Biol* 120(1):33-53.
- Blasco MA. 2007. Telomere length, stem cells and aging. *Nat Chem Biol* 3(10):640-9.
- Blasco MA, Funk W, Villeponteau B, Greider CW. 1995. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA. *Science* 269(5228):1267-70.
- Blasco MA, Lee HW, Hande MP, Samper E, Lansdorp PM, DePinho RA, Greider CW. 1997. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 91(1):25-34.
- Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtsteiner S, Wright WE. 1998. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 279(5349):349-52.
- Braude P, Bolton V, Moore S. 1988. Human gene expression first occurs between the four- and eight-cell stages of preimplantation development. *Nature* 332(6163):459-61.
- Brinster RL, Chen HY, Trumbauer ME, Yagle MK, Palmiter R.D. 1985. Factors affecting the efficiency of introducing foreign DNA into mice by microinjecting eggs. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(13): 4438-42.
- Brock GJ, Charlton J, Bird A. 1999. Densely methylated sequences that are preferentially localized at telomere-proximal regions of human chromosomes. *Gene* 240(2):269-77.
- Broer L, Codd V, Nyholt DR, Deelen J, Mangino M, Willemsen G, Albrecht E, Amin N, Beekman M, de Geus EJ et al. . 2013. Meta-analysis of telomere length in 19,713

- subjects reveals high heritability, stronger maternal inheritance and a paternal age effect. *Eur J Hum Genet* 21(10):1163-8.
- Brouillette S, Singh RK, Thompson JR, Goodall AH, Samani NJ. 2003. White cell telomere length and risk of premature myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 23(5):842-6.
- Brouillette SW, Moore JS, McMahon AD, Thompson JR, Ford I, Shepherd J, Packard CJ, Samani NJ, Group WoSCPS. 2007. Telomere length, risk of coronary heart disease, and statin treatment in the West of Scotland Primary Prevention Study: a nested case-control study. *Lancet* 369(9556):107-14.
- Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. 1997. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 3(11):1271-4.
- Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, Reddel RR. 1995. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 14(17):4240-8.
- Bryan TM, Goodrich KJ, Cech TR. 2003. Tetrahymena telomerase is active as a monomer. *Mol Biol Cell* 14(12):4794-804.
- Bryan TM, Reddel RR. 1997. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer* 33(5):767-73.
- Burger AM, Dai F, Schultes CM, Reszka AP, Moore MJ, Double JA, Neidle S. 2005. The G-quadruplex-interactive molecule BRACO-19 inhibits tumor growth, consistent with telomere targeting and interference with telomerase function. *Cancer Res* 65(4):1489-96.
- Burnet M. 1974. *Intrinsic mutagenesis: a genetic approach to ageing*. Lancaster: Medical and Technical Publishing Co.
- Cairney CJ, Keith WN. 2008. Telomerase redefined: integrated regulation of hTR and hTERT for telomere maintenance and telomerase activity. *Biochimie* 90(1):13-23.
- Campos PB, Paulsen BS, Rehen SK. 2014. Accelerating neuronal aging in in vitro model brain disorders: a focus on reactive oxygen species. *Front Aging Neurosci* 6, 292.
- Canela A, Martín-Caballero J, Flores JM, Blasco MA. 2004. Constitutive expression of tert in thymocytes leads to increased incidence and dissemination of T-cell lymphoma in Lck-Tert mice. *Mol Cell Biol* 24(10):4275-93.
- Canela A, Vera E, Klatt P, Blasco MA 2007. High-throughput telomere length quantification by FISH and its application to human population studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(13): 5300-05.
- Calado R, Young N. 2012. Telomeres in disease. *F1000 Med Rep* 4:8.
- Carrel A. 1912. On the permanent life of tissues outside of the organism. *J Exp Med* 15(5):516-28.
- Carrel A, Ebeling AH. 1921. Age and multiplication of fibroblasts. *J Exp Med* 34(6):599-623.
- Cawthon RM. 2002. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 30(10): e47.
- Cawthon RM, Smith KR, O'Brien E, Sivatchenko A, Kerber RA. 2003. Association between telomere length in blood and mortality in people aged 60 years or older. *Lancet* 361(9355):393-5.
- Celli GB, de Lange T. 2005. DNA processing is not required for ATM-mediated telomere damage response after TRF2 deletion. *Nat Cell Biol* 7(7):712-8.
- Cesare AJ, Griffith JD. 2004. Telomeric DNA in ALT cells is characterized by free telomeric circles and heterogeneous t-loops. *Mol Cell Biol* 24(22):9948-57.
- Cesare AJ, Karlseder J. 2012. A three-state model of telomere control over human proliferative boundaries. *Curr Opin Cell Biol* 24(6):731-8.
- Cesare AJ, Reddel RR. 2010. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 11(5):319-30.
- Chan SR, Blackburn EH. 2004. Telomeres and telomerase. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 359(1441):109-21.
- Chargaff E. 1950. Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia* 6(6):201-9.

- Chen JL, Greider CW. 2003. Determinants in mammalian telomerase RNA that mediate enzyme processivity and cross-species incompatibility. *EMBO J* 22(2):304-14.
- Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. 2003. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Res* 31(5): 1576-83.
- Chiang YJ, Calado RT, Hathcock KS, Lansdorp PM, Young NS, Hodes RJ. 2010. Telomere length is inherited with resetting of the telomere set-point. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(22):10148-53.
- Chiang YJ, Kim SH, Tessarollo L, Campisi J, Hodes RJ. 2004. Telomere-associated protein TIN2 is essential for early embryonic development through a telomerase-independent pathway. *Mol Cell Biol* 24(15):6631-4.
- Chiodi I, Mondello C. 2012. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Front Oncol* 2:133.
- Churikov D, Wei C, Price CM. 2006. Vertebrate POT1 restricts G-overhang length and prevents activation of a telomeric DNA damage checkpoint but is dispensable for overhang protection. *Mol Cell Biol* 26(18):6971-82.
- Cifuentes-Rojas C, Shippen DE. 2012. Telomerase regulation. *Mutat Res* 730(1-2):20-7.
- Cioce M, Lamond AI. 2005. Cajal bodies: a long history of discovery. *Annu Rev Cell Dev Biol* 21:105-31.
- Clemente M, de La Fuente J, Fair T, Al Naib A, Gutierrez-Adan A, Roche JF, Rizos D, Lonergan P. 2009. Progesterone and conceptus elongation in cattle: a direct effect on the embryo or an indirect effect via the endometrium? *Reproduction* 138(3):507-17.
- Codd V, Mangino M, van der Harst P, Braund PS, Kaiser M, Beveridge AJ, Rafelt S, Moore J, Nelson C, Soranzo N et al. . 2010. Common variants near TERC are associated with mean telomere length. *Nat Genet* 42(3):197-9.
- Cohen SB, Graham ME, Lovrecz GO, Bache N, Robinson PJ, Reddel RR. 2007. Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells. *Science* 315(5820):1850-3.
- Collado M, Serrano M. 2006. The power and the promise of oncogene-induced senescence markers. *Nat Rev Cancer* 6(6):472-6.
- Collins K, Mitchell JR. 2002. Telomerase in the human organism. *Oncogene* 21(4):564-79.
- Cong YS, Wright WE, Shay JW. 2002. Human telomerase and its regulation. *Microbiol Mol Biol Rev* 66(3):407-25, table of contents.
- Conomos D, Pickett HA, Reddel RR. 2013. Alternative lengthening of telomeres: remodeling the telomere architecture. *Front Oncol* 3:27.
- Cooke HJ, Smith BA. 1986. Variability at the telomeres of the human X/Y pseudoautosomal region. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1:213-9.
- Coppé JP, Desprez PY, Krtolica A, Campisi J. 2010. The senescence-associated secretory phenotype: the dark side of tumor suppression. *Annu Rev Pathol* 5:99-118.
- Costa A, Daidone MG, Daprai L, Villa R, Cantù S, Pilotti S, Mariani L, Gronchi A, Henson JD, Reddel RR et al. . 2006. Telomere maintenance mechanisms in liposarcomas: association with histologic subtypes and disease progression. *Cancer Res* 66(17):8918-24.
- Coviello-McLaughlin GM, Prowse KR. 1997. Telomere length regulation during postnatal development and ageing in *Mus spretus*. *Nucleic Acids Res* 25(15):3051-8.
- Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, Lingner J. 2007. Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Mol Cell* 27(6):882-9.
- Crosby IM, Gandolfi F, Moor RM. 1988. Control of protein synthesis during early cleavage of sheep embryos. *J Reprod Fertil* 82(2):769-75.
- Cusanelli E, Romero CA, Chartrand P. 2013. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell* 51(6):780-91.
- d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. 2003. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426(6963):194-8.

- d'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. 2004. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes Dev* 18(15):1781-99.
- Dandjinou AT, Dionne I, Gravel S, LeBel C, Parenteau J, Wellinger RJ. 1999. Cytological and functional aspects of telomere maintenance. *Histol Histopathol* 14(2):517-24.
- Daniali L, Benetos A, Susser E, Kark JD, Labat C, Kimura M, Desai K, Granick M, Aviv A. 2013. Telomeres shorten at equivalent rates in somatic tissues of adults. *Nat Commun* 4:1597.
- De Cian A, Lacroix L, Douarre C, Temime-Smaali N, Trentesaux C, Riou JF, Mergny JL. 2008. Targeting telomeres and telomerase. *Biochimie* 90(1):131-55.
- De La Fuente R, Viveiros MM, Burns KH, Adashi EY, Matzuk MM, Eppig JJ. 2004. Major chromatin remodeling in the germinal vesicle (GV) of mammalian oocytes is dispensable for global transcriptional silencing but required for centromeric heterochromatin function. *Dev Biol* 275(2):447-58.
- De Lange T. 1998. Ending up with the right partner. *Nature* 392(6678):753-4.
- De Lange T. 2004. T-loops and the origin of telomeres. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(4):323-9.
- De Lange T. 2005. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 19(18):2100-10.
- De Lange T. 2009. How telomeres solve the end-protection problem. *Science* 326(5955):948-52.
- De Lange T, Shiue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE. 1990. Structure and variability of human chromosome ends. *Mol Cell Biol* 10(2):518-27.
- De Meyer T, Rietzschel ER, De Buyzere ML, De Bacquer D, Van Criekinge W, De Backer GG, Gillebert TC, Van Oostveldt P, Bekaert S, investigators A. 2007. Paternal age at birth is an important determinant of offspring telomere length. *Hum Mol Genet* 16(24):3097-102.
- De Meyer T, Vandepitte K, Denil S, De Buyzere ML, Rietzschel ER, Bekaert S. 2014. A non-genetic, epigenetic-like mechanism of telomere length inheritance? *Eur J Hum Genet* 22(1):10-1.
- Demissie S, Levy D, Benjamin EJ, Cupples LA, Gardner JP, Herbert A, Kimura M, Larson MG, Meigs JB, Keaney JF et al. . 2006. Insulin resistance, oxidative stress, hypertension, and leukocyte telomere length in men from the Framingham Heart Study. *Aging Cell* 5(4):325-30.
- Denchi EL, de Lange T. 2007. Protection of telomeres through independent control of ATM and ATR by TRF2 and POT1. *Nature* 448(7157):1068-71.
- Deng Z, Wang Z, Xiang C, Molczan A, Baubet V, Conejo-Garcia J, Xu X, Lieberman PM, Dahmane N. 2012. Formation of telomeric repeat-containing RNA (TERRA) foci in highly proliferating mouse cerebellar neuronal progenitors and medulloblastoma. *J Cell Sci* 125(Pt 18):4383-94.
- Dennis EL, Thompson PM. 2013. Typical and atypical brain development: a review of neuroimaging studies. *Dialogues Clin Neurosci* 15(3): 359-84.
- Ding Z, Wu CJ, Jaskelioff M, Ivanova E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Chu GC, Wang G, Lu X, Labrot ES et al. . 2012. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell* 148(5):896-907.
- Djojoseburoto MW, Choi YS, Lee HW, Rudolph KL. 2003. Telomeres and telomerase in aging, regeneration and cancer. *Mol Cells* 15(2):164-75.
- Dokal I. 2011. Dyskeratosis congenita. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011:480-6.
- Dlouha D, Maluskova, J, Kralova Lesna I, Lanska V, Hubacek JA. 2014. Comparison of the relative telomere length measured in leukocytes and eleven different human tissues. *Physiol Res* 63 Suppl 3: S343-50.
- Dragon F, Pogacić V, Filipowicz W. 2000. In vitro assembly of human H/ACA small nucleolar RNPs reveals unique features of U17 and telomerase RNAs. *Mol Cell Biol* 20(9):3037-48.

- Draskovic I, Londono Vallejo A. 2013. Telomere recombination and alternative telomere lengthening mechanisms. *Front Biosci (Landmark Ed)* 18:1-20.
- Dunham MA, Neumann AA, Fasching CL, Reddel RR. 2000. Telomere maintenance by recombination in human cells. *Nat Genet* 26(4):447-50.
- Ebeling AH. 1913. The permanent life of connective tissue outside of the organism. *J Exp Med* 17(3):273-85.
- Egan ED, Collins K. 2010. Specificity and stoichiometry of subunit interactions in the human telomerase holoenzyme assembled in vivo. *Mol Cell Biol* 30(11):2775-86.
- Eickbush TH. 1997. Telomerase and retrotransposons: which came first? *Science* 277(5328):911-2.
- Eisenberg DT, Hayes MG, Kuzawa CW. 2012. Delayed paternal age of reproduction in humans is associated with longer telomeres across two generations of descendants. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Eisenhauer KM, Gerstein RM, Chiu CP, Conti M, Hsueh AJ. 1997. Telomerase activity in female and male rat germ cells undergoing meiosis and in early embryos. *Biol Reprod* 56(5):1120-5.
- Eitan E, Hutchison ER, Mattson MP. 2014. Telomere shortening in neurological disorders: an abundance of unanswered questions. *Trends Neurosci* 37(5): 256-63.
- Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. 2004. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(49):17312-5.
- Etheridge KT, Banik SS, Armbruster BN, Zhu Y, Terns RM, Terns MP, Counter CM. 2002. The nucleolar localization domain of the catalytic subunit of human telomerase. *J Biol Chem* 277(27):24764-70.
- Evans SK, Lundblad V. 2000. Positive and negative regulation of telomerase access to the telomere. *J Cell Sci* 113 Pt 19:3357-64.
- Farnung BO, Brun CM, Arora R, Lorenzi LE, Azzalin CM. 2012. Telomerase efficiently elongates highly transcribing telomeres in human cancer cells. *PLoS One* 7(4):e35714.
- Falco G, Lee SL, Stanghellini I, Bassey UC, Hamatani T, Ko MS. 2007. Zscan4: a novel gene expressed exclusively in late 2-cell embryos and embryonic stem cells. *Dev Biol* 307(2):539-50.
- Feldser DM, Greider CW. 2007. Short telomeres limit tumor progression in vivo by inducing senescence. *Cancer Cell* 11(5):461-9.
- Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. 2007. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *Am J Epidemiol* 165(1):14-21.
- Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA. 2008. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes Dev* 22(5):654-67.
- Flynn RL, Centore RC, O'Sullivan RJ, Rai R, Tse A, Songyang Z, Chang S, Karlseder J, Zou L. 2011. TERRA and hnRNPA1 orchestrate an RPA-to-POT1 switch on telomeric single-stranded DNA. *Nature* 471(7339):532-6.
- Forsythe HL, Jarvis JL, Turner JW, Elmore LW, Holt SE. 2001. Stable association of hsp90 and p23, but Not hsp70, with active human telomerase. *J Biol Chem* 276(19):15571-4.
- Franklin RE, Gosling RG. 1953. Evidence for 2-chain helix in crystalline structure of sodium deoxyribonucleate. *Nature* 172(4369):156-7.
- Frei RE, Schultz GA, Church RB. 1989. Qualitative and quantitative changes in protein synthesis occur at the 8-16-cell stage of embryogenesis in the cow. *J Reprod Fertil* 86(2):637-41.
- Fu D, Collins K. 2007. Purification of human telomerase complexes identifies factors involved in telomerase biogenesis and telomere length regulation. *Mol Cell* 28(5):773-85.
- Gandhi S, Abramov AY. 2012. Mechanism of oxidative stress in neurodegeneration. *Oxid Med Cell Longev*: 428010.

- García-Cao I, García-Cao M, Martín-Caballero J, Criado LM, Klatt P, Flores JM, Weill JC, Blasco MA, Serrano M. 2002a. "Super p53" mice exhibit enhanced DNA damage response, are tumor resistant and age normally. *EMBO J* 21(22):6225-35.
- García-Cao M, Gonzalo S, Dean D, Blasco MA. 2002b. A role for the Rb family of proteins in controlling telomere length. *Nat Genet* 32(3):415-9.
- García-Cao M, O'Sullivan R, Peters AH, Jenuwein T, Blasco MA. 2004. Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases. *Nat Genet* 36(1):94-9.
- Gardner JP, Li S, Srinivasan SR, Chen W, Kimura M, Lu X, Berenson GS, Aviv A. 2005. Rise in insulin resistance is associated with escalated telomere attrition. *Circulation* 111(17):2171-7.
- Garrels W, Kues WB, Herrmann D, Holler S, Baulain U, Niemann H. 2012. Ectopic expression of human telomerase RNA component results in increased telomerase activity and elongated telomeres in bovine blastocysts. *Biol Reprod* 87(4):95.
- Gaynutdinov TI, Neumann RD, Panyutin IG. 2008. Structural polymorphism of intramolecular quadruplex of human telomeric DNA: effect of cations, quadruplex-binding drugs and flanking sequences. *Nucleic Acids Res* 36(12):4079-87.
- Gilson E, Laroche T, Gasser SM. 1993. Telomeres and the functional architecture of the nucleus. *Trends Cell Biol* 3(4):128-34.
- Gilson E, Ségal-Bendirdjian E. 2010. The telomere story or the triumph of an open-minded research. *Biochimie* 92(4):321-6.
- Gomez D, O'Donohue MF, Wenner T, Douarre C, Macadré J, Koebel P, Giraud-Panis MJ, Kaplan H, Kolkes A, Shin-ya K et al. . 2006a. The G-quadruplex ligand telomestatin inhibits POT1 binding to telomeric sequences in vitro and induces GFP-POT1 dissociation from telomeres in human cells. *Cancer Res* 66(14):6908-12.
- Gomez D, Wenner T, Brassart B, Douarre C, O'Donohue MF, El Khoury V, Shin-Ya K, Morjani H, Trentesaux C, Riou JF. 2006b. Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells. *J Biol Chem* 281(50):38721-9.
- Gonzalo S, Jaco I, Fraga MF, Chen T, Li E, Esteller M, Blasco MA. 2006. DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 8(4):416-24.
- González-Suárez E, Gesserick C, Flores JM, Blasco MA. 2005. Antagonistic effects of telomerase on cancer and aging in K5-mTert transgenic mice. *Oncogene* 24(13):2256-70.
- González-Suárez E, Samper E, Flores JM, Blasco MA. 2000. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis. *Nat Genet* 26(1):114-7.
- González-Suárez E, Samper E, Ramírez A, Flores JM, Martín-Caballero J, Jorcano JL, Blasco MA. 2001. Increased epidermal tumors and increased skin wound healing in transgenic mice overexpressing the catalytic subunit of telomerase, mTERT, in basal keratinocytes. *EMBO J* 20(11):2619-30.
- Greenberg RA, Chin L, Femino A, Lee KH, Gottlieb GJ, Singer RH, Greider CW, DePinho RA. 1999. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the INK4a(delta2/3) cancer-prone mouse. *Cell* 97(4):515-25.
- Greider CW. 1991. Telomerase is processive. *Mol Cell Biol* 11(9):4572-80.
- Greider CW. 2012. Molecular biology. Wnt regulates TERT--putting the horse before the cart. *Science* 336(6088):1519-20.
- Greider CW, Blackburn EH. 1985. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43(2 Pt 1):405-13.
- Greider CW, Blackburn EH. 1987. The telomere terminal transferase of *Tetrahymena* is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell* 51(6):887-98.
- Greider CW, Blackburn EH. 1989. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 337(6205):331-7.
- Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, de Lange T. 1999. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97(4):503-14.

- Guilleret I, Yan P, Grange F, Braunschweig R, Bosman FT, Benhattar J. 2002. Hypermethylation of the human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene correlates with telomerase activity. *Int J Cancer* 101(4):335-41.
- Guo X, Deng Y, Lin Y, Cosme-Blanco W, Chan S, He H, Yuan G, Brown EJ, Chang S. 2007. Dysfunctional telomeres activate an ATM-ATR-dependent DNA damage response to suppress tumorigenesis. *EMBO J* 26(22):4709-19.
- Hackett JA, Feldser DM, Greider CW. 2001. Telomere dysfunction increases mutation rate and genomic instability. *Cell* 106(3):275-86.
- Hackett JA, Greider CW. 2002. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene* 21(4):619-26.
- Hande MP, Samper E, Lansdorp P, Blasco MA. 1999. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice. *J Cell Biol* 144(4):589-601.
- Hajkova P. 2010. Epigenetic reprogramming--taking a lesson from the embryo. *Curr Opin Cell Biol* 22(3):342-50.
- Hansen M, Hsu AL, Dillin A, Kenyon C. 2005. New genes tied to endocrine, metabolic, and dietary regulation of lifespan from a *Caenorhabditis elegans* genomic RNAi screen. *PLoS Genet* 1(1):119-28.
- Harley CB. 1990. Aging of cultured human skin fibroblasts. *Methods Mol Biol* 5:25-32.
- Harley CB, Futcher AB, Greider CW. 1990. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 345(6274):458-60.
- Harley CB, Vaziri H, Counter CM, Allsopp RC. 1992. The telomere hypothesis of cellular aging. *Exp Gerontol* 27(4):375-82.
- Harper L, Golubovskaya I, Cande WZ. 2004. A bouquet of chromosomes. *J Cell Sci* 117(Pt 18):4025-32.
- Harrison R. 1907. Observations on the living developing nerve fiber. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*(4):140-143.
- Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2(4):280-91.
- Hastings R, Li NC, Lacy PS, Patel H, Herbert KE, Stanley AG, Williams B. 2004. Rapid telomere attrition in cardiac tissue of the ageing Wistar rat. *Exp Gerontol* 39(5): 855-57.
- Hayflick. 1965. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37:614-36.
- Hayflick L. 1989. Advances in Animal Cell Biology and Technology for Bioprocesses. In: Spier RE, Griffiths, J. B., Stephenne, J., and Crooy, P. J., eds., editor. European Society for Animal Cell Technology, 9th Meeting.: Butterworth and Co., Ltd.
- Hayflick L. 1997. Mortality and immortality at the cellular level. A review. *Biochemistry (Mosc)* 62(11):1180-90.
- Hayflick L. 1998. A brief history of the mortality and immortality of cultured cells. *Keio J Med* 47(3):174-82.
- Hayflick L. 2000. The illusion of cell immortality. *Br J Cancer* 83(7):841-6.
- Hayflick L, Moorhead PS. 1961. The serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25:585-621.
- Heiss NS, Knight SW, Vulliamy TJ, Klauck SM, Wiemann S, Mason PJ, Poustka A, Dokal I. 1998. X-linked dyskeratosis congenita is caused by mutations in a highly conserved gene with putative nucleolar functions. *Nat Genet* 19(1):32-8.
- Hemann MT, Greider CW. 2000. Wild-derived inbred mouse strains have short telomeres. *Nucleic Acids Res* 28(22):4474-8.
- Hemann MT, Strong MA, Hao LY, Greider CW. 2001. The shortest telomere, not average telomere length, is critical for cell viability and chromosome stability. *Cell* 107(1):67-77.
- Henderson SA, Edwards RG. 1968. Chiasma frequency and maternal age in mammals. *Nature* 218(5136):22-8.

- Henson JD, Cao Y, Huschtscha LI, Chang AC, Au AY, Pickett HA, Reddel RR. 2009. DNA C-circles are specific and quantifiable markers of alternative-lengthening-of-telomeres activity. *Nat Biotechnol* 27(12):1181-5.
- Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. 2002. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21(4):598-610.
- Henson JD, Reddel RR. 2010. Assaying and investigating Alternative Lengthening of Telomeres activity in human cells and cancers. *FEBS Lett* 584(17):3800-11.
- Hisatomi H, Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Nagao K, Kanamaru T, Hirata H, Hibi N, Tsukada Y. 2003. Expression profile of a gamma-deletion variant of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Neoplasia* 5(3):193-7.
- Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Shay JW. 2001. Immunohistochemical detection of telomerase (hTERT) protein in human cancer tissues and a subset of cells in normal tissues. *Neoplasia* 3(1):17-26.
- Hockemeyer D, Daniels JP, Takai H, de Lange T. 2006. Recent expansion of the telomeric complex in rodents: Two distinct POT1 proteins protect mouse telomeres. *Cell* 126(1):63-77.
- Hockemeyer D, Palm W, Else T, Daniels JP, Takai KK, Ye JZ, Keegan CE, de Lange T, Hammer GD. 2007. Telomere protection by mammalian Pot1 requires interaction with Tpp1. *Nat Struct Mol Biol* 14(8):754-61.
- Hoffmann J, Erben Y, Zeiher AM, Dimmeler S, Spyridopoulos I. 2009. Telomere length-heterogeneity among myeloid cells is a predictor for chronological ageing. *Exp Gerontol* 44(5):363-6.
- 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):1549-54.
- Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K et al. . 2013. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* 339(6122):959-61.
- Hu J, Hwang SS, Liesa M, Gan B, Sahin E, Jaskelioff M, Ding Z, Ying H, Boutin AT, Zhang H et al. . 2012. Antitelomerase therapy provokes ALT and mitochondrial adaptive mechanisms in cancer. *Cell* 148(4):651-63.
- Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. 2013. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* 339(6122):957-9.
- Hunt P, LeMaire R, Embury P, Sheean L, Mroz K. 1995. Analysis of chromosome behavior in intact mammalian oocytes: monitoring the segregation of a univalent chromosome during female meiosis. *Hum Mol Genet* 4(11):2007-12.
- Hurley LH. 2001. Secondary DNA structures as molecular targets for cancer therapeutics. *Biochem Soc Trans* 29(Pt 6):692-6.
- Hurley LH. 2002. DNA and its associated processes as targets for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2(3):188-200.
- Hurley LH, Wheelhouse RT, Sun D, Kerwin SM, Salazar M, Fedoroff OY, Han FX, Han H, Izbicka E, Von Hoff DD. 2000. G-quadruplexes as targets for drug design. *Pharmacol Ther* 85(3):141-58.
- Iqbal K, Kues WA, Baulain U, Garrels W, Herrmann D, Niemann H. 2011. Species-specific telomere length differences between blastocyst cell compartments and ectopic telomere extension in early bovine embryos by human telomerase reverse transcriptase. *Biol Reprod* 84(4):723-33.
- Jacinto E, Facchinetti V, Liu D, Soto N, Wei S, Jung SY, Huang Q, Qin J, Su B. 2006. SIN1/MIP1 maintains rictor-mTOR complex integrity and regulates Akt phosphorylation and substrate specificity. *Cell* 127(1):125-37.
- Jakob S, Schroeder P, Lukosz M, Büchner N, Spyridopoulos I, Altschmied J, Haendeler J. 2008. Nuclear protein tyrosine phosphatase Shp-2 is one important negative regulator of nuclear export of telomerase reverse transcriptase. *J Biol Chem* 283(48):33155-61.

- Jaskelioff M, Muller FL, Paik JH, Thomas E, Jiang S, Adams AC, Sahin E, Kost-Alimova M, Protopopov A, Cadiñanos J et al. . 2011. Telomerase reactivation reverses tissue degeneration in aged telomerase-deficient mice. *Nature* 469(7328):102-6.
- Jeanclous E, Schork NJ, Kyvik KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A. 2000. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36(2):195-200.
- Jiang H, Ju Z, Rudolph KL. 2007. Telomere shortening and ageing. *Z Gerontol Geriatr* 40(5):314-24.
- Jiang J, Lv W, Ye X, Wang L, Zhang M, Yang H, Okuka M, Zhou C, Zhang X, Liu L et al. . 2013. Zscan4 promotes genomic stability during reprogramming and dramatically improves the quality of iPS cells as demonstrated by tetraploid complementation. *Cell Res* 23(1):92-106.
- Johnson JE, Varkonyi RJ, Schwalm J, Cragle R, Klein-Szanto A, Patchefsky A, Cukierman E, von Mehren M, Broccoli D. 2005. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist in liposarcomas. *Clin Cancer Res* 11(15):5347-55.
- Jády BE, Bertrand E, Kiss T. 2004. Human telomerase RNA and box H/ACA scaRNAs share a common Cajal body-specific localization signal. *J Cell Biol* 164(5):647-52.
- Jády BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. 2006. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Mol Biol Cell* 17(2):944-54.
- Jarrell VL, Day BN, Prather RS. 1991. The transition from maternal to zygotic control of development occurs during the 4-cell stage in the domestic pig, *Sus scrofa*: quantitative and qualitative aspects of protein synthesis. *Biol Reprod* 44(1):62-8.
- Kalmbach KH, Fontes Antunes DM, Dracxler RC, Knier TW, Seth-Smith ML, Wang F, Liu L, Keefe DL. 2013. Telomeres and human reproduction. *Fertil Steril* 99(1):23-9.
- Kang SS, Kwon T, Kwon DY, Do SI. 1999. Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. *J Biol Chem* 274(19):13085-90.
- Kaplan W, Witz VJ, Mantel-Teeuwisse A, Stolk P, Duthey B, Laing R. 2013. Priority Medicines for Europe and the World 2013 Update. World Health Organization.
- Karlseder J. 2014. Modern genome editing meets telomeres: the many functions of TPP1. *Genes Dev* 28(17):1857-8.
- Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, de Lange T. 1999. p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283(5406):1321-5.
- Karlseder J, Smogorzewska A, de Lange T. 2002. Senescence induced by altered telomere state, not telomere loss. *Science* 295(5564):2446-9.
- Kass-Eisler A, Greider CW. 2000. Recombination in telomere-length maintenance. *Trends Biochem Sci* 25(4):200-4.
- Keefe DL, Franco S, Liu L, Trimarchi J, Cao B, Weitzen S, Agarwal S, Blasco MA. 2005. Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women--toward a telomere theory of reproductive aging in women. *Am J Obstet Gynecol* 192(4):1256-60; discussion 1260-1.
- Keefe DL, Marquard K, Liu L. 2006. The telomere theory of reproductive senescence in women. *Curr Opin Obstet Gynecol* 18(3):280-5.
- Kenyon C. 2005. The plasticity of aging: insights from long-lived mutants. *Cell* 120(4):449-60.
- Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumder P, Yuan ZM, Whang Y, Strauss W, Pandita TK et al. . 2000. Regulation of the hTERT telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Curr Biol* 10(10):568-75.
- Khurts S, Masutomi K, Delgermaa L, Arai K, Oishi N, Mizuno H, Hayashi N, Hahn WC, Murakami S. 2004. Nucleolin interacts with telomerase. *J Biol Chem* 279(49):51508-15.
- Kilian A, Bowtell DD, Abud HE, Hime GR, Venter DJ, Keese PK, Duncan EL, Reddel RR, Jefferson RA. 1997. Isolation of a candidate human telomerase catalytic subunit gene, which reveals complex splicing patterns in different cell types. *Hum Mol Genet* 6(12):2011-9.

- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. 1994. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266(5193):2011-5.
- Kim SH, Han S, You YH, Chen DJ, Campisi J. 2003. The human telomere-associated protein TIN2 stimulates interactions between telomeric DNA tracts in vitro. *EMBO Rep* 4(7):685-91.
- Kim SH, Kaminker P, Campisi J. 1999. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nat Genet* 23(4):405-12.
- Kimura M, Cherkas LF, Kato BS, Demissie S, Hjelmborg JB, Brimacombe M, Cupples A, Hunkin JL, Gardner JP, Lu X, Cao X, Sastrasinh M, Providence MA, Hunt SC, Christensen K, Levy D, Spector TD, Aviv A. 2008. Offspring's leukocyte telomere length, paternal age, and telomere elongation in sperm. *PLoS Genet* 4(2): e37.
- Kipling D, Cooke HJ. 1990. Hypervariable ultra-long telomeres in mice. *Nature* 347(6291):400-2.
- Kirkwood TB. 1977. Evolution of ageing. *Nature* 270(5635):301-4.
- Kirkwood TB, Austad SN. 2000. Why do we age? *Nature* 408(6809):233-8.
- Kirkwood TB, Cremer T. 1982. Cytogerontology since 1881: a reappraisal of August Weismann and a review of modern progress. *Hum Genet* 60(2):101-21.
- Kirkwood TB, Holliday R. 1979. The evolution of ageing and longevity. *Proc R Soc Lond B Biol Sci* 205(1161):531-46.
- Kirwan M, Dokal I. 2008. Dyskeratosis congenita: a genetic disorder of many faces. *Clin Genet* 73(2):103-12.
- Kishigami S, Wakayama T. 2007. Efficient strontium-induced activation of mouse oocytes in standard culture media by chelating calcium. *J Reprod Dev* 53(6):1207-15.
- Kiss T, Fayet E, Jády BE, Richard P, Weber M. 2006. Biogenesis and intranuclear trafficking of human box C/D and H/ACA RNPs. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 71:407-17.
- Knight SW, Vulliamy TJ, Morgan B, Devriendt K, Mason PJ, Dokal I. 2001. Identification of novel DKC1 mutations in patients with dyskeratosis congenita: implications for pathophysiology and diagnosis. *Hum Genet* 108(4):299-303.
- Kobayashi H, Sakurai T, Imai M, Takahashi N, Fukuda A, Yayoi O, Sato S, Nakabayashi K, Hata K, Sotomaru Y et al. . 2012. Contribution of intragenic DNA methylation in mouse gametic DNA methylomes to establish oocyte-specific heritable marks. *PLoS Genet* 8(1):e1002440.
- Kozik A, Bradbury EM, Zalensky A. 1998. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)_n arrays. *Molecular Reproduction and Development* 51(1): 98-104.
- Kyo S, Inoue M. 2002. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene* 21(4):688-97.
- Lamb NE, Sherman SL, Hassold TJ. 2005. Effect of meiotic recombination on the production of aneuploid gametes in humans. *Cytogenet Genome Res* 111(3-4):250-5.
- Lansdorp PM, Verwoerd NP, van de Rijke FM, Dragowska V, Little MT, Dirks RW, Raap AK, Tanke HJ. 1996. Heterogeneity in telomere length of human chromosomes. *Hum Mol Genet* 5(5):685-91.
- Latham KE, Garrels JI, Chang C, Solter D. 1991. Quantitative analysis of protein synthesis in mouse embryos. I. Extensive reprogramming at the one- and two-cell stages. *Development* 112(4): 921-32.
- Lee HW, Blasco MA, Gottlieb GJ, Horner JW, Greider CW, DePinho RA. 1998. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs. *Nature* 392(6676):569-74.
- LeMaire-Adkins R, Radke K, Hunt PA. 1997. Lack of checkpoint control at the metaphase/anaphase transition: a mechanism of meiotic nondisjunction in mammalian females. *J Cell Biol* 139(7):1611-9.
- Levene PA. 1919. The structure of yeast nucleic acid. IV. Ammonia hydrolysis. *Journal of Biological Chemistry* 40:415-424.

- Levy D, Neuhausen SL, Hunt SC, Kimura M, Hwang SJ, Chen W, Bis JC, Fitzpatrick AL, Smith E, Johnson AD et al. . 2010. Genome-wide association identifies OBFC1 as a locus involved in human leukocyte telomere biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(20):9293-8.
- Li B, de Lange T. 2003. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Mol Biol Cell* 14(12):5060-8.
- Li B, Oestreich S, de Lange T. 2000. Identification of human Rap1: implications for telomere evolution. *Cell* 101(5):471-83.
- Li H, Zhao L, Yang Z, Funder JW, Liu JP. 1998. Telomerase is controlled by protein kinase Calpha in human breast cancer cells. *J Biol Chem* 273(50):33436-42.
- Lin J, Jin R, Zhang B, Yang PX, Chen H, Bai YX, Xie Y, Huang C, Huang J. 2007. Characterization of a novel effect of hPinX1 on hTERT nucleolar localization. *Biochem Biophys Res Commun* 353(4):946-52.
- Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. 1997. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276(5312):561-7.
- Liu L, Bailey SM, Okuka M, Muñoz P, Li C, Zhou L, Wu C, Czerwiec E, Sandler L, Seyfang A et al. . 2007. Telomere lengthening early in development. *Nat Cell Biol* 9(12):1436-41.
- Liu L, Blasco MA, Keefe DL. 2002a. Requirement of functional telomeres for metaphase chromosome alignments and integrity of meiotic spindles. *EMBO Rep* 3(3):230-4.
- Liu L, Franco S, Spyropoulos B, Moens PB, Blasco MA, Keefe DL. 2004. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17):6496-501.
- Liu Y, Kha H, Ungrin M, Robinson MO, Harrington L. 2002b. Preferential maintenance of critically short telomeres in mammalian cells heterozygous for mTert. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(6):3597-602.
- Loayza D, De Lange T. 2003. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 423(6943):1013-8.
- Londoño-Vallejo JA, Der-Sarkissian H, Cazes L, Bacchetti S, Reddel RR. 2004. Alternative lengthening of telomeres is characterized by high rates of telomeric exchange. *Cancer Res* 64(7):2324-7.
- Louis SB. 1977. *Time, cells and aging*. New York: Academic Press.
- Luke B, Panza A, Redon S, Iglesias N, Li Z, Lingner J. 2008. The Rat1p 5' to 3' exonuclease degrades telomeric repeat-containing RNA and promotes telomere elongation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell* 32(4):465-77.
- Lukowiak AA, Narayanan A, Li ZH, Terns RM, Terns MP. 2001. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 7(12):1833-44.
- Lundblad V, Blackburn EH. 1993. An alternative pathway for yeast telomere maintenance rescues est1- senescence. *Cell* 73(2):347-60.
- Lustig AJ. 2003. Clues to catastrophic telomere loss in mammals from yeast telomere rapid deletion. *Nat Rev Genet* 4(11):916-23.
- López de Silanes I, Stagno d'Alcontres M, Blasco MA. 2010. TERRA transcripts are bound by a complex array of RNA-binding proteins. *Nat Commun* 1:33.
- Maicher A, Kastner L, Dees M, Luke B. 2012. Dereglated telomere transcription causes replication-dependent telomere shortening and promotes cellular senescence. *Nucleic Acids Res* 40(14):6649-59.
- Mangino M, Richards JB, Soranzo N, Zhai G, Aviv A, Valdes AM, Samani NJ, Deloukas P, Spector TD. 2009. A genome-wide association study identifies a novel locus on chromosome 18q12.2 influencing white cell telomere length. *J Med Genet* 46(7):451-4.
- Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E. 2000. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* 10(8):487-90.
- Martens UM, Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W, Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM. 1998. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nat Genet* 18(1):76-80.

- Martín-Coello J, González R, Crespo C, Gomendio M, Roldan ER. 2008. Superovulation and in vitro oocyte maturation in three species of mice (*Mus musculus*, *Mus spretus* and *Mus spicilegus*). *Theriogenology* 70(6):1004-13.
- Martínez P, Blasco MA. 2010. Role of shelterin in cancer and aging. *Aging Cell* 9(5):653-66.
- Maser RS, DePinho RA. 2002. Keeping telomerase in its place. *Nat Med* 8(9):934-6.
- Matheu A, Maraver A, Klatt P, Flores I, Garcia-Cao I, Borrás C, Flores JM, Viña J, Blasco MA, Serrano M. 2007. Delayed ageing through damage protection by the Arf/p53 pathway. *Nature* 448(7151):375-9.
- Matheu A, Pantoja C, Efeyan A, Criado LM, Martín-Caballero J, Flores JM, Klatt P, Serrano M. 2004. Increased gene dosage of Ink4a/Arf results in cancer resistance and normal aging. *Genes Dev* 18(22):2736-46.
- Mattson MP, Klapper W. 2001. Emerging roles for telomerase in neuronal development and apoptosis. *J Neurosci Res* 63(1): 1-9.
- Mayer S, Bruderlein S, Perner S, Waibel I, Holdenried A, Ciloglu N, Hasel C, Mattfeldt T, Nielsen KV, Möller P. 2006. Sex-specific telomere length profiles and age-dependent erosion dynamics of individual chromosome arms in humans. *Cytogenet Genome Res* 112(3-4):194-201.
- McClintock B. 1938. The fusion of broken ends of sister half chromatids following chromatid breakage at meiotic anaphase. *Mo. Agric. Exp. Stn. Res. Bull.*(290):1-48.
- McClintock B. 1939. The Behavior in Successive Nuclear Divisions of a Chromosome Broken at Meiosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 25(8):405-16.
- McClintock B. 1941. The Stability of Broken Ends of Chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 26(2):234-82.
- McClintock B. 1942. The Fusion of Broken Ends of Chromosomes Following Nuclear Fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 28(11):458-63.
- Medawar P. 1952. An unsolved problem in biology. HK Lewis, London.
- Meeker AK, Hicks JL, Iacobuzio-Donahue CA, Montgomery EA, Westra WH, Chan TY, Ronnett BM, De Marzo AM. 2004. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin Cancer Res* 10(10):3317-26.
- Melk A, Ramassar V, Helms LM, Moore R, Rayner D, Solez K, Halloran PF. 2000. Telomere shortening in kidneys with age. *J Am Soc Nephrol* 11(3): 444-453.
- Miescher F. 2003. Ueber die chemische Zusammensetzung der Eiterzellen. [On the Chemical Composition of Pus Cells.]. *Medicinischchemische Untersuchungen* 4:441-460.
- Mirabello L, Yu K, Kraft P, De Vivo I, Hunter DJ, Prescott J, Wong JY, Chatterjee N, Hayes RB, Savage SA. 2010. The association of telomere length and genetic variation in telomere biology genes. *Hum Mutat* 31(9):1050-8.
- Miracco EJ, Jiang J, Cash DD, Feigon J. 2014. Progress in structural studies of telomerase. *Curr Opin Struct Biol* 24:115-24.
- Mitchell JR, Collins K. 2000. Human telomerase activation requires two independent interactions between telomerase RNA and telomerase reverse transcriptase. *Mol Cell* 6(2):361-71.
- Mitchell JR, Wood E, Collins K. 1999. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402(6761):551-5.
- Mochizuki Y, He J, Kulkarni S, Bessler M, Mason PJ. 2004. Mouse dyskerin mutations affect accumulation of telomerase RNA and small nucleolar RNA, telomerase activity, and ribosomal RNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(29):10756-61.
- Morin GB. 1989. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. *Cell* 59(3):521-9.
- Mourkioti F, Kustan J, Kraft P, Day JW, Zhao MM, Kost-Alimova M, Protopopov A, Depinho RA, Bernstein D, Meeker AK et al. . 2013. Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. *Nature Cell Biology*.
- Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LL, Jones MD, Meyne J, Ratliff RL, Wu JR. 1988. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)*n*, present at the telomeres of human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(18):6622-6.

- Muggleton-Harris AL, Hayflick L. 1976. Cellular aging studied by the reconstruction of replicating cells from nuclei and cytoplasms isolated from normal human diploid cells. *Exp Cell Res* 103(2):321-30.
- Muller H, Herskowitz L. 1954. Concerning the healing of chromosomes ends produced by breakage in *Drosophila Melanogaster*. *Am. Natur* 88:177-208.
- Muller HJ. 1938. The re-making of chromosomes. *Collecting Net, Woods Hole* 13:181-198.
- Muntoni A, Neumann AA, Hills M, Reddel RR. 2009. Telomere elongation involves intramolecular DNA replication in cells utilizing alternative lengthening of telomeres. *Hum Mol Genet* 18(6):1017-27.
- Murnane JP, Sabatier L, Marder BA, Morgan WF. 1994. Telomere dynamics in an immortal human cell line. *EMBO J* 13(20):4953-62.
- Nabetani A, Ishikawa F. 2009. Unusual telomeric DNAs in human telomerase-negative immortalized cells. *Mol Cell Biol* 29(3):703-13.
- Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, Weinrich SL, Andrews WH, Lingner J, Harley CB, Cech TR. 1997. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human. *Science* 277(5328):955-9.
- Nandakumar J, Bell CF, Weidenfeld I, Zaug AJ, Leinwand LA, Cech TR. 2012. The TEL patch of telomere protein TPP1 mediates telomerase recruitment and processivity. *Nature* 492(7428):285-9.
- Natarajan S, McEachern MJ. 2002. Recombinational telomere elongation promoted by DNA circles. *Mol Cell Biol* 22(13):4512-21.
- Navy A, Gertsenstein M, Vintersten K, Behringer R. *Manipulating the mouse embryo: a laboratory manual*, third edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2003. Cold Spring Harbor, New York.
- Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. 2004. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 363(9408):507-10.
- Neidle S, Read MA. 2000. G-quadruplexes as therapeutic targets. *Biopolymers* 56(3):195-208.
- Neumann AA, Watson CM, Noble JR, Pickett HA, Tam PP, Reddel RR. 2013. Alternative lengthening of telomeres in normal mammalian somatic cells. *Genes Dev* 27(1):18-23.
- Niwa H, Yamamura K, Miyazaki J. 1991. Efficient selection for high-expression transfectants with a novel eukaryotic vector. *Gene* 108(2):193-9.
- Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC. 2007. Telomere length is paternally inherited and is associated with parental lifespan. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(29):12135-9.
- Nordfjäll K, Larefalk A, Lindgren P, Holmberg D, Roos G. 2005. Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(45):16374-8.
- Nordfjäll K, Svenson U, Norrback KF, Adolfsson R, Roos G. 2010. Large-scale parent-child comparison confirms a strong paternal influence on telomere length. *Eur J Hum Genet* 18(3):385-9.
- Nosek J, Dinouël N, Kovac L, Fukuhara H. 1995. Linear mitochondrial DNAs from yeasts: telomeres with large tandem repetitions. *Mol Gen Genet* 247(1):61-72.
- O'Connor MS, Safari A, Liu D, Qin J, Songyang Z. 2004. The human Rap1 protein complex and modulation of telomere length. *J Biol Chem* 279(27):28585-91.
- O'Callaghan NJ, Fenech M. 2011. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online* 13: 3.
- Oeckl P, Scheffold A, Lechel A, Rudolph KL, Ferger B. 2014. Substantial telomere shortening in the substantia nigra of telomerase-deficient mice does not increase susceptibility to MPTP-induced dopamine depletion. *Neuroreport* 25(5): 335-339.
- Mourkioti F, Kustan J, Kraft P, Day JW, Zhao MM, Kost-Alimova M, Protopopov A, Depinho RA, Bernstein D, Meeker AK et al. . 2013. Role of telomere dysfunction in cardiac failure in Duchenne muscular dystrophy. *Nature Cell Biology*.

- O'Sullivan RJ, Karlseder J. 2010. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(3):171-81.
- O'Sullivan RJ, Kubicek S, Schreiber SL, Karlseder J. 2010. Reduced histone biosynthesis and chromatin changes arising from a damage signal at telomeres. *Nat Struct Mol Biol* 17(10):1218-25.
- Ogino H, Nakabayashi K, Suzuki M, Takahashi E, Fujii M, Suzuki T, Ayusawa D. 1998. Release of telomeric DNA from chromosomes in immortal human cells lacking telomerase activity. *Biochem Biophys Res Commun* 248(2):223-7.
- Oikawa S, Kawanishi S. 1999. Site-specific DNA damage at GGG sequence by oxidative stress may accelerate telomere shortening. *FEBS Lett* 453(3):365-8.
- Okano M, Xie S, Li E. 1998. Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* 19(3):219-20.
- Olovnikov AM. 1971. Principle of marginotomy in template synthesis of polynucleotides. *Dokl Akad Nauk SSSR* 201(6):1496-9.
- Olovnikov AM. 1973. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 41(1):181-90.
- Olovnikov AM. 1996. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory. *Exp Gerontol* 31(4):443-8.
- Ornish D, Lin J, Daubenmier J, Weidner G, Epel E, Kemp C, Magbanua MJ, Marlin R, Yglecias L, Carroll PR et al. . 2008. Increased telomerase activity and comprehensive lifestyle changes: a pilot study. *Lancet Oncol* 9(11):1048-57.
- Orr-Weaver TL, Szostak JW, Rothstein RJ. 1981. Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* 78(10):6354-8.
- Panossian LA, Porter VR, Valenzuela HF, Zhu X, Reback E, Masterman D, Cummings JL, Effros RB. 2003. Telomere shortening in T cells correlates with Alzheimer's disease status. *Neurobiol Aging* 24(1):77-84.
- Pauling L, Corey RB. 1953a. A Proposed Structure For The Nucleic Acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 39(2):84-97.
- Pauling L, Corey RB. 1953b. Structure of the nucleic acids. *Nature* 171(4347):346.
- Paynton BV, Bachvarova R. 1994. Polyadenylation and deadenylation of maternal mRNAs during oocyte growth and maturation in the mouse. *Mol Reprod Dev* 37(2):172-80.
- Perera SA, Maser RS, Xia H, McNamara K, Protopopov A, Chen L, Hezel AF, Kim CF, Bronson RT, Castrillon DH et al. . 2008. Telomere dysfunction promotes genome instability and metastatic potential in a K-ras p53 mouse model of lung cancer. *Carcinogenesis* 29(4):747-53.
- Perrem K, Bryan TM, Englezou A, Hackl T, Moy EL, Reddel RR. 1999. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* 18(22):3383-90.
- Perrem K, Colgin LM, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. 2001. Coexistence of alternative lengthening of telomeres and telomerase in hTERT-transfected GM847 cells. *Mol Cell Biol* 21(12):3862-75.
- Pfeiffer V, Lingner J. 2012. TERRA promotes telomere shortening through exonuclease 1-mediated resection of chromosome ends. *PLoS Genet* 8(6):e1002747.
- Pfeiffer V, Lingner J. 2013. Replication of telomeres and the regulation of telomerase. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5(5):a010405.
- Pickett HA, Cesare AJ, Johnston RL, Neumann AA, Reddel RR. 2009. Control of telomere length by a trimming mechanism that involves generation of t-circles. *EMBO J* 28(7):799-809.
- Pickett HA, Henson JD, Au AY, Neumann AA, Reddel RR. 2011. Normal mammalian cells negatively regulate telomere length by telomere trimming. *Hum Mol Genet* 20(23):4684-92.
- Pogacić V, Dragon F, Filipowicz W. 2000. Human H/ACA small nucleolar RNPs and telomerase share evolutionarily conserved proteins NHP2 and NOP10. *Mol Cell Biol* 20(23):9028-40.

- Prescott J, Du M, Wong JY, Han J, De Vivo I. 2012. Paternal age at birth is associated with offspring leukocyte telomere length in the nurses' health study. *Hum Reprod* 27(12):3622-31.
- Prowse KR, Avilion AA, Greider CW. 1993. Identification of a nonprocessive telomerase activity from mouse cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(4):1493-7.
- Prowse KR, Greider CW. 1995. Developmental and tissue-specific regulation of mouse telomerase and telomere length. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(11):4818-22.
- Pérez-Morga D, Amiguet-Vercher A, Vermijlen D, Pays E. 2001. Organization of telomeres during the cell and life cycles of *Trypanosoma brucei*. *J Eukaryot Microbiol* 48(2):221-6.
- Poon SS, Martens UM, Ward RK, Lansdorp PM. 1999. Telomere length measurements using digital fluorescence microscopy. *Cytometry* 36(4): 267-78.
- Qiao F, Cech TR. 2008. Triple-helix structure in telomerase RNA contributes to catalysis. *Nat Struct Mol Biol* 15(6):634-40.
- Quinn P, Kerin JF, Warnes GM. 1985. Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid. *Fertil Steril* 44(4):493-8.
- Rafnar T, Sulem P, Stacey SN, Geller F, Gudmundsson J, Sigurdsson A, Jakobsdottir M, Helgadóttir H, Thorlacius S, Aben KK et al. . 2009. Sequence variants at the TERT-CLPTM1L locus associate with many cancer types. *Nat Genet* 41(2):221-7.
- Reaper PM, di Fagagna F, Jackson SP. 2004. Activation of the DNA damage response by telomere attrition: a passage to cellular senescence. *Cell Cycle* 3(5):543-6.
- Redon S, Reichenbach P, Lingner J. 2010. The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* 38(17):5797-806.
- Renaud S, Loukinov D, Abdullaev Z, Guilleret I, Bosman FT, Lobanenkov V, Benhattar J. 2007. Dual role of DNA methylation inside and outside of CTCF-binding regions in the transcriptional regulation of the telomerase hTERT gene. *Nucleic Acids Res* 35(4):1245-56.
- Riou JF. 2004. G-quadruplex interacting agents targeting the telomeric G-overhang are more than simple telomerase inhibitors. *Curr Med Chem Anticancer Agents* 4(5):439-43.
- Robart AR, Collins K. 2010. Investigation of human telomerase holoenzyme assembly, activity, and processivity using disease-linked subunit variants. *J Biol Chem* 285(7):4375-86.
- Robart AR, O'Connor CM, Collins K. 2010. Ciliate telomerase RNA loop IV nucleotides promote hierarchical RNP assembly and holoenzyme stability. *RNA* 16(3):563-71.
- Rockmill B, Roeder GS. 1998. Telomere-mediated chromosome pairing during meiosis in budding yeast. *Genes Dev* 12(16):2574-86.
- Rogan EM, Bryan TM, Hukku B, Maclean K, Chang AC, Moy EL, Englezou A, Warneford SG, Dalla-Pozza L, Reddel RR. 1995. Alterations in p53 and p16INK4 expression and telomere length during spontaneous immortalization of Li-Fraumeni syndrome fibroblasts. *Mol Cell Biol* 15(9):4745-53.
- Rolyan H, Scheffold A, Heinrich A, Begus-Nahrman Y, Langkopf BH, Hölter SM, Vogt-Weisenhorn DM, Liss B, Wurst W, Lie DC, Thal DR, Biber K, Rudolph KL. 2011. Telomere shortening reduces Alzheimer's disease amyloid pathology in mice. *Brain* 134(Pt 7): 2044-2056.
- Román V. 2014. La ciencia lanzó una carrera contrarreloj para ganarle al envejecimiento. *Clarín.com*.
- Roth CW, Kobeski F, Walter MF, Biessmann H. 1997. Chromosome end elongation by recombination in the mosquito *Anopheles gambiae*. *Mol Cell Biol* 17(9):5176-83.
- Rubtsova MP, Vasilkova DP, Malyavko AN, Naraikina YV, Zvereva MI, Dontsova OA. 2012. Telomere lengthening and other functions of telomerase. *Acta Naturae* 4(2):44-61.
- Rufer N, Brümmendorf TH, Chapuis B, Helg C, Lansdorp PM, Roosnek E. 2001. Accelerated telomere shortening in hematological lineages is limited to the first year following stem cell transplantation. *Blood* 97(2):575-7.

- Rufer N, Brümmendorf TH, Kolvraa S, Bischoff C, Christensen K, Wadsworth L, Schulzer M, Lansdorp PM. 1999. Telomere fluorescence measurements in granulocytes and T lymphocyte subsets point to a high turnover of hematopoietic stem cells and memory T cells in early childhood. *J Exp Med* 190(2):157-67.
- Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. 1998. Telomere length dynamics in human lymphocyte subpopulations measured by flow cytometry. *Nat Biotechnol* 16(8):743-7.
- Saebøe-Larsen S, Fossberg E, Gaudernack G. 2006. Characterization of novel alternative splicing sites in human telomerase reverse transcriptase (hTERT): analysis of expression and mutual correlation in mRNA isoforms from normal and tumour tissues. *BMC Mol Biol* 7:26.
- Samassekou O, Gadjji M, Drouin R, Yan J. 2010. Sizing the ends: normal length of human telomeres. *Ann Anat* 192(5):284-91.
- Samassekou O, Ntwari A, Hébert J, Yan J. 2009. Individual telomere lengths in chronic myeloid leukemia. *Neoplasia* 11(11):1146-54.
- Samper E, Flores JM, Blasco MA. 2001. Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in *Terc*^{-/-} mice with short telomeres. *EMBO Rep* 2(9):800-7.
- Sandell LL, Gottschling DE, Zakian VA. 1994. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(25):12061-5.
- Sandin S, Rhodes D. 2014. Telomerase structure. *Curr Opin Struct Biol* 25C:104-110.
- Savage SA, Bertuch AA. 2010. The genetics and clinical manifestations of telomere biology disorders. *Genet Med* 12(12):753-64.
- Sawyers CL, McLaughlin J, Goga A, Havlik M, Witte O. 1994. The nuclear tyrosine kinase c-Abl negatively regulates cell growth. *Cell* 77(1):121-31.
- Schaetzlein S, Lucas-Hahn A, Lemme E, Kues WA, Dorsch M, Manns MP, Niemann H, Rudolph KL. 2004. Telomere length is reset during early mammalian embryogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(21):8034-8.
- Schaetzlein S, Rudolph KL. 2005. Telomere length regulation during cloning, embryogenesis and ageing. *Reprod Fertil Dev* 17(1-2):85-96.
- Scherthan H. 2007. Telomere attachment and clustering during meiosis. *Cell Mol Life Sci* 64(2):117-24.
- Scherthan H, Jerratsch M, Li B, Smith S, Hultén M, Lock T, de Lange T. 2000. Mammalian meiotic telomeres: protein composition and redistribution in relation to nuclear pores. *Mol Biol Cell* 11(12):4189-203.
- Scherthan H, Weich S, Schwegler H, Heyting C, Härle M, Cremer T. 1996. Centromere and telomere movements during early meiotic prophase of mouse and man are associated with the onset of chromosome pairing. *J Cell Biol* 134(5):1109-25.
- Schoeftner S, Blasco MA. 2008. Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 10(2):228-36.
- Schoeftner S, Blasco MA. 2009. A 'higher order' of telomere regulation: telomere heterochromatin and telomeric RNAs. *EMBO J* 28(16):2323-36.
- Scott TJ, Miller K, Olivares R, Su J, Fratterelli J, Treff N. 2008. Microarray based 24 chromosome preimplantation genetic diagnosis (mPGD) is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective blinded non-selection trial. *Fertility and sterility* 90(1):22.
- Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T. 2000. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO J* 19(11):2652-61.
- Serrano M, Blasco MA. 2007. Cancer and ageing: convergent and divergent mechanisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(9):715-22.
- Sexton AN, Regalado SG, Lai CS, Cost GJ, O'Neil CM, Urnov FD, Gregory PD, Jaenisch R, Collins K, Hockemeyer D. 2014. Genetic and molecular identification of three human

- TPP1 functions in telomerase action: recruitment, activation, and homeostasis set point regulation. *Genes Dev* 28(17):1885-99.
- Schmittgen TD, Livak KJ. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. *Nat Protoc* 3(6): 1101-8.
- Shay JW, Bacchetti S. 1997. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 33(5):787-91.
- Shay JW, Reddel RR, Wright WE. 2012. Cancer. Cancer and telomeres--an ALternative to telomerase. *Science* 336(6087):1388-90.
- Shay JW, Wright WE. 2000. Hayflick, his limit, and cellular ageing. *Nat Rev Mol Cell Biol* 1(1):72-6.
- Shen Q, Zhang Z, Yu L, Cao L, Zhou D, Kan M, Li B, Zhang D, He L, Liu Y. 2011. Common variants near TERC are associated with leukocyte telomere length in the Chinese Han population. *Eur J Hum Genet* 19(6):721-3.
- Siderakis M, Tarsounas M. 2007. Telomere regulation and function during meiosis. *Chromosome Res* 15(5):667-79.
- Slagboom PE, Droog S, Boomsma DI. 1994. Genetic determination of telomere size in humans: a twin study of three age groups. *Am J Hum Genet* 55(5):876-82.
- Smekalova EM, Shubernetskaya OS, Zvereva MI, Gromenko EV, Rubtsova MP, Dontsova OA. 2012. Telomerase RNA biosynthesis and processing. *Biochemistry (Mosc)* 77(10):1120-8.
- Smith ZD, Chan MM, Mikkelsen TS, Gu H, Gnirke A, Regev A, Meissner A. 2012. A unique regulatory phase of DNA methylation in the early mammalian embryo. *Nature* 484(7394):339-44.
- Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. 2000. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 20(5):1659-68.
- Snow BE, Erdmann N, Cruickshank J, Goldman H, Gill RM, Robinson MO, Harrington L. 2003. Functional conservation of the telomerase protein Est1p in humans. *Curr Biol* 13(8):698-704.
- Soerensen M, Thinggaard M, Nygaard M, Dato S, Tan Q, Hjelmberg J, Andersen-Ranberg K, Stevnsner T, Bohr VA, Kimura M et al. . 2012. Genetic variation in TERT and TERC and human leukocyte telomere length and longevity: a cross-sectional and longitudinal analysis. *Aging Cell* 11(2):223-7.
- Starling JA, Maule J, Hastie ND, Allshire RC. 1990. Extensive telomere repeat arrays in mouse are hypervariable. *Nucleic Acids Res* 18(23):6881-8.
- Stewart SA, Hahn WC, O'Connor BF, Banner EN, Lundberg AS, Modha P, Mizuno H, Brooks MW, Fleming M, Zimonjic DB et al. . 2002. Telomerase contributes to tumorigenesis by a telomere length-independent mechanism. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99(20):12606-11.
- Sun D, Thompson B, Cathers BE, Salazar M, Kerwin SM, Trent JO, Jenkins TC, Neidle S, Hurley LH. 1997. Inhibition of human telomerase by a G-quadruplex-interactive compound. *J Med Chem* 40(14):2113-6.
- Surani A, Tischler J. 2012. Stem cells: a sporadic super state. *Nature* 487(7405):43-5.
- Szostak JW, Blackburn EH. 1982. Cloning yeast telomeres on linear plasmid vectors. *Cell* 29(1):245-55.
- Tahara H, Shin-Ya K, Seimiya H, Yamada H, Tsuruo T, Ide T. 2006. G-Quadruplex stabilization by telomestatin induces TRF2 protein dissociation from telomeres and anaphase bridge formation accompanied by loss of the 3' telomeric overhang in cancer cells. *Oncogene* 25(13):1955-66.
- Takubo K, Izumiyama-Shimomura N, Honma N, Sawabe M, Arai T, Kato M, Oshimura M, Nakamura K. 2002. Telomere lengths are characteristic in each human individual. *Exp Gerontol* 37(4):523-31.
- Tanemura K, Ogura A, Cheong C, Gotoh H, Matsumoto K, Sato E, Hayashi Y, Lee HW, Kondo T. 2005. Dynamic rearrangement of telomeres during spermatogenesis in mice. *Dev Biol* 281(2): 196-207.

- Tease C, Fisher G. 1998. Analysis of meiotic chromosome pairing in the female mouse using a novel minichromosome. *Chromosome Res* 6(4):269-76.
- Theimer CA, Feigon J. 2006. Structure and function of telomerase RNA. *Curr Opin Struct Biol* 16(3):307-18.
- Theimer CA, Jády BE, Chim N, Richard P, Breece KE, Kiss T, Feigon J. 2007. Structural and functional characterization of human telomerase RNA processing and cajal body localization signals. *Mol Cell* 27(6):869-81.
- Toftgad R. 2014. Maintenance of chromosomes by telomeres and the enzyme telomerase. Disponible en: www.telomereinformation.com/nobelprize112.php?user=admin.
- Tokutake Y, Matsumoto T, Watanabe T, Maeda S, Tahara H, Sakamoto S, Niida H, Sugimoto M, Ide T, Furuichi Y. 1998. Extra-chromosomal telomere repeat DNA in telomerase-negative immortalized cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 247(3):765-72.
- Tomaska L, Nosek J, Kramara J, Griffith JD. 2009. Telomeric circles: universal players in telomere maintenance? *Nat Struct Mol Biol* 16(10):1010-5.
- Tomás-Loba A, Flores I, Fernández-Marcos PJ, Cayuela ML, Maraver A, Tejera A, Borrás C, Matheu A, Klatt P, Flores JM et al. . 2008. Telomerase reverse transcriptase delays aging in cancer-resistant mice. *Cell* 135(4):609-22.
- Treff NR, Su J, Taylor D, Scott RT. 2011. Telomere DNA deficiency is associated with development of human embryonic aneuploidy. *PLoS Genet* 7(6):e1002161.
- Trelles-Sticken E, Dresser ME, Scherthan H. 2000. Meiotic telomere protein Ndj1p is required for meiosis-specific telomere distribution, bouquet formation and efficient homologue pairing. *J Cell Biol* 151(1):95-106.
- Turner S, Hartshorne GM. 2013. Telomere lengths in human pronuclei, oocytes and spermatozoa. *Mol Hum Reprod* 19(8): 510-8.
- Turner S, Wong HP, Rai J, Hartshorne GM. 2010. Telomere length in human oocytes, cleavage stage embryos and blastocysts. *Mol Hum Reprod* 16(9): 685-94.
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. 1998. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Res* 58(18):4168-72.
- Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Oruganti H, Giudice LC, Hoffman AR. 2000. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *Int J Cancer* 85(3):330-5.
- Unryn BM, Cook LS, Riabowol KT. 2005. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell* 4(2):97-101.
- Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. 2009. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol* 7(1): 65-74
- van Steensel B, Smogorzewska A, de Lange T. 1998. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92(3):401-13.
- Vasa-Nicotera M, Brouillette S, Mangino M, Thompson JR, Braund P, Clemitson JR, Mason A, Bodycote CL, Raleigh SM, Louis E et al. . 2005. Mapping of a major locus that determines telomere length in humans. *Am J Hum Genet* 76(1):147-51.
- Vaziri H, Dragowska W, Allsopp RC, Thomas TE, Harley CB, Lansdorp PM. 1994. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(21):9857-60.
- Venteicher AS, Abreu EB, Meng Z, McCann KE, Terns RM, Veenstra TD, Terns MP, Artandi SE. 2009. A human telomerase holoenzyme protein required for Cajal body localization and telomere synthesis. *Science* 323(5914):644-8.
- Vera E, Bernardes de Jesus B, Foronda M, Flores JM, Blasco MA. 2013. Telomerase reverse transcriptase synergizes with calorie restriction to increase health span and extend mouse longevity. *PLoS One* 8(1):e53760.
- Vera E, Blasco MA. 2012. Beyond average: potential for measurement of short telomeres. *Aging (Albany NY)* 4(6): 379-92.

- Vidal-Cardenas SL, Greider CW. 2010. Comparing effects of mTR and mTERT deletion on gene expression and DNA damage response: a critical examination of telomere length maintenance-independent roles of telomerase. *Nucleic Acids Res* 38(1):60-71.
- Von Zglinicki T, Serra V, Lorenz M, Saretzki G, Lenzen-Grossimlighaus R, Gessner R, Risch A, Steinhagen-Thiessen E. 2000. Short telomeres in patients with vascular dementia: an indicator of low antioxidative capacity and a possible risk factor? *Lab Invest* 80(11):1739-47.
- Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. 2001. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 413(6854):432-5.
- Wang F, Podell ER, Zaug AJ, Yang Y, Baciu P, Cech TR, Lei M. 2007. The POT1-TPP1 telomere complex is a telomerase processivity factor. *Nature* 445(7127):506-10.
- Wang J, Chen Y, Ren J, Zhao C, Qu X. 2014. G-Quadruplex binding enantiomers show chiral selective interactions with human telomere. *Nucleic Acids Res* 42(6):3792-802.
- Wang RC, Smogorzewska A, de Lange T. 2004. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119(3):355-68.
- Watson J, Crick F. 1953a. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. *Nature* 171(4361):964-7.
- Watson J, Crick F. 1953b. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. *Nature* 171(4356):737-8.
- Watson JD. 1972. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nat New Biol* 239(94):197-201.
- Watson JM, Shippen DE. 2007. Telomere rapid deletion regulates telomere length in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Cell Biol* 27(5):1706-15.
- Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB et al. . 1997. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 17(4):498-502.
- Weismann A. 1889. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Oxford.
- Weismann A. 1891. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Oxford.
- Weismann A. 1892a. *Aufsätze über Vererbung und verwandte biologische Fragen*. Jena.
- Weismann A. 1892b. *Essays upon heredity and kindred biological problems*. Oxford.
- Weng NP, Granger L, Hodes RJ. 1997. Telomere lengthening and telomerase activation during human B cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(20):10827-32.
- Wilkins MH, Gosling RG, Seeds WE. 1951. Physical studies of nucleic acid. *Nature* 167(4254):759-60.
- Wilkins MH, Stokes AR, Wilson HR. 1953. Molecular structure of deoxypentose nucleic acids. *Nature* 171(4356):738-40.
- Witkin KL, Collins K. 2004. Holoenzyme proteins required for the physiological assembly and activity of telomerase. *Genes Dev* 18(10):1107-18.
- Witkowski J. 1985. The myth of cell immortality. *Trends in Biochemical Sciences* 10:258-260.
- Witkowski JA. 1979. Alexis Carrel and the mysticism of tissue culture. *Med Hist* 23(3):279-96.
- Witkowski JA. 1980. Dr. Carrel's immortal cells. *Med Hist* 24(2):129-42.
- Wojtyla A, Gładych M, Rubis B. 2011. Human telomerase activity regulation. *Mol Biol Rep* 38(5):3339-49.
- Wolf G. 2003. Friedrich Miescher: The man who discovered DNA. *Chemical Heritage* 21:10-11, 37-41.
- Wong JM, Kusdra L, Collins K. 2002. Subnuclear shuttling of human telomerase induced by transformation and DNA damage. *Nat Cell Biol* 4(9):731-6.
- Wossidlo M, Nakamura T, Lepikhov K, Marques CJ, Zakhartchenko V, Boiani M, Arand J, Nakano T, Reik W, Walter J. 2011. 5-Hydroxymethylcytosine in the mammalian zygote is linked with epigenetic reprogramming. *Nat Commun* 2:241.

- Wright DL, Jones EL, Mayer JF, Oehninger S, Gibbons WE, Lanzendorf SE. 2001. Characterization of telomerase activity in the human oocyte and preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod* 7(10): 947-55.
- Wright WE, Hayflick L. 1975. Nuclear control of cellular aging demonstrated by hybridization of anucleate and whole cultured normal human fibroblasts. *Exp Cell Res* 96(1):113-21.
- Wright WE, Piatyszek MA, Rainey WE, Byrd W, Shay JW. 1996. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 18(2):173-9.
- Wright WE, Shay JW. 2001. Cellular senescence as a tumor-protection mechanism: the essential role of counting. *Curr Opin Genet Dev* 11(1):98-103.
- Wu KJ, Grandori C, Amacker M, Simon-Vermot N, Polack A, Lingner J, Dalla-Favera R. 1999. Direct activation of TERT transcription by c-MYC. *Nat Genet* 21(2):220-4.
- Xin H, Liu D, Wan M, Safari A, Kim H, Sun W, O'Connor MS, Songyang Z. 2007. TPP1 is a homologue of ciliate TEBP-beta and interacts with POT1 to recruit telomerase. *Nature* 445(7127):559-62.
- Xu J, Yang X. 2000. Telomerase activity in bovine embryos during early development. *Biol Reprod* 63(4):1124-8.
- Yamada-Fukunaga T, Yamada M, Hamatani T, Chikazawa N, Ogawa S, Akutsu H, Miura T, Miyado K, Tarín JJ, Kuji N et al. . 2013. Age-associated telomere shortening in mouse oocytes. *Reprod Biol Endocrinol* 11:108.
- Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. 2005. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *N Engl J Med* 352(14):1413-24.
- Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. 1999. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Res* 59(17):4175-9.
- Young NS. 2010. Telomere biology and telomere diseases: implications for practice and research. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2010:30-5.
- Yu GL, Blackburn EH. 1991. Developmentally programmed healing of chromosomes by telomerase in Tetrahymena. *Cell* 67(4):823-32.
- Yu GL, Bradley JD, Attardi LD, Blackburn EH. 1990. In vivo alteration of telomere sequences and senescence caused by mutated Tetrahymena telomerase RNAs. *Nature* 344(6262):126-32.
- Zahler AM, Williamson JR, Cech TR, Prescott DM. 1991. Inhibition of telomerase by G-quartet DNA structures. *Nature* 350(6320):718-20.
- Zalenskaya IA, Zalensky AO. 2002. Telomeres in mammalian male germline cells. *Int Rev Cytol* 218:37-67.
- Zaug AJ, Podell ER, Cech TR. 2005. Human POT1 disrupts telomeric G-quadruplexes allowing telomerase extension in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(31):10864-9.
- Zalzman M, Falco G, Sharova LV, Nishiyama A, Thomas M, Lee SL, Stagg CA, Hoang HG, Yang HT, Indig FE et al. . 2010. Zscan4 regulates telomere elongation and genomic stability in ES cells. *Nature* 464(7290):858-63.
- Zhong FL, Batista LF, Freund A, Pech MF, Venteicher AS, Artandi SE. 2012. TPP1 OB-fold domain controls telomere maintenance by recruiting telomerase to chromosome ends. *Cell* 150(3):481-94.
- Zhou XZ, Lu KP. 2001. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107(3):347-59.
- Zickler D, Kleckner N. 1998. The leptotene-zygotene transition of meiosis. *Annu Rev Genet* 32:619-97.
- Zhu L, Hathcock KS, Hande P, Lansdorp PM, Seldin MF, Hodes RJ. 1998. Telomere length regulation in mice is linked to a novel chromosome locus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95(15): 8648-53.

