

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE FARMACIA
Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II



**FUNCIÓN TELOMÉRICA Y MECANISMOS DE
REPARACIÓN DEL ADN EN CÁNCER NO
MICROCÍTICO DE PULMÓN.**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

Cristina Frías García

Bajo la dirección de los doctores

Pilar Iniesta Serrano
Manuel Benito de las Heras

Madrid, 2009

- ISBN: 978-84-692-9946-3

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II



**FUNCIÓN TELOMÉRICA Y MECANISMOS DE
REPARACIÓN DEL ADN EN CÁNCER NO
MICROCÍTICO DE PULMÓN**

CRISTINA FRÍAS GARCÍA

Madrid, 2009

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR II



**FUNCIÓN TELOMÉRICA Y MECANISMOS DE
REPARACIÓN DEL ADN EN CÁNCER NO
MICROCÍTICO DE PULMÓN**

Memoria que presenta la Licenciada en Farmacia
Cristina Frías García
para aspirar al Grado de Doctora en Bioquímica y Biología Molecular
Madrid, 2009

Este trabajo ha sido realizado íntegramente en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular II, Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Dña. Pilar Iniesta Serrano y el Dr. D. Manuel Benito de las Heras.

Para el desarrollo del estudio ha resultado imprescindible la colaboración del Servicio de Cirugía II del Hospital Clínico San Carlos de Madrid.

Para la realización de este trabajo se concedió una beca Complutense Pre-doctoral.

AGRADECIMIENTOS

Me gustaría, en primer lugar, dar las gracias al Dr. Manuel Benito y a la Dra. Pilar Iniesta por darme la oportunidad de realizar mi Tesis Doctoral en el grupo de investigación de cáncer. Gracias por su dedicación y disponibilidad a lo largo de estos años. Gracias, también, a los Servicios de Cirugía II, Inmunología y Anatomía-Patología del Hospital Clínico San Carlos, sin los que este trabajo no hubiera podido realizarse. Asimismo, gracias a todos los pacientes de cáncer de pulmón de dicho hospital que, de manera desinteresada, han colaborado en este y otros estudios en aras de la ciencia y el progreso.

Durante la realización de esta Tesis, a lo largo de más de cuatro años, he pasado buenos y malos momentos, durante los que, indudablemente, he aprendido, no sólo de ciencia, sino también de la vida. He tenido la suerte de estar rodeada, en general, de grandes compañeros y profesionales, sin los que me hubiera sido más difícil seguir adelante en esos malos momentos. ¡Gracias a todos!

Antonio y Paloma han sido los mejores compañeros que he podido tener. En vosotros he encontrado un gran apoyo y una sincera amistad. Os agradezco vuestra ayuda, escucha y paciencia. Guardo cada momento compartido con vosotros. Sois unos excelentes científicos y mejores personas.

Gracias a Javier, Alberto, Almudena y Óscar. Habéis compartido conmigo vuestros conocimientos, no dudando en atenderme y en enseñarme.

Álvaro, Yoli, Rocío, Dora, Gema y Sylvia. Gracias por haber estado a mi lado, aun cuando ni siquiera os lo pedía.

Rebe, Piedad, Amy, Susana, Conrad, Miguel y el grupo de la Dra. Margarita Lorenzo. Gracias por esas risas, que tan sanas y necesarias son.

Gracias a mi familia y a mi novio porque siempre han creído en mí y me han dado fuerzas para seguir adelante, siempre adelante. Me han enseñado que, cada caída, no debía hundirme, sino hacerme más fuerte. Gracias por evitar que perdiera la confianza en mí y las ganas de luchar. Sin vuestro apoyo no hubiera podido realizar esta Tesis.

Es difícil expresar en tan poco espacio lo que siento y lo que han significado para mí las personas aquí mencionadas. He disfrutado de inolvidables momentos a su lado. Espero haber sabido transmitir, en el tiempo que hemos compartido juntos, el cariño y respeto que siento hacia cada uno de ellos. Sólo puedo decir que este trabajo les pertenece a todos, de alguna manera.

GRACIAS

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	1
ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS	3
1. Cáncer de pulmón	3
1.1 Alteraciones moleculares en cáncer de pulmón	11
1.1.1 Pérdidas de heterozigosidad (LOHs) en 3p	16
2. Telómeros	18
2.1 Estructura de los telómeros	21
2.1.1 Proteínas del complejo <i>shelterin</i>	24
2.2.2 Otras proteínas teloméricas	27
2.2 El acortamiento progresivo de los telómeros	31
2.3 Otras funciones de los telómeros	35
3. Telomerasa	37
3.1 Estructura y regulación de la telomerasa	37
3.2 Función de la telomerasa con relación a los telómeros	40
3.3 Otras funciones de la telomerasa	43
4. Mecanismo alternativo de elongación telomérica	49
5. Telómeros, telomerasa y cáncer	53
6. Mecanismos de reparación del ADN	57
6.1 Mecanismos de reparación del ADN y cáncer	57
6.2 Mecanismos de reparación del ADN y función telomérica	61
MATERIAL Y MÉTODOS	65
1. Pacientes y muestras tisulares	65
2. Extracción, valoración y purificación del ARN	67
2.1 Extracción del ARN	67
2.2 Valoración del ARN	67
2.3 Purificación del ARN	68

3. Extracción y valoración del ADN	69
3.1 Extracción del ADN	69
3.2 Valoración del ADN	71
4. Extracción y valoración de proteínas	71
4.1 Extracción de proteínas	71
4.2 Valoración de proteínas	72
5. Ensayo de medición de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción	72
5.1 Análisis de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción	74
6. Ensayo de la medida de la actividad telomerasa	75
6.1 Análisis de la actividad telomerasa	78
7. Evaluación de los niveles de expresión génica con matrices de ADN complementario	79
7.1 Síntesis de la sonda de ADN complementario marcado.....	81
7.2 Hibridación y detección	83
7.3 Análisis de las matrices de ADN complementario	85
8. Evaluación de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real	86
8.1 Síntesis del ADN complementario	89
8.2 Comprobación de la reacción de retrotranscripción	90
8.3 PCR cuantitativa a tiempo real	92
8.4 Análisis de los resultados de PCR cuantitativa a tiempo real ...	95
9. Actividad telomerasa y PARP3	95
9.1 Determinación de pérdidas de heterocigosidad (LOHs) en <i>loci</i> cercanos a <i>PARP3</i>	96
9.1.1 Análisis de los resultados de LOHs en <i>loci</i> cercanos a <i>PARP3</i>	102
9.2 Determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen <i>PARP3</i>	102
9.2.1 Análisis de los resultados de SNPs en el gen <i>PARP3</i>	105
9.3 Estudio de la relación entre telomerasa y PARP3 utilizando líneas celulares de cáncer no microcítico de pulmón	105

9.3.1 Mantenimiento, propagación, congelación y descongelación de la línea celular A549	106
9.3.2 Caracterización de la línea celular A549	107
9.3.2.1 Determinación de los niveles de ARN mensajero de <i>PARP3</i>	107
9.3.2.2 Determinación de los niveles de actividad telomerasa	108
9.4 Obtención del ADN complementario de <i>PARP3</i> para transfectar en la línea celular A549	109
9.4.1 Ultimate™ ORF clon de <i>PARP3</i> (clon de entrada)	110
9.4.1.1 Vector de entrada pENTR™221	110
9.4.1.2 T1-Phage resistant <i>E. coli</i>	113
9.4.1.3 Preparación de alícuotas y propagación del vector de entrada pENTR™221	113
9.4.1.4 Purificación del vector de entrada pENTR™221	114
9.4.2 Vector de destino pcDNA-DEST53 GATEWAY®	115
9.4.2.1 Preparación de alícuotas y propagación del vector de destino pcDNA-DEST53	116
9.4.3 Reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR™221 y el vector de destino pcDNA-DEST53	117
9.4.3.1 Propagación de los productos resultantes de la reacción de recombinación	119
9.4.3.2 Comprobación y selección de colonias transformadas con el vector de entrada pENTR™221 recombinado con pcDNA-DEST53	119
9.5 Transfección transitoria de la línea celular A549	122
9.5.1 Comprobación de la transfección	123
9.6 Determinación de la influencia de <i>PARP3</i> en la actividad telomerasa	124
9.6.1 Análisis de la influencia de <i>PARP3</i> en la actividad telomerasa	126
10. Análisis estadístico de los resultados	127
10.1 Estudio de la función telomérica y su relación con variables clínico-patológicas	127

10.1.1 Estudio de la función telomérica	127
10.1.2 Estudio de la función telomérica y su relación con variables clínico-patológicas	127
10.2 Análisis de los genes de reparación del ADN mediante matrices de ADN complementario	129
10.3 Análisis de los genes de reparación del ADN mediante PCR cuantitativa a tiempo real	130
10.3.1 Relación entre los valores de expresión génica y las variables clínico-patológicas	130
10.3.2 Relación entre los valores de expresión génica y la función telomérica	131
10.4 Análisis de LOHs en <i>loci</i> cercanos a <i>PARP3</i> ..	132
10.4.1 Estudio de LOHs y su relación con la actividad telomerasa y la expresión génica de <i>PARP3</i>	132
10.4.2 Estudio de LOHs y su relación con variables clínico-patológicas	132
10.5 Análisis de SNPs en el gen <i>PARP3</i>	133
10.6 Análisis de la influencia de <i>PARP3</i> en la actividad telomerasa	133
RESULTADOS	134
1. Estudio de la función telomérica en cáncer no microcítico de pulmón y su relación con variables clínico-patológicas	134
1.1 Estudio de la función telomérica	134
1.2 Estudio del estatus telomérico y su relación con variables clínico-patológicas	139
1.3 Estudio de la actividad telomerasa y su relación con variables clínico-patológicas	147
2. Análisis de los genes de reparación del ADN mediante matrices de ADN complementario	153

2.1 Análisis de los genes de reparación del ADN en muestras tumorales y control	153
2.2 Análisis de los genes de reparación del ADN y estatus telomérico.....	156
2.3 Análisis de los genes de reparación del ADN y actividad telomerasa	159
3. Análisis de los genes de reparación del ADN mediante PCR cuantitativa a tiempo real	160
3.1 Análisis de los genes de reparación del ADN en cáncer no microcítico de pulmón	160
3.2 Relación entre los valores de expresión génica y las variables clínico-patológicas	162
3.3 Relación entre los valores de expresión génica y el estatus telomérico	168
3.4 Relación entre los valores de expresión génica y la actividad telomerasa	170
4. Actividad telomerasa y <i>PARP3</i>.....	174
4.1 Determinación de pérdidas de heterocigosidad (LOHs) en <i>loci</i> cercanos a <i>PARP3</i>	174
4.1.1 LOHs en D3S3026	176
4.1.2 LOHs en D3S3561	176
4.1.3 LOHs en D3S3026 y D3S3561	177
4.1.4 LOHs en D3S3026 y su relación con variables clínico-patológicas	179
4.1.5 LOHs en D3S3561 y su relación con variables clínico-patológicas	184
4.1.6 LOHs en D3S3026 y D3S3561 y su relación con variables clínico-patológicas	189
4.2 Determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen <i>PARP3</i>	194
4.3 Estudio de la actividad telomerasa en la línea celular A549 ...	196
4.3.1 Caracterización de la línea celular A549	196
4.3.2 Transfección transitoria de la línea celular A549	196

DISCUSIÓN	200
1. Estudio de la función telomérica en cáncer no microcítico de pulmón y su relación con variables clínico-patológicas	202
1.1 Estudio de la función telomérica	203
1.2 Estudio del estatus telomérico y su relación con variables clínico-patológicas	205
1.3 Estudio de la actividad telomerasa y su relación con variables clínico-patológicas	208
2. Análisis de los genes de reparación del ADN en cáncer no microcítico de pulmón y su relación con la función telomérica	211
3. Actividad telomerasa y <i>PARP3</i>	225
3.1 Determinación de LOHs en <i>loci</i> cercanos a <i>PARP3</i>	225
3.2 Determinación de SNPs en el gen <i>PARP3</i>	228
3.3 <i>PARP3</i> : posible represor de la actividad telomerasa	229
CONCLUSIONES	232
BIBLIOGRAFÍA	234

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

El cáncer de pulmón constituye, en la actualidad, una patología de enorme relevancia a nivel social, tanto por su incidencia como por los altos índices de mortalidad derivados de la misma (revisado por Alberg et al., 2005). El problema fundamental que conlleva el desarrollo de esta enfermedad es que no se ha encontrado una terapia que se pueda considerar eficaz para paliarla y, en este sentido, cabe destacar la relevancia clínica que están adquiriendo los estudios acerca de los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis pulmonar (revisado por Sánchez-Céspedes, 2003).

Muchos de los componentes del tabaco son capaces de reaccionar con el ADN provocando mutaciones. Con objeto de salvaguardar la integridad del genoma y prevenir las consecuencias que trae consigo la persistencia de daño en el ADN, las células humanas poseen complejos sistemas de reparación de lesiones. Si estos mecanismos no funcionan convenientemente, las mutaciones en el genoma se acumulan, lo que llevaría a la célula a morir, por activación de los mecanismos de apoptosis, o bien, a seguir reproduciéndose, dando lugar a un proceso tumoral.

Por otro lado, está bien establecido el papel de la función telomérica en relación con los procesos de inmortalización celular. Los telómeros se sitúan en los extremos de los cromosomas lineales, ejerciendo una función protectora, y se acortan progresivamente en cada ciclo celular. Por ello, se ha propuesto que actúan como reloj mitótico, regulándose así el número de veces que las células pueden dividirse antes de entrar en senescencia o apoptosis (Hayflick, 1976). Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, se produce inestabilidad genética que, en la mayoría de las células afectadas, trae consigo la muerte celular (revisado por De Lange, 2002). Por tanto, aunque el acortamiento de los telómeros limita la capacidad replicativa de las células humanas y suprime la transformación celular, también conduce a la inestabilidad cromosómica.

Para que las células se dividan de manera ilimitada es necesario que mantengan las secuencias teloméricas. De ahí que, en la mayoría de células tumorales, se desencadenen mecanismos de mantenimiento de telómeros, fundamentalmente a través de la telomerasa, una transcriptasa reversa

especializada (revisado por Harley, 2008). Esta estabilización de los telómeros permite la inmortalización y facilita la progresión tumoral (Masutomi y Hahn, 2003).

Recientemente, se ha establecido el papel de las moléculas relacionadas con la señalización de daño en el ADN o con los propios mecanismos de reparación, en el mantenimiento de la integridad cromosómica en relación con la función telomérica. Incluso se ha sugerido que las proteínas de unión a telómeros podrían ser factores de reparación del ADN, cuya función consiste en proteger a las secuencias teloméricas, o bien que los telómeros podrían actuar como reservorio de proteínas de reparación del ADN (Martin et al., 1999; revisado por De Lange, 2004).

Teniendo en cuenta lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo, nos propusimos los siguientes objetivos:

1. **Analizar la función telomérica en cánceres no microcíticos de pulmón (CNMPs) y su relación con variables clínico-patológicas.**

Para ello, se ha investigado la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa en un total de 95 muestras tumorales, así como en sus correspondientes controles de tejido no tumoral.

2. **Estudiar en CNMP la expresión génica de los factores implicados en la reparación de daño en el ADN y su relación con variables clínico-patológicas.**

Este análisis se llevó a cabo, inicialmente, con matrices de ADN complementario. Los resultados obtenidos se corroboraron mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

3. **Investigar en CNMP la relación existente entre la función telomérica y los resultados obtenidos a partir del análisis de expresión de los factores de reparación del ADN.**

Se han estudiado posibles asociaciones entre las variaciones de expresión génica detectadas y el estatus telomérico, así como en relación a la actividad telomerasa.

ANTECEDENTES BIBLIOGRÁFICOS

1. CÁNCER DE PULMÓN

En el siglo XX la incidencia y mortalidad del cáncer de pulmón ha aumentado dramáticamente en la mayoría de los países europeos, de tal manera que puede ser considerado como una de las mayores epidemias de nuestro siglo. (Janssen-Heijnen et al., 2003). De hecho, el cáncer de pulmón ha sido la primera causa de muerte entre los varones en el 2002 a nivel mundial y la segunda entre las mujeres, según la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) (Figura 1). Según datos de 2005 del Centro Nacional de Epidemiología, la tendencia en España es la misma: considerando ambos sexos, el cáncer que más muertes causa es el de pulmón, seguido del cáncer colorrectal, tumores hematológicos, mama, estómago y próstata, apreciándose una tendencia ascendente en la incidencia de tumores de pulmón en mujeres (Figura 2).

La Agencia Americana del Cáncer (ACS) estimó que, en 2008, el 15% de los cánceres diagnosticados serían de pulmón. Además, teniendo en cuenta todas las muertes acontecidas como consecuencia del cáncer, el 29% de ellas serían causadas por este tipo tumoral. Es más, el número de muertes como consecuencia del cáncer de pulmón, superaría a las causadas por los cánceres de colon, mama y próstata considerados conjuntamente.

La media de edad de los pacientes diagnosticados es de, aproximadamente, 70 años, siendo 2 de cada 3 mayores de 65 años. Menos del 3% de todos los pacientes que padecen la enfermedad tienen edades inferiores a 45 años (ACS).

El principal agente etiológico responsable del cáncer de pulmón es el tabaco, causante del 90% de los casos en varones y del 55-80% de los casos entre las mujeres en los países de mayor incidencia. Para varones, las regiones de mayor incidencia son Norteamérica, Europa del Este y Rusia. En el caso de las mujeres, Norteamérica, China y los países escandinavos. La supresión del hábito tabáquico constituye la principal medida preventiva. Sin embargo, el riesgo entre los individuos que dejan de fumar continua siendo elevado,

aunque menor que en los fumadores. Los ex-fumadores representan una gran proporción de los pacientes diagnosticados de cáncer de pulmón en países donde el consumo de tabaco está disminuyendo, como son E.E.U.U. y Reino Unido (Carretero, 2005; Brody et al, 2006; ACS, 2007; Hung et al, 2008). Esto es debido a que la expresión de una gran variedad de genes se altera en las células epiteliales de los conductos aéreos de los fumadores. Algunos de ellos, como los genes que codifican para proteínas antioxidantes o implicadas en el metabolismo de xenobióticos, recuperan sus niveles de expresión a los 2 años de haber abandonado el tabaco, pero la expresión de oncogenes y genes supresores de tumores permanece alterada durante décadas. Estos genes pueden ser, en parte, responsables del desarrollo de cáncer de pulmón años después de que el paciente haya abandonado el tabaquismo (Spira et al., 2004; Brody et al, 2006).

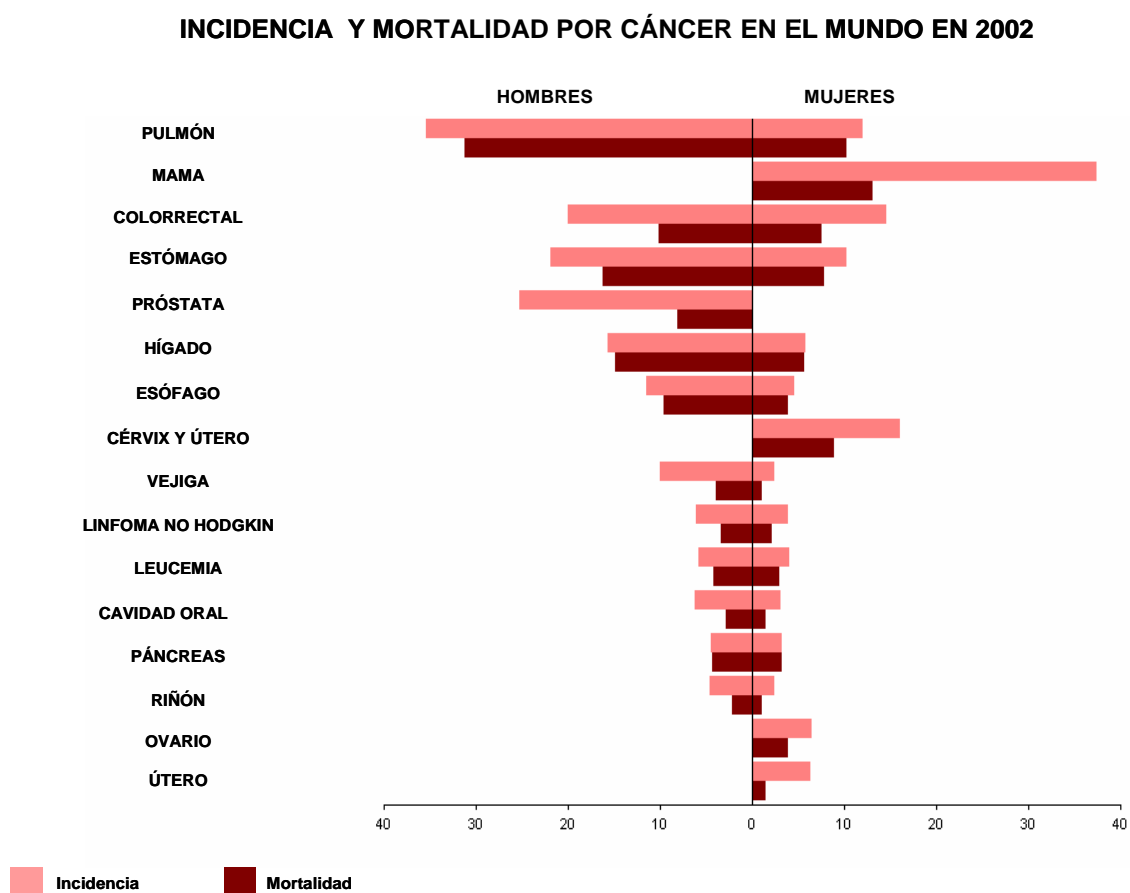


Figura 1. Incidencia y mortalidad por cáncer en el mundo en 2002, según datos de la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC). El eje de abscisas representa el número

MORTALIDAD POR CÁNCER EN ESPAÑA EN 2005

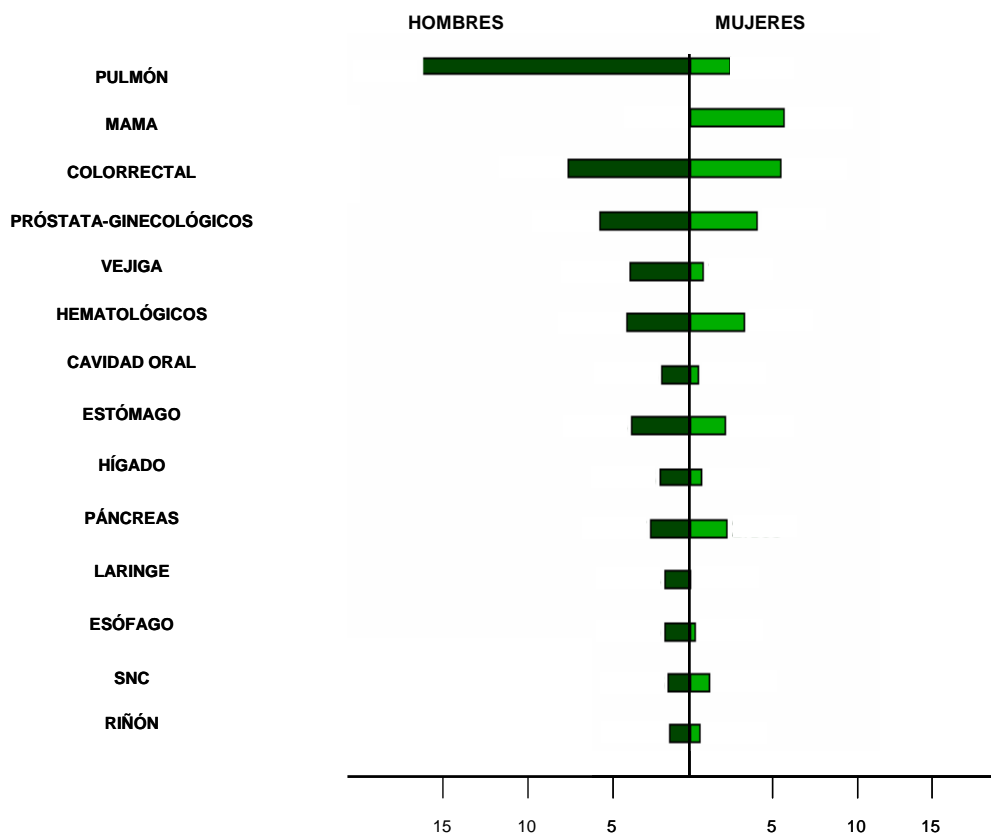


Figura 2. Mortalidad por cáncer en España en 2005, según datos del Centro Nacional de Epidemiología. El eje de abscisas representa el número de casos por 1.000.

El humo del tabaco contiene alrededor de 4.800 compuestos diferentes, que se pueden separar en compuestos gaseosos y partículas. Al menos 60 de estos compuestos son considerados carcinógenos por la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) en base a evidencias epidemiológicas y experimentales (Carretero, 2005).

Los compuestos carcinogénicos del tabaco se absorben y son metabolizados en los individuos fumadores. La respuesta del organismo a los carcinógenos es similar a la que ocurre durante la exposición a cualquier xenobiótico. Muchos de estos compuestos son de naturaleza lipófila, cualidad que les permite atravesar las membranas biológicas y, por esta misma razón, son difícilmente eliminables por la principal vía de excreción: la orina. Con objeto de incrementar esta excreción, el organismo somete al xenobiótico a una serie de

transformaciones encaminadas a aumentar la polaridad de los compuestos. Diversas enzimas participan en este proceso, destacando la familia citocromo P450 y la glutatión-S-transferasa (Carretero, 2005).

Por un lado, la hidroxilación activa de los componentes carcinógenos del tabaco los convierte en especies más reactivas, capaces de reaccionar con el ADN, formando aductos con las bases nitrogenadas. Si estos aductos no se reparan convenientemente, mediante los mecanismos celulares pertinentes, durante la replicación del ADN pueden introducirse mutaciones (Carretero, 2005; Brody et al, 2006) (Figura 3).

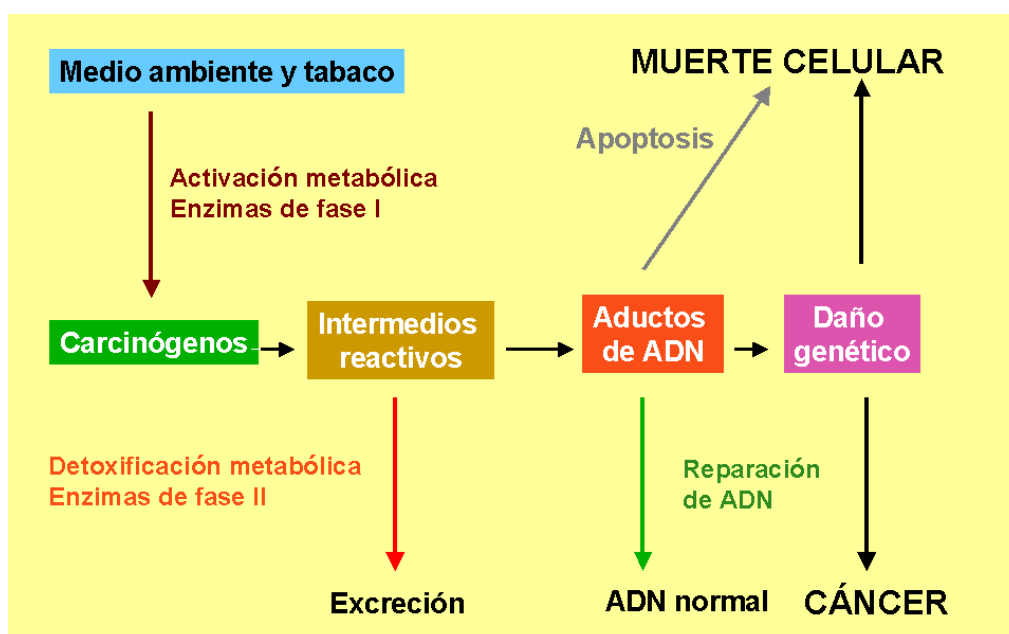


Figura 3. Esquema representativo del metabolismo de los carcinógenos del tabaco.

Por otro lado, la existencia de diferentes polimorfismos en estas enzimas detoxificadoras explicaría, en parte, las diferentes susceptibilidades individuales a la acción de los carcinógenos, al igual que ocurre con las proteínas responsables de la reparación del ADN (Carretero, 2005; Brody et al, 2006). De hecho, se ha descrito que una capacidad reducida en la reparación del ADN aumenta el riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Wei et al., 2000; Brody et al, 2006). Es más, una disminución de ésta implica

un aumento de los aductos de ADN relacionados con el tabaco (Wei et al., 2000; Vulimiri et al., 2000). Asimismo, una elevada capacidad de reparación del ADN puede traer consigo procesos de resistencia a las quimio y radioterapias dirigidas a inducir daño genético en las células tumorales (Sánchez-Céspedes, 2003).

También existe una asociación clara entre la exposición ocupacional a otras sustancias (asbestos, radón, berilio, cromo...) y la aparición de cáncer de pulmón. Sin embargo, no en todos los casos existe una causa concreta detectada, ni la presencia de un agente etiológico conlleva siempre la aparición de cáncer de pulmón. De ahí que sólo entre el 10 y el 15% de los fumadores desarrollen la enfermedad. Estos hechos hacen pensar en la existencia de efectos aditivos y sinérgicos entre las distintas causas para determinados casos, así como en factores de predisposición y de riesgo para el cáncer de pulmón (Carretero, 2005).

Típicamente, el cáncer de pulmón se divide en dos grupos mayoritarios, de acuerdo a aspectos histológicos y clínicos: cánceres microcíticos (CMPs) y cánceres no microcíticos (CNMPs). Este último grupo, que es el objeto de nuestro estudio, es el mayoritario, clasificándose como tal el 80-90% de los tumores pulmonares. Existe un tercer grupo, muy poco común, que presenta características de ambos tipos y se denomina cáncer mixto de célula pequeña/célula grande. Asimismo, hay otros tumores de pulmón muy minoritarios, como los tumores carcinoides, que crecen lentamente y suelen curarse por cirugía (ACS).

El cáncer no microcítico de pulmón se subdivide, a su vez, en tres tipos, en función de la histología del tumor:

- Adenocarcinoma: representa el 40% de los carcinomas no microcíticos diagnosticados en España. Suele localizarse en zonas periféricas de los pulmones, por lo que frecuentemente afecta a la pleura y pared torácica.
- Carcinoma epidermoide o de célula escamosa: es la variedad de cáncer broncopulmonar más frecuente en España. Representa el 50% de los

carcinomas no microcíticos. Suele localizarse en la parte central de los pulmones. Tiene un crecimiento relativamente lento y es el tipo histológico que muestra mayor correlación con la exposición a los carcinógenos del tabaco.

- Carcinoma indiferenciado de célula grande: es el minoritario de los tres, englobando al 10% de los CNMPs diagnosticados. Puede desarrollarse en cualquier parte del pulmón y crece y se disemina rápidamente (AECC, Agencia Española Contra el Cáncer).

Para poder emitir un juicio sobre el pronóstico del enfermo y determinar el tratamiento más adecuado, es importante clasificar el tumor, es decir, determinar en qué fase se encuentra. El sistema que con mayor frecuencia se emplea para su clasificación es el TNM. Estas siglas hacen referencia a tres aspectos del cáncer: la T se refiere al tamaño y localización del tumor, la N a la afectación de los ganglios linfáticos y la M a la afectación o no de otros órganos (Mountain, 1997).

- Tamaño del tumor (T):
 - T0: no existen evidencias de tumor primario.
 - TX: el tumor primario no puede ser evaluado o bien ha sido certificado por la presencia de células malignas en el esputo o lavado bronquial, pero no visualizado por imágenes o broncoscopía.
 - TIS: carcinoma in situ.
 - T1: tumor inferior a 3 cm en su diámetro mayor, rodeado por pulmón o pleura visceral, sin evidencia broncoscópica de invasión más proximal del bronquio lobar.
 - T2: tumor superior a 3 cm en su diámetro mayor o con compromiso de bronquio principal, alejado de la carina más de 2 cm, o con invasión de pleura visceral o asociado con atelectasia o neumonitis obstructiva extendida al hilio pero que no compromete el pulmón entero.
 - T3: tumor de cualquier tamaño que invade directamente la pared torácica (incluyendo tumores del sulcus superior), diafragma, pleura mediastinal, pericardio parietal; también, tumor en

bronquio principal a una distancia inferior de 2 cm de la carina, pero sin compromiso de ésta, o atelectasia asociada o neumonitis obstructiva del pulmón entero.

- T4: tumor de cualquier tamaño que invade el mediastino, corazón, grandes vasos, traquea, esófago, cuerpos vertebrales o carina; también, tumor con derrame pleural o pericárdico maligno, o con ganglio(s) tumoral satélite dentro del lóbulo tumoral primario ipsilateral del pulmón.
- Ganglios linfáticos (N):
 - N0: no hay metástasis en los ganglios linfáticos regionales.
 - NX: los ganglios linfáticos regionales no pueden ser evaluados.
 - N1: metástasis en ganglios linfáticos peribronquial, ipsilateral y/o hiliar ipsilateral, y compromiso de ganglios intrapulmonares por extensión directa del tumor primario.
 - N2: metástasis de ganglio(s) linfáticos ipsilateral, mediastinal y/o subcarinales.
 - N3: metástasis de ganglio(s) linfáticos mediastinales contralaterales, hiliares contralaterales, escalenos ipsilaterales o contralaterales, o supraclaviculares.
- Metástasis a distancia (M):
 - M0: no hay metástasis a distancia.
 - MX: la presencia de metástasis a distancia no puede ser evaluada.
 - M1: hay metástasis a distancia.

En función de estos aspectos, los cánceres de pulmón no microcíticos se agrupan en diferentes etapas o estadios, como se refleja en la Tabla 1 (Mountain, 1997). En algunos estudios, se han subclasificado los tumores de estadios I y II. Los resultados aportados por la Asociación Internacional para el Estudio del Cáncer de Pulmón (IASLC) demuestran que no existen diferencias significativas en la supervivencia de los pacientes al realizar esta división (Travis et al., 2008). En 2009, se publicará la séptima edición de la clasificación TNM de tumores malignos y la IASLC guiará revisiones sobre el actual sistema de estadificación del cáncer de pulmón. Las recomendaciones

se enviarán a distintos organismos internacionales, que las considerarán para la próxima edición de los manuales de estadificación (Schneider, 2008).

ESTADIO	DESCRIPCIÓN TNM
I	T1/T2 N0 M0
II	T1/T2 N1 M0 T3 N0 M0
IIIA	T3 N1 M0 T1/T2/T3 N2 M0
IIIB	T4 N0/N1/N2 M0 T1/T2/T3/T4 N3 M0
IV	T1/T2/T3/T4 N0/N1/N2 M1

Tabla 1. Sistema internacional de estadificación TNM para el cáncer de pulmón (Mountain, 1997).

El principal problema del cáncer de pulmón es que la mayoría de los pacientes afectados presentan un estado avanzado de la enfermedad en el momento del diagnóstico, siendo la tasa de supervivencia a 5 años inferior al 15% (Lantuejoul et al., 2005). De hecho, la supervivencia a 5 años, tras el diagnóstico, ha cambiado muy poco desde 1974, de manera que la tasa ha aumentado, tan sólo, del 12.4% al 15% para pacientes diagnosticados entre 1996-2000 (Ries et al, 2004).

El diagnóstico temprano del cáncer de pulmón, del que depende el pronóstico del paciente es, a menudo, difícil. Esto, unido a que la quimioterapia para

casos avanzados tiene beneficios limitados para la supervivencia del paciente, hace que sea, cada vez más necesario, el traslado de los descubrimientos de la patología molecular del cáncer de pulmón, del laboratorio a la práctica clínica (Noda et al., 2002; Schiller et al., 2002; Sekido et al., 2003). Además, los recientes avances ofrecen la posibilidad de mejorar el diagnóstico, tratamiento y pronóstico de los pacientes afectados por esta enfermedad (Meyerson et al. 2004).

1.1 ALTERACIONES MOLECULARES EN CÁNCER DE PULMÓN

Se han descrito polimorfismos en las moléculas implicadas en la detoxificación de los carcinógenos del tabaco que se relacionan con un mayor riesgo a desarrollar cáncer de pulmón. En concreto, el genotipo homocigoto mutante de *CYP1A1 Msp1* y el polimorfismo *CYP1A1* Ile-Val tienen una asociación positiva con el desarrollo de cáncer de pulmón en la población japonesa, pero no en la caucásica o afroamericana. Asimismo, en poblaciones asiáticas, se ha determinado que la combinación de los genotipos *CYP1A1 Msp1* y polimorfismos en *GSTM1* implican un mayor riesgo de desarrollar esta enfermedad. La asociación en otros grupos poblacionales es cuestionable ya que su frecuencia es muy baja, tanto en cáncer de pulmón, como en la población sana (Alexandrie et al., 1994; revisado por Kiyohara et al., 2002). Polimorfismos en el promotor de la enzima mieloperoxidasa causantes de una disminución en sus niveles transcripcionales, se han relacionado con un menor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en distintos grupos poblacionales (revisado por Kiyohara et al., 2002).

Existen numerosas enfermedades causadas por mutaciones en genes de reparación del ADN que se caracterizan por una elevada incidencia de cáncer, probablemente por los defectos en la subsanación del daño genómico. De igual manera, polimorfismos en algunos de estos genes pueden implicar diferencias en la capacidad de reparación del ADN e influir en el riesgo individual a desarrollar cáncer de pulmón. En general, los individuos con una capacidad

de reparación del daño en el ADN reducida tienen mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Wei et al., 1996; Wei et al., 2000; revisado por Kiyohara et al., 2002; Brody et al., 2006). La asociación entre la capacidad de reparación del ADN disminuida y este tipo tumoral ha sido significativa para los genes *ERCC5*, *ERCC6*, *XPC* y *XRCC1*, todos ellos implicados en la reparación por escisión de nucleótidos (revisado por Kiyohara et al., 2002). Es más, de manera general, ha sido descrito que la disminución en los niveles de ARN mensajero de genes de la vía de reparación por escisión de nucleótidos, así como la disminución en su capacidad de reparación, se asocian a un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón (Wei et al., 1996; Cheng et al., 2000; Wei et al., 2000).

El gen supresor de tumores *p53* es una de las moléculas que más frecuentemente mutan en cáncer (Ara et al., 1990; Hollstein et al., 1991; revisado por Nikliński et al., 2001). Estas mutaciones alteran su capacidad de unirse al ADN y de controlar el ciclo celular y la proliferación (Roy et al., 1994; revisado por Nikliński et al., 2001). Se han detectado mutaciones en el 40-70% de los cánceres microcíticos de pulmón y en el 40-60% de los cánceres no microcíticos y suelen relacionarse con carcinomas epidermoides, quizás por la mayor exposición a los carcinógenos del tabaco de los pacientes que desarrollan este tipo tumoral. Estas alteraciones pueden detectarse en fases precoces de la enfermedad. Generalmente, la forma mutante de *p53* tiene una vida media más larga que la forma no mutada, por lo que los niveles proteicos suelen ser elevados en células tumorales (Fujita et al., 1999; revisado por Luiz de Menezes y Machado, 2005; revisado por Pankiewicz et al., 2007).

La activación de *p21* por *p53* inhibe la progresión celular en la fase G1/S y evita la fosforilación de *Rb*. En CNMP, *p21* se encuentra sobre-expresada en el 65-75% de los casos, especialmente en los tumores bien diferenciados, por lo que su sobre-expresión se ha relacionado con un mejor pronóstico (revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001; Shoji et al., 2002).

Otra molécula supresora de tumores en la que se han descrito alteraciones es retinoblastoma (*Rb*). La inactivación de los dos alelos de *Rb* se ha detectado en

el 90% de los cánceres microcíticos de pulmón y en el 15-30% de los no microcíticos (Fong et al., 1999; Burke et al., 2005). En la misma vía de actuación que Rb se encuentra *p16*, en la que se han detectado mutaciones en el 10-40% de los CNMPs. Asimismo, la delección de *p16* o la hipermetilación de su promotor, que se ha detectado en el 30-50% de los cánceres de pulmón, se consideran factores de pronóstico desfavorable y son eventos precoces en el cáncer de pulmón (revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001; Cheng et al., 2003; revisado por Chorostowska-Wynimko y Szpechcinski, 2007). Puesto que *Rb* y *p16* pertenecen a la misma vía de señalización, las alteraciones génicas en ellas son excluyentes; esto es, si una está alterada, no lo estará la otra. Las alteraciones génicas no son redundantes en las células cancerígenas (revisado por Sánchez-Céspedes, 2008).

Anormalidades en las vías de p53 y Rb se han correlacionado con un peor pronóstico en pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón (Steels et al., 2001; Burke et al., 2005).

El protooncogén *K-ras* se encuentra mutado en el 20-50% de los adenocarcinomas. Las mutaciones que afectan a este gen, generalmente, provocan que *K-ras* permanezca en un estado constante de activación y suelen ocurrir en el codon 12 (revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001; Broermann et al., 2002; Kim et al., 2003; revisado por Luiz de Menezes y Machado, 2005). Las mutaciones en *K-ras* se asocian al hábito tabáquico. De hecho, han sido detectadas en biopsias bronquiales de individuos fumadores sin cáncer de pulmón, así como en el esputo recolectado antes de la detección de la enfermedad, por lo que se ha sugerido que *K-ras* podría ser un marcador de pre-malignidad (revisado por Luiz de Menezes y Machado, 2005).

El gen *EGFR* aparece mutado, especialmente, en adenocarcinomas de pacientes no fumadores y se ha considerado relevante el estudio de las mutaciones que en él acontecen para determinar la respuesta al tratamiento de inhibidores de la actividad tirosin-quinasa (Lynch et al., 2004; Pacz et al.,

2004). Los tumores pulmonares con mutaciones en *EGFR* constituyen una identidad claramente diferenciada de los adenocarcinomas carentes de estas alteraciones. La etiología e histopatología de los tumores con mutaciones difiere ampliamente de los tumores sin mutaciones en el gen (Conde et al. 2006). Además, se han detectado amplificaciones génicas y sobre-expresión proteica en tumores pulmonares (Bhattacharjee et al., 2001). La activación de este receptor modula a proteínas implicadas en la supervivencia y proliferación celular. Las mutaciones en *K-ras* y *EGFR* son mutuamente excluyentes (Lynch et al., 2004; Pacz et al., 2004; Scagliotti et al., 2004; Conde et al., 2006).

Las amplificaciones de *c-myc* son un hecho frecuente en cáncer microcítico de pulmón (80-90%), asociándose con una mayor agresividad de la enfermedad, mientras que en CNMP aparecen tan sólo en el 10% de los tumores (Kubokura et al., 2001).

La sobre-expresión de *c-erbB-1* es más frecuente en cáncer no microcítico, especialmente en carcinomas escamosos (65-90%), no correlacionándose con la prognosis del paciente. *c-erbB-2* se sobre-expresa en el 25% de los CNMP. Este gen codifica para una proteína denominada HER-2. En tumores de estadio IIIB y IV se han detectado niveles elevados de la proteína, lo que se ha relacionado con un peor pronóstico (revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001; Micke et al., 2001; revisado por Luiz de Menezes y Machado, 2005).

El factor de crecimiento de hepatocitos (HGF) estimula el crecimiento de células epiteliales y estimula la mitosis del epitelio bronquial y de las células alveolares de tipo II. Además, media en la angiogénesis, movilidad celular e invasión. Se expresa en la mayoría de los cánceres no microcíticos, lo que se relaciona con un peor pronóstico, y ocasionalmente en cánceres microcíticos (Siegfried et al., 1997a).

La ciclina D1 está implicada, también, en la tumorigénesis pulmonar y se encuentra sobre-expresada en el 25-47% de los CNMPs (Fong et al., 1999). De

hecho, se ha descrito que esta sobre-expresión ocurre en lesiones previas al desarrollo del proceso invasivo y que se correlaciona con tumores poco diferenciados y con metástasis en nódulos linfáticos (Betticher et al., 1996; Brambilla et al., 1999).

La presencia de actividad telomerasa es otra de las características de la mayoría de los tumores. Más adelante se revisa esta enzima, sus funciones y su implicación en el proceso tumorigénico.

El péptido de liberación de gastrina (GRP) se expresa en el 20-60% de los cánceres microcíticos y rara vez en CNMP (Siegfried et al., 1997b).

TFG- β promueve la inflamación pulmonar y puede unirse a las integrinas que se expresan en las células tumorales. Este factor inhibe el ciclo celular en la fase G1/S e induce la expresión de p21 y c-myc (Hasegawa et al., 2001; Shoji et al., 2002). Además, afecta a la angiogénesis y participa en la progresión tumoral del CNMP, actuando como un factor pronóstico de supervivencia independiente en los adenocarcinomas (revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001).

El factor antiapoptótico Bcl-2 se expresa con mayor frecuencia en CMP que en CNMP (75-95% frente a 10-35% de los casos) (Grossi et al., 2003; Shibata et al., 2004). Además de la inhibición de la apoptosis, las células tumorales requieren de factores angiogénicos que promuevan la proliferación y migración de células epiteliales. Entre estos, destaca el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF). Su expresión aumenta en cánceres de pulmón con metástasis y se ha considerado como indicador pronóstico en pacientes afectados de cáncer de pulmón. Se ha descrito que la expresión elevada de VEGF, p53, Rb y Bcl-2 puede afectar a la resistencia quimioterápica (Ludovini et al., 2004).

Algunas regiones cromosómicas tienden a deleccionarse en cáncer de pulmón, como 3p, 9p y 17p. También se han descrito ganancias cromosómicas (El-Zein

et al., 2000; revisado por Rom et al., 2000; revisado por Nikliński et al., 2001; Wistuba et al., 2001; revisado por Huber y Stratakis, 2004).

En la Tabla 2 se resumen los principales marcadores moleculares encontrados en cáncer de pulmón.

PRINCIPALES ALTERACIONES MOLECULARES EN CÁNCER DE PULMÓN

Genes supresores de tumores	p53, p21, Rb, p16
Protooncogenes	K-ras, EGFR, c-myc, c-erbB-1 y 2, HGF, HER-2, ciclina D1
Telomerasa	hTERT
Factores de crecimiento	GRP/BN, TFG- β
Apoptosis y angiogénesis	Bcl-2, VEGF
Anormalidades genéticas	LOH en 3p

Tabla 2. Principales alteraciones moleculares en cáncer de pulmón.

1.1.1 PÉRDIDAS DE HETEROZIGOSIDAD (LOHs) EN 3P

Las pérdidas de heterozigosidad en el brazo corto del cromosoma 3 es un hecho común en el cáncer de pulmón, de manera que en esta región podrían estar localizados genes supresores de tumores. LOHs en 3p han sido detectados en la mayoría de cánceres microcíticos de pulmón, así como en el 75% de los casos de cáncer no microcítico (Kok et al., 1997; Sekido et al., 1998; Cuthbert et al., 1999; Zabarovsky et al., 2002). Distintas regiones en 3p muestran pérdidas alélicas: 3p25-26, 3p21-22, 3p14 y 3p12-13, siendo este hecho considerado como el evento más frecuente y temprano en el desarrollo

de cáncer de pulmón. De hecho, estas alteraciones se han encontrado en el epitelio normal bronquial, no sólo de pacientes con cáncer de pulmón, sino también de fumadores que no han desarrollado esta patología, precediendo a cambios histológicos. Por tanto, parece que las deleciones en 3p y, en concreto, en 3p21, son inducidas por los carcinógenos del tabaco (Hibi et al., 1992; Sundaresan et al., 1992; Hung et al., 1995; Mao et al., 1997; Wistuba et al., 1997; Sozzi, 1998; Wistuba et al., 1999; Lerman y Minna, 2000; Hirao et al., 2001; Wistuba et al., 2001; Zabarovsky et al., 2001; Minna et al., 2002; Sasatomi et al., 2002; Sekido et al., 2003). De las cuatro regiones con alta tasa de pérdida alélica, una extensión de 600 Kb en 3p21.3, es la que presenta mayor tendencia a deleccionarse en el epitelio no tumoral y tumoral de pacientes con cáncer de pulmón y en individuos fumadores pero no enfermos, lo que indica que contiene genes implicados en el desarrollo tumorigénico (Lerman y Minna, 2000; Wistuba et al., 2000; Zochbauer-Muller et al., 2002; revisado por Angeloni, 2007).

Estas alteraciones en 3p, si bien no en un porcentaje tan alto como en CNMP, se han encontrado, también, en otros tipos tumorales, como mama, cabeza y cuello, lengua, ovario, cérvix/útero, esófago, vejiga, vesícula biliar, cáncer colorrectal, pancreático, renal y hepático (Petursdottir et al., 2004; revisado por Ji et al., 2005; Hu et al., 2006; revisado por Angeloni, 2007; revisado por Kost-Almilova e Imreh, 2007; Asakawa et al., 2008).

2. TELÓMEROS

Hermann Muller fue el primero en describir, en su estudio sobre la mosca de la fruta *Drosophila melanogaster*, a los telómeros (Muller, 1938). El término “telómero” proviene de las palabras griegas *telos*, que significa “fin”, y *meros*, cuyo significado es “parte”. Muller acuñó este término basándose en la función protectora que tienen los telómeros en la parte final de los cromosomas lineales (revisado por Bailey y Goodwin, 2004) (Figura 4). La conexión entre la función telomérica y la estabilidad genómica fue descrita por primera vez en un trabajo de McClintock (1941), del cual se desprende que los telómeros protegen los extremos de los cromosomas y mantienen su integridad estructural. Por lo tanto, los telómeros se convirtieron en uno de los primeros mecanismos celulares reconocidos implicados en la estabilidad genómica (revisado por Bailey y Goodwin, 2004).

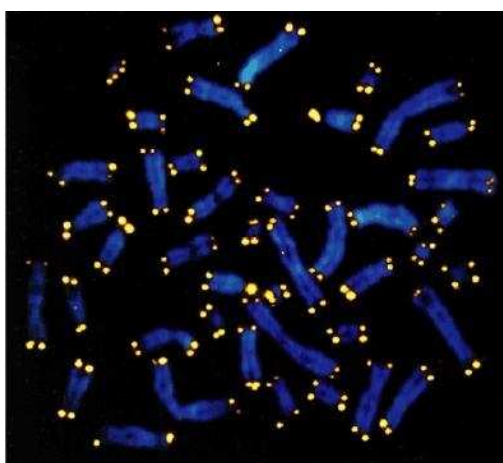


Figura 4. Extremos cromosómicos de células en metafase. Los cromosomas, en azul, están teñidos con DAPI (diclorohidrato de 4',6-diamino-2-fenilindol) y los telómeros han sido hibridados con una sonda fluorescente (amarilla) específica de secuencias teloméricas (Hodes et al., 2002).

El ADN telomérico consiste en repeticiones en tándem de secuencias nucleotídicas cortas, ricas en residuos de guanina. Aunque todos los telómeros de un mismo genoma presentan las mismas repeticiones, éstas

varían entre las distintas especies (De Lange et al., 1990). No obstante, es notable la gran conservación que existe en las repeticiones teloméricas de especies tan distantes en la evolución como vertebrados, plantas y protozoos, lo que implica una conservación de sus funciones para proteger los extremos cromosómicos (Bearss et al., 2000; Chan y Blackburn, 2002).

En vertebrados, el ADN telomérico está formado por pequeños fragmentos de 6 nucleótidos repetidos en tándem, siendo la secuencia 5'-(TTAGGG)_n-3' y, en humanos, tiene una longitud de entre 5 y 15 Kb (Moyzis et al, 1988; Allshire et al, 1989; Cross et al 1989; revisado por Hug y Lingner, 2006).

Estudios llevados a cabo en linfocitos de sangre periférica de gemelos monozigotos, dizigotos e individuos no emparentados, revelan que la distribución de la longitud de los telómeros está genéticamente determinada y, por ello, cromosomas homólogos tienen distinta longitud telomérica. Es más, sugieren que ésta se define en el cigoto y se mantiene de por vida, lo que podría favorecer la aparición de alteraciones en la proliferación o determinadas patologías ligadas al acortamiento telomérico en cigotos con telómeros anormalmente acortados. Asimismo, la longitud de las secuencias teloméricas podría influir, junto a otros factores genéticos, en el riesgo a desarrollar cáncer (Graakjaer et al., 2004; Londoño-Vallejo, 2004).

Varios grupos han encontrado correlaciones significativas entre la longitud de los telómeros en los hijos y la longitud de los telómeros de los padres, pero no de las madres. Este resultado llevó a los autores a plantear que la longitud de los telómeros era heredada de los padres (Nordfjall et al., 2005; Unryd et al., 2005; Njajou et al., 2007). También, se encontró una correlación positiva y significativa entre la longitud telomérica y la longevidad de los individuos analizados (Njajou et al., 2007). Hay estudios que defienden que las mujeres tienen telómeros más largos que los hombres, lo que podría explicar por qué las mujeres tienen una mayor supervivencia (Benetos et al., 2001; Cherif et al., 2003; Nawrot et al., 2004; Bischoff et al., 2006; Fitzpatrick et al., 2007).

Por otro lado, se ha comprobado el hecho de que la longitud telomérica es específica de cada cromosoma, siendo notable el caso de 17p, cuyos telómeros son más cortos que otros en los individuos analizados (Martens et al., 1998; Britt-Compton et al., 2006).

Se ha descrito, también, que variaciones en la tasa de recambio celular inducidas por los diferentes estilos de vida o estados patológicos, determinan la diferente longitud telomérica entre distintos individuos (Jeanclos et al., 2000; Benetos et al., 2004; Valdes et al., 2005; Cherkas et al., 2006; Huda et al., 2007).

Estudios realizados en ratones demostraron que los telómeros más largos se localizan, en aquellos tejidos estudiados, en los nichos de células madre, de manera que éstos se van acortando progresivamente a medida que las células madre se movilizan a nichos adyacentes. Las secuencias teloméricas más cortas se detectaron en las capas más diferenciadas, de acuerdo a la historia proliferativa y de diferenciación. Asimismo, el proceso de envejecimiento conlleva un acortamiento de la longitud de los telómeros en todos los compartimentos, incluidos los nichos de células madre (Flores et al., 2008).

Adyacentes a los telómeros se encuentran unas secuencias, a menudo repetitivas, con gran variabilidad denominadas regiones subteloméricas (Louis, 1995; Riethman, 2008). Se ha descrito que están implicadas en la regulación de la longitud y estructura teloméricas, así como en la expresión de genes cercanos (revisado por McCord y Broccoli, 2008).

Si bien se creía que los telómeros estaban constituidos por secuencias no codificantes, estudios llevados a cabo en la línea celular de cáncer de cérvix HeLa, han demostrado que las secuencias teloméricas no son transcripcionalmente silentes. Mediante Northern-blot y usando sondas complementarias a la secuencia 5'-UUAGGG-3', se ha detectado ARN de tamaños comprendidos entre las 100 pares de bases y las 9 kilobases (TERRA, *Telomeric Repeat-containing RNA*). La transcripción de ARN comienza en la región subtelomérica y estas moléculas forman *foci* colocándose con Rap1,

lo que indica que forman parte de la heterocromatina telomérica (Azzalin et al., 2007). La fuerte inducción de la transcripción de TERRA en levaduras produjo acortamiento telomérico e inhibición de TPE (*Telomere Position Effect*), esto es, inhibición del silenciamiento de genes mediado por la estructura heterocromatínica de los telómeros, lo que sugiere que estas secuencias pueden estar implicadas en la regulación epigenética de los extremos cromosómicos (Sandell et al., 1994; Azzalin et al., 2007).

2.1 ESTRUCTURA DE LOS TELÓMEROS

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas especializadas que protegen los extremos de los cromosomas lineales eucarióticos de los mecanismos de reparación del ADN y de la degradación (Chan y Blackburn, 2002). Son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los cromosomas y para la viabilidad celular.

A las secuencias teloméricas están unidas una serie de proteínas que forman el denominado complejo *shelterin*. Éstas, que comenzaron a identificarse a partir de 1995, presentan las características de localizarse sólo en los extremos cromosómicos, estar presentes en ellos a lo largo de todo el ciclo celular y de tener una función en la célula limitada a los telómeros. El complejo *shelterin* está constituido por las siguientes moléculas: TRF1, TRF2, POT1, Rap1, TPP1 y TIN2 (De Lange, 2002; revisado por De Lange, 2005).

Además del complejo *shelterin*, existen otras proteínas que forman parte de la estructura telomérica, si bien su función no está limitada a los extremos cromosómicos (De Lange, 2002; revisado por De Lange, 2005).

Los telómeros terminan, en su extremo 3', en una hebra sencilla rica en guanina y de una longitud de unos 30-110 nucleótidos, que ha permanecido conservada en todos los organismos eucariotas, y que se retrae, invaginándose en la doble cadena de repeticiones teloméricas, para formar un *T-loop* estabilizado por las proteínas teloméricas (Chai et al. 2006a). De esta manera,

se constituye una estructura de tres hebras (van Steensel et al., 1998; Griffith et al., 1999; De Lange, 2004) (Figura 5). La pérdida de ésta es letal para la célula, pues el telómero quedaría desprotegido, convirtiéndose en una estructura lineal que podría ser reconocida por los mecanismos de reparación del ADN, como si de una rotura de doble hebra se tratase, lo que activaría fusiones cromosómicas y, finalmente, llevaría a la inestabilidad genómica. Esta estructura también está implicada en la regulación de la enzima telomerasa, responsable de la síntesis de repeticiones teloméricas *de novo*, pues inhibe la elongación telomérica *in cis* (Van Steensel y De Lange, 1997; Blackburn, 2001; Ancelin et al., 2002; Sherr, 2004; Smogorzewska y De Lange, 2004; Baumgartner y Lundblad, 2005; revisado por De Lange, 2005).

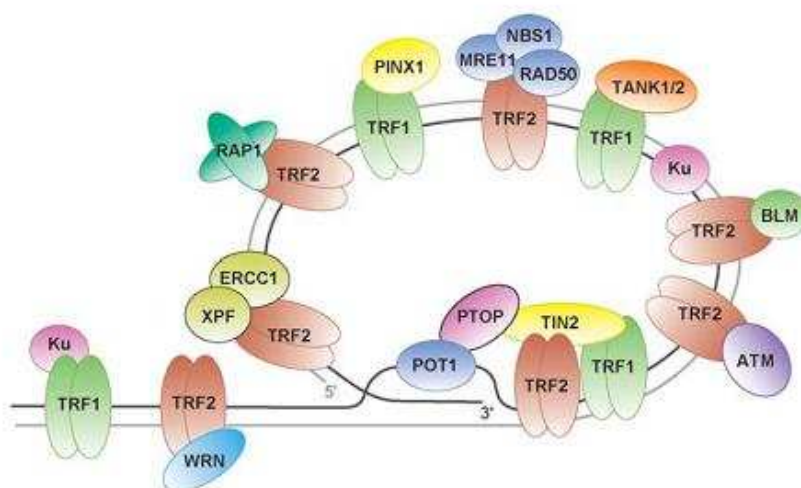


Figura 5. Representación esquemática del T-loop y de las proteínas teloméricas que colaboran en el mantenimiento de la estructura de los telómeros (Stewart y Weinberg, 2006).

Recientemente ha sido establecida una correlación positiva entre la longitud de los telómeros y la longitud de la hebra sencilla rica en guanina. También, en investigaciones llevadas a cabo en líneas celulares tumorales y normales, se ha determinado que esta hebra es significativamente más corta en las líneas celulares tumorales que en las normales (Lee et al., 2008). Trabajos llevados a cabo por el mismo grupo, señalan que la longitud de la hebra rica

en guanina es más larga en células embrionarias, lo que confirmaría la correlación negativa encontrada entre ésta y la edad.

Se ha postulado que los telómeros muestran tres estados a lo largo del ciclo celular, cambiando de manera dependiente del ciclo, para limitar el acceso de la enzima telomerasa a los telómeros durante la fase S. El paso del estado en el que el telómero se encuentra formando el *T-loop* (*non-extendible state*) al estado en el que se encuentra en estado lineal (*extendible state*) es dependiente de la longitud telomérica. Es decir, durante la fase de replicación del ADN por la enzima ADN polimerasa, los telómeros pierden la estructura de *loop*, manteniéndose así durante mayor tiempo aquellos telómeros con un menor número de repeticiones teloméricas. El tercer estado (*extending state*) sería dependiente de la concentración de enzima telomerasa, de manera que si la concentración de ésta es baja, elongará, principalmente, los telómeros más cortos. Por tanto, todos los telómeros, independientemente de su longitud, estarían accesibles a la enzima telomerasa durante un breve periodo de tiempo, tras la replicación, pero la telomerasa se une a los telómeros más cortos con mayor probabilidad, pues permanecen más tiempo en estado lineal. Esta hipótesis afirma que la función de *T-loop* no es evitar la elongación de los telómeros por la enzima telomerasa, sino favorecer la extensión de los telómeros más cortos cuando la concentración de enzima está limitada (Cristofari y Lingner, 2006; revisado por Hug y Lingner, 2006) (Figura 6).

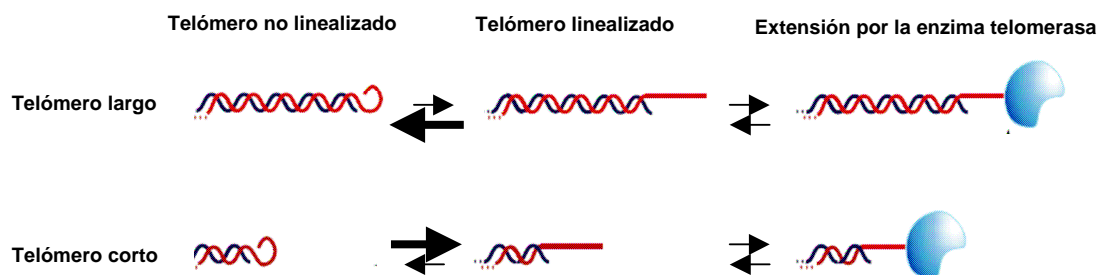


Figura 6. Modelo de los tres estados en los que se encuentran los telómeros a lo largo del ciclo celular (adaptado de Hug y Lingner, 2006).

2.1.1 PROTEÍNAS DEL COMPLEJO SHELTERIN

La principal función del complejo *shelterin* es proteger a los telómeros, tanto de posibles degradaciones, como de fusiones entre extremos de diferentes cromosomas (revisado por De Lange, 2005; revisado por Hug y Lingner, 2006). Este complejo determina la estructura telomérica, la formación del *T-loop* y la síntesis del ADN telomérico por la enzima telomerasa. Algunas de las proteínas de este complejo (TRF1, TRF2, POT1 y Rap1) han sido identificadas en organismos inferiores, mientras que otras sólo se encuentran en vertebrados (TIN2 y TPP1) (revisado por De Lange, 2005).

TRF1 y TRF2 (*Telomeric Repeat binding Factor 1 y 2*, respectivamente) se unen específicamente al ADN telomérico como homodímeros, mediante un dominio de unión al ADN de tipo Myb localizado en el extremo C-terminal (Broccoli et al., 1997; Bianchi et al., 1999; Court et al., 2005; Hanaoka et al., 2005).

En células tumorales humanas, la inhibición de TRF1 da lugar a la elongación de los telómeros, mientras que su sobre-expresión causa acortamiento telomérico, no viéndose afectada la actividad telomerasa. Estos experimentos llevaron a concluir que TRF1 actúa como un regulador negativo del mantenimiento telomérico en *cis*, evitando que la telomerasa alcance a los telómeros (Van Steensel y De Lange, 1997; Ancelin et al., 2002).

TRF2 cataliza la formación del *T-loop* y suprime la actividad ATM kinasa, lo que inhibe el proceso de recombinación no homóloga a nivel telomérico, y la apoptosis mediada por ATM y p53 (Van Steensel et al., 1998; Karlseder et al. 1999; Stansel et al. 2001; De Lange, 2002; Smogorzewska et al., 2002; Karlseder et al. 2004; Verdun et al., 2005). TRF2 se une a ATM en un residuo que evita la autofosforilación de ésta y, por tanto, el que se desencadene la respuesta a daño en el ADN (Karlseder et al. 1999; Bakkenist y Kastan, 2003; Karlseder et al., 2004; Bradshaw et al., 2005; Jacobs y De Lange, 2005). Por otro lado, TRF2 también es capaz de inhibir la recombinación homóloga y, de esta manera, las fusiones teloméricas (revisado por Cesare y Reddel, 2008; revisado por Longhese, 2008).

Al igual que en el caso de TRF1, la sobre-expresión de TRF2 también está relacionada con el acortamiento telomérico, tanto en presencia como en ausencia de la enzima telomerasa. Estudios llevados a cabo en ratones que sobre-expresaban esta proteína, demostraron que TRF2 interacciona con la nucleasa XPF, lo que llevaría a un aumento de su actividad, y a una degradación del ADN telomérico (Ancelin et al., 2002; Muñoz et al., 2007). Asimismo, también en ratones, se ha descrito que TRF2 es un potente factor oncogénico que, junto con la deficiencia en la enzima telomerasa y el acortamiento telomérico, acelera la carcinogénesis epitelial y genera inestabilidad cromosómica. Esta situación, así como la deficiencia en p53, son las únicas conocidas en las que la disfunción telomérica, en ausencia de telomerasa, no actúa como un mecanismo supresor de tumores, sino que, por el contrario, acelera la carcinogénesis (Blanco et al., 2007).

TRF2 está implicada en la reparación de daño en el ADN. La inducción de rotura de la doble hebra provoca la fosforilación de TRF2 por ATM, lo que conlleva su separación de los telómeros, probablemente por la pérdida de dimerización, y colocalización con el ADN dañado. Si el daño tiene lugar en los extremos cromosómicos, TRF2 fosforilada se localiza en ellos. En este caso, la unión al ADN telomérico estaría mediada por otra(s) proteína(s) que son reclutadas al lugar del daño, siendo la función de TRF2 fosforilada promover la llegada de proteínas implicadas en la reparación de daño en el ADN y favorecer y/o evitar interacciones con otras proteínas del complejo *shelterin* (Bradshaw et al., 2005; Tanaka et al., 2005a). Williams et al. (2007) encontraron resultados semejantes, si bien afirman que TRF2 no tiene un papel biológico relevante en la respuesta al daño exógeno en el ADN. Esta nueva función de TRF2 contradice el que las proteínas del complejo *shelterin* tengan una función limitada a los telómeros y sólo se localicen en ellos.

POT1 (*Protection Of Telomere protein 1*) se une a la hebra sencilla de ADN en el extremo 3' a través de un dominio OB, en su extremo N-terminal, y al ADN telomérico de cadena doble a través de su interacción con TRF1 y TRF2, colaborando con TRF2 en el mantenimiento del *T-loop* (Loayza y De Lange, 2003; Ye et al., 2004b; Yang et al., 2005). Se ha sugerido que POT1 está

implicada en la generación del extremo 5' del ADN telomérico. Asimismo, también juega un papel muy importante en la regulación de la longitud telomérica por la enzima telomerasa, pues su no unión a la hebra sencilla rica en guanina desencadena la pérdida de control de la longitud de los telómeros, de manera que la telomerasa puede acceder a ellos, lo que da lugar a telómeros muy elongados (Loayza y De Lange, 2003).

La unión de POT1 a la hebra sencilla rica en guanina evita, también, que ésta active la respuesta a daño en el ADN. Estudios en los que la proteína había sido eliminada de los extremos cromosómicos provocaron una desprotección de los telómeros, activación de los mecanismos de reparación del ADN, reducción de la longitud de la hebra sencilla y, finalmente, apoptosis o senescencia dependientes de p53 y retinoblastoma (Hockemeyer et al., 2005; Yang et al., 2005).

Rap1 se asocia a los telómeros mediante TRF2 (revisado por Hug y Lingner, 2006). Participa en el control de la longitud de los telómeros, regulándola negativamente de una manera dependiente de telomerasa. Su sobre-expresión en células humanas con actividad telomerasa produce acortamiento telomérico, si bien la proteína truncada causa el efecto contrario, quizá porque actúa como alelo dominante negativo. Asimismo, también está implicada en el reclutamiento de proteínas hacia los extremos cromosómicos (Li y De Lange, 2003; revisado por Smogorzewska y De Lange, 2004).

TPP1 se une a TRF1 y TRF2 mediante otra proteína del complejo *shelterin*: TIN2. Además, se une a POT1, reclutándola hacia la doble hebra telomérica (Houghtalin et al., 2004; Liu D et al., 2004a; Ye et al., 2004a; revisado por Hug y Lingner, 2006). La supresión de TPP1, mediante ARN de interferencia, o la pérdida de interacción entre TPP1 y POT1 da lugar a un alargamiento telomérico, así como a una pérdida de la señal de POT1 en los extremos cromosómicos (Liu D et al., 2004b; Ye et al., 2004b).

TIN2, a parte de unir a TPP1 con TRF1 y TRF2, protege a TRF1 de las modificaciones que puede sufrir por las enzimas tankinrasas, que evitarían su

unión al ADN telomérico, y contribuye a la estabilización de la unión de TRF2 al ADN telomérico. En humanos, la disminución en los niveles de TIN2 o la expresión de alelos mutantes que no se unían a TRF1 ni a TRF2, dio lugar a elongaciones teloméricas (Houghtalin et al., 2004; Kim et al., 2004; Liu D et al., 2004b; Ye et al., 2004b).

TIN2, además, se colocaliza con dominios heterocromatínicos no teloméricos, lo que indicaría su posible implicación en el ensamblaje de la heterocromatina (Kaminker et al., 2005). De nuevo, parece que las proteínas del complejo *shelterin* pueden tener funciones independientes de la homeostasis telomérica.

2.1.2 OTRAS PROTEÍNAS TELOMÉRICAS

PinX1 (*Pin2 interacting protein X1*) regula negativamente la actividad telomerasa *in vivo*, inhibiéndola y causando acortamiento telomérico (Zhou et al., 2001). Es capaz de interactuar directamente con hTERT y hTR, las subunidades catalítica y reguladora, respectivamente, de telomerasa *in vitro*, de manera que parece que su función inhibitoria de telomerasa es mediante la unión al complejo hTERT/hTR (Banik et al., 2004; revisado por Raynaud et al., 2008).

El complejo ADN-PK, implicado en la recombinación no homóloga y constituido por la subunidad catalítica ADN-PKc y las subunidades reguladoras Ku70/80, está asociado con distintas proteínas del complejo *shelterin*. Las proteínas Ku pueden, además, unirse directamente al ADN telomérico. En ratones se ha descrito que la deficiencia en *Ku86* o *ADN-PKc* aumenta las fusiones entre los extremos teloméricos, lo que sugiere que su función no se limita a la recombinación no homóloga. La delección de *Ku70* conlleva un aumento de recombinaciones teloméricas entre cromátidas hermanas (TSCE, *Telomere Sister Chromatid Exchange*), evento característico de las recombinaciones homólogas entre los telómeros, lo que indica que Ku70 protege a los extremos cromosómicos de estos procesos (Celli et al., 2006). En células humanas, la inactivación de un alelo de *Ku70/80* causa acortamiento

telomérico y la de los dos muerte celular, si bien no está claro si esto se debe al acortamiento telomérico o a la incapacidad para reparar daños en el ADN (Bailey et al., 1999; Hsu et al., 2000; Samper et al., 2000; D'Adda di Fagagna et al., 2001; Gilley et al., 2001; Goytisolo et al., 2001; Li et al., 2002; Myung et al., 2004).

El tratamiento de células humanas con inhibidores de ADN-PKc resultó, al igual que en ratones, en un aumento de la fusiones cromosómicas y se ha sugerido que esta proteína está implicada en la protección del telómero post-replicación (Bailey et al., 2004). Células de ratones doble deficientes en *ADN-PKc* y telomerasa acortaban, de manera acelerada, la longitud de los telómeros, lo que llevó a postular que existían interacciones funcionales entre ADN-PKc y la enzima telomerasa para regular la longitud telomérica (Espejel et al., 2002).

La nucleasa ERCC1/XPF, que participa en la reparación por escisión de nucleótidos, está implicada en la formación de la hebra sencilla rica en guanina, tras el daño en el ADN telomérico. Se ha sugerido que el complejo *shelterin* podría emplear esta enzima para bloquear la posible recombinación entre telómeros mediada por la recombinación no homóloga (Zhu et al., 2003; revisado por De lange, 2005). Asimismo, también se ha sugerido su posible implicación en facilitar el acceso de la maquinaria de replicación durante la fase S (revisado por Stewart y Weinberg, 2006).

Las RecQ helicasas con actividad 3' exonucleasa WRN y BLM, interaccionan con TRF2, lo que estimula su actividad. Experimentos llevados a cabo *in vitro* relacionan a estas proteínas con la formación de la estructura *T-loop* y la degradación del extremo 3' (Opresko et al., 2002; Machwe et al., 2004). Mutaciones en los genes que las codifican producen los síndromes progeroides de *Werner* y *Bloom*, respectivamente, caracterizados por un rápido acortamiento telomérico, predisposición al cáncer, envejecimiento prematuro y una elevada inestabilidad genética (Ellis et al., 1995; Yu et al., 1996; Mohaghegh y Hickson, 2001; Bohr, 2002; revisado por Oakley y Hickson, 2002).

El papel de WRN en los telómeros está más definido que el de BLM. WRN es indispensable para la replicación de los telómeros, estando implicada en la síntesis de la hebra retardada (Crabbe et al., 2004). De hecho, WRN se localiza en los telómeros sólo en la fase S, pudiendo, además, participar en la resolución de estructuras complejas que podrían interferir con la adecuada replicación del ADN telomérico (revisado por Stewart y Weinberg, 2006).

El complejo MRN está integrado por tres proteínas: Mre11, Rad50 y Nbs1 y está implicado en la recombinación no homóloga. Se encuentra unido al ADN telomérico a través de TRF2. La disminución en los niveles de este complejo da lugar a un acortamiento de la hebra sencilla rica en guanina sólo en células con actividad telomerasa. Esto se ha interpretado como que el complejo MRN está implicado en el reclutamiento de la enzima hacia los telómeros (Chai et al., 2006b). Además, defectos en MRN se han relacionado con acortamiento y disfunción telomérica (revisado por Ayouaz et al., 2008). Mre11 y Rad50 se encuentran presentes en los telómeros a lo largo de todo el ciclo celular, mientras que Nbs1 es reclutada por TRF2 hacia los extremos cromosómicos en fase S, lo que sugiere que puede estar implicada en la replicación telomérica (Zhu XD et al., 2000; revisado por Bailey y Murnane, 2006).

El síndrome NBS (*Nijmegen Breakage Syndrome*) se debe a una mutación en el gen *Nbs1* (Carney et al., 1998) y se caracteriza, entre otros síntomas, por un acortamiento telomérico acelerado, lo que se traduce en un fenotipo de envejecimiento prematuro (Digweed et al., 2004).

Las enzimas tankirasas 1 y 2 (*TRF1-interacting, ankyrin-related ADP-ribose polymerase*) son poli ADP-ribosa polimerasas que modifican a TRF1 por adición de polímeros de ADP-ribosa, lo que inhibe su capacidad de unión al ADN telomérico *in vitro* e *in vivo* y promueve su degradación. De esta manera, se favorece el acceso de la enzima telomerasa a los telómeros. En el caso de tankirasa 1, la elongación telomérica dependiente de ella no se ha detectado en ausencia de actividad telomerasa (Smith et al., 1998; Smith y De Lange, 2000; Kaminker et al., 2001; Seimiya y Smith, 2002; Cook et al., 2002; Chang

et al., 2003; Smogorzewska y De Lange, 2004; Seimiya et al., 2005). Además, tankirasa 1 está implicada en la resolución de los complejos de cohesión formados entre telómeros hermanos, pues su inhibición, mediante ARN de interferencia, bloqueó la replicación celular, no produciéndose segregación cromosómica durante la anafase (Dynek y Smith, 2004). Resultados semejantes fueron descritos por otro grupo, si bien la inhibición de tankirasa 1 causó parada en la metafase como consecuencia de la cohesión entre cromátidas hermanas, más que entre telómeros hermanos (Chang et al., 2005).

La proteína ATM está implicada en la señalización de daño en el ADN y en su reparación mediante la recombinación no homóloga, así como en la activación de p53, en respuesta al daño genómico. Como se ha descrito anteriormente, parece estar implicada en la formación del *T-loop*, tras su inhibición por TRF2. ATM se requiere, inicialmente, activa en los telómeros durante la fase G2, de manera que recluta a Mre11 y Nbs1 hacia los extremos cromosómicos. Esto ha llevado a sugerir que es necesario el reconocimiento de los telómeros como doble hebra dañada, y la activación de los mecanismos de reparación pertinentes, para el adecuado procesamiento y plegamiento de los telómeros (Verdun et al., 2005; revisado por Stewart y Weinberg, 2006).

Recientemente ha sido descrito que la fosforilación de TRF1 por ATM, mediada por el complejo MRN, provoca la disociación de TRF1 del ADN telomérico y facilita la elongación telomérica por parte de la enzima telomerasa (revisado por Longhese, 2008).

La proteína ATR también se encuentra unida a los telómeros, pero su ausencia no provoca disfunción telomérica (Herbig et al., 2004). Algunos estudios sugieren que se requiere en los extremos cromosómicos antes de que finalice su replicación, para atraer a componentes de la vía de reparación por recombinación homóloga y que tenga lugar la formación del *T-loop* (Verdun y Karlseder, 2006).

Recientemente se ha descrito que moléculas implicadas en la estructura cromatinica, como HP1 y SUV39/H1/H2, también están implicadas en la regulación de la longitud telomérica (revisado por Blasco, 2007).

2.2 EL ACORTAMIENTO PROGRESIVO DE LOS TELÓMEROS

Las secuencias teloméricas se acortan progresivamente en las células en cada ciclo de división, debido a lo que se conoce como el “problema de la replicación terminal”: la ADN polimerasa sólo puede replicar el ADN en dirección 5' → 3'. Además, no puede iniciar la síntesis de una cadena de ADN *de novo*, ya que necesita un cebador de ARN de unos 8-12 nucleótidos que proporcione el extremo 5' de la nueva hebra. Durante la síntesis discontinua de la cadena retardada, el cebador más distal no puede ser reemplazado, con lo que el extremo 5' de la hebra retardada se acorta progresivamente en cada ciclo celular (Watson, 1972; Olovnikov, 1973). Debido a este problema en la replicación de los extremos cromosómicos, y a su procesamiento por ciertas exonucleasas, los telómeros sufren una pérdida neta de 50-200 pb en cada ronda de división celular (Harley et al., 1990; Sedivy, 1997) (Figura 7).

Se ha descrito que, mientras que el extremo 3' puede terminar en cualquier residuo de la secuencia TTAGGG, el extremo 5' termina en la secuencia AATCCCAATC en casi todos los cromosomas humanos, indicando que el proceso nucleolítico está altamente regulado (Sfeir et al., 2005). Cuando POT1 está inhibida, se pierde esta homogeneidad, lo que ha llevado a sugerir que esta proteína está, de alguna manera, implicada en el proceso nucleolítico de generación del extremo 5' (Hockemeyer et al., 2005). Tras la acción de 5' exonucleasas sobre el extremo 3', POT1 se une a éste evitando que exista un procesamiento posterior del extremo 5' (revisado por De Lange, 2005) (Figura 8).

Replicación semiconservativa de ADN

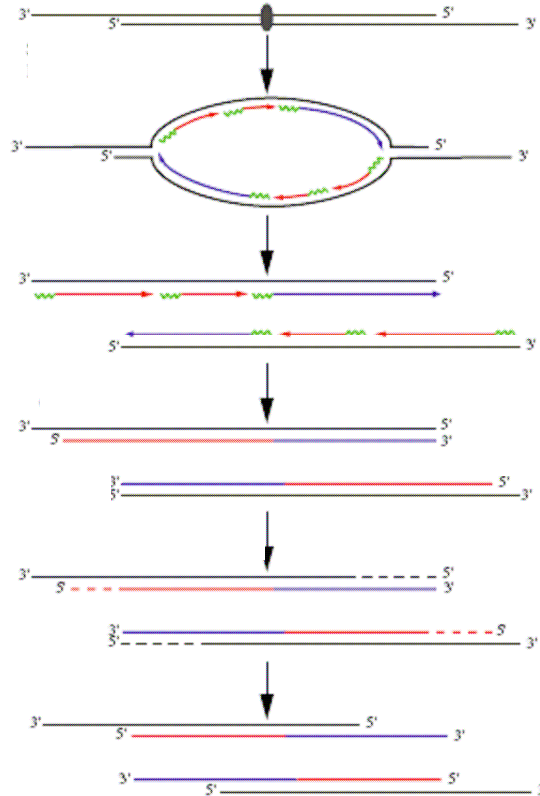


Figura 7. Esquema representativo de la replicación de los extremos cromosómicos y del “problema de la replicación terminal” (adaptado de Hug y Lingner, 2006).

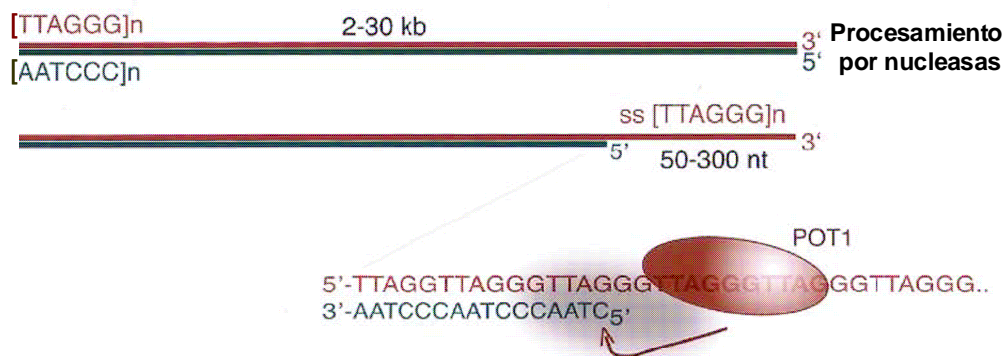


Figura 8. Generación del extremo 5' e implicación de POT1 en su procesamiento (adaptado de De Lange, 2005).

El acortamiento progresivo de los telómeros se ha propuesto como reloj mitótico, regulándose así el número de veces que las células pueden dividirse antes de entrar en senescencia o apoptosis, según el tipo celular. Este límite, conocido como límite de Hayflick, llevó a la hipótesis de que el acortamiento de los telómeros juega un papel muy importante en el envejecimiento y en la supresión tumoral (Hayflick, 1976). Realmente, no es el acortamiento telomérico *per se* el que limita la vida de la célula, sino la pérdida de la estructura nucleoproteica de los telómeros (Shay y Wright, 2005).

Los telómeros no sólo se acortan como consecuencia de la replicación, sino que el estrés oxidativo, la obesidad, el humo del tabaco, la radiación ultravioleta, la alquilación y los oncogenes también intervienen en el acortamiento telomérico (revisado por Von Zglinicki, 2002; revisado por Ayoub et al., 2008). Han sido también propuestas, como causas de acortamiento telomérico, el fallo en el procesamiento del *T-loop* o su delección por recombinación homóloga (Crabbe et al., 2004; Ding et al., 2004; Wang et al., 2004). Estudios llevados a cabo en personas infectadas con el virus VIH demostraron que sus linfocitos T CD8+ tenían los telómeros más cortos y menor actividad telomerasa que individuos sanos de la misma edad (Dagarag et al., 2004; Franzese et al., 2007). Actualmente, factores psicológicos como el estrés están siendo estudiados como posibles causas de acortamiento telomérico acelerado (Epel et al., 2004; revisado por Gilley et al., 2008).

La entrada en senescencia de una célula está mediada por p53 y retinoblastoma, siendo necesario que ambos mecanismos fallen simultáneamente para que la célula sea capaz de evadirla (Shay et al., 1991). En este caso, el acortamiento telomérico contribuiría a la inestabilidad genómica, característica de los tumores humanos (Shay y Wright, 2002). Diversos estudios apoyan el hecho de que la senescencia, además de la apoptosis, bloquea la formación de tumores (revisado por Stewart y Weinberg, 2006; revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008; revisado por Deng et al., 2008).

Si las células consiguen superar la senescencia, continúan dividiéndose hasta que los telómeros alcanzan una longitud crítica, no pudiendo proteger a los extremos cromosómicos de la maquinaria que los detectará como rotura de doble hebra. Cuando esto ocurre, las células entran en una nueva fase, llamada crisis, que se caracteriza por la existencia de telómeros extremadamente cortos, fusiones cromosómicas, problemas de segregación cromosómica durante la anafase y, finalmente, muerte celular por apoptosis (Wright y Shay, 1992; Shay y Wright, 2005).

Ocasionalmente, un clon de células ($1/10^7$) puede superar la fase de crisis, alcanzando la inmortalidad. En estos casos, la longitud de los telómeros se mantiene, bien por la enzima telomerasa, o mediante un mecanismo alternativo que se definirá más adelante (Wright y Shay, 1992) (Figura 9).

Por tanto, la inmortalidad debe ser entendida como la evasión de la senescencia y la pérdida de control del ciclo y los programas de proliferación celular, siendo el mantenimiento telomérico esencial para que ésta tenga lugar (Saretzki, 2003; Pickett et al., 2004).

Estas observaciones indican que la función telomérica tiene papeles duales: induce la senescencia replicativa y promueve la tumorigénesis. Esta función dual puede variar entre los distintos tipos celulares dependiendo de la expresión de la enzima telomerasa, el nivel de mutaciones inducidas y la eficiencia/deficiencia de las rutas relacionadas con la reparación del ADN (Hande, 2004).

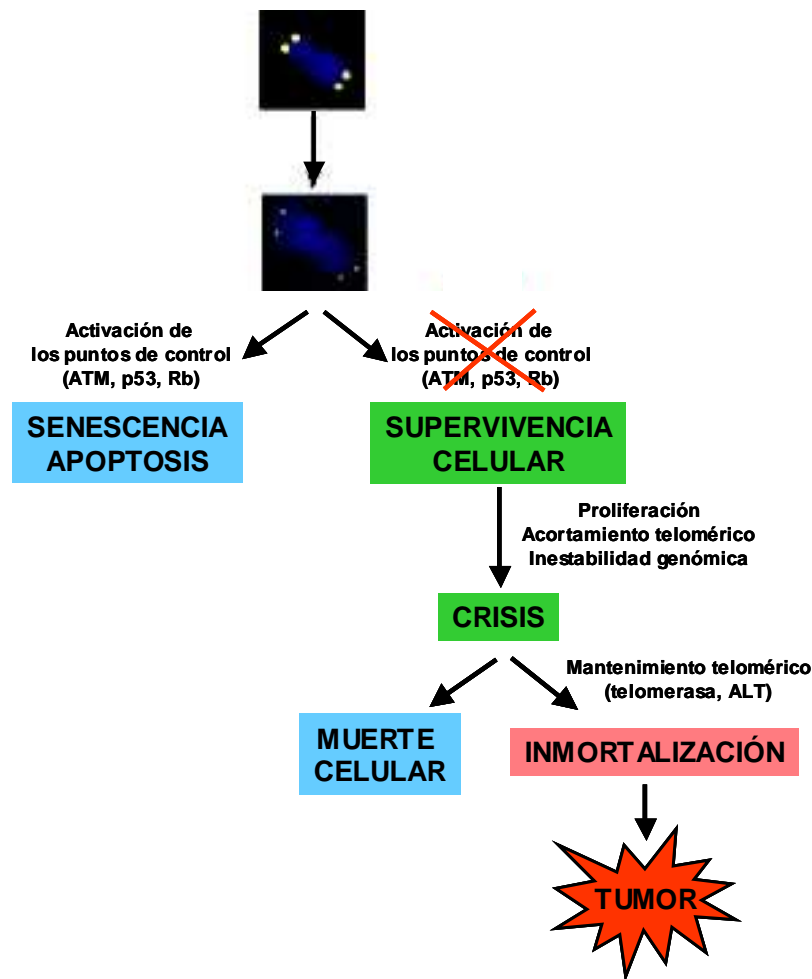


Figura 9. Esquema de las posibles vías que seguirá una célula tras alcanzar sus telómeros la longitud crítica (adaptado de Carrén y Surreales, 2004).

2.3 OTRAS FUNCIONES DE LOS TELÓMEROS

Además de proteger los extremos de los cromosomas lineales de ser reconocidos como ADN dañado, evitando degradaciones y recombinaciones, los telómeros desempeñan otras funciones. Participan en la organización de la arquitectura nuclear y desempeñan un papel importante en la segregación cromosómica durante la mitosis y meiosis, propiciando el alineamiento correcto de los cromosomas. Se ha observado que mutantes de ADN telomérico de *Tetrahymena* tienen graves defectos en la separación de las cromátidas hermanas en anafase, lo que se traduce en un bloqueo de la división nuclear y celular (Kirk et al., 1997). También participan en el apareamiento de

cromosomas homólogos en la profase meiótica y presentan puntos de anclaje con la matriz nuclear (Luderus et al., 1996).

Como se ha mencionado anteriormente, los telómeros de mamíferos son capaces de silenciar genes localizados en las zonas adyacentes (TPE), estando este fenómeno determinado por la longitud de los telómeros y la hipoacetilación de histonas. De hecho, TPE aumenta con la elongación telomérica, mientras que la hiperacetilación de histonas, en concreto H3 y H4, se relaciona con la pérdida de silenciamiento transcripcional (Hecht et al., 1995; Baur et al., 2001; Koering et al., 2002). Este efecto se cree que es debido al estado más compacto de la heterocromatina telomérica, capaz de afectar a las zonas adyacentes a ella (revisado por Blasco, 2005). El silenciamiento de genes es un proceso reversible en el que está implicado, probablemente, el complejo *shelterin*, así como en el estatus epigenético, debido a su capacidad para regular la longitud de los telómeros. Si bien los efectos biológicos de TPE se desconocen, es posible que este fenómeno permita programar ciertos cambios a medida que las células se dividen y acortan sus telómeros, conduciendo a unos patrones de expresión génica que podrían afectar a la función de células y tejidos (Shay y Wright, 2005).

3. TELOMERASA

3.1 ESTRUCTURA Y REGULACIÓN DE LA TELOMERASA

La enzima telomerasa es una transcriptasa reversa que utiliza su componente ARN como molde para elongar las extensiones 3' de cadena sencilla de los extremos cromosómicos, mediante la síntesis *de novo* de ADN telomérico. La telomerasa humana está formada por un complejo mínimo compuesto por un componente ARN o hTR (*human Telomerase RNA*), que contiene la secuencia molde para la síntesis de nuevas repeticiones teloméricas, y una subunidad catalítica con actividad transcriptasa inversa o hTERT (*human Telomerase Reverse Transcriptase*) (revisado por Stewart y Weinberg, 2006). La región molde para la transcripción inversa, complementaria al ADN telomérico humano, está próxima al extremo 5' y comprende 11 nucleótidos de secuencia 5'-CUAACCCUAAC-3'. Mutaciones en esta región alteran la secuencia de las repeticiones teloméricas añadidas por la enzima (Feng et al., 1995). Existe un tercer componente, DKC1 (*Dyskerin 1*), implicado en la estabilidad y plegamiento de hTR, y en su localización nucleolar (Mitchell et al., 1999; Narayanan et al., 1999; Lukowiak et al., 2001).

Mutaciones en el gen *hTR* o *DKC1* producen el síndrome denominado *dyskeratosis congenita*, causado por la pérdida de estabilidad de la enzima y el acortamiento de los telómeros (Mitchell et al., 1999; Vulliamy et al., 2001; Vulliamy et al., 2004; revisado por Blasco, 2005). Existen, al menos, dos enfermedades más que se relacionan con el acortamiento telomérico dependiente de mutaciones en genes que codifican para proteínas que forman parte de la enzima telomerasa: anemia aplásica y fibrosis pulmonar idiopática (Yamaguchi et al., 2005; Armanios et al., 2007; Drummond et al., 2007; Tsakiri et al., 2007).

Se han descrito otras proteínas asociadas a telomerasa: Tep1, p23, Hsp90, NOLA 1/2/3 (*Nucleolar protein family A*) y hnRNP A1/C/D (*Ribonucleoproteínas nucleares heterogéneas*), si bien estudios bioquímicos y

genéticos han demostrado que no son indispensables para la actividad de la enzima (Weinrich et al., 1997; Harrington et al., 1997; Holt et al., 1999; Liu et al., 2000a; revisado por Raynaud et al., 2008) (Figura 10).

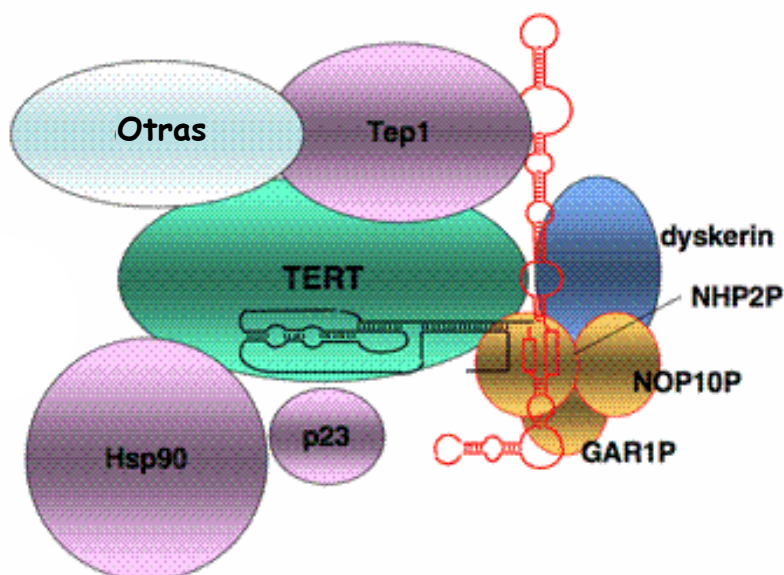


Figura 10. Representación esquemática de la enzima telomerasa humana. En verde, la subunidad catalítica, hTERT; en rojo, la subunidad reguladora hTR; en azul, DKC1; en morado, las proteínas Tep1, p23 y Hsp90; en amarillo, otras proteínas de unión a hTR (adaptado de Mason et al., 2005).

Inicialmente se pensó que la enzima telomerasa tenía una localización exclusivamente nuclear. Sin embargo, estudios de diversos grupos han demostrado que la actividad telomerasa está fuertemente regulada y que esta regulación incluye translocaciones a otros compartimentos celulares. La mayor parte del tiempo se encuentra en el nucleolo, colocándose con los telómeros sólo en el momento de la replicación. También puede situarse en el citoplasma y en la mitocondria. Es más, se ha descrito en el extremo N-terminal de hTERT una secuencia específica para ser exportada del núcleo a la mitocondria (Maser y DePinho, 2002a; Santos et al., 2004; revisado por Passos et al., 2007; revisado por Bollman, 2008).

Asimismo, también se pensaba que hTERT se expresaba sólo en las células tumorales, células con alta tasa proliferativa y células germinales. Sin embargo, se han detectado niveles de la subunidad catalítica de telomerasa en una gran variedad de células epiteliales e, incluso, en fibroblastos, concluyéndose que hTERT se expresa específicamente durante la fase S del ciclo celular, si bien los niveles de expresión son muy bajos, lo que explica el hecho de que no se detecte actividad telomerasa mediante los ensayos convencionales. Debido a esta baja tasa de expresión, la telomerasa no es capaz de elongar los telómeros en las células somáticas normales (Nagao et al., 2005; revisado por Bollman, 2008).

Se han realizado diversos estudios encaminados a determinar cuáles son los mecanismos reguladores de la actividad telomerasa y de la expresión hTERT. Un estudio realizado en tumores primarios y líneas celulares humanas derivadas de tumores, detectó amplificaciones de *hTERT* en ambos casos (Zhang et al., 2000). Se postuló que la desmetilación del promotor podría regular positivamente la transcripción de *hTERT*. La comparación del estatus de metilación del promotor de dicho gen entre líneas celulares con y sin actividad telomerasa, demostró que este mecanismo epigenético no controlaba la expresión de la subunidad catalítica de telomerasa, si bien sí debe considerarse la acetilación y metilación de histonas de los promotores de *hTERT* y *hTR* (Devereux et al., 1999; Dessain et al., 2000; revisado por Horikawa y Barrett, 2003; revisado por Liu L et al., 2004; revisado por Blasco, 2007). Otro hecho a tener en cuenta es la proximidad de *hTERT* al telómero del brazo corto del cromosoma 5, lo que implica que su expresión podría estar regulada por la estructura heterocromatínica de los telómeros, el fenómeno TPE descrito anteriormente (Baur et al., 2001; revisado por Horikawa y Barrett, 2003).

Varias moléculas parecen estar implicadas en la regulación de *hTERT*, mediando tanto su activación como su represión. Algunas de estas moléculas son: E2F1, c-myc, Mad1, p53, moléculas de unión a la caja MT, HDAC, p16, p21, Notch1, SP1, Menin, RAK, BRIT1, hSIR2 y WT1 (revisado por Ducrest et

al., 2002; revisado por Horikawa y Barrett, 2003; Lin y Elledge, 2003; revisado por Liu L et al., 2004; Hashimoto et al., 2008).

Ha sido descrita la existencia de 4 *splicings* alternativos en *hTERT* que regulan la actividad telomerasa. La proteína completa (*full length*) se une a hTR y es catalíticamente activa. El resto de los transcritos carecen del dominio RT, lo que implica que la proteína resultante no va a tener actividad retrotranscriptasa. Se ha propuesto este mecanismo como regulador de la actividad telomerasa, tanto durante el desarrollo como durante el proceso oncogénico (Ulaner et al., 1998; Holt et al., 1999; Colgin et al., 2000; Ulaner et al., 2000; Villa et al., 2001).

3.2 FUNCIÓN DE LA TELOMERASA CON RELACIÓN A LOS TELÓMEROS

Tal y como se ha descrito en el apartado “2.2 El acortamiento progresivo de los telómeros”, la longitud de las secuencias teloméricas actúa como mecanismo regulador de la vida de las células, de manera que cuando alcanzan una longitud crítica, la célula entra en senescencia replicativa. Estudios llevados a cabo en fibroblastos, células endoteliales y células epiteliales en fase de pre-crisis en las que se introdujo *hTERT*, demostraron que la enzima telomerasa no sólo elongaba los telómeros, sino que confería a estas células inmortalidad, si bien, por sí misma, no causaba transformación celular (revisado por Stewart y Weinberg, 2006; Chapman et al., 2008). La telomerasa evita que los telómeros alcancen longitudes críticas, protegiéndoles y manteniendo la viabilidad celular (revisado por Blasco, 2005). Diversos grupos han constatado que las células tumorales que sobre-expresan telomerasa tienen telómeros más cortos que las células no tumorales, es decir, la enzima telomerasa mantiene la longitud de las secuencias teloméricas, no alarga los telómeros. Es más, estudios llevados a cabo en la levadura *S. cerevisiae* han demostrado que el número de repeticiones teloméricas añadidas a los extremos cromosómicos por telomerasa es independiente de la longitud de los telómeros, salvo que estén completamente erosionados (Teixeira et al., 2004).

A diferencia de otras transcriptasas reversas, la telomerasa no es capaz de copiar largos fragmentos de ARN, sino que sólo emplea como molde la pequeña región de su componente ARN con lo que la enzima se transloca repetidamente hacia el extremo terminal del telómero para verificar la síntesis de las repeticiones teloméricas (Lingner et al., 1997). Tras la actuación de la telomerasa, la síntesis de la cadena complementaria, rica en citosina, puede llevarse a cabo por las ADN polimerasas (Figura 11).

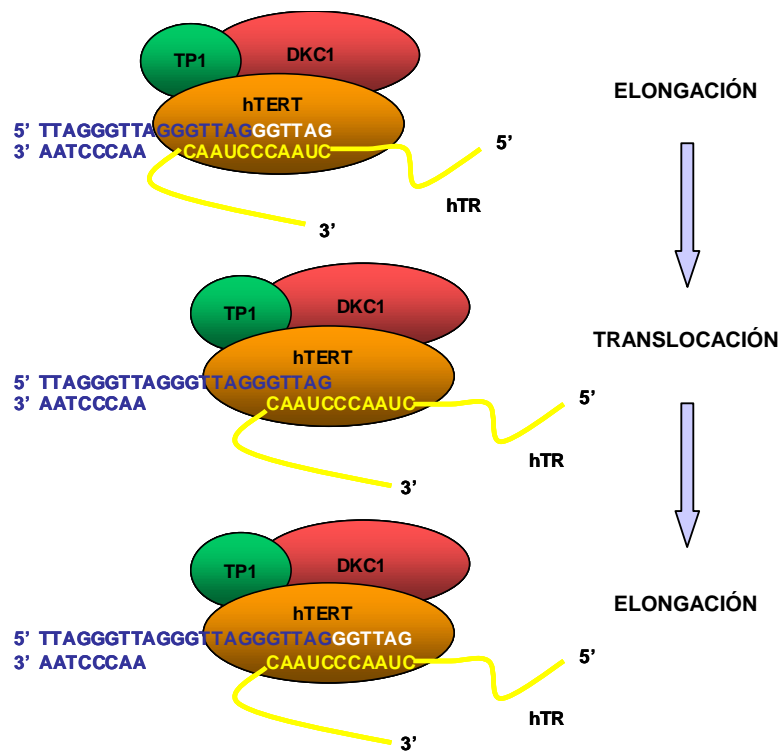


Figura 11. Representación de la elongación telomérica por la enzima telomerasa.

Las proteínas del complejo *shelterin* regulan la elongación de los telómeros por la enzima telomerasa. Cuanto mayor es la longitud telomérica, mayor número de proteínas están unidas a ellos y menor es la probabilidad de que la enzima acceda a los telómeros. A mayor longitud telomérica, mayor cantidad de POT1 en la hebra sencilla rica en guanina, lo que ayuda a bloquear el acceso de telomerasa a los extremos cromosómicos (revisado por De Lange, 2005) (Figura 12).

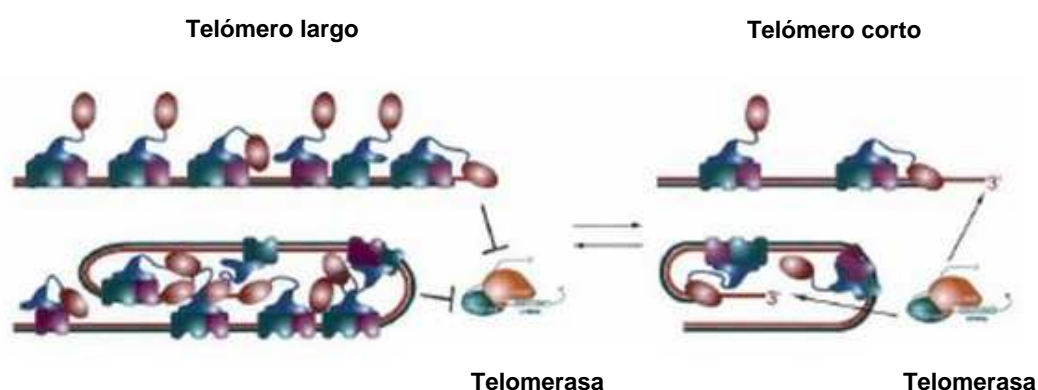


Figura 12. Modelo que representa la regulación de la longitud telomérica por el complejo shelterin (revisado por De Lange, 2005).

Además, como ya se ha mencionado, la elongación de los telómeros por parte de la enzima telomerasa es dependiente de la concentración de ésta, tendiendo a añadir secuencias teloméricas a los telómeros más cortos, pues permanecen durante más tiempo en un estado extendido, lo que facilita el acceso de la enzima al extremo cromosómico durante la fase S (Cristofari y Lingner, 2006; revisado por Hug y Lingner, 2006). También, el estatus epigenético de los telómeros y regiones subtelo méricas podría explicar el hecho de que la telomerasa elongue, principalmente, los telómeros más cortos, ya que la enzima podría reconocer marcadores cromatínicos específicos, así como tener un acceso más fácil a las secuencias teloméricas por encontrarse la cromatina en un estatus más laxo (Wang et al., 2004; revisado por Blasco, 2005 y 2007; Blanco et al., 2007).

Mediante estudios de hibridación *in situ* en células tumorales, se ha detectado hTR en los cuerpos de Cajal, estructuras dinámicas nucleares implicadas en la biogénesis de pequeñas RNPs, a lo largo de la mayor parte del ciclo celular. hTERT se encuentra, por el contrario, en *foci* de composición desconocida en el nucleoplasma (Tomlinson et al., 2006). Al inicio de la fase S, los cuerpos de Cajal que contienen hTR, se localizan en la periferia del núcleo, mientras que hTERT lo hace en el nucleolo. Durante la fase S, ambas subunidades de la telomerasa se aproximan, formando *foci* adyacentes a los cuerpos de Cajal. Estas tres estructuras se han encontrado asociadas a los telómeros durante la

fase S, durando esta asociación 30 minutos, pues si bien no se requiere que hTR colocalice con los cuerpos de Cajal para su ensamblaje con hTERT, sí es necesario para que la telomerasa actúe sobre los telómeros (Jady et al., 2006; Cristofari et al., 2007). Los experimentos sugieren que la enzima telomerasa se ensambla de manera dependiente del ciclo celular, siendo también dependiente del ciclo su unión a los telómeros (revisado por Hug y Lingner, 2006) (Figura 13).

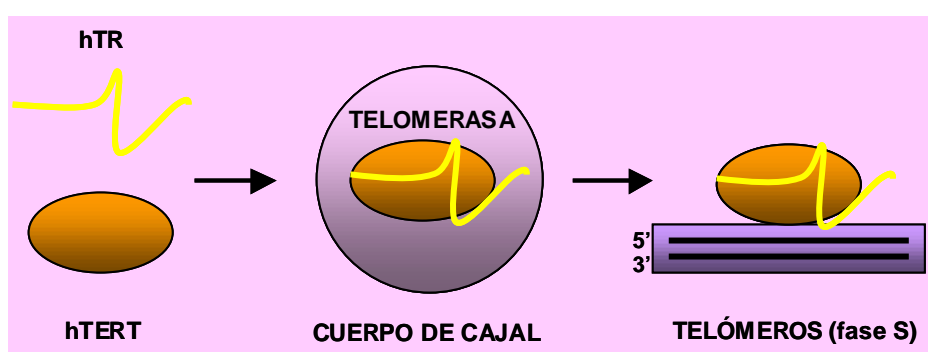


Figura 13. Modelo esquemático de la localización de la enzima telomerasa en los cuerpos de Cajal y en los telómeros (adaptado de Tomlinson et al., 2008).

Estudios llevados a cabo en células sanas revelaron que hTR no se acumulaba en los cuerpos de Cajal, ni en los telómeros, sino que se encontraba repartida de manera difusa en el nucleoplasma (Zhu et al., 2004). Se requiere la presencia de hTERT para que hTR colocalice con los cuerpos de Cajal y con los telómeros durante la fase S (Tomlinson et al., 2008).

3.3 OTRAS FUNCIONES DE LA TELOMERASA

La enzima telomerasa tiene otras funciones en la célula, aparte de la consabida sobre las secuencias teloméricas. Éstas pueden ser dependientes o independientes de la actividad catalítica (Tabla 3).

FUNCIÓN	DEPENDENCIA DE LA ACTIVIDAD CATALÍTICA
Elongación telomérica	Dependiente
Mejora de la capacidad de reparación del ADN	Dependiente
Promoción del crecimiento celular	Dependiente
Modulación de la función mitocondrial bajo condiciones de estrés oxidativo	Dependiente
Inhibición de la apoptosis	Independiente
Promoción de la proliferación de células madre	Independiente
Supresión de los puntos de control de daño en el ADN	Función extra-telomérica de hTR

Tabla 3. Funciones de la enzima telomerasa y su posible dependencia de la actividad catalítica de la enzima (revisado por Bollman, 2008).

La implicación de la enzima telomerasa en la reparación del ADN está mediada por hTERT. Fibroblastos en los que se suprimió la actividad enzimática mostraron alteraciones en la reparación del ADN. Asimismo, mutaciones en *hTERT* que evitaban la elongación de los telómeros por parte de la telomerasa, pero no la actividad catalítica, mantenían la capacidad de reparación, mientras que la expresión de una forma mutante de *hTERT* catalíticamente inactiva, también daba lugar a alteraciones en la reparación del ADN en los fibroblastos transfectados. La regulación de la maquinaria implicada en la reparación del ADN por la enzima telomerasa es debida a los efectos de hTERT sobre la cromatina, pues es capaz de alterar su configuración, de manera que adquiera un estado que inhiba la activación de los mecanismos de reparación (Masutomi et al., 2005).

hTERT induce la expresión de proteínas relacionadas con el crecimiento celular, como EGFR (*Epidermal Growth Factor Receptor*), e interfiere con la vía de señalización de TGF- β , pues afecta a la expresión de genes de esta vía, en fibroblastos de ratones (Smith et al., 2003; Geserick et al., 2006). Recientemente, estudios llevados a cabo en fibroblastos de ratón, con y sin actividad telomerasa, han demostrado que la falta de actividad telomerasa se relaciona con una disminución en los niveles de catalasa, tanto de ARN mensajero, como de proteína y actividad enzimática, lo que a su vez conlleva un aumento de expresión de TGF- β , probablemente como consecuencia de la mayor cantidad de peróxido de hidrógeno en los fibroblastos carentes de actividad telomerasa (Pérez-Rivero et al., 2008). El análisis de la expresión génica de 3 líneas celulares tumorales (HCT116, LOX y HeLa) en las que se silenció a *hTR* e inhibió la actividad telomerasa, reveló una disminución en la proliferación, independiente de la longitud telomérica. Asimismo, se detectaron disminuciones en los niveles de expresión génica de moléculas implicadas en el crecimiento tumoral, angiogénesis, metástasis y progresión del ciclo celular. Los autores de este trabajo consideran que la influencia de telomerasa en la expresión génica es independiente de su actividad catalítica (Li et al., 2005).

La implicación de la enzima telomerasa en la función mitocondrial no está claramente establecida. La telomerasa es expulsada del núcleo bajo condiciones de estrés oxidativo (Haendeler et al., 2003). Santos et al. (2006) observaron un aumento del daño oxidativo en el ADN mitocondrial mediado por telomerasa. Afirmaron que este hecho podría ayudar a las células madre a morir por apoptosis cuando tienen un elevado estrés oxidativo, asegurándose, de esta manera, la calidad de las células madre. Por otro lado, estudios llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Von Zglinicki (2008) mostraron resultados contrarios: fibroblastos que expresaban telomerasa tenían menor daño en el ADN mitocondrial, menor producción de superóxidos, aumento del potencial de membrana mitocondrial y menores niveles de peróxidos en respuesta al estrés oxidativo, tanto agudo como crónico. Según estos resultados, la enzima telomerasa estaría protegiendo a la mitocondria. Además, observaron que, en estas condiciones, el 80-90% de la enzima se translocaba a la mitocondria, no siendo capaz la cantidad de enzima residual

del núcleo de elongar los telómeros. La restauración de las condiciones normales de cultivo devolvía a la enzima telomerasa al núcleo y ésta era capaz de actuar sobre las secuencias teloméricas.

La implicación de telomerasa en la protección frente al estrés oxidativo ha sido estudiada recientemente en fibroblastos embrionarios y en células renales de ratón. Los ratones *Terc*^{-/-} (componente ARN de la enzima telomerasa) mostraron un mayor estrés oxidativo que los controles, en los que sí había actividad telomerasa. Este aumento estaba causado por una disminución en los niveles de catalasa, como se ha descrito anteriormente (Pérez-Rivero et al., 2008).

El hecho de que la telomerasa protegiera a las células neuronales del péptido β amiloide en la enfermedad de Alzheimer, modulando el umbral de apoptosis, llevó a postular que esta enzima estaba también implicada en la inhibición de la apoptosis (Zhu H et al., 2000; Folini et al., 2007). Esto podría, además, explicar el hecho de por qué la telomerasa confiere ventajas proliferativas, fundamentalmente en condiciones de estrés, cuando la célula debería morir por apoptosis. Esta función de hTERT, que supone una ventaja para las células madre, tiene consecuencias nefastas en las células tumorales (revisado por Bollamn, 2008).

La inhibición de la apoptosis por hTERT es mediante el bloqueo de las dos rutas apoptóticas descritas: la mitocondrial y la mediada por receptores. El efecto anti-apoptótico ha sido detectado en células transfectadas con formas de hTERT inactivas, por tanto, es independiente de la actividad telomerasa y del acortamiento telomérico. De hecho, células de cáncer de mama que mostraban bajos niveles de hTERT reflejaban una mayor sensibilidad al estrés inducido por tratamiento con G418 durante 24-72 horas. Por el contrario, la sobre-expresión de hTERT en dichas células causó un aumento de la supervivencia, tras el tratamiento antibiótico (Saretzki et al. 2001; Dudognon et al., 2002; Cao et al., 2002; Rahman et al., 2005; Xi et al., 2006; Del Bufalo et al., 2007). PARP1 coimmunoprecipita con hTERT y, debido al papel de hTERT en la inhibición de la apoptosis y mejora de la reparación del ADN, se

sugirió que, en respuesta al daño en el ADN, PARP1 poli ADP-ribosila la señal de exportación nuclear de hTERT, evitando que ésta salga del núcleo y promoviendo su participación en el mantenimiento de la integridad genómica (Cao et al., 2002).

La actividad telomerasa es crucial para la función y el potencial replicativo de las células madre, pues su deficiencia en ratones con telómeros muy cortos da lugar a alteraciones en la regeneración tisular y supervivencia. La reconstitución de la enzima confirió a los ratones objeto de estudio una vida media y fenotipo de envejecimiento semejantes al control, no aumentando la tumorigénesis (Siegl-Cachedenier et al., 2007). Sin embargo, no está claro si la enzima es capaz de elongar los telómeros en las células madre. De hecho, la sobre-expresión de hTERT en células madre hematopoyéticas no evita el acortamiento telomérico (Zimmermann et al., 2004; Wang JC et al., 2005).

En células progenitoras de la epidermis de ratón, hTERT activa la transcripción de genes implicados en el desarrollo y morfogénesis, transducción de señales y señalización célula-célula o citoesqueleto-membrana, de manera independiente de la actividad telomerasa. De esta forma, hTERT coordina la expresión de los genes implicados en el crecimiento del pelo del ratón. El estudio de estos genes reveló que el control de hTERT es muy semejante al realizado por myc y Wnt, moléculas implicadas en el desarrollo y la regulación de las células madre, así como en el cáncer (Choi et al., 2008). Ratones *TERT*^{-/-} no muestran anormalidades epidérmicas en la primera generación, lo que significa que las vías myc y Wnt pueden estar minimizando la pérdida de TERT (Yuan et al., 1999; Liu et al., 2000b; Rajaraman et al., 2007; Choi et al., 2008).

hTR también tiene una función extra-telomérica: modula la respuesta a daño en el ADN a través de ATR, pues inhibe su actividad *in vitro* e *in vivo*, y aumenta la viabilidad celular tras la irradiación con UV, alterando el funcionamiento de los puntos de control de daño de la célula (Kedde et al., 2006).

Como conclusión, podríamos decir que la enzima telomerasa inhibe la apoptosis y aumenta la viabilidad y crecimiento celular.

4. MECANISMO ALTERNATIVO DE ELONGACIÓN TELOMÉRICA

Algunas células tumorales, alrededor de un 7-10%, son capaces de mantener o elongar sus telómeros mediante un mecanismo independiente de la telomerasa, conocido como ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*). En levaduras y mamíferos se ha determinado que la recombinación homóloga es la responsable de este fenómeno. La recombinación entre los telómeros puede producirse entre cromátidas hermanas, cromátidas de cromosomas diferentes, o bien, con el ADN telomérico extra-cromosómico. La enzima telomerasa es capaz de inhibir la recombinación telomérica entre cromátidas hermanas, lo que ha llevado a postular que ésta podría ser una de las causas por las que las células telomerasa positivas carecen de este mecanismo. Sin embargo, mediante la técnica CO-FISH, no ha sido posible determinar cómo se produce, realmente, la recombinación (Bechter et al., 2004; revisado por Blasco, 2005; revisado por Muntoni y Reddel, 2005).

Es característico de las células que desarrollan este mecanismo la presencia de APBs (*ALT-associated PML Bodies*), estructuras subnucleares en las que la proteína PML (*Promyelocytic Leukemia*) colocaliza con Sp100, ADN extra-cromosómico (lineal o circular), proteínas de unión a telómeros y proteínas implicadas en la síntesis y recombinación del ADN: TRF1, TRF2, RAD50, RAD51, RAD52, BLM, WRM, RPA y el complejo MRN. Su aparición tiene lugar tras la activación de ALT y desaparecen cuando éste es reprimido en células somáticas híbridas (Yeager et al., 1999; Perrem et al., 1999; Wu et al., 2000; Henson et al., 2002; revisado por Nittis et al., 2008). Se ha determinado que las proteínas PML, TRF1, TRF2, TIN2, Rap1, Mre11, Nbs1, RAD50 y las proteínas del complejo SMC5/6, son imprescindibles para la formación de APBs y, por tanto, son requeridas para ALT. Sin embargo, Reddel et al., manifestaron que APBs no parecía ser esencial para el desarrollo de ALT, si bien la inhibición de este mecanismo disminuía el número de células positivas para APBs (Wu et al., 2000; Fasching et al., 2005; Jiang et al., 2005 y 2007; Potts y Yu, 2007). También se ha sugerido que APBs actúan como

reservorios de proteínas y de ADN telomérico y que participan en la recombinación entre extremos cromosómicos (Yeager et al., 1999).

Otra característica del mecanismo ALT es la presencia de telómeros de longitudes muy heterogéneas, bien extremadamente cortos o extremadamente largos. Se ha propuesto que la desigualdad en la recombinación entre cromátidas hermanas puede ser la responsable de este suceso: si el proceso no es simétrico, la recombinación dará lugar a ganancias de secuencias teloméricas de una cromátida, con la consiguiente pérdida de la otra (Figura 14). De este modo, la célula hija que resulte tener los telómeros más cortos, entrará en senescencia rápidamente, mientras que aquella con mayor número de secuencias teloméricas tendrá un potencial replicativo mayor que la célula progenitora. Para que este mecanismo sea efectivo, se ha sugerido que la segregación cromosómica durante la mitosis sea desigual, es decir, que la misma célula hija reciba los cromosomas con los telómeros más largos. Si este mecanismo se repite cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica, la población de células alcanzará la inmortalidad (revisado por Muntoni y Reddel, 2005; revisado por Nittis et al., 2008).

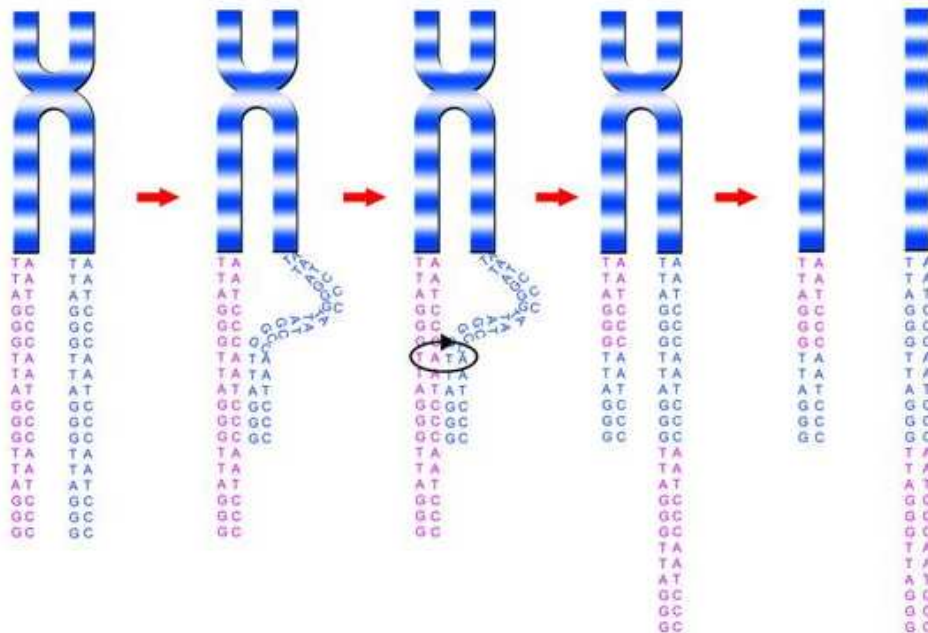


Figura 14. Representación gráfica del mecanismo de recombinación desigual entre cromátidas hermanas a nivel telomérico (revisado por Muntoni y Reddel, 2005).

Tres estudios diferentes han localizado dos líneas celulares capaces de mantener la longitud de sus telómeros mediante ALT, si bien carecían de las características propias de éste (Cerone et al., 2005; Fashing et al. 2005; Marciniak et al., 2005). Estas observaciones han llevado a especular que, quizás, ALT comprenda más de un mecanismo molecular (revisado por Nittis et al., 2008).

Los detalles moleculares sobre este mecanismo de elongación telomérica no están bien definidos. Ha sido descrita la existencia de inestabilidad y mutaciones en el minisatélite MS32 en varias líneas celulares ALT, así como en sarcomas de tejidos blandos con mecanismo ALT, no encontrándose esta alteración en líneas celulares con actividad telomerasa ni en cultivos mortales (Jeyapalan et al., 2005).

Estudios llevados a cabo en líneas celulares con actividad telomerasa y líneas celulares con alargamiento alternativo de las secuencias teloméricas, revelaron que estas últimas poseían diferencias epigenéticas con respecto a las primeras. Así, las histonas H3 y H4 de los promotores de *hTR* y *hTERT* se encontraban hipoacetiladas y H3 metilada en el residuo de lisina 9 en las células ALT. Estos descubrimientos llevaron a sugerir que la cromatina es capaz de regular la expresión de la enzima telomerasa, no sólo en las células ALT, sino también en las células no tumorales (Atkinson et al., 2005; revisado por Blasco, 2007). Asimismo, el estatus de metilación de las regiones subteloméricas podría controlar, de alguna manera, el mecanismo alternativo de elongación telomérica (Gonzalo et al., 2006; Benetti et al., 2007; revisado por Nittis et al., 2008).

También se ha considerado que ALT puede ser la consecuencia de la pérdida de función de p53, pues ésta inhibe la recombinación homóloga, probablemente, por inhibición de la actividad de RAD51 (Mekeel et al., 1997; Linke et al., 2003). Esta afirmación está basada en el hecho de que líneas celulares provenientes de pacientes con el síndrome Li-Fraumeni, que se caracteriza por la presencia de mutaciones hereditarias en *p53*, y líneas inmortalizadas con SV40, que inhibe a p53, presentan, muy frecuentemente,

el mecanismo alternativo de elongación telomérica. Además, la inadecuada protección de los extremos cromosómicos por proteínas teloméricas, en concreto TRF2 y POT1, favorece las recombinaciones entre telómeros cuando éstos alcanzan una longitud crítica, fenómeno que necesita de la inactivación de p53 para prosperar (revisado por Cesare y Reddel, 2008). Es más, en un estudio realizado en tumores humanos, se determinó que el 78% (14/18) de los que mostraron ALT carecían de p53, mientras que en el mismo porcentaje de tumores telomerasa positivos (79%) p53 estaba activa (Chen et al., 2006).

Otra posible explicación para ALT podría ser la alteración de los mecanismos de reparación del ADN basados en la corrección de los errores de apareamiento de bases, pues no podemos olvidar que el ADN telomérico está constituido por unas secuencias repetitivas de 6 pares de bases. Sin embargo, no se ha encontrado correlación alguna entre defectos en este mecanismo y el desarrollo de ALT (Ibanez de Caceres et al., 2004).

Estudios y observaciones clínicas determinaron que los tumores ALT suelen tener un origen neuroepitelial (astrocitomas) o mesenquimático, lo que incluye osteosarcomas y sarcomas de tejidos blandos. Se ha postulado que, posiblemente, las células epiteliales tienen más dificultad para reprimir la actividad telomerasa y, por tanto, tienden a desarrollar tumores telomerasa positivos (Henson et al., 2005; revisado por Muntoni y Reddel, 2005; revisado por Nittis et al., 2008).

El pronóstico entre los pacientes que desarrollan cánceres con mecanismo ALT varía en función del tipo tumoral ya que, probablemente, cada tipo tumoral activa este mecanismo mediante una vía genética diferente y, puede que sea la activación de una u otra vía, lo que determine el pronóstico del paciente, más que la activación de ALT *per se*. Lo que sí se ha observado es que los tumores ALT tienen menos capacidad para metastatizar que los tumores con actividad telomerasa, aunque esto no parece conferir mayor supervivencia (Henson et al., 2005; revisado por Muntoni y Reddel, 2005).

5. TELÓMEROS, TELOMERASA Y CÁNCER

El cáncer se caracteriza por poder desarrollarse, prácticamente, en todos los tejidos, mostrar una gran heterogeneidad y diferente pronóstico. A pesar de este comportamiento, *a priori* tan dispar, todos los tumores comparten una serie de características que definen su estado de malignidad (Hanahan y Weinberg, 2000). Durante la progresión del cáncer, las células tumorales sufren una serie de cambios genéticos y epigenéticos que les permiten escapar del control homeostático de los tejidos.

Los análisis citogenéticos llevados a cabo por McClintock constituyeron la primera evidencia de que el mantenimiento de los telómeros es fundamental para la integridad y estabilidad genómica. Los telómeros disfuncionales son altamente recombinantes, propiciando fusiones cromosómicas que pueden dar lugar a cromosomas dicéntricos. Durante la anafase, los cromosomas dicéntricos pueden localizarse en extremos opuestos de la célula, formando *anaphase bridges* (puentes de anafase). La célula hija, entonces, contendría cromosomas rotos, y se producirían ciclos de rotura-fusión-puente (BFB, *Breakage-Fusion-Bridge*). Ya que las roturas cromosómicas pueden ocurrir en cualquier punto, esta inestabilidad genómica ocasionaría pérdidas de heterocigosidad en una de las células hijas, mientras que la otra tendría ganancia genética. Estos procesos generan variantes cromosómicas en cada ciclo celular y, algunas de éstas, pueden dar lugar a la adquisición de fenotipos que contribuyan a que la célula tenga un potencial replicativo ilimitado. Los ciclos BFB terminan cuando los cromosomas adquieren telómeros y se vuelven, de nuevo, estables. Por tanto, la pérdida de un único telómero puede generar una amplia variedad de cambios cromosómicos en una población de células (revisado por Bailey y Murnane, 2006, revisado por Ayoub et al., 2008; revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008). A partir de estos resultados, se estableció que la pérdida de la función telomérica y la consiguiente inestabilidad genómica son de vital importancia en la tumorigénesis y en la progresión tumoral (Harley et al., 1994; Hahn et al., 1999; Hanahan y Weinberg, 2000; Kelland, 2007; revisado por Harley, 2008).

De hecho, se considera que los telómeros cortos constituyen un riesgo significativo para desarrollar cáncer (revisado por Harley, 2008).

Para que el acortamiento de los telómeros no favorezca el desarrollo tumorigénico, es necesario que la vía de p53 no esté alterada. Ensayos llevados a cabo en cultivos celulares, demostraron que células carentes de p53 y con telómeros cortos eran más susceptibles a ser transformadas por myc y ras (revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008). Por otro lado, ratones con telómeros disfuncionales *mTerc* -/- p53 +/- mostraron un aumento en la tasa de carcinomas, lo que llevó a sugerir que la disfunción telomérica, junto con la deficiencia en p53, están implicados en el desarrollo de tumores de origen epitelial (Artandi et al., 2000). Recientemente, se ha planteado como hipótesis que la senescencia mediada por p53 e inducida por telómeros disfuncionales es capaz de inhibir el desarrollo de tumores mesenquimales y linfoides, pero incapaz de evitar la progresión tumoral en compartimentos epiteliales (revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008).

Por tanto, aunque el acortamiento de los telómeros limita la capacidad replicativa de las células humanas y suprime la transformación celular, también conduce a la inestabilidad cromosómica. Para que esta inestabilidad no induzca la aparición de tumores es necesario que las vías de senescencia y apoptosis funcionen adecuadamente. La inactivación de una de las vías puede ser contrarrestada por la otra. Lo que se desconoce es si existe especificidad de tejido en cuanto a la activación de mecanismos de senescencia o apoptosis como supresores tumorales (revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008).

La enzima telomerasa es capaz de mantener la estabilidad genómica, pues evita la disfunción telomérica y el inicio de los ciclos BFB (revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008). Esta estabilización de los telómeros permite, de igual manera, la inmortalización y facilita la progresión tumoral (Masutomi y Hahn, 2003). Sin embargo, se han descrito tumores que no desarrollan ningún mecanismo para mantener la longitud de las secuencias teloméricas (Gupta et al., 1996; Ulaner et al., 2003; Ulaner et al., 2004; Johnson et al., 2005). Se trata de células mortales cuyos telómeros se acortan paulatinamente y que, de

alguna manera, crecen desmesuradamente antes de entrar en crisis. Estos tumores presentan un pronóstico más favorable (Ulaner et al., 2003; revisado por Bollman, 2007).

Mediante el ensayo TRAP (*Telomere Repeat Amplification Protocol*) se ha detectado actividad telomerasa en, aproximadamente, el 90% de las líneas celulares tumorales y tejidos tumorales, mientras que ésta no se detecta en la mayoría de las células humanas normales, con excepción de aquellas células cuya tasa de recambio es elevada, como los linfocitos, keratinocitos basales, células de la cripta intestinal y las células madre de sangre periférica que expresan CD-34 (revisado por Hahn, 2003; revisado por Harley, 2008). En tumores pulmonares se ha detectado actividad telomerasa hasta en un 85% de los casos (Lantuejoul et al., 2005). Estos estudios han permitido confirmar que la actividad telomerasa se correlaciona con la tumorigénesis en diferentes tejidos humanos (Hiyama e Hiyama, 2002). Por tanto, la represión de la enzima telomerasa y su regulación actúan como un mecanismo supresor de tumores en las células humanas (revisado por Harley, 2008). Es más, parece probable que la expresión de *hTERT* se active en células tumorales como consecuencia de la pérdida de los mecanismos supresores que la regulan. Se ha postulado que la transcripción de *hTERT* está controlada por un represor, no presente en las células tumorales, pudiendo ser una molécula de unión directa al ADN, o bien, una proteína represora que se une a factores de transcripción del promotor de *hTERT* (revisado por Ducrest et al., 2002; Lin y Elledge, 2003).

Además, como se ha descrito en el apartado “3.3 Otras funciones de la enzima telomerasa”, esta proteína es capaz de inhibir la apoptosis y aumentar la viabilidad y crecimiento celular, de manera independiente de los telómeros.

Lo expuesto anteriormente justifica que diversos autores hayan considerado que la combinación de telómeros cortos y la falta de expresión de *hTERT* constituya un mecanismo anticancerígeno (revisado por Hornsby, 2007).

Las células tumorales muestran telómeros más cortos que las células adyacentes no tumorales. Esto ha llevado a pensar que la actividad elevada de telomerasa es un evento tardío en el proceso de malignización, de manera que, una vez activada, es capaz de estabilizar a los telómeros más cortos, pero no de igualarlos a los de las células cercanas sanas (revisado por Maser y De Pinho, 2002b).

Alteraciones en la metilación del ADN y la modificación de histonas son dos hechos comunes en el cáncer (Jones et al., 2002; Fraga et al., 2005). Debido a que la estructura de la cromatina afecta a la regulación de los telómeros de mamíferos, estos cambios epigenéticos podrían establecer un nexo de unión entre la desregulación telomérica y el desarrollo del cáncer (revisado por Blasco, 2007).

6. MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN

6.1 MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN Y CÁNCER

El genoma de todos los organismos vivos está constantemente sujeto a condiciones que le causan daño. Este daño puede ser espontáneo, como consecuencia de procesos metabólicos fisiológicos, o bien causado por agentes exógenos. La maquinaria celular que responde a los daños en el ADN está constituida por una red dinámica de proteínas y complejos proteicos capaces de detectar lesiones en el ADN, y de señalar su presencia para activar distintas rutas que retrasen la progresión del ciclo celular, reparen estas lesiones o eliminen las células con inestabilidad genética mediante la inducción de apoptosis. Está ampliamente documentada la implicación de los factores de reparación en el desarrollo embrionario, en la homeostasis tisular de individuos adultos y en diferentes patologías, como el cáncer. El papel que juegan los mecanismos de reparación del ADN en esta enfermedad es amplio: por un lado, el cáncer es la consecuencia del daño genómico en las células; por otro, muchas de las proteínas de reparación son supresoras tumorales. Además, no hay que olvidar que las terapias antitumorales persiguen la muerte celular por el daño que ocasionan en el ADN. De hecho, se ha sugerido, como tratamiento adyuvante, la manipulación selectiva de genes o proteínas implicados en la reparación del ADN para mejorar el efecto de la actual terapia antitumoral (revisado por Bartek et al., 2007; revisado por Lieberman, 2008). Numerosos estudios evidencian que la predisposición a desarrollar cáncer hereditario está mediada por mutaciones en genes implicados en la reparación del ADN de células germinales (revisado por Paz-Elizur et al., 2008).

Podríamos definir el cáncer como una enfermedad multigénica (revisado por Hoeijmakers, 2001). La variabilidad interindividual en humanos en respuesta a los carcinógenos ha sido descrita repetidamente. No solamente hay que considerar los polimorfismos hereditarios en genes implicados en el metabolismo de estas sustancias, sino también la capacidad de reparación del

ADN. Cada individuo difiere ampliamente en su capacidad para subsanar el daño genómico. De hecho, al menos el 10% de la población presenta una capacidad de reparación del ADN *in vitro* en linfocitos, tras la exposición a agentes genotóxicos, de, aproximadamente, el 60-75%, con respecto a la media poblacional, relacionándose esta disminución en la reparación del ADN con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón, mama, piel, hígado y cabeza y cuello (Grossman et al., 1999; revisado por Berwick y Vineis, 2000; Paz-Elizur et al., 2003; Paz-Elizur et al., 2005; Paz-Elizur et al., 2006). La disminución de la capacidad de reparación del ADN, en concreto de la enzima OGG1, unido al hábito tabáquico, se ha asociado con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón y cabeza y cuello (Paz-Elizur et al., 2003; Paz-Elizur et al., 2005; Paz-Elizur et al., 2006).

Debido a los distintos tipos de lesiones que puede sufrir el ADN, existen varios mecanismos de reparación capaces de solucionar la mayoría, aunque no todos, de los errores que se acumulan en el genoma:

- Reparación por escisión de nucleótidos: este sistema escinde fragmentos de oligonucleótidos que rodean a bases anormales. La mayoría de estas lesiones son producidas por agentes exógenos capaces de bloquear la replicación del ADN o su transcripción.
- Reparación por escisión de bases: se eliminan las bases dañadas inapropiadas del ADN. Generalmente, este mecanismo de reparación está relacionado con el daño de origen endógeno.
- Reparación de apareamientos incorrectos de bases: reconoce apareamientos incorrectos, tanto de una sola base, como de repeticiones cortas de nucleótidos. Este sistema de reparación es crítico para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Defectos en él son la causa del cáncer de colon no polipósico hereditario, típico y atípico, así como de una baja proporción de cánceres de colon esporádicos.
- Reparación por recombinación no homóloga: es el principal mecanismo de reparación cuando existe rotura de la doble hebra de ADN en mamíferos. Se unen los extremos rotos independientemente de su homología, con la consiguiente pérdida de algunos nucleótidos en el punto de unión. Está establecido, desde levaduras hasta mamíferos,

que esta vía de reparación juega un papel esencial en el mantenimiento telomérico, pues media la fusión entre telómeros desprotegidos.

- Reparación por recombinación homóloga: este sistema también repara las roturas de la doble hebra de ADN y es el de elección cuando están presentes dos hebras homólogas. Este mecanismo de reparación es más eficiente en las fases del ciclo celular S y G2 (Johnson y Jasin, 2000; revisado por Hoeijmakers, 2001; revisado por Maser y De Pinho, 2004; revisado por Park y Gerson, 2005; revisado por Lieberman, 2008).

Con el paso del tiempo, el ADN acumula cambios que activan protooncogenes e inactivan genes supresores de tumores. Sin embargo, las mutaciones espontáneas son insuficientes para explicar el riesgo de padecer cáncer. De hecho, se han identificado numerosas conexiones entre la oncogénesis y fallos, adquiridos o heredados, en los llamados “guardianes del genoma”, lo que determina el papel tan importante que juegan los mecanismos de reparación del ADN en el desarrollo tumorigénico (revisado por Hoeijmakers, 2001) (Figura 15).

Se ha propuesto que los mecanismos de reparación del ADN son una barrera fisiológica que trata de evitar la progresión tumoral (Bartkova et al., 2005; Gorgoulis et al., 2005). Esta afirmación se basa en la observación de la activación constitutiva de las vías de señalización de daño genómico en tumores humanos de estadios pre-invasivos, cultivos celulares y modelos animales. Esta activación precede a las mutaciones o desregulaciones epigenéticas de las proteínas implicadas en la respuesta a daño en el ADN. Estudios realizados en líneas celulares y en animales revelaron que la senescencia inducida por oncogenes requería que la señalización de daño en el ADN no estuviera truncada. Sin embargo, no todas las alteraciones son capaces de activar la respuesta a daño en el ADN, lo que favorecería la expansión clonal de células alteradas. Cuando éstas acumulan errores capaces de activar a la maquinaria de señalización de daño genómico, se pondrán en marcha los mecanismos encaminados a inducir la entrada en senescencia o muerte celular, de manera que no sigan proliferando. La inactivación de las moléculas de las vías de señalización y reparación del daño

en el ADN implica su pérdida como barrera antitumoral, lo que favorece el crecimiento y expansión de las células tumorales. Esta hipótesis trata de explicar por qué mutaciones de genes como *ATM*, *BRCA1*, *BRCA2* o *p53* en la línea germinal predisponen al individuo que las padece a sufrir cáncer (revisado por Bartek et al., 2007).

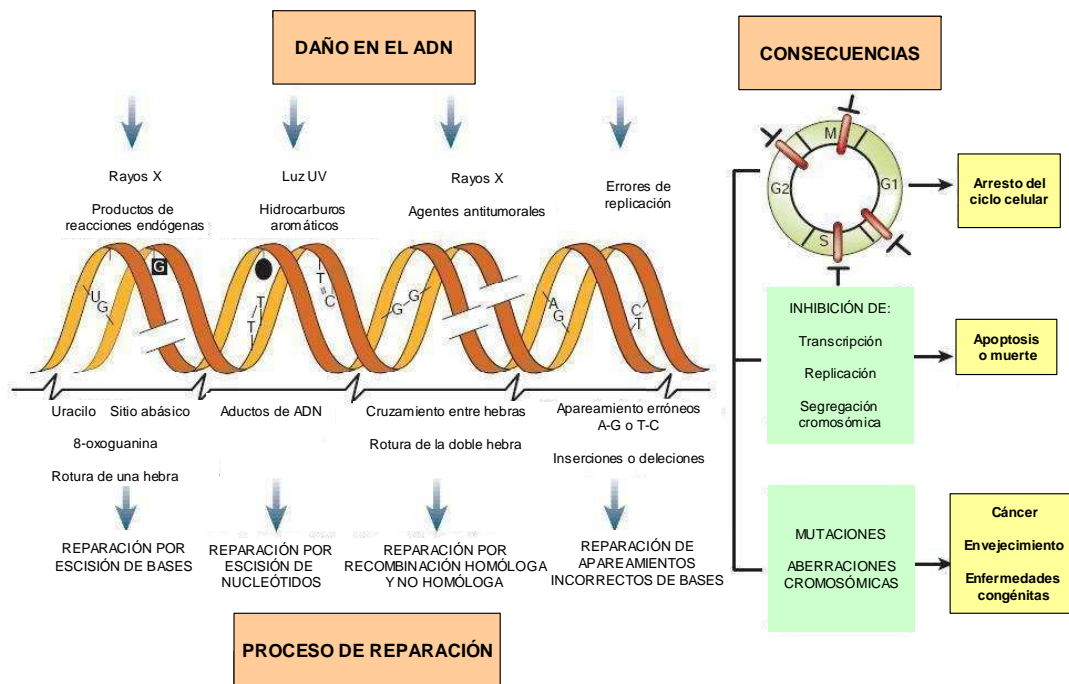


Figura 15. Representación esquemática del daño en el ADN causado por agentes y lesiones comunes (parte superior). En la parte inferior, se nombran los distintos mecanismos de reparación, así como las lesiones que reparan. En la parte derecha, aparecen las consecuencias del daño genómico (parada del ciclo celular, alteraciones en el metabolismo del DNA y cambios permanentes en la molécula de ADN) (adaptado de Hoeijmakers, 2001).

6.2 MECANISMOS DE REPARACIÓN DEL ADN Y FUNCIÓN TELOMÉRICA

Numerosos factores de reparación del ADN, tales como, el complejo ADN-PK, ERCC1/XPF, WRN o el complejo MRN, se han encontrado asociados a los telómeros, desarrollando un papel crítico en la homeostasis telomérica

(Boulton y Jackson, 1996). De hecho, líneas celulares de pacientes con alteraciones en algunos de estos genes muestran una mayor tasa de acortamiento telomérico, por división, que aquellas líneas provenientes de individuos sanos (Cabuy et al., 2005). Esto ha llevado a algunos investigadores a pensar que los telómeros son reconocidos por estos factores como ADN dañado o anormal, pero que las proteínas específicas de unión a telómeros, de alguna manera, forman una estructura que protege el final de los cromosomas de posibles degradaciones (Wright et al., 2005; revisado por Longhese, 2008). Se ha sugerido, incluso, que las proteínas de unión a telómeros podrían ser antiguos factores de reparación del ADN que han pasado a ser utilizados por la célula como protectores de los telómeros (revisado por De Lange, 2004); o bien que los telómeros actúan como reservorio de proteínas de reparación del ADN (Martin et al., 1999).

La entrada en senescencia de las células, como consecuencia del acortamiento telomérico, comparte características con la parada del ciclo celular inducida como consecuencia del daño en el ADN (D`Adda di Fagagna et al., 2003). Entre éstas, cabe destacar la activación de quinasas y mediadores de la respuesta al daño en el ADN y la aparición de *foci* asociados a la senescencia que contienen factores de reparación (revisado por D`Adda di Fagagna et al., 2004). La alteración de la estructura telomérica como consecuencia de la desregulación de las proteínas integrantes del complejo *shelterin*, también es capaz de activar la respuesta a daño en el ADN y de inducir la entrada de la célula en senescencia, o bien, su muerte por apoptosis (revisado por Cosme-Blanco y Chang, 2008; revisado por Deng et al., 2008).

Otro enigma es cómo la maquinaria de reparación del ADN es capaz de distinguir los extremos cromosómicos funcionales de los no funcionales. De nuevo, se ha postulado que las proteínas de unión a telómeros están implicadas en este reconocimiento, pues la poca presencia de éstas favorecería la activación de los factores de reparación del ADN, lo que daría lugar a fusiones cromosómicas, parada del ciclo celular y/o apoptosis. Estudios llevados a cabo en levaduras pusieron de manifiesto que, para que los telómeros sean reconocidos como ADN dañado, es necesario que se

encuentren acomplejados con la proteína RPA. La unión de ésta al ADN telomérico estaría inhibida por Cdc13p (proteína homóloga a la humana POT1), que competiría con RPA. También se ha especulado que la estructura heterocromatínica de los telómeros puede estar implicada en este proceso, evitando el acceso de las proteínas de reparación a los extremos cromosómicos (revisado por D`Adda di Fagagna et al., 2004).

Además de las proteínas descritas anteriormente, que forman parte de la estructura telomérica, existen otros factores de reparación del ADN que, sin estar unidos a los telómeros, sí están implicados, de alguna manera, en la homeostasis telomérica. Entre estos, se encuentran RAD51 y RAD54, implicadas en la recombinación homóloga y necesarias para la formación del *T-loop*, y PARP1 y PARP2 (Poli ADP-ribosil polimerasa 1 y 2, respectivamente), implicadas en la reparación por escisión de bases (revisado por Slijepcevic y Al-Wahiby, 2005; revisado por Slijepcevic, 2006; Verdun y Karlseder, 2006; revisado por Ayoub et al., 2008). Cabe también destacar en este grupo a Artemis (DCLRE1C), proteína de la vía de reparación por recombinación no homóloga y que es fosforilada por ADN-PKc y ATM. En células embrionarias de ratón se ha determinado su implicación en la homeostasis telomérica, pues su carencia produjo un aumento de fusiones teloméricas, si bien todavía no está clara su función en los extremos cromosómicos (Rooney et al., 2003).

La familia de proteínas de retinoblastoma, entre las cuales Rb1 está frecuentemente mutada en cáncer, parece estar implicada en el control de la longitud telomérica, mediante un mecanismo de regulación epigenética, pues se ha demostrado su requerimiento para la trimetilación de la histona H4K20, ya que su ausencia provoca una rápida pérdida de modificación de dicha histona en fibroblastos embrionarios de ratón. Además, provoca una elongación aberrante de los telómeros (Garcia-Cao et al., 2002).

Teniendo en cuenta lo expuesto a lo largo de esta introducción, podría afirmarse que la desregulación de los componentes de la vía de reparación por recombinación no homóloga conlleva alteraciones en la estabilidad telomérica e induce inestabilidad genómica. Asimismo, la maquinaria implicada en la

recombinación homóloga es esencial para el mantenimiento de la longitud de las secuencias teloméricas y su protección (revisado por Ayouaz et al., 2008). Además, las células que mantienen la longitud de sus telómeros mediante el mecanismo ALT se caracterizan por tener *foci* formados por proteínas de unión a telómeros, ADN telomérico, cuerpos PML y proteínas implicadas en la señalización de daño en el ADN (Henson et al., 2002).

Es interesante destacar el hecho de que defectos genéticos en moléculas implicadas en la reparación del ADN afecten al estatus telomérico, aunque no estén directamente relacionadas con la función telomérica, lo que sugiere una fuerte interdependencia entre ambos procesos. La implicación, por tanto, de estas proteínas en la función telomérica ha llevado a sugerir que se requieren telómeros funcionales para que pueda llevarse a cabo la reparación del ADN por los factores de reparación. De hecho, se ha descrito que células de pacientes afectados de cáncer con telómeros acortados, poseen defectos en los mecanismos de reparación del ADN (revisado por D'Adda di Fagagna et al., 2004; revisado por Slijepcevic y Al-Wahiby, 2005). De manera inversa, estudios realizados en ratones y en células humanas con alteraciones en genes implicados en la reparación del ADN, tales como *ATM*, *ADN-PK*, *ERCC1/XPF* y *WRN*, han demostrado la existencia de disfunción telomérica en el 87% y en el 90% de los casos, respectivamente (revisado por Slijepcevic, 2008).

Otro ejemplo de la implicación de los mecanismos de reparación del ADN en la función telomérica viene dado por el hecho de que la fosforilación de hTERT, como consecuencia de daño en el ADN, mediada por c-Abl, proteína implicada en la ruta de ATM, produce inactividad enzimática (Kharbanda et al., 2000). Además, parece que hTERT está implicada en la reparación de roturas de doble hebra del ADN en regiones no teloméricas (Pennaneach et al., 2006). Por último, TRF2 es fosforilada por ATM en respuesta al daño en el ADN, movilizándose a aquella región en la que está el daño, aunque éste no se localice en los extremos cromosómicos (Tanaka et al., 2005a).

Al igual que ocurre con los telómeros, mutaciones en genes implicados en la reparación del ADN se han asociado con la aparición de cáncer y fenómenos de inestabilidad genómica (revisado por Hoeijmakers, 2001). Es más, variaciones en la capacidad de reparación del ADN pueden determinar la susceptibilidad a desarrollar esta enfermedad, así como su posterior evolución (revisado por Madhusudan y Middleton, 2005).

MATERIAL Y MÉTODOS

1. PACIENTES Y MUESTRAS TISULARES

Las muestras empleadas en esta Tesis provienen del Banco de Tumores del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Todas ellas fueron obtenidas a partir de pacientes afectados de cáncer no microcítico de pulmón (CNMP) sometidos a cirugía con intención curativa en el Servicio de Cirugía II del mencionado Hospital. Nos proporcionaron 190 muestras de tejido pulmonar de 95 pacientes. En cada caso, se dispuso de tejido tumoral y de tejido no tumoral del propio paciente (tomado, al menos, a 10 cm de distancia del margen del tumor). Las muestras venían incluidas en bloques de Tissue-Tek® y se almacenaron a -80°C hasta su uso.

Las muestras tumorales fueron examinadas por un anatómo-patólogo del Servicio de Anatomía Patológica del citado Hospital, no considerándose válidas aquellas que tenían más de un 20% de tejido normal y/o más de un 10% de necrosis. El examen se realizó por observación directa de las muestras en un porta, teñidas con hematoxilina-eosina, según el esquema representado en la Figura 16:

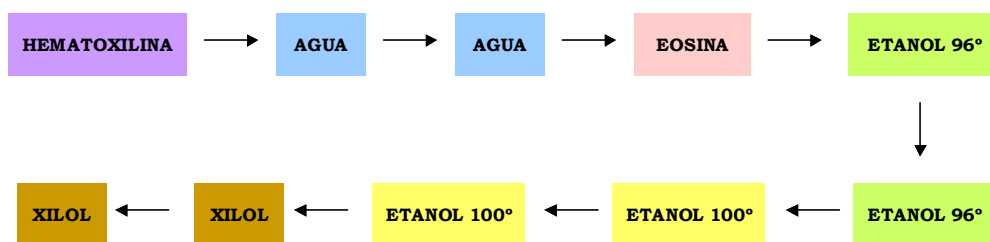


Figura 16. Representación esquemática de la tinción hematoxilina-eosina. Los reactivos empleados están representados en el mismo orden en el que se utilizaron. Los portas se sumergieron en cada solución 10 segundos, aproximadamente.

El grosor de la muestra fijada en el porta fue de 5 micras. Los cortes se realizaron con un criostato cedido por el Servicio de Inmunología del Hospital. Las características clínico-patológicas de los 95 tumores se indican en la Tabla 4.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	95
I	51
II	7
IIIA	29
IIIB	4
IV	4
Tipo histológico	95
Adenocarcinoma	38
Carcinoma epidermoide	53
Carcinoma indiferenciado de célula grande	4
Recidiva	95
Positiva	29
Negativa	61
Sospecha	3
No intervalo libre de enfermedad	2

Tabla 4. Características clínico-patológicas de la población de 95 tumores de pulmón estudiada en esta Tesis.

El periodo de seguimiento de la serie, en la mayor parte de los casos, fue de 5 años (rango, 1-79 meses). Los pacientes fueron operados en el Hospital Clínico San Carlos entre los años 2000 y 2005. La edad media de los pacientes fue 63.8 ± 1.23 años (rango, 40-82 años) y sólo había 4 mujeres en la serie incluida en esta Tesis. El resto de los pacientes (91) fueron varones.

2. EXTRACCIÓN, VALORACIÓN Y PURIFICACIÓN DEL ARN

2.1 EXTRACCIÓN DEL ARN

El método empleado para ello fue el descrito por Chomczynski & Sacchi, ligeramente modificado, utilizando trizol. Este reactivo contiene fenol y otros componentes que garantizan la estabilidad del ARN mientras se disgregan los cortes del tejido. Estos fueron de 20 micras y se realizaron con un criostato en el Servicio de Inmunología del Hospital Clínico San Carlos de Madrid. Los cortes se almacenaron a -80°C hasta la extracción.

En primer lugar, se añadió 1 ml de trizol a cada tubo, que contenía 10-12 cortes de tejido pulmonar. Las muestras se homogeneizaron usando, primero la punta de la pipeta y, posteriormente, una jeringuilla. A continuación se añadió a cada tubo 0.2 ml de cloroformo, se agitaron con el vórtex y, tras incubar 2 ó 3 minutos a temperatura ambiente, se centrifugaron durante 15 minutos a 13.200 r.p.m., separándose la fase acuosa, que contenía el ARN. Ésta se transfirió, en cada caso, a un tubo limpio, añadiéndose 0.5 ml de isopropanol frío para precipitar el ARN. Las muestras se almacenaron una noche a 4°C. Tras la precipitación, los tubos se centrifugaron a 4°C durante 30 minutos a 13.200 r.p.m. Se eliminó el sobrenadante, y se lavó el pellet con etanol al 75% frío dos veces, realizándose una pequeña centrifugación entre cada lavado por si se hubiera despegado el precipitado. Tras eliminar el etanol del último lavado, se secó el ARN a temperatura ambiente. Éste se resuspendió en 50 µl de agua libre de nucleasas.

2.2 VALORACIÓN DEL ARN

La valoración se realizó usando un espectrofotómetro que nos permitió medir a una longitud de onda de 260 nm, máximo de absorción de los ácidos

nucleicos, y a 280 nm, máximo de absorción de las proteínas. De esta manera, el aparato no sólo era capaz de cuantificar la cantidad de ARN, sino que también medía la pureza de éste, pues determinaba la relación existente entre la absorbancia a 260 nm y 280 nm. Se usaron cubetas de cuarzo cuyo volumen era de 100 µl. El blanco utilizado fue agua libre de nucleasas y se valoró 1 µl de ARN diluido en 99 µl de agua libre de nucleasas.

Tras la valoración, se procedió a comprobar la integridad del ARN aislado mediante una electroforesis. Se realizó un gel de agarosa al 0.8% con TBE 1X (TBE 10X: Tris 0.89M, ácido bórico 0.88M y EDTA 0.01M), al que se le añadió bromuro de etidio para poder visualizar las bandas. Cada pocillo del gel se cargó con 1.5 µg de ARN, tampón de carga 1X (tampón de carga 6X: 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de xileno cianol y 30% de glicerol) y agua libre de nucleasas. La electroforesis se desarrolló durante 40 minutos a 80V.

Las muestras se almacenaron a -80°C hasta su uso.

2.3 PURIFICACIÓN DEL ARN

El ARN se usó para estudios de expresión con matrices de ADN complementario y PCR cuantitativa a tiempo real. Para el empleo de las matrices es imprescindible eliminar el ADN genómico y no se recomienda el uso de ADNasas. Por ello, en los casos en los que se detectó la presencia de ADN durante la electroforesis, se empleó el kit “RNeasy[®] Micro” de Qiagen.

El ensayo se realizó a temperatura ambiente. En primer lugar, se ajustó el volumen de la muestra a 0.1 ml con agua libre de nucleasas y se añadieron 0.35 ml de tampón RLT, proporcionado por el kit, mezclado, previamente, con β-mercapto etanol, para inactivar a las ARNasas, y 0.25 ml de etanol absoluto. De esta manera, se crearon las condiciones óptimas para que el ARN se uniera a la membrana de silica-gel de la columna, a la que se transfirió la muestra. Se centrifugó a 10.000 r.p.m. durante 15 segundos y se eliminó el tubo con el

líquido eluido. Se procedió a lavar la columna con 0.5 ml de tampón RPE, incluido en el kit, y se centrifugó en las mismas condiciones que las descritas anteriormente. Por último, se añadieron 0.5 ml de etanol al 80% y se centrifugó durante 2 minutos a la misma velocidad. Para secar la membrana, se procedió a colocar la columna dentro de un tubo nuevo y, con la tapa abierta, se centrifugó durante 5 minutos a la máxima velocidad. La elución del ARN se realizó en dos pasos: se añadieron a la columna 7 ó 5 µl de agua libre de nucleasas, en función de la cantidad de ARN de partida, y se centrifugó a 2.000 r.p.m. durante 1 minuto; a continuación, se añadieron otros 7 ó 5 µl de agua libre de nucleasas y se centrifugó a 13.200 r.p.m. el mismo tiempo. El ARN se recogió en un tubo de 1.5 ml en el que se introdujo la columna previamente.

Tras la purificación, se valoró el ARN obtenido, se comprobó su integridad y se almacenó, según lo descrito en el apartado “2.2 Valoración del ARN”.

3. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DEL ADN

3.1 EXTRACCIÓN DEL ADN

Para la extracción del ADN se siguieron dos procedimientos: el método Chomczynski & Sacchi, y el método Blin y Stafford de 1976, ambos modificados. Aplicando el primer protocolo, a la fase orgánica resultante tras separar la fase acuosa que contenía el ARN, se añadieron 0.6 ml de etanol absoluto frío para precipitar el ADN. Se mezcló con un vórtex y se centrifugó a 8.000 r.p.m. durante 10 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el precipitado resultante dos veces con citrato sódico 0.1M disuelto en etanol al 10%, sin centrifugar entre cada uno de los lavados. A continuación, se lavó con la solución B (NaCl 0.075M y EDTA 0.02M) para eliminar los posibles restos de citrato sódico. El precipitado resultante se mantuvo 2 días a 55°C con 0.3 ml de solución B, 10 µl de SDS 10% y 5 µl de proteinasa K a una

concentración de 20 mg/ml. Tras la incubación, se añadieron 176 µl de NaCl 6M, se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 13.200 r.p.m. durante 15 minutos. Se recogió el sobrenadante, donde estaba el ADN, y éste se precipitó con isopropanol frío. Se dejó 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugándose de nuevo a 13.200 r.p.m. durante 30 minutos. Se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado resultante dos veces con etanol al 75% frío, centrifugando entre ambos lavados por si éste se hubiera despegado. Finalmente, se dejó secar a temperatura ambiente y se resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas.

Para extraer ADN genómico por el procedimiento de Blin y Stafford de 1976, con modificaciones, se partió de los bloques de tejido embebidos en el Tissue-Tek[®]. Debido al tamaño de los bloques, estos se cortaron en fragmentos más pequeños empleando cuchillas estériles (una para cada muestra), introduciéndose en un tubo de 10 ml, al que se añadió 2.5 ml de un tampón formado por Tris-HCl 0.01M, EDTA 0.01M y NaCl 0.15M. Se homogeneizó el contenido utilizando un politrón. El vástago empleado se mantuvo la noche anterior en EDTA 0.02M y se aclaró con agua ultra pura estéril, tanto al principio, como entre cada uso. A continuación, se añadieron 50 µl de proteinasa K a una concentración de 20 mg/ml. Se volvió a homogeneizar brevemente, se adicionaron 125 µl de SDS al 10% y se incubaron los tubos durante 3 horas a 65°C para que tuviera lugar la fase de lisis. Seguidamente, se añadieron 2.5 ml de una solución que contenía Tris-HCl 0.01M, EDTA 0.01M y NaCl 0.65M a pH 7.5 y 5 ml de fenol. Se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos para separar la fase acuosa, donde estaba el ADN, de la orgánica. La fase acuosa se recogió en un tubo nuevo de 10 ml y se añadieron 5 ml de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1. De nuevo se mezcló con el vórtex y se centrifugó a 4.000 r.p.m. 5 minutos. La fase acuosa se pasó a un tubo de 50 ml que contenía entre 10 y 13 ml de etanol absoluto frío. Se precipitó el ADN durante una noche a -20°C. Al día siguiente, se centrifugaron los tubos a 4.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C, se decantó el sobrenadante y se lavó el precipitado con 2 ml de etanol frío al 70% dos veces. Finalmente, se secó el precipitado y se resuspendió en 0.3 ml de agua libre de nucleasas.

3.2 VALORACIÓN DEL ADN

La valoración se realizó usando un espectrofotómetro que nos permitió medir a una longitud de onda de 260 nm y a 280 nm, para cuantificar la cantidad de ADN y medir su pureza. Se usaron cubetas de cuarzo cuyo volumen era de 100 µl. El blanco usado fue 100 µl de agua libre de nucleasas y las muestras de ADN se diluyeron 1:100 con agua libre de nucleasas.

Las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

4. EXTRACCIÓN Y VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

4.1 EXTRACCIÓN DE PROTEÍNAS

La extracción de proteínas se realizó a partir de los bloques de tejido embebidos en el Tissue-Tek®. Estos se cortaron en fragmentos más pequeños, siguiendo el mismo procedimiento que el empleado para extraer ADN. En cada tubo de 2 ml se introdujeron 0.1-0.2 g de tejido y 0.4 ml de un reactivo de lisis, que contiene inhibidores de proteasas y ARNasas, incluido en el kit de Roche "Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA®". Se procedió a homogeneizar la mezcla, empleando un politrón y aclarando el vástago con agua DEPC entre cada lavado. El día anterior, el vástago estuvo 4 horas en NaOH 4N y, durante toda la noche, en agua DEPC, para eliminar las posibles ARNasas. Una vez homogeneizadas las muestras, se dejaron los tubos 30 minutos en hielo, para favorecer la extracción, y se centrifugaron a 4°C durante 20 minutos a 12.000 r.p.m. Finalmente, se separó la fase acuosa, que contenía las proteínas.

4.2 VALORACIÓN DE PROTEÍNAS

La valoración se realizó en un espectrofotómetro que midió la absorbancia a una longitud de onda de 595 nm y se usaron cubetas de plástico de 1 ml. La cuantificación de las proteínas se realizó con el ensayo de Bradford. El blanco utilizado fue 1 ml de Bradford comercial diluido 5 veces. Para cada muestra, se emplearon 0.8 ml de agua ultra pura estéril y 0.2 ml de reactivo Bradford comercial. Se tomó 1 µl de cada alícuota de proteínas a valorar, se diluyó 1:5 ó 1:10 y se valoraron 4 µl. La cuantificación se realizó por duplicado.

Las proteínas se almacenaron a -80°C hasta su uso.

5. ENSAYO DE MEDICIÓN DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS TELOMÉRICOS DE RESTRICCIÓN

La medida de la longitud de los telómeros se realizó en 95 pacientes a partir del ADN genómico procedente de los tejidos tumorales y no tumorales, en cada caso. El kit empleado para ello fue "Telo TAGGG Telomere Length Assay®" de Roche. Este método permite determinar la longitud de los telómeros mediante el análisis por Southern-blot de los TRF (*Telomeric Restriction Fragments*) obtenidos tras la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción de corte frecuente.

El ensayo parte de 2.5 µg de ADN que se digieren con 1 µl de una mezcla de enzimas de restricción, que cortan el ADN en pequeños fragmentos, salvo el ADN telomérico y subtelomérico. Las enzimas fueron: Hinf I y Rsa I y se emplearon 20 unidades de cada una de ellas por muestra. Como controles se emplearon muestras con telómeros de alto y/o bajo peso molecular proporcionadas por el kit. La digestión tuvo lugar durante 2 horas a 37°C.

Tras ésta, se añadieron a cada tubo 5 µl de tampón de carga del kit para parar la reacción.

El ADN digerido se separó en un gel de agarosa al 0.8% en TAE 1X (TAE 50X: Tris 2M, EDTA 50mM y ácido acético glacial, pH 8) a 75–85V durante, aproximadamente, 4 horas. En el momento de cargar las muestras, se preparó, y cargó también, el marcador de peso molecular: 3 µl del marcador proporcionado por el kit, 5 µl agua libre de nucleasas y 2 µl del tampón de carga.

Cuando finalizó la electroforesis, el gel se trató durante 10 minutos con HCl 0.25M a temperatura ambiente con agitación. De esta manera, se obtuvo un pH óptimo para la desnaturalización del ADN. Se aclaró dos veces con agua destilada, y se realizaron dos incubaciones de 15 minutos a temperatura ambiente con una solución de desnaturalización (NaOH 0.5M y NaCl 1.5M). Se aclaró de nuevo con agua destilada, y se trató con una solución de neutralización (Tris-HCl 0.5M y NaCl 3M, pH 7.5) que adecuó el pH para la transferencia. Se realizaron dos incubaciones a temperatura ambiente de 15 minutos de duración cada una.

La transferencia tuvo lugar por capilaridad a temperatura ambiente durante una noche. Previamente, se activó la membrana de nylon cargada positivamente (Roche Diagnostics) con agua ultra pura estéril. El tampón de transferencia empleado fue SSC 20X (NaCl 3M y citrato sódico 0.3M, pH 7).

Una vez concluida la transferencia, se fijó el ADN con luz UV primero, 7 minutos a una longitud de onda de 254 nm, y con calor posteriormente, 30 minutos a 80°C. Se lavó la membrana con SSC 2X y se prehibridó durante 40 minutos a 42°C con 15 ml de la solución de hibridación calentada a la misma temperatura, proporcionada por el kit. Tras la prehibridación, ésta se eliminó, y se procedió a incubar la membrana con 10 ml de la solución de hibridación precalentada, a la que se le añadió 2 µl de una sonda específica para secuencias teloméricas que lleva unida digoxigenina, también

proporcionada por el kit. El tiempo de incubación fue de 2 horas y 40 minutos.

Una vez finalizó la incubación, se lavó la membrana dos veces, a temperatura ambiente, con una solución de lavado compuesta por SSC 2X y SDS 0.1%. La duración de cada lavado fue de 5 minutos. Seguidamente, se realizaron otros dos lavados, de 17 minutos de duración cada uno, a 50°C con una solución que contenía SSC 0.2X y SDS 0.1%. Un último lavado de 4 minutos de duración se llevó a cabo a temperatura ambiente con un tampón incluido en el kit.

Seguidamente, se bloqueó la membrana durante 30 minutos, a temperatura ambiente, con la solución de bloqueo del kit. A continuación, se añadió a la solución anterior un anticuerpo antidigoxigenina unido a fosfatasa alcalina, a una concentración de 75 mU/ml. La incubación duró 30 minutos y se realizó a temperatura ambiente. Para eliminar los restos de anticuerpo que no se unieron a la digoxigenina, se lavó la membrana a temperatura ambiente, con el tampón de lavado incluido en el kit, dos veces. La duración de cada lavado fue de 15 minutos. Tras el último lavado, se incubó la membrana durante 4 minutos a temperatura ambiente con 70 ml del tampón de detección del kit. Finalmente, se procedió al revelado: para ello, se puso en contacto la membrana, durante 15 segundos y a temperatura ambiente, con 11.2 ml de agua ultra pura estéril, 1.25 ml de tampón de detección y 5 ml de sustrato de la fosfatasa alcalina. Se secó el exceso de líquido y se realizó una autorradiografía. El tiempo de exposición fue, aproximadamente, de 4 minutos. Las películas utilizadas fueron “Hyperfilm™” de Amersham Bioscience®.

5.1 ANÁLISIS DE LA LONGITUD DE LOS FRAGMENTOS TELOMÉRICOS DE RESTRICCIÓN

Las películas se escanearon con el programa informático “Quantity one®”. La cuantificación se realizó comparando los resultados obtenidos en cada

muestra tumoral con su pareja no tumoral, empleando el software "Image Gauge 3.46®" de Fujifilm.

La heterogeneidad entre los telómeros de distintos cromosomas y células determina que, tras la hibridación con la sonda complementaria a las repeticiones teloméricas, no se obtenga una única banda, sino un arrastre que abarca todas las longitudes de los fragmentos teloméricos de restricción presentes en cada muestra.

En cada caso, se estableció el parámetro de longitud de telómeros (TRF), que corresponde al valor de la longitud telomérica media en Kb, calculado teniendo en cuenta las diferentes intensidades de la señal de hibridación en función del tamaño. Cuanto mayor es el peso molecular del fragmento, mayor es la densidad óptica, por lo que es necesaria una homogeneización que permita eliminar el sesgo que este hecho produce. Para ello se determinó la longitud media de los TRF en cada muestra empleando la fórmula:

$$\text{Media} = \frac{(\text{DO}_i)}{(\text{DO}_i/\text{Li})}$$

DO_i es la densidad óptica en la posición *i* y Li es la longitud de los TRF, en Kb, en esa posición. Esta fórmula se aplicó en un rango de 0.8 a 21.2 Kb.

6. ENSAYO DE LA MEDIDA DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA

La medida de la actividad telomerasa se llevó a cabo a partir de las proteínas extraídas de las 95 muestras tumorales y no tumorales con el kit de Roche "Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA®", según lo descrito en el apartado "4. Extracción y valoración de proteínas".

Como controles positivos del ensayo, se utilizaron extractos de células de riñón humanas inmortalizadas que expresaban telomerasa, línea 293, a una concentración de, aproximadamente, 10^3 células/ μl . A partir de estos, se prepararon los controles negativos. Para ello, se añadieron a 2 μl del control positivo, 7 μl de agua libre de ARNasas, y se incubaron a 65°C 10 minutos. A continuación, se añadieron ARNasas, siendo la concentración final 10 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$. Se incubaron 30 minutos a 37°C . De esta manera, se degradó el componente ARN de la telomerasa, inactivándose la enzima. También se empleó el tampón de lisis, en sustitución de un extracto proteico, como control negativo.

Se añadieron en diferentes tubos de 0.5 ml, 25 μl de una mezcla de reacción proporcionada por el kit y 2 μl del control positivo ó 10 μl del control negativo preparado anteriormente o los diferentes extractos proteicos. De estos, se llevaron a cabo dos determinaciones en cada caso: en un tubo se realizó el ensayo empleando 10 μg de muestra, y en otro, el análisis sobre el mismo extracto diluido 1:10. De esta forma, se puede controlar la presencia de otras proteínas en el extracto capaces de inhibir a la enzima Taq ADN polimerasa. Cada tubo de 0.5 ml se completó hasta un volumen de 50 μl con agua libre de nucleasas. La mezcla de reacción contenía un tampón Tris HCl, el sustrato de la enzima telomerasa P1-TS (marcado con biotina), los cebadores (P1-TS y P2), nucleótidos y la Taq ADN polimerasa. Todos los tubos se sometieron al programa descrito en la Tabla 5 en un termociclador.

En el primer paso de la reacción, la enzima telomerasa, si está presente, añade repeticiones teloméricas al extremo 3' del cebador P1-TS marcado con biotina. A continuación, los productos de esta elongación son amplificados por PCR usando los cebadores P1-TS y P2.

Una vez finalizó la PCR, se añadieron en tubos nuevos, 20 μl de un agente desnaturizante incluido en el kit, y 5 μl del producto amplificado. Se mezclaron e incubaron 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 225 μl de un tampón de hibridación, también suministrado por el kit. Éste contenía una sonda complementaria a las secuencias repetitivas

teloméricas unida a digoxigenina. De los 0.25 ml que contenía cada tubo, se transfirieron 0.1 ml a una placa de ELISA de 96 pocillos, y se incubaron durante 2 horas con agitación a 37°C, cubriendo los pocillos para evitar la evaporación del contenido. Cada pocillo de la placa estaba tapizado con estreptavidina, la cual se unió a la biotina del cebador P1-TS.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Primera elongación	30 minutos	25°C	1
Inactivación de la enzima telomerasa	5 minutos	94°C	1
Amplificación:			
Desnaturalización	30 segundos	94°C	30
Hibridación	30 segundos	50°C	
Elongación	90 segundos	72°C	
Elongación final	10 minutos	72°C	1

Tabla 5. Programa empleado en la reacción de amplificación para determinar la actividad telomerasa.

Tras la incubación, se aspiró la solución de hibridación y se lavó cada pocillo de la placa 3 veces con 0.25 ml de un tampón de lavado, para eliminar uniones inespecíficas. Este tampón formaba parte del kit. Seguidamente, se adicionó un anticuerpo policlonal antidigoxigenina–peroxidasa, incluido en el kit, a cada pocillo, y a una concentración final de 10 mU/ml, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente con agitación. Se eliminó la solución y se lavó cada pocillo 5 veces con 0.25 ml del tampón de lavado. Finalmente, se añadió 0.1 ml del sustrato, 3, 3', 5, 5'-tetrametil bencidina (TMB). Se incubó la placa a temperatura ambiente 20 minutos con agitación, para que tuviera lugar la reacción. Tras la incubación, se añadió 0.1 ml de una solución que contenía ácido sulfúrico, incluida en el kit, para parar la reacción. Este reactivo causó un cambio de color en los pocillos: de azul a

amarillo. Cuanto mayor es la actividad de la enzima telomerasa, mayor intensidad de color (Figura 17).

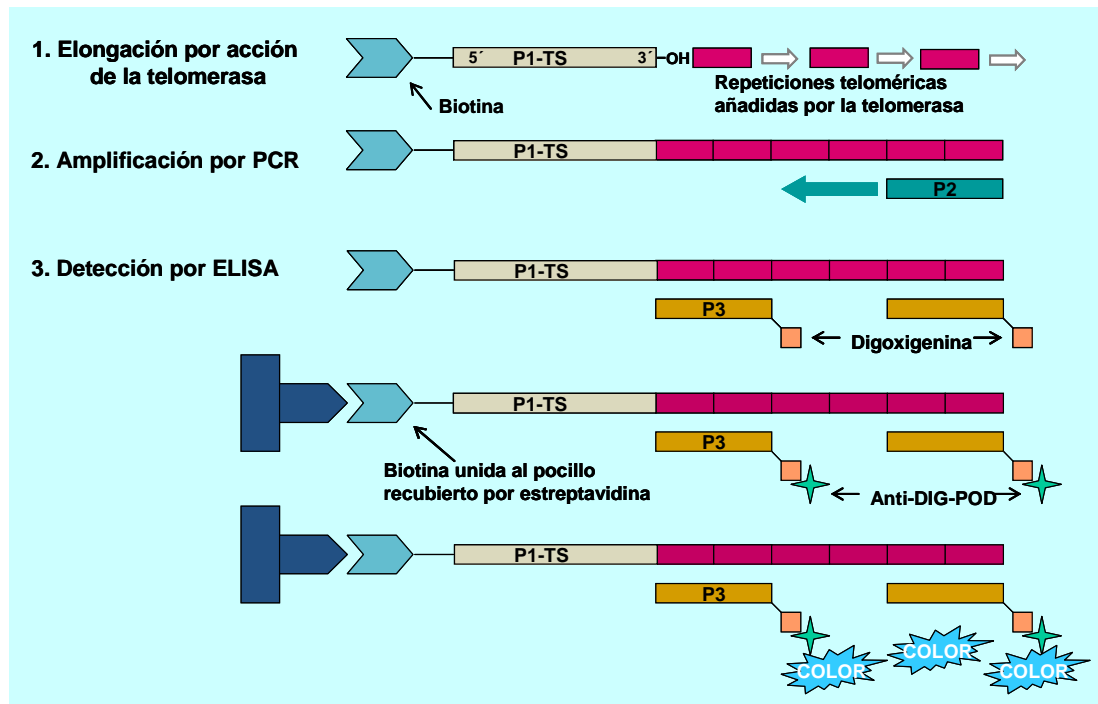


Figura 17. Representación esquemática del ensayo de medida de la actividad telomerasa. P1-TS es el sustrato de la enzima telomerasa y un cebador; P2 es el otro cebador; P3 representa a la sonda complementaria a las secuencias repetitivas teloméricas marcada con digoxigenina (adaptada de la Tesis Doctoral de Cristina García-Aranda, 2006).

6.1 ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA

Con el programa bioinformático “Microplate manager 5.2®”, se midió la absorbancia de cada pocillo a una longitud de onda de 450 nm, usando como referencia una longitud de onda de 690 nm.

Se consideraron telomerasa positivas aquellas muestras cuyo valor de absorbancia ($A_{450} - A_{690}$) fue superior a 0.2. Los controles positivos y negativos se consideraron válidos cuando la absorbancia fue superior a 1.5 e inferior a 0.2, respectivamente.

7. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA CON MATRICES DE ADN COMPLEMENTARIO

Los ensayos de expresión de ARN mensajero se llevaron a cabo utilizando matrices de ADN complementario comerciales. Se siguió el protocolo de “GEArray Q Series Human Genome Stability/DNA Repair Gene Array” de SuperArray®. Gracias a la tecnología de las matrices, fue posible analizar la expresión de 96 genes asociados con el mantenimiento de la estabilidad genómica y con la reparación del ADN. Los genes pertenecen a las siguientes vías:

- Reversión directa del daño en el ADN: *DEPC-1*, *MGMT*.
- Reparación por escisión de bases: *ADPRT*, *ADPRTL2*, *ADPRTL3*, *APEX1* (*APEX*, *REF1*), *APEX2* (*APEXL2*), *FLJ10858*, *LIG3*, *MBD4*, *MUTYH* (*MYH*), *NEIL1*, *NEIL2*, *NTHL1* (*NTH1*), *OGG1*, *SMUG1*, *TDG*, *UNG*, *XRCC1*.
- Reparación por escisión de nucleótidos: *CCNH*, *CDK7*, *CETN2*, *CKN1* (*CSA*), *DDB1*, *DDB2*, *ERCC1*, *ERCC2* (*XPD*), *ERCC3* (*XPB*), *ERCC4* (*XPF*), *ERCC5* (*XPG*), *ERCC6* (*CSB*), *GTF2H1*, *GTF2H2*, *GTF2H3*, *GTF2H4*, *LIG1*, *MNAT1*, *RAD23A* (*HHR23A*), *RAD23B* (*HR23B*), *RPA1*, *RPA2*, *RPA3*, *XAB2* (*HCNP*), *XPA*, *XPC*.
- Reparación de apareamientos incorrectos de bases: *MLH1*, *MLH3*, *MSH2*, *MSH3*, *MSH4*, *MSH5*, *MSH6*, *PMS1*, *PMS2*, *PMS2L3*, *PMS2L4* (*PMS6*).
- Reparación por recombinación homóloga y no homóloga: *BRCA1*, *BRCA2* (*FANCB/FANCD1*), *DCLRE1C* (*SNM1C*), *DMC1*, *G22P1* (*KU70*), *LIG4*, *MRE11A*, *NBS1*, *PRKDC*, *RAD50*, *RAD51C*, *RAD51L1* (*RAD51B*), *RAD51L3* (*RAD51D*), *RAD54B*, *RAD54L*, *XRCC2*, *XRCC3*, *XRCC4*, *XRCC5* (*KU80*).
- Reparación por la ruta dependiente de RAD-6: *RAD18*, *UBE2A* (*RAD6A*), *UBE2B* (*RAD6B*), *UBE2I* (*UBC9*), *UBE2N* (*UBC13*), *UBE2V2* (*MMS2*).
- Otros genes implicados en la estabilidad del genoma: *ATM*, *ATR*, *DCLRE1A* (*SNM1*), *DCLRE1B*, *DUT*, *EXO1*, *FEN1*, *PNKP*, *RECQL4*, *RECQL5*, *TERF1*, *TERF2*, *TERT* (*TCS1*), *TOP3A*, *TOP3B*.

En la matriz, también están incluidos varios genes de expresión constitutiva: *GAPDH*, *CICLOFILINA A*, *RPL13A* y β -*ACTINA*. Asimismo, también están incluidos dos controles negativos: *PUC 18* (ADN bacteriano) y blancos.

Se seleccionaron 21 muestras tumorales, pertenecientes a 21 pacientes, que presentaban una integridad del ARN óptima para la realización del ensayo. Las características clínico-patológicas de estos se resumen en la Tabla 6.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	21
I	13
II	0
IIIA	2
IIIB	3
IV	3
Tipo histológico	21
Adenocarcinoma	9
Carcinoma epidermoide	9
Carcinoma indiferenciado de célula grande	3
Recidiva	21
Positiva	5
Negativa	12
Sospecha	3
No intervalo libre de enfermedad	1

Tabla 6. Características clínico-patológicas de la población de 21 tumores de pulmón en la que se evaluó la expresión del ARN mensajero de 96 genes implicados en la reparación y estabilidad del ADN.

De las 21 muestras tumorales, 11 acertaban significativamente las secuencias teloméricas, esto es, los telómeros en las muestras tumorales mostraban un grado de acortamiento igual o superior al 20% con respecto a los telómeros de la muestra no tumoral. Las 10 muestras tumorales restantes mantenían las secuencias teloméricas, es decir, los telómeros en las muestras tumorales se

acortaban menos de un 20%, o bien, se alargaban, con respecto a su correspondiente muestra no tumoral.

Con respecto a la actividad telomerasa, 6 de ellas carecían de actividad, mientras que 15 mostraron actividad enzimática.

Como control no tumoral, se analizó una mezcla de ARNs procedentes de tejido no tumoral de 8 pacientes.

7.1 SÍNTESIS DE LA SONDA DE ADN COMPLEMENTARIO MARCADO

El primer paso del ensayo consistió en realizar una reacción de retrotranscripción (RT) y marcaje para transformar el ARN mensajero en ADN complementario marcado. Se empleó el kit “AmpoLabeling-LPR™” de SuperArray®. Para ello, se añadieron a un tubo de 0.5 ml, 2 µg de ARN, 1 µl de cebadores, proporcionados por el kit, y se completó volumen hasta 10 µl con agua libre de nucleasas. En un termociclador se aplicó el programa descrito en la Tabla 7, cuyo objetivo era conseguir que los cebadores se unieran al ARN.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Hibridación	3 minutos	70°C	1
Incubación	10 minutos	37°C	1

Tabla 7. Programa empleado para conseguir la unión de los cebadores al ARN.

Mientras se producía la incubación a 37°C, se preparó la mezcla de la reacción de retrotranscripción (Tabla 8), que contenía: tampón 5X GEAlabeling (BN),

agua libre de nucleasas, inhibidor de ARNasas y la enzima transcriptasa reversa. Todos los reactivos fueron suministrados por el kit.

REACTIVOS	1 MATRIZ	2 MATRICES	4 MATRICES
Tampón BN	4 µl	8 µl	16 µl
Agua libre de ARNasas	4 µl	8 µl	16 µl
Inhibidor de ARNasas	1 µl	2 µl	4 µl
Transcriptasa reversa	1 µl	2 µl	4 µl
Volumen final	10 µl	20 µl	40 µl

Tabla 8. Descripción de las cantidades y reactivos empleados en la RT, en función del número de matrices a hibridar.

La mezcla de la reacción se atemperó a 37°C durante 1 minuto. A continuación, se transfirieron 10 µl a cada tubo de 0.5 ml y se incubó a 37°C durante 25 minutos en el termociclador. Para parar la reacción, se aumentó la temperatura hasta 85°C, 5 minutos, lo que no sólo inactivó a la enzima transcriptasa reversa, sino que, además, hidrolizó el ARN. La reacción RT finalizada se mantuvo en hielo.

Para la reacción de marcaje y amplificación del ADN complementario se emplearon los reactivos de la Tabla 9. Por cada reacción RT se usaron 30 µl de la mezcla descrita y se sometió al programa del termociclador reflejado en la Tabla 10.

Finalmente, el ADN complementario se desnaturalizó, sometándolo a 94°C durante 2 minutos e, inmediatamente, introduciéndolo en hielo.

REACTIVOS	1 MATRIZ	2 MATRICES	4 MATRICES
Tampón L	18 µl	36 µl	72 µl
Tampón AF (cebadores específicos)	9 µl	18 µl	36 µl
Biotina-16-dUTP	2 µl	4 µl	8 µl
ADN polimerasa	1 µl	2 µl	4 µl
Volumen final	30 µl	60 µl	120 µl

Tabla 9. Descripción de las cantidades y reactivos empleados en la reacción de marcaje y amplificación del ADN complementario, en función del número de matrices a hibridar.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización inicial	5 minutos	85°C	1
Amplificación: Desnaturalización	1 minuto	85°C	30
Hibridación	1 minuto	50°C	
Elongación	1 minuto	72°C	
Elongación final	5 minutos	72°C	1

Tabla 10. Programa empleado en la reacción de amplificación y marcaje del ADN complementario.

7.2 HIBRIDACIÓN Y DETECCIÓN

Previamente a la síntesis de la sonda de ADN complementario marcada, se prehibridó la matriz. De esta manera, se redujo el tiempo de duración del ensayo, pues el protocolo especificaba que la prehibridación

debía durar entre 1 y 72 horas. El primer paso consistió en humedecer la matriz con 5 ml de agua ultra pura estéril. Se calentó la solución de hibridación, proporcionada por el kit, a 60°C y ADN de esperma de salmón a 100°C durante 5 minutos, enfriándolo en hielo inmediatamente después, para su desnaturalización. Para cada matriz se necesitaron 2 ml de solución de hibridación y ADN de esperma de salmón a una concentración final de 100 µg/ml. Ambos se mezclaron y calentaron a 60°C. Se eliminó el agua de los tubos que contenían las matrices, y se añadió la solución de prehibridación. La prehibridación se realizó en un horno de hibridación a 60°C durante 6 horas, aproximadamente.

Transcurrida la prehibridación y la síntesis de la sonda, se procedió a realizar la hibridación de las matrices. Para ello, se añadió a 0.75 ml de la solución de prehibridación calentada a 60°C, el ADN complementario desnaturalizado y marcado de cada muestra. Se mantuvieron unos minutos a 60°C y se añadieron a los tubos, tras eliminar de estos la solución de prehibridación. La hibridación se desarrolló durante una noche a 60°C en el horno de hibridación.

Finalizada la hibridación, se procedió a realizar una serie de lavados con objeto de eliminar el exceso de sonda que no se unió al ADN complementario de las matrices. Se realizaron 4 lavados de 15 minutos cada uno, a 60°C, en el horno de hibridación. Antes de cada lavado, cada tubo se agitó con el vórtex. Para los dos primeros se empleó una solución compuesta por SSC 2X y SDS 1%; para los dos últimos, SSC 0.1X y SDS 0.5%. La cantidad empleada fue de 5 ml para cada matriz y cada lavado. La sonda se almacenó a -20°C.

Los pasos incluidos en la detección quimioluminiscente se realizaron a temperatura ambiente. Tras eliminar la última solución de lavado, se añadieron 2 ml de la solución de bloqueo, proporcionada por el kit, a cada tubo. Ésta, se precalentó, previamente, a 37°C para disolver los posibles precipitados formados durante su almacenamiento a 4°C. La incubación duró 40 minutos. A continuación, se añadió a cada uno fosfatasa alcalina conjugada con estreptavidina. Ésta se diluyó 1:8.000 en un tampón, tampón

F, proporcionado por el kit y precalentado a 37°C por lo expuesto anteriormente. A cada tubo se le añadieron 2 ml y se incubaron durante 10 minutos. Finalmente, se lavó cada matriz 4 veces con 4 ml del tampón F. Se agitaron con un vórtex entre cada lavado, siendo la duración de cada uno 5 minutos. Se realizaron otros dos lavados con 3 ml de otro tampón incluido en el kit, tampón G, tras lo cual, se añadió a cada tubo 1 ml del sustrato, CDP-Star. Se incubó 5 minutos con él y se procedió a realizar el revelado. Para ello, se secó la matriz del exceso de líquido, se introdujo en un cassette y se expuso una película durante una media de 15 segundos. Las películas utilizadas fueron “Hyperfilm™” de Amersham Bioscience®.

7.3 ANÁLISIS DE LAS MATRICES DE ADN COMPLEMENTARIO

El análisis de las matrices se realizó con el programa “GEArray Expression Analysis Suite” de Superarray®. Primeramente, las películas se escanearon con el programa informático “Quantity one®”. La imagen se guardó en formato Tiff y 16 bits por canal. Los niveles de expresión génica de la población se normalizaron con el gen de expresión constitutiva *PPIA* (*CICLOFILINA A*). El programa de Superarray® nos permitió determinar qué genes estaban expresados ± 2 veces en las distintas muestras tumorales con respecto a la población no tumoral. Asimismo, se determinaron las diferencias de expresión entre la población de tumores que mostraba un acortamiento significativo de los telómeros y aquella que los mantenía. En el estudio también se evaluaron las diferencias de expresión entre los tumores que mostraron actividad telomerasa y aquellos en los que no se detectó actividad.

8. EVALUACIÓN DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN GÉNICA MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

El ensayo de expresión de ARN mensajero con matrices de ADN complementario nos permitió seleccionar una serie de genes cuyos niveles de expresión se validaron mediante la técnica PCR cuantitativa a tiempo real. Este ensayo, basado en la PCR convencional, es altamente sensible y permite detectar pequeños cambios en los niveles de expresión génica, pues determina, en tiempo real, la amplificación del fragmento de interés.

Partiendo de ARN, se realiza una retrotranscripción, transformando el ARN mensajero en ADN complementario, y éste se hibrida con una sonda fluorescente de longitud entre 20 y 26 nucleótidos diseñada para unirse entre los cebadores. La sonda lleva unida en el extremo 5' un fluoróforo y en el extremo 3' un amortiguador de la fluorescencia. Cuando la sonda está intacta, la proximidad de ambos implica una supresión de la fluorescencia. Durante la reacción de PCR, y gracias a la actividad nucleasa 5'→3' de la enzima ADN polimerasa, ambas moléculas se separan, lo que da como resultado un aumento de la fluorescencia a medida que se forman nuevos productos de PCR. Este proceso ocurre en cada ciclo y no interfiere con la acumulación exponencial del producto. La Figura 18 ilustra la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.

En cada ciclo, se duplica la cantidad de ADN hasta que llega a una fase de meseta. Esto se refleja en un gráfico, Figura 19, en el que en el eje de ordenadas están representadas las unidades arbitrarias de fluorescencia y en el eje de abscisas el número de ciclos. La PCR cuantitativa a tiempo real se basa en evaluar la reacción de amplificación cuando está en fase logarítmica: se determina el número de ciclo a partir del cual el aumento de fluorescencia es logarítmico. Este punto se llama umbral, lo establece el usuario, y el número de ciclo que lo cruza se denomina C_T .

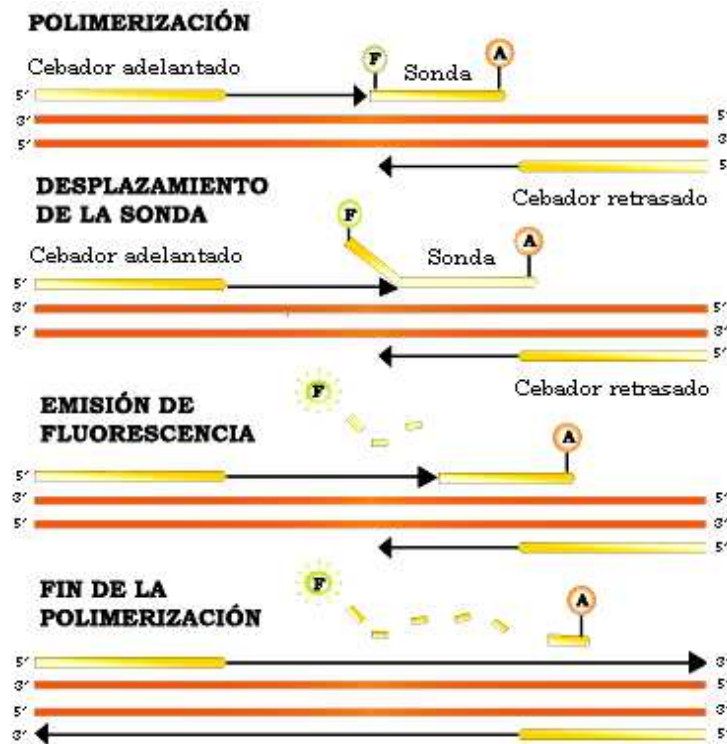


Figura 18. Esquema representativo de la técnica PCR cuantitativa a tiempo real. La “F” representa al fluoróforo y la “A” a la molécula que amortigua la fluorescencia.

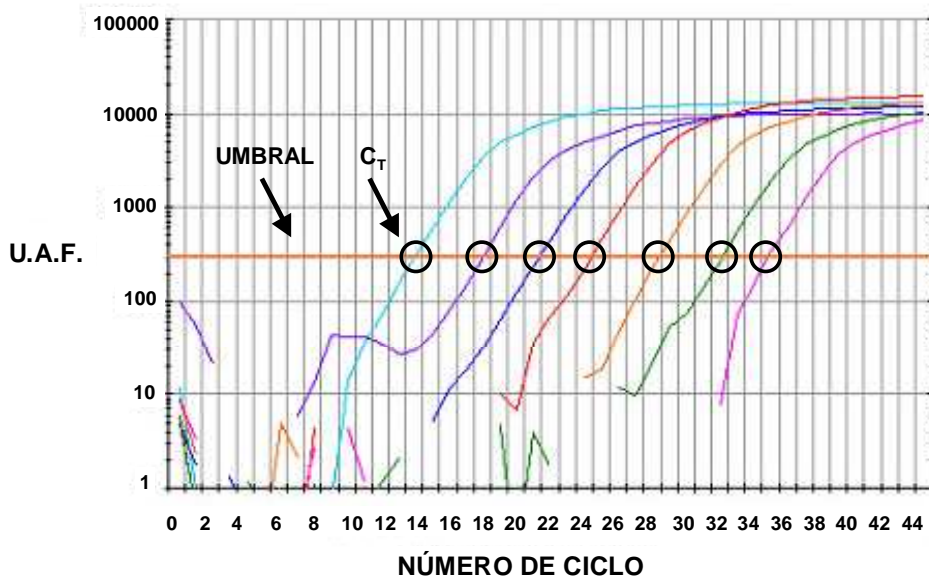


Figura 19. Representación gráfica de la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real. En el eje de ordenadas están representadas las unidades arbitrarias de fluorescencia (U.A.F.) y en el eje de abscisas el número de ciclos. La línea horizontal naranja marca el umbral y, el punto donde se cruzan con ella las curvas de amplificación, el C_t .

El ensayo de PCR cuantitativa a tiempo real se realizó en 37 muestras tumorales, incluidas las 21 analizadas con las matrices de ADN complementario, así como en la mezcla de 8 muestras de tejido no tumoral empleada como control en el estudio de matrices. El número de muestras tumorales con acortamiento significativo de las secuencias teloméricas, con respecto a su correspondiente muestra no tumoral, fue 22, mientras que 15 mantenían la longitud de éstas. Con respecto a la actividad telomerasa, 10 muestras tumorales carecían de actividad enzimática, mientras que se detectó actividad en 27.

Las características clínico-patológicas de las 37 muestras tumorales quedan reflejadas en la Tabla 11.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	37
I	20
II	0
IIIA	5
IIIB	4
IV	4
Desconocido	4
Tipo histológico	37
Adenocarcinoma	12
Carcinoma epidermoide	17
Carcinoma indiferenciado de célula grande	4
Desconocido	4
Recidiva	37
Positiva	8
Negativa	20
Sospecha	3
No intervalo libre de enfermedad	2
Desconocido	4

Tabla 11. Características clínico-patológicas de la población de 37 tumores de pulmón en la que se evaluó la expresión del ARN mensajero de distintos genes mediante PCR cuantitativa a tiempo real.

8.1 SÍNTESIS DEL ADN COMPLEMENTARIO

Para sintetizar ADN complementario a partir de ARN se empleó el kit “High-Capacity cDNA Archive” de Applied Biosystems®. Se partió de 2 µg de ARN, diluyéndolo hasta un volumen de 50 µl con agua libre de nucleasas. A continuación, se preparó la mezcla de la reacción de retrotranscripción 2X, utilizando los componentes que proveía el kit. Las cantidades y reactivos empleados están descritos en la Tabla 12. El inhibidor de ARNasas no estaba incluido en el kit y fue adquirido de la casa comercial Applied Biosystems®.

REACTIVOS	VOLUMEN (µl)/ REACCIÓN
10X Tampón de la reacción de retrotranscripción	10 µl
25X Mezcla de dNTPs	4 µl
10X cebadores que hibridan al azar	10 µl
Enzima transcriptasa reversa MultiScribe™ 50 U/µl	5 µl
Inhibidor de ARNasas 50 U/µl	5 µl
Agua libre de nucleasas	16 µl
Volumen final	50 µl

Tabla 12. Descripción de los reactivos y cantidades empleados en la reacción de retrotranscripción.

La reacción de retrotranscripción se realizó en un termociclador aplicando el programa descrito en la Tabla 13.

	TIEMPO	TEMPERATURA
Hibridación de los cebadores	10 minutos	25°C
Retrotranscripción	120 minutos	37°C

Tabla 13. Programa utilizado en la síntesis de ADN complementario a partir del ARN.

La concentración final obtenida de ADN complementario fue de 20 ng/ μ l en un volumen de 100 μ l. Éste se alicuoteó y almacenó a -20°C hasta su uso.

8.2 COMPROBACIÓN DE LA REACCIÓN DE RETROTRANSCRIPCIÓN

Para comprobar que la reacción había tenido lugar adecuadamente, se realizó una PCR de comprobación empleando cebadores exón-exón de la enzima *GAPDH*. Estos cebadores presentan la característica de que sólo hibridan con el ADN complementario, evitando interferencias con ADN genómico. Los cebadores se adquirieron de la casa comercial Sigma-Aldrich®, siendo su secuencia la siguiente:

- Cebador adelantado: 5' GATCATCAGCAATGCCTCCTG 3'
- Cebador retrasado: 5' TGGCATGGACTGTGGTCATG 3'

Los demás reactivos empleados en la reacción de PCR, así como las concentraciones y cantidades empleadas, están descritos en la Tabla 14.

Tras preparar la mezcla de reacción en un tubo de 0.5 ml, éste se sometió al programa detallado en la Tabla 15, en un termociclador.

Finalizada la reacción de amplificación, se realizó un gel de agarosa al 2% con TBE 1X, al que se le añadió bromuro de etidio para poder visualizar el

producto de la PCR. El tamaño de éste era de 100 pares de bases. Se cargaron 20 μl del producto amplificado junto al tampón de carga 1X. Como marcador de peso molecular, se empleó Ecoladder 4, de la casa comercial Ecogen, cargándose 10 μg . El rango de pesos moleculares va desde 100 pares de bases hasta 1.000, de 100 en 100, exceptuando el fragmento de 900 pares de bases. La electroforesis se realizó a 120V durante 30 minutos.

REACTIVOS (CASA COMERCIAL)	VOLUMEN (μl)/ REACCIÓN
10X Tampón sin MgCl_2 (Biotherm™)	5 μl
MgCl_2 50 mM (Biotherm™)	2 μl
Mezcla de dNTPs 10 mM (Promega®)	1 μl
ADN polimerasa 5 U/μl (Biotherm™)	0.25 μl
Cebador adelantado 10 μM (Sigma®)	1 μl
Cebador retrasado 10 μM (Sigma®)	1 μl
Agua libre de nucleasas	38.75 μl
ADN complementario	1 μl
Volumen final	50 μl

Tabla 14. Descripción de los reactivos y cantidades empleados en la reacción de PCR para amplificar un fragmento de ADN complementario de *GAPDH*. Entre paréntesis aparece la casa comercial que nos suministró los reactivos.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización	2 minutos	94°C	1
Amplificación:			
Desnaturalización	30 segundos	94°C	40
Hibridación	30 segundos	55°C	
Elongación	90 segundos	72°C	
Elongación final	10 minutos	72°C	1

Tabla 15. Programa empleado en la reacción de amplificación del fragmento de ADN complementario de *GAPDH*.

8.3 PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Para realizar la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real se empleó el kit “TaqMan® Gene Expression Assays” de Applied Biosystems®. En cada ensayo se empleaban dos cebadores específicos no marcados, para amplificar la secuencia de interés, y una sonda MGB (*Minor Groove Binder*) TaqMan® específica marcada con el fluoróforo 6-FAM™ en el extremo 5’ y un amortiguador de la fluorescencia no fluorescente (NFQ, *Non Fluorescent Quencher*) en el extremo 3’. Estos componentes venían formulados como una única mezcla 20X (sonda 250nM y cebadores 900nM cada uno, concentración final). Las sondas adquiridas, salvo la dirigida frente a *GTF2H1*, eran de tipo *m*, es decir, estaban diseñadas para hibridar en la zona de unión de dos exones, de manera que así se descartaba la emisión de fluorescencia como consecuencia de la amplificación de ADN genómico. La sonda dirigida frente a *GTF2H1* era de tipo *g*, es decir, podía detectar ADN genómico. Las sondas empleadas fueron específicas de las siguientes moléculas: *DCLRE1C*, *ERCC3*, *FLJ10858*, *GTF2H1*, *MLH1*, *MSH4*, *MSH6*, *NTHL1*, *PARP1*, *PARP3*, *PMS1*, *PPIA*, *PRKDC*, *TERT*, *TOP3B*, *TRF1*, *TRF2*, *XAB2* y *XRCC5*.

Además de la sonda y los cebadores específicos, para realizar la amplificación se requirieron desoxinucleótidos, un tampón óptimo para la reacción y la enzima ADN polimerasa. Estos componentes se adquirieron de Applied Biosystems®, en forma de una mezcla de reacción llamada “TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG”. La enzima incluida en esta mezcla era AmpliTaq Gold® y tenía la peculiaridad de activarse sólo a altas temperaturas, no requiriendo activación previa. La Tabla 16 muestra las cantidades de cada componente empleadas en la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.

REACTIVOS	VOLUMEN (µl)/ REACCIÓN
Mezcla de los cebadores y la sonda 20X	1 µl
TaqMan® Fast Universal PCR Master Mix (2X), No AmpErase® UNG	10 µl
Agua libre de nucleasas	8 µl
ADN complementario	1 µl
Volumen final	20 µl

Tabla 16. Descripción de los reactivos y cantidades empleados en la reacción de PCR cuantitativa a tiempo real.

Para llevar a cabo la reacción se partió de 20 ng de ADN complementario, siendo cantidad suficiente para obtener una detección óptima con todos los ensayos. Las amplificaciones de cada muestra se realizaron por duplicado y en una placa de 96 pocillos (“Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plate with Barcode”, de Applied Biosystems®). Asimismo, se incluyeron dos controles negativos por ensayo para confirmar que la amplificación obtenida era exclusivamente debida al ADN complementario de la muestra en estudio.

Estos consistieron en agua libre de nucleasas, sonda y cebadores específicos del gen analizado y mezcla de reacción. Cada placa se repitió, al menos, dos veces.

En la Tabla 17 queda reflejado el programa del termociclador empleado para llevar a cabo la amplificación.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización	20 segundos	95°C	1
Amplificación: Desnaturalización	1 segundo	95°C	40
Hibridación/ Elongación	20 segundos	60°C	

Tabla 17. Programa empleado en la amplificación por PCR cuantitativa a tiempo real.

Para determinar si la sonda *g* dirigida frente a *GTF2H1* detectaba ADN genómico, se realizó una RT en la que estaban presentes todos los componentes necesarios para que tuviera lugar la reacción, salvo la enzima transcriptasa reversa. A continuación, se comprobó que no había habido amplificación mediante el procedimiento descrito en el apartado “8.2 Comprobación de la reacción de retrotranscripción” y se realizó una PCR cuantitativa a tiempo real. Al no detectarse emisión de fluorescencia, se determinó que el ensayo podía ser usado en nuestras muestras.

8.4 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

El procedimiento empleado para analizar los datos de PCR cuantitativa a tiempo real fue el método comparativo C_T . Este método se basa en comparar los valores C_T de la muestra de interés con el de un control o calibrador que, en nuestro caso, fue la mezcla de muestras no tumorales. Ambos C_T fueron normalizados con *PPIA*, el gen de expresión constitutiva empleado en las matrices de ADN complementario.

Las fórmulas para determinar los niveles de expresión del ARN mensajero de la muestra estudiada fueron las siguientes:

$$[\Delta]C_{T \text{ muestra}} = C_{T \text{ muestra}} - C_{T \text{ endógeno}}$$

$$[\Delta]C_{T \text{ calibrador}} = C_{T \text{ calibrador}} - C_{T \text{ endógeno}}$$

$$[\Delta][\Delta]C_T = [\Delta]C_{T \text{ muestra}} - [\Delta]C_{T \text{ calibrador}}$$

$RQ = 2^{-[\Delta][\Delta]C_T}$ = número de veces que se expresa el gen de interés con respecto al calibrador.

El valor de RQ del calibrador es 1. Está aceptado, de manera general, que la interpretación de los resultados sea la siguiente:

- $RQ < 0.5$: expresión de ARN mensajero en la muestra tumoral, al menos, la mitad que en la mezcla control.
- $0.5 \leq RQ \leq 2$: expresión de ARN mensajero en la muestra tumoral similar a la mezcla control.
- $RQ > 2$: expresión de ARN mensajero en la muestra tumoral, al menos, el doble que en la mezcla control.

9. ACTIVIDAD TELOMERASA Y PARP3

De los genes que mostraron diferencias significativas de expresión de ARN mensajero, en función de la actividad telomerasa, se profundizó en el estudio

de *PARP3*. Éste se localiza en el brazo corto del cromosoma 3, región 3p21.31-p21.1. Dicha región se ha relacionado con la carcinogénesis pulmonar, ya que las deleciones en 3p representan la alteración citogenética más frecuente en cáncer de pulmón. De hecho, alrededor del 75% de los CNMPs presentan deleciónada esa zona. Asimismo, ha sido descrita la existencia, en dicha región, de genes supresores de tumores relacionados con la regulación negativa de la actividad telomerasa. Por todo ello, nos propusimos profundizar en el estudio *PARP3*. En primer lugar, se analizaron pérdidas de heterozigosidad (LOHs) en 2 marcadores polimórficos cercanos a *PARP3*. Seguidamente, se llevaron a cabo análisis de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en dicho gen. Por último, se estableció un estudio *in vitro* para intentar determinar variaciones de actividad telomerasa en función de diferencias en la expresión de *PARP3*.

9.1 DETERMINACIÓN DE PÉRDIDAS DE HETEROZIGOSIDAD (LOHs) EN LOCI CERCANOS A PARP3

Debido a la no existencia de marcadores polimórficos en *PARP3*, cromosoma 3p *locus* 51951401-51957921 (coordinadas VEGA), se realizó un ensayo de pérdidas de heterozigosidad en las regiones más cercanas al gen: *loci* 51882304-51882524 y 52316909-5231713 (Figura 20).

Los cebadores para analizar los marcadores polimórficos, D3S3026 y D3S3561, fueron sintetizados por la casa comercial Sigma® y sus secuencias fueron las siguientes:

- D3S3026: 5' GCATCTTTGGTCCCAGCTAC 3'
3' TAAATGGAACACCCTGTGGT 5'
- D3S3561: 5' TCCTGGGGACTGTGATG 3'
3' GGTGACTGGAGGTTCAAG 5'

En el extremo 5' del cebador adelantado se une un fluoróforo para su posterior detección. En el caso de D3S3026 fue 6-FAM y para D3S3561, TET. Debido a

que la emisión de fluorescencia se produce a distinta longitud de onda, ambos marcadores pudieron ser analizados simultáneamente, si bien la reacción de amplificación se realizó por separado. Los tamaños de los fragmentos amplificados fueron de 209-226 y 185-229 pares de bases, respectivamente.

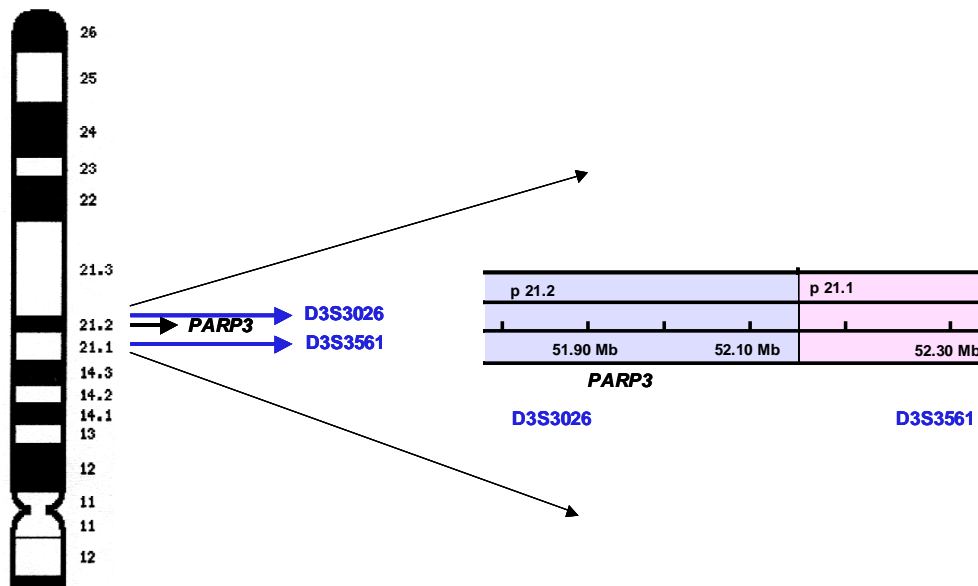


Figura 20. A la izquierda, representación esquemática del brazo corto del cromosoma 3 donde se encuentran el gen *PARP3* y los marcadores empleados para el estudio de LOHs. Las flechas indican el *loci* de cada uno de ellos. A la derecha, ampliación de la zona donde se localizan *PARP3* y los marcadores D3S3026 y D3S3561.

El ensayo se llevó cabo en 95 CNMPs, la serie completa investigada en esta Tesis. El estudio de pérdidas de heterocigosidad se realizó únicamente en las muestras informativas, es decir, aquellas en las que se detectó heterocigosidad, lo que se determinó por el diferente tamaño de los alelos del marcador correspondiente, cuando se analizaron las muestras no tumorales de cada paciente. De ahí, que el número de pacientes que formaron parte del estudio para el marcador D3S3026 fuera 64; en el caso del marcador D3S3561 fueron 69 y, cuando se estudiaron ambos simultáneamente, sólo 50 pacientes pudieron ser evaluados. En las Tablas 18, 19 y 20 se resumen,

respectivamente, las características clínico-patológicas de los tumores que formaron parte de cada grupo.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	64
I	38
II	4
IIIA	18
IIIB	1
IV	3
Tipo histológico	64
Adenocarcinoma	28
Carcinoma epidermoide	34
Carcinoma indiferenciado de célula grande	2
Recidiva	64
Positiva	15
Negativa	45
Sospecha	3
No intervalo libre de enfermedad	1

Tabla 18. Características clínico-patológicas de la población de 64 tumores de pulmón en la que evaluó la existencia de LOHs en el *locus* D3S3026.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	69
I	38
II	4
IIIA	23
IIIB	1
IV	3
Tipo histológico	69
Adenocarcinoma	26
Carcinoma epidermoide	41
Carcinoma indiferenciado de célula grande	2
Recidiva	69
Positiva	21
Negativa	43
Sospecha	3
No intervalo libre de enfermedad	2

Tabla 19. Características clínico-patológicas de la población de 69 tumores de pulmón en la que evaluó la existencia de LOHs en el *locus* D3S3561.

Se emplearon 50 ng de ADN genómico para la amplificación del posible fragmento polimórfico con cada uno de los marcadores. Los reactivos y concentraciones de cada amplificación (Tabla 21), así como el programa del termociclador (Tabla 22) fueron los mismos para los análisis de los dos marcadores considerados.

Tras las sucesivas amplificaciones, se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 1.2% con TBE 1X y bromuro de etidio para poder visualizar las bandas. Se cargaron 5 µl de muestra junto al tampón de carga 1X. Como marcador de peso molecular, se emplearon 10 µg de ΦX 174 DNA/Hae III (Promega®). Los pesos moleculares del marcador son los siguientes: 118 pares de bases, 194 pares de bases, 234 pares de bases, 271 pares de bases, 281 pares de bases, 310 pares de bases, 603 pares de bases, 872 pares de bases, 1078 pares de bases y 1353 pares de bases. La electroforesis se desarrolló durante 30 minutos a 120V.

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS	Nº DE CASOS
Estadio	50
I	29
II	3
IIIA	15
IIIB	1
IV	2
Tipo histológico	50
Adenocarcinoma	20
Carcinoma epidermoide	29
Carcinoma indiferenciado de célula grande	1
Recidiva	50
Positiva	16
Negativa	33
Sospecha	1

Tabla 20. Características clínico-patológicas de la población de 50 tumores de pulmón en la que evaluó la existencia de LOHs en los loci D3S3026 y D3S3561.

Para el análisis de LOHs, 1 μ l de cada uno de los productos de la reacción de amplificación de los dos marcadores, se desnaturalizó con 25 μ l de formamida desionizada (Applichem). Asimismo, se añadieron 0.5 μ l de “GeneScan™ 500 TAMRA Size™ Standard” (Applied Biosystems®), marcador de peso molecular interno. La mezcla se analizó con el aparato Abi Prism™ 310 Genetic Analyser, de Applied Biosystems®.

REACTIVOS (CASA COMERCIAL)	VOLUMEN (µl)/ REACCIÓN
10X Tampón sin MgCl₂ (Biotherm™)	2 µl
MgCl₂ 50 mM (Biotherm™)	1 µl
Mezcla de dNTPs 10 mM (Promega®)	0.2 µl
ADN polimerasa 5 U/µl (Biotherm™)	0.3 µl
Cebador adelantado 2µM (Sigma®)	2 µl
Cebador retrasado 2µM (Sigma®)	2 µl
Agua libre de nucleasas	c.s.p. 20 µl
Volumen final	20 µl

Tabla 21. Reactivos y cantidades empleados en la reacción de amplificación de los marcadores polimórficos D3S3026 y D3S3561. Entre paréntesis figura la casa comercial de la que se adquirieron los distintos productos.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización	4 minutos	95°C	1
Amplificación:			
Desnaturalización	10 segundos	95°C	35
Hibridación	10 segundos	62°C	
Elongación	20 segundos	72°C	
Elongación final	7 minutos	72°C	1

Tabla 22. Programa empleado en la reacción de amplificación de los marcadores polimórficos D3S3026 y D3S3561.

9.1.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE LOHs EN LOCI CERCANOS A PARP3

Para el análisis de la posible pérdida de heterocigosidad se empleó el programa informático “310 GeneScan® 3.1”, de Applied Biosystems®. Se comparó cada muestra tumoral con su correspondiente muestra de tejido control. Se aplicó la siguiente fórmula:

$$\text{LOHs} = \frac{\text{Fluorescencia Alelo 2 tumoral} / \text{Fluorescencia Alelo 1 tumoral}}{\text{Fluorescencia Alelo 2 no tumoral} / \text{Fluorescencia Alelo 1 no tumoral}}$$

La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- $0.5 \leq \text{Cociente} \leq 1.5$: el paciente no tenía LOHs en la muestra tumoral.
- $\text{Cociente} < 0.5$ ó > 1.5 : el paciente tenía LOHs en la muestra tumoral.

9.2 DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN EL GEN PARP3

El objetivo de estos ensayos fue comprobar si en el *locus* donde se sitúa *PARP3* existen polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphism*) entre los pacientes con CNMP incluidos en esta Tesis.

Para ello, se empleó el kit “TaqMan® SNP Genotyping Assays” de Applied Biosystems®. Este ensayo permite su detección y amplificación en muestras de ADN genómico. De esta manera, se puede genotipar a distintos individuos para un SNP específico.

La casa comercial suministra los cebadores para la amplificación de la secuencia polimórfica de interés, así como dos sondas MGB TaqMan®. Una de ellas, marcada con el fluoróforo VIC™ en el extremo 5', detecta el alelo 1, el más común, y la otra, marcada con el fluoróforo 6-FAM™ en el extremo 5', detecta el alelo 2. En el extremo 3' de ambas sondas se encuentra NFQ. La detección está basada en la emisión de fluorescencia de ambas moléculas, a

distintas longitudes de onda, al ser liberadas durante la amplificación del producto, como se describió en el apartado “8. Evaluación de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real” (Figura 21).

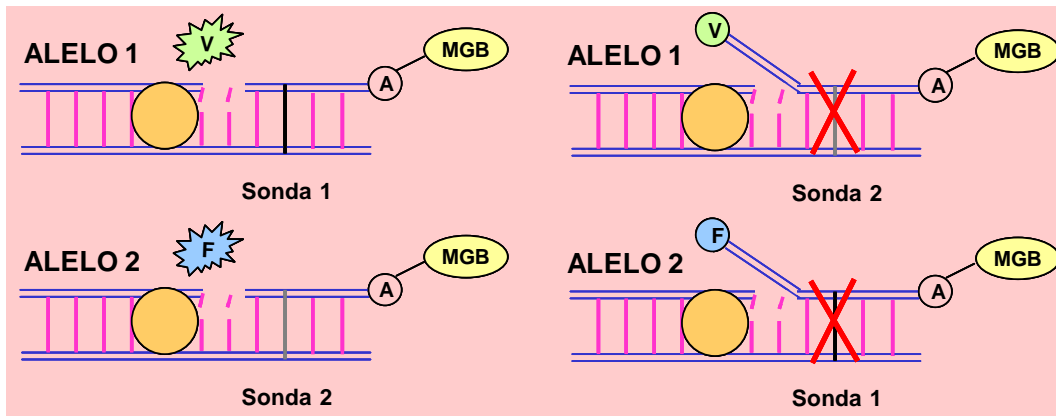


Figura 21. Ilustración de la reacción de discriminación alélica basada en la amplificación y detección con sondas marcadas con fluoróforos. La “F” y la “V” representan a los fluoróforos y la “A” a la molécula que amortigua la fluorescencia.

Se analizaron las muestras no tumorales de los 94 pacientes afectados de CNMP incluidos en esta Tesis. De uno de los pacientes no se dispuso de ADN de la muestra control para llevar a cabo este estudio.

La mezcla de cebadores y sondas se preparó a la concentración requerida, 20X, diluyéndola en TE (Tris-HCl 10mM y EDTA 1mM, pH 8). Se emplearon 2 sondas diferentes, correspondientes a 2 SNPs, que habían sido validadas por la casa comercial:

- Localización: 51953367. Polimorfismo T/C. Rs 323868. La frecuencia de este polimorfismo había sido previamente analizada en una población caucásica de 62 individuos, siendo de un 3.2%.
- Localización: 51957291. Polimorfismo T/C. Rs 188953. La frecuencia de este polimorfismo había sido previamente analizada en dos poblaciones europeas de 116 y 118 individuos, siendo de un 1% en ambos estudios.

Las concentraciones y componentes empleados en la reacción de amplificación y detección se detallan en la Tabla 23.

REACTIVOS	VOLUMEN (μl)/ REACCIÓN
Mezcla de los cebadores y la sonda 20X	0.5 μ l
TaqMan® Genotyping Master Mix (Applied Biosystems®)	5 μ l
ADN genómico diluido en agua libre de nucleasas (20 ng)	4.5 μ l
Volumen total	10 μ l

Tabla 23. Descripción de los reactivos y cantidades empleados en la reacción de discriminación alélica.

Las amplificaciones de cada muestra y cada sonda se realizaron por duplicado y en dos ensayos independientes en una placa de 96 pocillos (“Optical 96-Well Fast Thermal Cycling Plate with Barcode”, de Applied Biosystems®). Se incluyeron dos controles negativos por sonda ensayada para confirmar que la amplificación obtenida era exclusivamente debida al ADN genómico de la muestra en estudio. Estos consistieron en agua libre de nucleasas, sonda y cebadores específicos del SNP analizado y mezcla de reacción.

El programa de amplificación es el descrito en la Tabla 24.

	TIEMPO	TEMPERATURA	NÚMERO DE CICLOS
Desnaturalización inicial	10 minutos	95°C	1
Amplificación: Desnaturalización Hibridación/ Elongación	15 segundos 1 minuto	92°C 60°C	40

Tabla 24. Programa empleado en la reacción de discriminación alélica por PCR.

9.2.1 ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS DE SNPs EN EL GEN PARP3

El análisis de los resultados se realizó con el programa informático “Sequence Detection System (SDS)” de Applied Biosystems®. Este programa mide la fluorescencia emitida por cada fluoróforo durante la reacción en cada pocillo y, de esta manera, determina qué genotipo presenta cada muestra.

9.3 ESTUDIO DE LA RELACIÓN ENTRE TELOMERASA Y PARP3 UTILIZANDO LÍNEAS CELULARES DE CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN

Para llevar a cabo los estudios *in vitro* de la actividad telomerasa y su posible regulación por la proteína PARP3, se dispuso de 2 líneas celulares humanas de CNMP: NCI-H522 (H522) y A549 (Figura 22).

La línea celular H522 (número de la ATCC® CRL-5810™) corresponde a un adenocarcinoma de estadio II de un varón caucásico de 60 años de edad. Posee una mutación en el codon 12 del gen *K-ras* y una mutación en el codon 191 del gen *p53*. Son células incapaces de sintetizar el péptido neuromedina B y el péptido de liberación de gastrina. La tinción para keratina y vimentina es positiva pero son negativas para la tinción de la proteína neurofilamentosa.

La línea celular A549 (número de la ATCC® (*American Type Culture Collection*) CCL-185™) pertenece a un carcinoma de un varón caucásico de 58 años. Se aisló en 1972. Es positiva para la keratina, mediante la tinción con inmunoperoxidasa, y sintetiza lecitina y keratina.

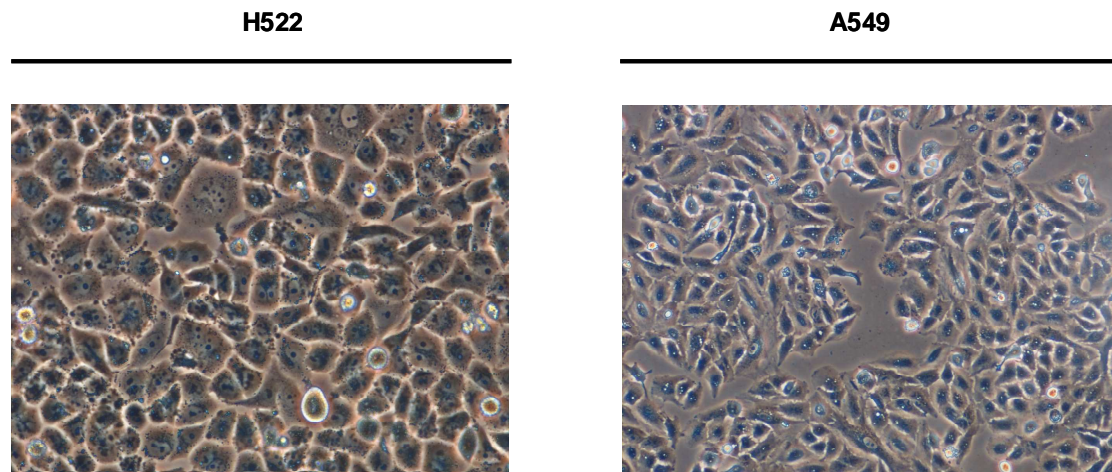


Figura 22. Líneas celulares H522 y A549 de CNMP.

Los ensayos encaminados a determinar la posible influencia de PARP3 en la actividad telomerasa sólo pudieron realizarse en la línea celular A549. No se alcanzó una tasa de transfección óptima en las células H522, pese a que se emplearon distintos métodos.

9.3.1 MANTENIMIENTO, PROPAGACIÓN, CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549

El medio de mantenimiento de la línea celular fue el recomendado por la ATCC®: medio Ham's F12K con glutamina (Gibco®) suplementado con un 10% de suero fetal bovino (Gibco®), una mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X (Gibco®) y plasmocin 5 µg/ml (Invivogen).

La propagación de las células se realizó en un incubador a 37°C y con un 5% de CO₂.

Cada vez que se cambiaba el medio a las células, se dividían o se preparaban para congelar, se lavaban con PBS 1X, preparado a partir de PBS 10X (Gibco®), al que se le añadía una mezcla de antibióticos y antimicóticos 1X, ajustándose el pH a 7-7.5 con NaOH 1N.

Cuando las células presentaban un grado de confluencia mayor a un 90%, se dividían. Para ello, se lavaban con PBS 1X y, tras aspirarlo, se añadía 1 ml, aproximadamente, de tripsina (Gibco®) a cada plato. Se aspiraba ésta y se incubaban las células 1 ó 2 minutos a 37°C. Una vez levantadas, se añadía medio y se repartían equitativamente en el número de platos deseado.

Para congelar las células, una vez estuvieran a confluencia, se usó suero fetal bovino y DMSO (Sigma-Aldrich®) al 10%. Se lavaban y tripsinizaban, según lo descrito en los dos párrafos anteriores, y se añadía el suero con el DMSO a cada plato. La suspensión de células se recogía en unos viales, “CryoTube™ Vials” (Nunc™), y se introducía a -80°C usando un congelador especial, “Cryo 1°C Freezing Container” (Nalgene™), que contenía isopropanol para que las células se congelasen paulatinamente. Tras 24 horas, las células se almacenaban en nitrógeno líquido.

El proceso de descongelación se hacía rápidamente. Las células se sacaban del tanque de nitrógeno líquido y se descongelaban a 37°C. Una vez estaban listas, se sembraban en los platos que contenían el medio, y se introducían en el incubador. Cuando las células estaban pegadas en el plato, se cambiaba el medio, previo lavado con PBS 1X, pues el DMSO es tóxico para las células.

9.3.2 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549

9.3.2.1 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ARN MENSAJERO DE PARP3

Inicialmente, se evaluaron los niveles de expresión génica de *PARP3* mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello, se sembraron las células y, una vez

estuvieron a confluencia, se extrajo el ARN, aplicando el método descrito en el apartado “2.1 Extracción del ARN”. El precipitado obtenido se resuspendió en 20 μ l de agua libre de nucleasas.

Para determinar los niveles de ARN mensajero, se siguió el protocolo descrito en el apartado “8. Evaluación de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real”. Se emplearon los mismos controles negativos y el gen de referencia fue, nuevamente, *PPIA*. Los resultados se expresaron como $[\Delta]C_T$, pues no había calibrador.

9.3.2.2 DETERMINACIÓN DE LOS NIVELES DE ACTIVIDAD TELOMERASA

Para medir la actividad telomerasa de la línea celular A549, se empleó el método TRAP, descrito en el apartado “6. Ensayo de la medida de la actividad telomerasa”, con ligeras modificaciones. El kit usado fue “Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA^{PLUS}”, de Roche®. La variación que presenta este kit, es la presencia de una secuencia interna de 216 pares de bases que permite determinar si existen inhibidores de la enzima Taq ADN polimerasa en la muestra y, por tanto, evita falsos negativos. Además, permite cuantificar los niveles de actividad telomerasa, mientras que el otro método es semicuantitativo.

La extracción de proteínas se realizó una vez estuvieron los platos a confluencia, siguiendo el protocolo descrito en el apartado “4. Extracción y valoración de proteínas”.

Para determinar la actividad enzimática de telomerasa, se partió de 5 μ g de extracto proteico. A diferencia del ensayo TRAP realizado en el apartado “6. Ensayo de la medida de la actividad telomerasa”, al extracto proteico y a la mezcla de reacción se le añadió la secuencia interna que, posteriormente, sería amplificada por la enzima polimerasa. Tras la reacción de amplificación, el producto resultante se separó en dos tubos, se desnaturalizó y se incubó cada uno con un tampón distinto: uno de ellos contenía la sonda que hibridaría con las secuencias teloméricas, si había habido elongación de éstas por parte de la

enzima telomerasa; el otro contenía una sonda que hibradaría con la secuencia interna. A partir de aquí, el protocolo del ensayo es igual que el del kit “Telo TAGGG Telomerase PCR ELISA”.

Como controles negativos de la actividad telomerasa se emplearon, por un lado, el extracto proteico de la línea celular, tras tratarlo con ARNasas y calor, de la misma manera que se describió en el apartado “6. Ensayo de la medida de la actividad telomerasa”, para inactivar el componente ARN de la enzima telomerasa; por otro lado, se incluyó el tampón de lisis, que sustituyó a los extractos proteicos.

Los controles positivos los suministró el kit y consistían en 8 repeticiones teloméricas, a distintas concentraciones. Estos, además, también actuaron como controles positivos de la amplificación de la secuencia interna.

9.4. OBTENCIÓN DEL ADN COMPLEMENTARIO DE PARP3 PARA TRANSFECTAR EN LA LÍNEA CELULAR A549

Se adquirió un clon de bacterias transformadas con el plásmido que contenía la secuencia completa del gen *PARP3*, “Ultimate™ ORF Clon” (Invitrogen™). Este plásmido, llamado vector de entrada, posee la característica de poder recombinarse con un vector de destino (Invitrogen™), esto es, el ADN complementario de *PARP3* pasa del primer vector a un segundo vector que contiene un promotor de alta expresión para las células de mamíferos. Esta tecnología, denominada “Gateway® Technology”, se basa en el sistema de recombinación específica del bacteriófago lambda, que facilita la integración de lambda en el cromosoma de *E. coli*, de tal manera, que puede tener lugar un rápido y eficaz movimiento del gen objeto de estudio a diferentes vectores. La integración de lambda en el cromosoma de *E. coli* es mediante una reacción de recombinación intermolecular de ADN, mediada por proteínas de recombinación codificadas por ambos. En la Figura 23 se representa, esquemáticamente, la reacción de recombinación entre el vector de entrada y el vector de destino.

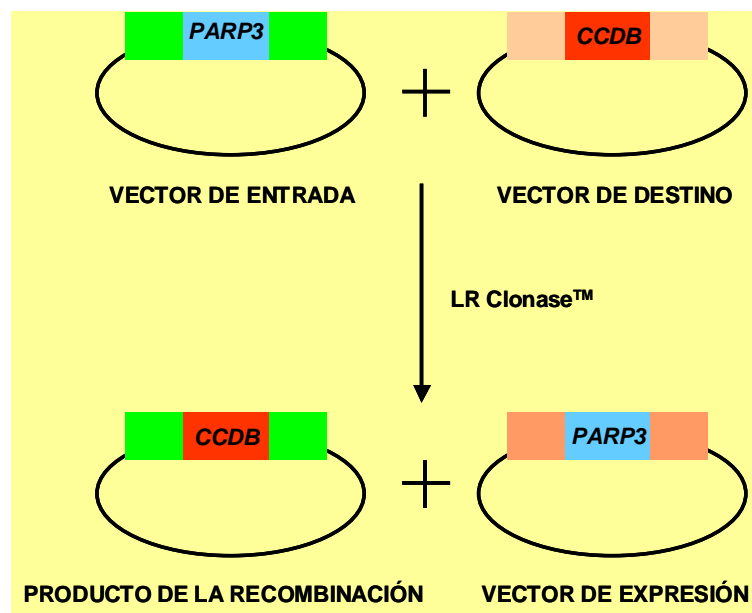


Figura 23. Representación esquemática de la reacción de recombinación entre el vector de entrada, que contiene *PARP3*, y el vector de destino, que contiene un promotor de alta expresión para las células de mamíferos. Este proceso está mediado, en este caso, por una mezcla de enzimas, denominada LR Clonase™ (Invitrogen™).

9.4.1 ULTIMATE™ ORF CLON DE PARP3 (CLON DE ENTRADA)

El ADN complementario de *PARP3* estaba contenido en un vector, denominado pENTR™ 221, y transformado en una cepa de *E. coli* llamada “T1-pHage Resistant *E. coli*”. Primeramente, se prepararon alícuotas para posteriores usos. A continuación, se crecieron estas bacterias en medio LB estéril y kanamicina y se purificó el plásmido que contenía el ADN complementario de *PARP3*.

9.4.1.1 VECTOR DE ENTRADA pENTR™221

El vector de entrada contiene 2.546 nucleótidos, sin el inserto de ADN complementario de *PARP3*. Éste está formado por 1.602 nucleótidos, lo que hace un total de 4.148 nucleótidos. Las características principales de pENTR™221 son las siguientes:

- Secuencias *rrnB* de fin de la transcripción para evitar la expresión basal del gen objeto de estudio en las bacterias *E. coli*.
- Secuencias *attL1* y *attL2*, flanqueando al ADN complementario de *PARP3*, para la recombinación en los lugares específicos con el vector de destino.
- Gen de resistencia a kanamicina para seleccionar los clones de *E. coli* que contengan el vector de entrada.
- Origen pUC para que exista una alta replicación y mantenimiento del plásmido en las bacterias.

En la Figura 24 se muestra un mapa del vector de entrada pENTR™221.

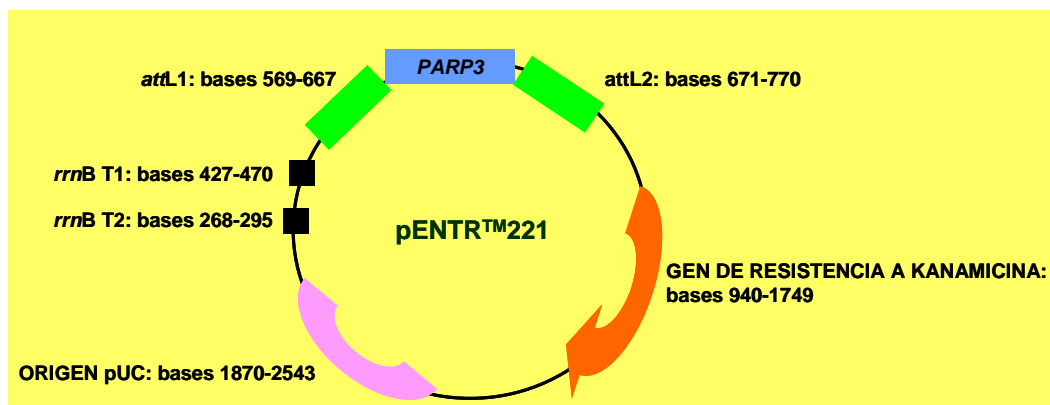


Figura 24. Mapa del vector de entrada pENTR™ 221.

La secuencia de *PARP3* incluida en el vector se corresponde con el ARN mensajero del transcrito 3, isoforma corta, de este gen. A continuación, se muestra la secuencia de nucleótidos y su correspondencia con los aminoácidos que constituyen *PARP3*:

ATG GCTCAAAGCCGAAGCCCTGGGTACAGACTGAGGGCCCTGAGAAGAAGAAGGGCCGG	60
M A P K P K P W V Q T E G P E K K K G R	20
CAGGCAGGAAGGGAGGAGGACCCCTTCCGCTCCACCGCTGAGGGCCCTCAAGGCCATACCC	120
Q A G R E E D P F R S T A E A L K A I P	40
GCAGAGAAGCGCATAATCCGCGTGGATCCAACATGTCCACTCAGCAGCAACCCCGGGACC	180
A E K R I I R V D P T C P L S S N P G T	60

CAGGTGTATGAGGACTACAACCTGCACCCTGAACCAGACCAACATCGAGAACAACAACAAC	240
Q V Y E D Y N C T L N Q T N I E N N N N	80
AAGTTCTACATCATCCAGCTGCTCCAAGACAGCAACCGCTTCTTTCACCTGCTGGAACCGC	300
K F Y I I Q L L Q D S N R F F T C W N R	100
TGGGGCCGTGTGGGAGAGGTTCGGCCAGTCAAAGATCAACCACTTCAACAAGGCTAGAAGAT	360
W G R V G E V G Q S K I N H F T R L E D	120
GCAAAGAAGGACTTTGAGAAGAAATTTTCGGGAAAAGACCAAGAACAACCTGGGCAGAGCGG	420
A K K D F E K K F R E K T K N N W A E R	140
GACCACTTTGTGTCTCACCCGGGCAAGTACACACTTATCGAAGTACAGGCAGAGGATGAG	480
D H F V S H P G K Y T L I E V Q A E D E	160
GCCCAGGAAGCTGTGGTGAAGGTGGACAGAGGCCAGTGAGGACTGTGACTAAGCGGGTG	540
A Q E A V V K V D R G P V R T V T K R V	180
CAGCCCTGCTCCCTGGACCCAGCCACGCAGAAGCTCATCACTAACATCTTTCAGCAAGGAG	600
Q P C S L D P A T Q K L I T N I F S K E	200
ATGTTCAAGAACACCATGGCCCTCATGGACCTGGATGTGAAGAAGATGCCCCCTGGGAAAG	660
M F K N T M A L M D L D V K K M P L G K	220
CTGAGCAAGCAACAGATTGCACGGGGTTTTCGAGGCCTTGGAGGCGCTGGAGGAGGCCCTG	720
L S K Q Q I A R G F E A L E A L E E A L	240
AAAGGCCCCACGGATGGTGGCCAAAGCCTGGAGGAGCTGTCCTCACACTTTTACACCGTC	780
K G P T D G G Q S L E E L S S H F Y T V	260
ATCCCGCACAACTTCGGCCACAGCCAGCCCCCGCCATCAATTCCTGAGCTTCTGCAG	840
I P H N F G H S Q P P P I N S P E L L Q	280
GCCAAGAAGGACATGCTGCTGGTGTGGCGGACATCGAGCTGGCCCAGGCCCTGCAGGCA	900
A K K D M L L V L A D I E L A Q A L Q A	300
GTCTCTGAGCAGGAGAAGACGGTGGAGGAGGTGCCACACCCCCTGGACCGAGACTACCAG	960
V S E Q E K T V E E V P H P L D R D Y Q	320
CTTCTCAAGTGCCAGCTGCAGCTGCTAGACTCTGGAGCACCTGAGTACAAGGTGATACAG	1020
L L K C Q L Q L L D S G A P E Y K V I Q	340
ACCTACTTAGAACAGACTGGCAGCAACCACAGGTGCCCTACACTTCAACACATCTGGAAA	1080
T Y L E Q T G S N H R C P T L Q H I W K	360
GTAACCAAGAAGGGGAGGAAGACAGATTCCAGGCCACTCCAAACTGGGTAATCGGAAG	1140
V N Q E G E E D R F Q A H S K L G N R K	380
CTGCTGTGGCATGGCACCAACATGGCCGTGGTGGCCGCCATCCTCACTAGTGGGCTCCGC	1200
L L W H G T N M A V V A A I L T S G L R	400
ATCATGCCACATTCTGGTGGGCGTGTGGCAAGGGCATCTACTTTGCCTCAGAGAACAGC	1260
I M P H S G G R V G K G I Y F A S E N S	420
AAGTCAGCTGGATATGTTATTGGCATGAAGTGTGGGGCCACCATGTCGGCTACATGTTT	1320
K S A G Y V I G M K C G A H H V G Y M F	440

CTGGGTGAGGTGGCCCTGGGCAGAGAGCACCATATCAACACGGACAACCCCAGCTTGAAG	1380
L G E V A L G R E H H I N T D N P S L K	460
AGCCACCTCCTGGCTTCGACAGTGTTCATTGCCCGAGGCCACACCGAGCCTGATCCGACC	1440
S P P P G F D S V I A R G H T E P D P T	480
CAGGACACTGAGTTGGAGCTGGATGGCCAGCAAGTGGTGGTGGCCAGGGCCAGCCTGTG	1500
Q D T E L E L D G Q Q V V V P Q G Q P V	500
CCCTGCCAGAGTTCAGCAGCTCCACATTCTCCAGAGCGAGTACCTCATCTACCAGGAG	1560
P C P E F S S S T F S Q S E Y L I Y Q E	520
AGCCAGTGTGCGCTGCGCTACCTGCTGGAGGTCCACCTCTAG	1602
S Q C R L R Y L L E V H L *	534

9.4.1.2 T1-PHAGE RESISTANT *E. coli*

El genotipo de las bacterias *E. coli* “T1-pHage Resistant” transformadas con el vector de entrada pENTR™ 221 es el siguiente: F-*mcrA*Δ(*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ*ΔM15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rposL* (Str^R) *endA1 nupGλ- tonA* (confiere resistencia a los fagos T1 y T5).

9.4.1.3 PREPARACIÓN DE ALÍCUOTAS Y PROPAGACIÓN DEL VECTOR DE ENTRADA pENTR™221

Para preparar alícuotas de las bacterias *E. coli* “T1-pHage Resistant” transformadas con el vector de entrada pENTR™ 221, que contenía el ADN complementario de *PARP3*, y crecerlas, se partió de la alícuota madre adquirida de Invitrogen™.

Primeramente, se tomó una pequeña porción de esta alícuota madre y se sembró en una placa que contenía LB agar estéril (1L de LB: 10g NaCl, 10g de bacteriotriptona y 5g de extracto de levadura; concentración de agar: 1.5%) y kanamicina, a una concentración de 50 µg/ml. Se incubó a 37°C durante una noche. Al día siguiente, se picó una colonia, la cual se inoculó en 5-10 ml de medio LB estéril con el mismo antibiótico y a la misma concentración referida anteriormente. Tras, aproximadamente, 6 horas, se mezclaron en una proporción 1:4 glicerol estéril y medio de cultivo, con las bacterias crecidas. Estas alícuotas se almacenaron a -80°C en los mismos viales empleados para congelar la línea celular A549.

El crecimiento de las bacterias para su propagación se realizó en 500 ml de LB estéril con kanamicina, a una concentración de 50 µg/ml, a 37°C durante una noche. Se partió de una de las alícuotas obtenidas a partir de la colonia que se picó anteriormente.

9.4.1.4 PURIFICACIÓN DEL VECTOR DE ENTRADA pENTR™221

Para purificar el vector pENTR™ 221 se empleó el kit “EndoFree® Plasmid Purification” de Qiagen, que suministró todos los tampones necesarios.

Una vez estaba crecido el cultivo de bacterias, éstas se centrifugaron a 3.000 r.p.m. durante 15 minutos a 4°C. El pellet resultante se resuspendió en 10 ml de un tampón, denominado tampón P1 (Tris-HCl 50mM, EDTA 10mM y 100 µg/ml RNAsa, pH 8). A continuación, se añadieron 10 ml de un segundo tampón, P2 (NaOH 200mM y SDS 1%), y se incubó a temperatura ambiente 5 minutos, para que tuviera lugar la lisis de las bacterias. Tras la incubación, se añadieron al lisado 10 ml del tampón de neutralización P3 (Acetato potásico 3M, pH 5.5) frío, se agitó y se vertió el contenido en una columna, incubándose, de nuevo, a temperatura ambiente, durante 10 minutos. De esta manera, se separó un precipitado que contenía proteínas, ADN genómico y detergentes que, pasados los 10 minutos, se filtró, con ayuda de un émbolo, a un tubo de 50 ml.

Se añadieron 2.5 ml de tampón ER (isopropanol y polietilen-glicol-octil-fenil éter), se agitó y se incubó en hielo 30 minutos. El lisado filtrado se pasó a otra columna que tenía un filtro en su parte final, donde se unió el ADN plasmídico, dejando que, por gravedad, se eliminasen el resto de los componentes. La columna fue, previamente, equilibrada con 10 ml de tampón QBT (NaCl 750mM, MOPS 50mM, isopropanol 15% y Tritón® X-100 0.15%, pH 7). Una vez se hubo vaciado, se lavó dos veces con 30 ml de un tampón de lavado llamado QC (NaCl 1M, MOPS 50mM e isopropanol 15%, pH 7), permitiendo que se eliminara por gravedad. El ADN plasmídico se eluyó con 15 ml de tampón QN (NaCl 1.6M, MOPS 50mM e isopropanol 15%, pH 7), y se precipitó con 10.5 ml de isopropanol durante unas horas a -20°C.

Tras la precipitación, se centrifugó durante 30 minutos a 4°C a una velocidad de 11.000 r.p.m. Finalizada ésta, se eliminó el sobrenadante y se lavó el precipitado dos veces con etanol al 70%, centrifugándose tras cada lavado a 11.000 r.p.m. durante 10 minutos. El precipitado se secó a temperatura ambiente y se disolvió en 0.2 ml de TE libre de endotoxinas.

La valoración del ADN plasmídico resultante se realizó según lo descrito en el apartado “3.2 Valoración del ADN”.

9.4.2 VECTOR DE DESTINO pcDNA-DEST53 GATEWAY®

El vector de destino, con el que se recombinó el vector pENTR™ 221, fue pcDNA-DEST53. Éste, de 7.767 nucleótidos, fue diseñado por Invitrogen™ para la expresión constitutiva y elevada de la proteína Cycle 3 GFP, forma mutante de GFP (*Green Fluorescent Protein*) fusionada con la proteína objeto de estudio, PARP3 en nuestro caso, en la mayoría de las células de mamíferos. Las principales características de este vector son:

- Promotor del citomegalovirus humano (CMV) para conseguir una elevada expresión de la proteína de interés fusionada con Cycle 3 GFP.
- Cycle 3 GFP fusionada con el extremo N-terminal de la proteína de interés, lo que permite visualizar en un microscopio de fluorescencia, con el filtro adecuado, la localización de la proteína objeto de estudio, así como la tasa de transfección. Asimismo, también se puede realizar la detección por Western-Blot o inmunocitoquímica empleando un anticuerpo antiCycle 3 GFP.
- Secuencias *attR1* y *attR2* específicas para la recombinación con el vector de entrada.
- Gen de resistencia a cloranfenicol y gen *ccdB* situado entre las secuencias anteriores, para la selección negativa tras la reacción de recombinación.
- Secuencia de poliadenilación de la hormona bovina de crecimiento (BGH) para una adecuada terminación y procesamiento del transcrito.

- Promotor del virus SV40 seguido del gen de resistencia a neomicina para la creación de líneas celulares estables que expresen el antígeno T de SV40.
- Origen pUC para que exista una alta replicación y mantenimiento del plásmido en las bacterias.
- Gen de resistencia a ampicilina para la selección bacteriana.

La Figura 25 representa, de manera esquemática, el mapa de este vector.

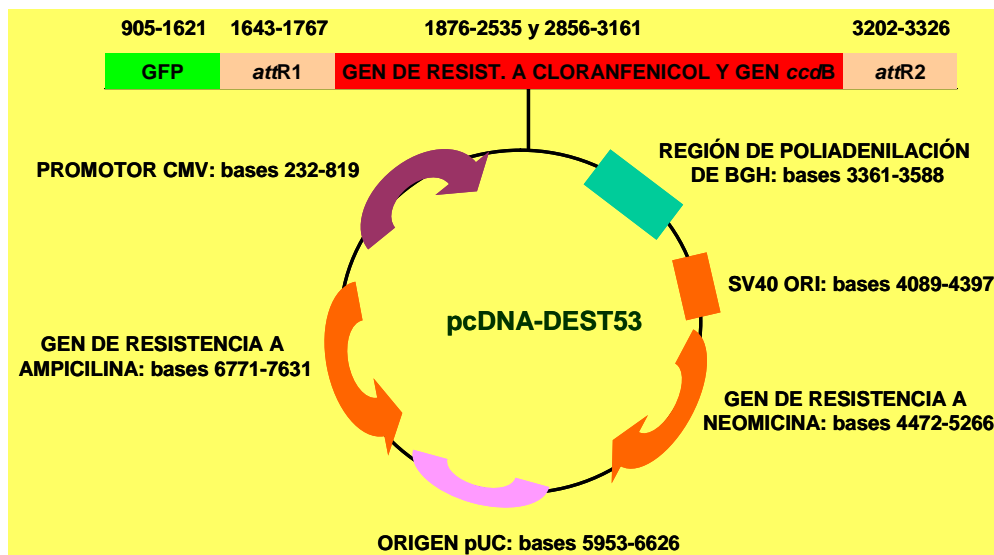


Figura 25. Mapa del vector de destino pcDNA-DEST53.

9.4.2.1 PREPARACIÓN DE ALÍCUOTAS Y PROPAGACIÓN DEL VECTOR DE DESTINO pcDNA-DEST53

Para preparar alícuotas del vector y propagarlo fue necesario, primeramente, transformar unas bacterias con él. Se empleó una cepa de *E. coli* denominada “One Shot® *ccdB* Survival™ T1-pHage Resistant Cells” (Invitrogen™). Esta cepa tiene la peculiaridad de ser resistente a los efectos del gen *ccdB*. Su genotipo es el siguiente: F-*mcrA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80*lacZ* Δ M15 Δ *lacX74 recA1 araD139* Δ (*ara-leu*)7697 *galU galK rposL* (Str^R) *endA1 nupGλ tonA::P_{trc}-ccdA*.

Se emplearon 100 ng de pcDNA-DEST53, así como 10 ng de pUC19, vector control de la transformación incluido en el kit de las bacterias. Se descongelaron las bacterias en hielo y, una vez estuvieron listas, se añadió el ADN, cada uno a un tubo distinto de bacterias. Se incubaron los viales en hielo durante 30 minutos y, por último, se sometieron a un golpe de calor 30 segundos a 42°C en un baño. Finalmente, se dejaron en hielo 2 minutos, añadiendo, seguidamente, 0.25 ml de medio S.O.C. precalentado a 37°C. Los viales se incubaron 1 hora a 37°C con agitación.

Una alícuota de bacterias transformadas con pcDNA-DEST53 se sembró en una placa de LB agar estéril con ampicilina y cloranfenicol. La concentración de estos antibióticos fue, respectivamente, 100 µg/ml y 30 µg/ml. Las bacterias transformadas con el vector pUC19 se sembraron sólo con ampicilina, a la misma concentración que las anteriores. Se incubaron ambas placas a 37°C durante una noche.

Al día siguiente, se evaluó si la transformación había sido exitosa, pues aparecían colonias en la placa sembrada con bacterias transformadas con el vector control. Se picó una colonia de la placa que contenía bacterias transformadas con pcDNA-DEST53 y se creció en medio LB estéril con los dos antibióticos indicados anteriormente y en las mismas concentraciones. A partir de esta colonia, se prepararon las alícuotas para su almacenamiento a -80°C y se propagó y purificó el vector, según lo descrito en los apartados “9.4.1.3 Preparación de alícuotas y propagación de pENTR™221” y “9.4.1.4 Purificación del vector de entrada pENTR™221”, teniendo en cuenta que los antibióticos empleados para seleccionar las colonias transformadas fueron ampicilina y cloranfenicol, a las concentraciones ya referidas.

9.4.3 REACCIÓN DE RECOMBINACIÓN ENTRE EL VECTOR DE ENTRADA pENTR™221 Y EL VECTOR DE DESTINO pcDNA-DEST 53

La reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR™ 221, que contenía el ADN complementario de *PARP3*, y el vector de expresión

pcDNA-DEST53, que contenía un promotor de alta expresión, se realizó empleando una mezcla de enzimas y tampones suministrada por Invitrogen™. Ésta estaba formada por proteínas implicadas en la recombinación del bacteriófago lambda, integrasa y excisionasa, y por el factor de integración del huésped, proteína codificada por *E. coli*. Todos los componentes venían ya formulados en un vial, “Gateway® LR Clonase™ II Enzyme Mix 5X”. El kit incluía también una solución de proteinasa K, a una concentración de 2 µg/µl, y un control positivo de la reacción de recombinación, “pENTR™-gus Positive Control”, a una concentración de 50 ng/µl.

En la Tabla 25 se muestran los componentes y cantidades incluidos en un tubo de 1.5 ml para llevar a cabo la reacción de recombinación. Los tubos, que contenían los componentes descritos anteriormente, se incubaron a 25°C durante 1 hora. Tras la incubación, se añadió a cada tubo 1 µl de la solución de proteinasa K, incubándose, esta vez, a 37°C 10 minutos.

REACTIVOS	“pENTR™-gus Positive Control”	pENTR™ 221 (control negativo)	pENTR™ 221
Vector de entrada	100 µg	100 µg	100 µg
Vector de destino	150 µg	150 µg	150 µg
Tampón TE, pH 8	c.s.p. 8 µl	c.s.p. 10 µl	c.s.p. 8 µl
LR Clonase™ II Enzyme Mix 5X	2 µl	—	2 µl
Volumen total	10 µl	10 µl	10 µl

Tabla 25. Reactivos y cantidades empleados en la reacción de recombinación entre el vector de entrada pENTR™ 221 y el vector de destino pcDNA-DEST53.

9.4.3.1 PROPAGACIÓN DE LOS PRODUCTOS RESULTANTES DE LA REACCIÓN DE RECOMBINACIÓN

Con los productos resultantes de la reacción de recombinación se transformó la cepa de bacterias *E. coli* “One Shot® OmniMAX™ 2T1-pHage Resistant Cells”, adquirida de la casa comercial Invitrogen™. El genotipo de esta cepa es el siguiente: F-(*proAB*⁺ *lacI*^q *lacZ* Δ M15 *Tn10*(Tet^R) Δ (*ccdAB*)) *mrcA* Δ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*) Φ80(*lacZ*) Δ M15 Δ (*lacZYA-argF*) U169 *endA1 recA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 tonA panD*. Esta cepa tiene la característica de ser sensible a los efectos del gen *ccdB*, por tanto, aquellas bacterias transformadas con el control negativo o con el vector de expresión no recombinado morirán.

Sólo se transformaron el control positivo de la reacción de recombinación, pENTR™ 221 recombinado con pcDNA-DEST53, y el control positivo de la transformación, pUC19 DNA. El protocolo seguido, así como las cantidades y reactivos empleados, fueron los descritos en el apartado “9.4.2.1 Preparación de las alícuotas y propagación de pcDNA-DEST53”.

Las bacterias transformadas se sembraron en una placa de medio LB agar estéril y se crecieron a 37°C durante una noche. El antibiótico de selección empleado fue ampicilina a una concentración de 100 µg/ml.

Al día siguiente, tras comprobar que la transformación había funcionado, gracias al vector control de la transformación, se procedió a evaluar qué colonias habían integrado correctamente al vector pENTR™ 221 recombinado con pcDNA-DEST53.

9.4.3.2 COMPROBACIÓN Y SELECCIÓN DE COLONIAS TRANSFORMADAS CON EL VECTOR DE ENTRADA pENTR™ 221 RECOMBINADO CON pcDNA-DEST53

Primeramente, se seleccionaron colonias de las placas que contenían bacterias transformadas con el vector control positivo de la reacción de recombinación y el vector pENTR™ 221 recombinado con pcDNA-DEST53. Éstas se crecieron

en 5-10 ml de medio LB estéril con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml y, tras unas horas, se procedió a aislar el ADN plasmídico, empleando el kit de Qiagen “EndoFree® Plasmid Purification”. Se siguió el protocolo descrito en el apartado “9.4.1.4 Purificación del vector de entrada pENTR™221”, con ligeras modificaciones.

Se pipetearon 1.5 ml del cultivo bacteriano y se centrifugaron a 12.000 r.p.m. a temperatura ambiente. Se eliminó el sobrenadante, y se añadieron 300 µl del tampón P1, resuspendiendo el pellet. A continuación, se añadió el mismo volumen de los tampones P2 y P3 frío, tras lo que se incubaron 10 minutos en hielo. Se centrifugaron, de nuevo, a máxima velocidad durante 10 minutos y se procedió a precipitar el ADN plasmídico a partir del sobrenadante obtenido. Para ello, se añadió isopropanol, 0.7 ml, y se incubaron a -20°C unas horas. Finalmente, los tubos se centrifugaron a velocidad máxima 10 minutos, a temperatura ambiente, y se lavó el precipitado resultante con etanol al 80% dos veces, centrifugándose entre cada lavado. El precipitado se secó y resuspendió en 20 µl de agua libre de nucleasas.

El ADN plasmídico obtenido se valoró según lo descrito en el apartado “3.2 Valoración del ADN”.

Para seleccionar aquellas colonias en las que la reacción de recombinación entre los vectores objeto de interés hubiera funcionado, se transformó una cepa de *E. coli*, resistente a los efectos del gen *ccdB*, con el ADN plasmídico obtenido anteriormente, así como con el control negativo de la reacción y el control positivo de la transformación. La cepa seleccionada fue “One Shot® *ccdB* Survival™ T1-pHage Resistant Cells”, cuyo genotipo se describió en el apartado “9.4.2.1 Preparación de alícuotas y propagación de pcDNA-DEST53”. En este mismo apartado se describe el proceso de transformación y las cantidades y reactivos empleados.

Las bacterias transformadas se crecieron en 5-10 ml de medio LB estéril con ampicilina y cloranfenicol a una concentración de 100 µg/ml y 30 µg/ml,

respectivamente. Las bacterias transformadas con el vector pUC19 DNA se crecieron sólo con ampicilina, a la misma concentración que las anteriores.

Los datos obtenidos de cada cultivo fueron los siguientes:

- El crecimiento de las bacterias transformadas con el vector pUC19 DNA nos indicó que la transformación había funcionado.
- El crecimiento de las bacterias transformadas con el control negativo de la reacción de recombinación, nos indicó que el vector de expresión estaba bien y la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos de selección era la adecuada.
- El no crecimiento de las bacterias transformadas con el control positivo de la reacción de recombinación, nos indicó que, en la colonia seleccionada, la recombinación había funcionado y, por tanto, los reactivos y el experimento eran adecuados.
- El no crecimiento de las bacterias transformadas con el vector pENTR™ 221 recombinado con pcDNA-DEST53, nos indicó que, en la colonia seleccionada, la recombinación se había producido y el ADN plasmídico que contenía era el adecuado para transfectar a la línea celular descrita en esta Tesis.

Una vez se identificó la colonia de interés, se procedió a crecerla y a purificar el ADN plasmídico. Se realizó en 500 ml de LB estéril con ampicilina a una concentración de 100 µg/ml, incubándose durante una noche a 37°C.

La purificación del plásmido se realizó según el protocolo descrito en el apartado “9.4.1.4 Purificación del vector de entrada pENTR™221” y la valoración del ADN según el apartado “3.2 Valoración del ADN”.

En la Figura 26 se muestra un mapa del vector final con el cual se transfectó la línea celular A549. Éste se almacenó a -20°C para su posterior uso.

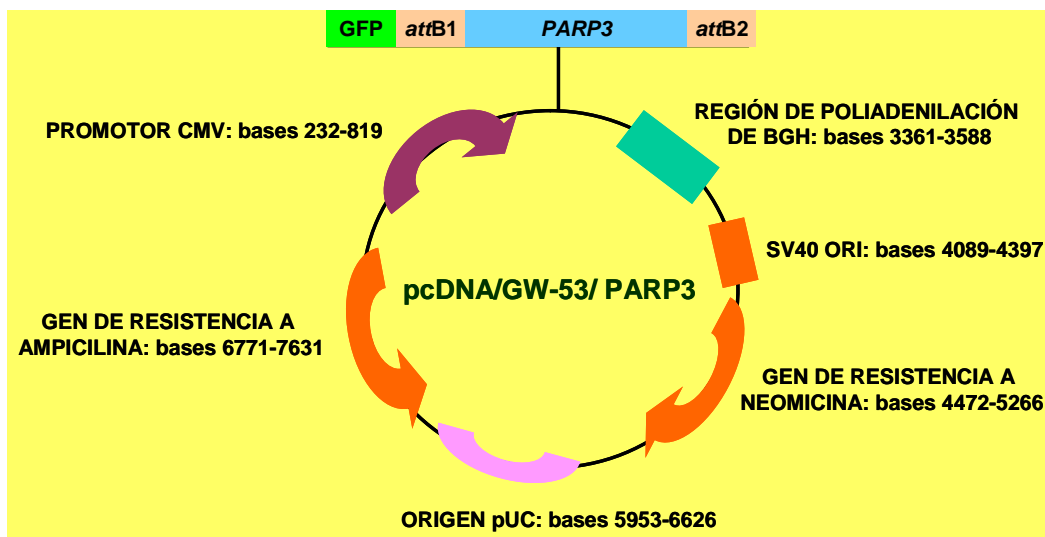


Figura 26. Mapa del vector resultante tras la reacción de recombinación.

9.5 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LA LÍNEA CELULAR A549

La transfección de A549 con el vector que contenía el ADN complementario de *PARP3*, pcDNA/GW-53/*PARP3*, se realizó mediante liposomas, empleando “Lipofectamine™ 2000 Reagent”, de la casa comercial Invitrogen™. Para ello, y siguiendo el protocolo recomendado por la casa comercial, se mezclaron 10 µl de lipofectamina con 0.25 ml de medio de transfección y se incubó 5 minutos a temperatura ambiente. El medio de transfección era el empleado para el mantenimiento y propagación de la línea celular pero sin suero fetal bovino, plasmocin y la mezcla de antibióticos y antimetabólicos. Por otro lado, en el medio de transfección se diluyó la cantidad de ADN plasmídico a transfectar, 4 µg. Este proceso se realizó de manera independiente para cada plato. Las cantidades de medio, lipofectamina y ADN plasmídico estaban condicionadas por la dimensión del plato, que era de 60x15 mm.

Tras los 5 minutos de incubación, se mezcló la lipofectamina diluida con el ADN, también diluido, incubándose esta nueva mezcla 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se añadieron a cada plato los complejos, permaneciendo en contacto con las células 5 horas en el incubador. Por

último, se lavaron los platos con PBS 1X y se añadió medio, esta vez, suplementado con todos los componentes.

La transfección se realizó cuando las células presentaban un nivel de confluencia alrededor del 70%. Previamente, las células se lavaron con PBS 1X e incubaron con el medio de transfección.

Debido a que se trataba de transfecciones transitorias, y a que se pretendía obtener ARN y proteínas a distintos tiempos, cada transfección se realizó en platos paralelos para obtener ARN y proteínas provenientes de una misma manipulación. Asimismo, como control, se transfectaron células con el vector de expresión no recombinado, pcDNA-DEST53.

9.5.1 COMPROBACIÓN DE LA TRANSFECCIÓN

Para comprobar si la transfección había funcionado correctamente, se determinaron los niveles de ARN mensajero de *PARP3* en las células transfectadas y en las células sin transfectar.

Se extrajo el ARN a las 24, 48 y 96 horas post-transfección. Tras su conversión a ADN complementario, éste se amplificó mediante PCR cuantitativa a tiempo real. Se siguieron los pasos descritos en los apartados “2.1 Extracción del ARN” y “8. Evaluación de los niveles de expresión génica mediante PCR cuantitativa a tiempo real”. Como calibrador, se empleó el ADN complementario extraído de las células sin transfectar y el gen empleado para normalizar fue *PPIA*. De esta manera, se obtuvo el dato RQ, cuya interpretación es la misma que la descrita en el apartado “8.4 Análisis de los resultados de PCR cuantitativa a tiempo real”.

El estudio de los niveles de ARN mensajero de *PARP3* en células transfectadas con pcDNA-DEST53, nos permitió evaluar la posible influencia del vector de expresión en los niveles de dicho gen.

La evaluación de los niveles de ARN mensajero en las células transfectadas se realizó por duplicado y en 3 ensayos independientes.

9.6. DETERMINACIÓN DE LA INFLUENCIA DE PARP3 EN LA ACTIVIDAD TELOMERASA

A las 24, 48 y 96 horas post-transfección, se recogieron las células y se extrajeron las proteínas, siguiendo el protocolo descrito en el apartado “4. Extracción y valoración de proteínas”. El ensayo TRAP se llevó a cabo de la misma manera que en la caracterización de la línea celular, incluyendo el empleo de los mismos controles (apartado “9.3.2.2 Determinación de los niveles de actividad telomerasa”).

Se evaluó la actividad telomerasa de las células sin transfectar, células transfectadas con el vector pcDNA-DEST53 y células transfectadas con el vector pcDNA/GW-53/PARP3. El ensayo se realizó 4 veces, siendo la reacción de amplificación en cada determinación independiente.

Para visualizar los productos resultantes de la elongación de la enzima telomerasa, se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida al 12% con los productos resultantes de la reacción de amplificación, empleándose una cubeta vertical de tamaño maxi. En la Tabla 26 se describen los reactivos y cantidades empleados para la realización del gel. El tampón en el que se desarrolló la electroforesis fue TBE 0.5X.

Se cargaron 20 µl de muestra junto a 4 µl del tampón de carga 1X.

La duración de la electroforesis fue de, aproximadamente, 15 horas, siendo el voltaje 55V y desarrollándose a 4°C. Tras ésta, se procedió a transferir los fragmentos separados a una membrana de nylon cargada positivamente. La transferencia fue por capilaridad. Tanto la transferencia como la fijación del ADN se realizó de la forma descrita en el ensayo de determinación de la

longitud telomérica, apartado “5. Ensayo de medición de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción”.

REACTIVOS	GEL DE POLIACRILAMIDA AL 12%
Agua millipore	23.2 ml
40% de solución de Acrilamida/Bis 19:1 (BioRad)	9 ml
TBE 10X	3 ml
Persulfato de amonio 10%	0.225 ml
TEMED	0.022 ml

Tabla 26. Composición y porcentaje del gel empleado en la electroforesis de los productos resultantes de la amplificación, por el método TRAP, de las secuencias elongadas por la enzima telomerasa.

Una vez fijado el ADN, se lavó la membrana, 5 minutos y a temperatura ambiente, con una solución que contenía ácido maleico 0.1M, NaCl 0.15M y Tween 0.3%, pH 7.5. A continuación, se procedió a bloquearla con 50 ml de una solución de bloqueo 5X diluida en la solución de ácido maleico antes descrita. Para su preparación, se partió de la solución de bloqueo al 10% (p/v) diluida en la solución de ácido maleico. La solución de bloqueo original se adquirió de la casa comercial Roche®. La duración del bloqueo fue de 30 minutos y se realizó a temperatura ambiente.

Finalizado el bloqueo, la membrana se incubó con fosfatasa alcalina unida a estreptavidina, a una concentración final de 200 mU/ml, durante 30 minutos y a temperatura ambiente. La fosfatasa alcalina se diluyó en la solución de bloqueo 5X 1:5.000. Tras la incubación, se realizaron 2 lavados, de 15 minutos cada uno, con la solución de ácido maleico. Por último, se equilibró la

membrana durante 5 minutos con un tampón de detección formado por Tris-HCl 0.1M y NaCl 0.1M, pH 9.5. El sustrato empleado en la detección fue CDP-Star (Roche®). Éste se diluyó en el tampón de detección 1:10 y se incubó con la membrana durante 5 minutos. Para la detección quimioluminiscente se emplearon las películas “Hyperfilm™” de Amersham Bioscience®.

9.6.1 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE PARP3 EN LA ACTIVIDAD TELOMERASA

Una vez se obtuvieron los datos de actividad telomerasa, tanto a partir de células transfectadas con pcDNA/GW-53/PARP3, como a partir de las células transfectadas con pcDNA-DEST53, se procedió a evaluar la posible influencia de PARP3 en la actividad telomerasa. Para ello, se estableció el siguiente ratio:

$$\frac{\text{Absorbancia de los extractos proteicos pcDNA/GW-53/PARP3 (24, 48 ó 96 h)}}{\text{Absorbancia de los extractos proteicos pcDNA-DEST53 (24, 48 ó 96 h)}}$$

De esta manera, se minimizaron los errores de eficiencia inter-experimental, pues cada repetición de la reacción de amplificación de los fragmentos teloméricos se realizó de manera independiente. Además, también se consideraban las posibles alteraciones que el vector pcDNA-DEST53 podría estar causando en la actividad telomerasa.

La interpretación de los resultados fue la siguiente:

- Ratio > 1: las células transfectadas con el ADN complementario de *PARP3* presentaban mayor actividad telomerasa que las transfectadas con el vector control.
- Ratio < 1: las células transfectadas con el ADN complementario de *PARP3* presentaban menor actividad telomerasa que las transfectadas con el vector control.

10. ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS

La estadística se realizó con el programa informático SPSS para Windows, versión 11.5.

10.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

10.1.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

Para estudiar las diferencias entre la longitud de los telómeros en las muestras no tumorales y las tumorales se aplicó la prueba *t de Student*. Así, se determinó si existían diferencias significativas entre ambas poblaciones, con respecto a la longitud de los telómeros. Para el estudio de correlaciones se aplicó el coeficiente de correlación de *Pearson*. Se consideró que ambas poblaciones eran estadísticamente diferentes y presentaban asociación, respectivamente, si $P < 0.05$ para ambos análisis.

Para estudiar si existía alguna diferencia en la longitud de los fragmentos teloméricos entre las muestras tumorales, dependiendo de si se detectó o no actividad telomerasa, se aplicó la prueba *t de Student* para comparar las medias de longitud de cada población. Se consideró que existían diferencias significativas entre las dos poblaciones si el nivel de significación (P) era inferior a 0.05.

10.1.2 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Se analizó la posible influencia del estatus telomérico y de la actividad de la enzima telomerasa en relación con diferentes variables clínico-patológicas: la

probabilidad de recidiva, el tipo histológico, los distintos estadios, el tamaño del tumor, el grado de infiltración ganglionar y la presencia de metástasis.

El estudio del estatus telomérico y su relación con variables clínico-patológicas se realizó a partir del ratio TRF T/TRF N. Se comprobó la distribución de esta población mediante el estadístico *Shapiro-Wilk*, en función de la recurrencia tumoral y la metástasis y, al no seguir una distribución normal, se empleó la prueba *U de Mann-Whitney*. La evaluación del tipo histológico, tamaño del tumor y estadio se realizó mediante la prueba de *ANOVA*, tras realizar el análisis de homocedasticidad y comprobar que las varianzas eran iguales. Se consideró que existían diferencias significativas entre las poblaciones si $P < 0.05$.

Para evaluar la implicación de la actividad telomerasa en las distintas variables clínico-patológicas, se realizó un estudio de frecuencias y se empleó la prueba *Chi-cuadrado* para determinar si, efectivamente, esta enzima condicionaba, de alguna manera, estos parámetros. Se consideró que existían diferencias significativas entre las poblaciones si $P < 0.05$.

Se llevaron a cabo estudios de supervivencia en relación con la función telomérica. Para ello, se consideró el intervalo libre de enfermedad (ILE), esto es, el tiempo transcurrido desde la resección quirúrgica del tumor hasta la aparición de recidivas. Únicamente se incluyeron en el estudio los pacientes que habían sido sometidos a cirugía con intención curativa (pacientes con tumores correspondientes a estadios I, II y IIIA). Asimismo, se eliminaron del estudio a los pacientes fallecidos durante el post-operatorio o de los que se desconocía si el tumor había, realmente, recidivado o no.

Se empleó el estimador de *Kaplan-Meier* y la comparación entre las curvas de supervivencia se realizó con la prueba de *rangos logarítmicos (Log Rank)*, considerándose que existían diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas si $P < 0.05$.

Para determinar que el acortamiento de las secuencias teloméricas, con respecto a su correspondiente muestra control, constituía un factor de mal pronóstico independiente, se realizó el análisis multivariable de Cox. Se evaluó el impacto pronóstico del acortamiento telomérico frente al estadio, incluyendo sólo estadios inferiores a IIIB, y la infiltración ganglionar, pues eran los parámetros que mostraron un nivel de significatividad estadística inferior a 0.1 en relación a la supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad. Se consideró que el acortamiento telomérico era un factor de mal pronóstico independiente si $P < 0.05$.

10.2 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE MATRICES DE ADN COMPLEMENTARIO

Para el estudio estadístico de los datos obtenidos a partir de las matrices de ADN complementario se emplearon las unidades arbitrarias dadas por el programa “GEMArray Expression Analysis Suite” de Superarray®. A partir de ellas, se realizó el estudio de normalidad, mediante el estadístico *Shapiro-Wilk*, de las distintas poblaciones consideradas: aquella que mantenía la longitud de los fragmentos teloméricos en la muestra tumoral con respecto a la muestra no tumoral, la que los acortaba significativamente, la población en la que se detectó actividad telomerasa y la población en la que no.

En función de los resultados obtenidos, se aplicó el estadístico *t de Student*, si las poblaciones seguían una distribución normal, o la prueba no paramétrica *U de Mann-Whitney*. Se consideró que los resultados eran estadísticamente significativos si $P < 0.05$.

10.3 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

El análisis estadístico, en este caso, se realizó a partir de los resultados expresados como $[\Delta][\Delta]C_T$, es decir, el número de ciclos del gen objeto de estudio normalizado con *PPIA* y calibrado con la mezcla de muestras no tumorales. El empleo de este valor, en lugar de RQ, es debido a que los datos expresados como $[\Delta][\Delta]C_T$ son lineales, característica básica para poder realizar un estudio estadístico, mientras que los valores RQ siguen una distribución exponencial. El resultado final se expresó como RQ.

10.3.1 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Analizamos la relación existente entre los niveles de expresión de los genes estudiados y las distintas variables clínico-patológicas evaluadas en esta Tesis: la probabilidad de recidivas, el tipo histológico, los distintos estadios, el tamaño del tumor, la infiltración ganglionar y la presencia de metástasis.

La evaluación de la expresión y la recurrencia y metástasis se realizó aplicando las pruebas *t de Student* o *U de Mann-Whitney*, en función de si la población objeto de estudio seguía una distribución normal o no normal, respectivamente. La relación entre la expresión de ARN mensajero de los genes estudiados y el estadio, tamaño del tumor y grado de infiltración ganglionar se realizó mediante una prueba *ANOVA*, tras realizar el análisis de homocedasticidad y comprobar que las varianzas eran iguales. Se estableció como límite de significatividad $P < 0.05$.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, se realizó de la misma manera que la descrita en el apartado “10.1.2 Estudio de la función telomérica y su relación con variables clínico-patológicas”.

10.3.2 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

En primer lugar, se evaluó la posible correlación entre la expresión de ARN mensajero de los genes estudiados y la longitud de los telómeros en la muestra tumoral. Para ello, comprobamos si las distintas poblaciones seguían una distribución normal con el estadístico *Shapiro-Wilk*, aplicándose, finalmente, la prueba estadística *Rho de Spearman*, pues la población “longitud de los fragmentos teloméricos en la muestra tumoral” no seguía una distribución normal. Se consideró la existencia de correlación entre ambos parámetros si el nivel de significación era inferior a 0.05.

Asimismo, se evaluó la expresión génica en relación con el tamaño de los fragmentos teloméricos, en función de si la muestra tumoral mostraba mantenimiento o acortamiento significativo de los telómeros con respecto a su correspondiente muestra no tumoral, y con respecto a la actividad telomerasa, en función de la detección o no de actividad enzimática en la muestra tumoral. Para determinar si existían diferencias de expresión de los ARNs mensajeros de los genes estudiados entre las poblaciones anteriormente señaladas, primeramente, se comprobó si cada una de ellas seguía una distribución normal. En caso afirmativo, se comparó el valor medio $[\Delta]\Delta C_T$ de los genes utilizando el estadístico *t de Student*. Si las poblaciones no seguían una distribución normal, se aplicó la prueba *U de Mann-Whitney*. En ambos casos, se consideró que existían diferencias significativas entre las poblaciones si $P < 0.05$ y si la diferencia de medias $[\Delta]\Delta C_T$ era cercana a 1.

10.4 ANÁLISIS DE LOHs EN LOCI CERCANOS A PARP3

10.4.1 ESTUDIO DE LOHs Y SU RELACIÓN CON LA ACTIVIDAD TELOMERASA Y LA EXPRESIÓN GÉNICA DE PARP3

El estudio de LOHs en los *loci* D3S3026 y D3S3561 en las muestras tumorales se realizó sólo en aquellos casos que resultaron informativos.

El impacto de LOHs sobre la actividad telomerasa se evaluó mediante un análisis de frecuencias, empleando la prueba *Chi-cuadrado*.

Para investigar la posible influencia sobre la expresión de *PARP3* de la existencia de LOHs en los *loci* estudiados, se analizó, en primer lugar, la distribución de la población, con respecto a los LOHs, de los niveles de expresión de ARN mensajero de *PARP3*, mediante el estadístico *Shapiro-Wilk*. Al seguir una distribución normal en todos los casos, se aplicó la prueba *t de Student* para determinar posibles diferencias entre la población con LOHs y la población sin LOHs, en función de los niveles de expresión génica de *PARP3*. Se consideró que existían diferencias estadísticamente significativas si $P < 0.05$.

10.4.2 ESTUDIO DE LOHs Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

La evaluación de LOHs y su posible impacto en las variables clínico-patológicas incluidas en esta Tesis, se realizó mediante un estudio de frecuencias aplicando la prueba *Chi-cuadrado*. Se consideraron poblaciones estadísticamente diferentes si $P < 0.05$.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, se realizó de la forma descrita en el apartado “10.1.2 Estudio de la función telomérica y su relación con variables clínico-patológicas”.

10.5 ANÁLISIS DE SNPs EN EL GEN PARP3

Para evaluar la posible implicación de SNPs en el gen *PARP3* en la actividad de la enzima telomerasa se realizó un estudio de frecuencias, aplicando el estadístico *Chi-cuadrado*. Se consideró que existían diferencias significativas entre la población con SNPs y aquella que carecía de ellos si $P < 0.05$.

10.6 ANÁLISIS DE LA INFLUENCIA DE PARP3 EN LA ACTIVIDAD TELOMERASA

Las diferencias entre los ratios obtenidos a distintos tiempos post-transfección se evaluaron con el estadístico *t de Student* o *U de Mann-Whitney*, dependiendo de si las poblaciones seguían una distribución normal o no, respectivamente. Se consideró que las diferencias eran estadísticamente significativas si $P < 0.05$ para ambos análisis.

RESULTADOS

1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

1.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

Se analizó la función telomérica de 95 pacientes, lo que incluyó el análisis de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción y la actividad telomerasa en las muestras tumorales y en sus correspondientes controles de tejido no tumoral.

El resultado global de la medida de la longitud de los telómeros en las muestras no tumorales fue 8.19 Kb (7.80 – 8.57 Kb, intervalo de confianza del 95% para la media) y 7.79 Kb (7.21 – 8.37 Kb, intervalo de confianza del 95% para la media) en las muestras tumorales, no siendo significativa la diferencia entre ambas poblaciones ($P = 0.298$, según la prueba *t de Student*) (Figura 27). Tomando como referencia las muestras control, el ratio de la longitud de los telómeros en las muestras tumorales (TRF T/TRF N) fue 0.97 (0.90 – 1.04, intervalo de confianza del 95% para la media).

Se observó una correlación significativa y positiva entre la longitud de los telómeros de las muestras no tumorales y las tumorales ($P < 0.001$, según el coeficiente de correlación de *Pearson*) (Figura 28).

En la Figura 29 se muestra un ejemplo de un Southern-blot a partir del cual se midieron los fragmentos de restricción en las muestras tumorales y no tumorales incluidas en este estudio.

En cuanto a la actividad de la enzima telomerasa, ésta se detectó en 79 tumores (83.2%), frente a 16 casos (16.8%) que no mostraron actividad enzimática en el ensayo TRAP.

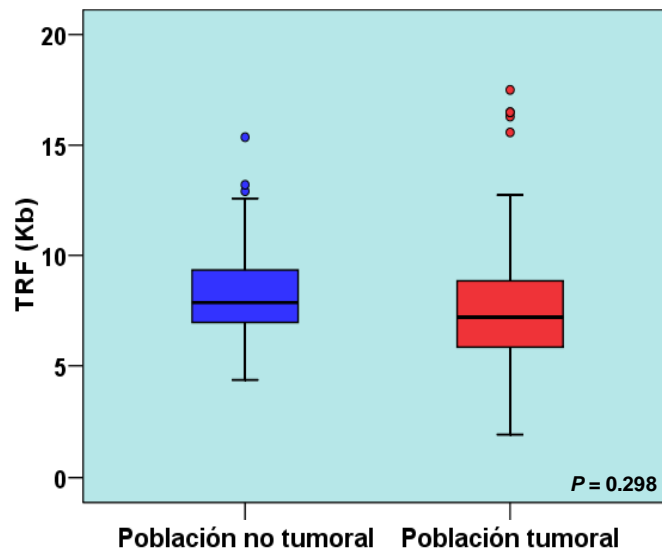


Figura 27. Diagrama de cajas donde están representadas las longitudes de los fragmentos teloméricos de restricción (TRF), en Kilobases (Kb), de los 95 pacientes analizados en esta Tesis, tanto en las muestras no tumorales (izquierda) como en las tumorales (derecha). En el diagrama están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces la desviación típica (situadas por encima del diagrama de cajas).

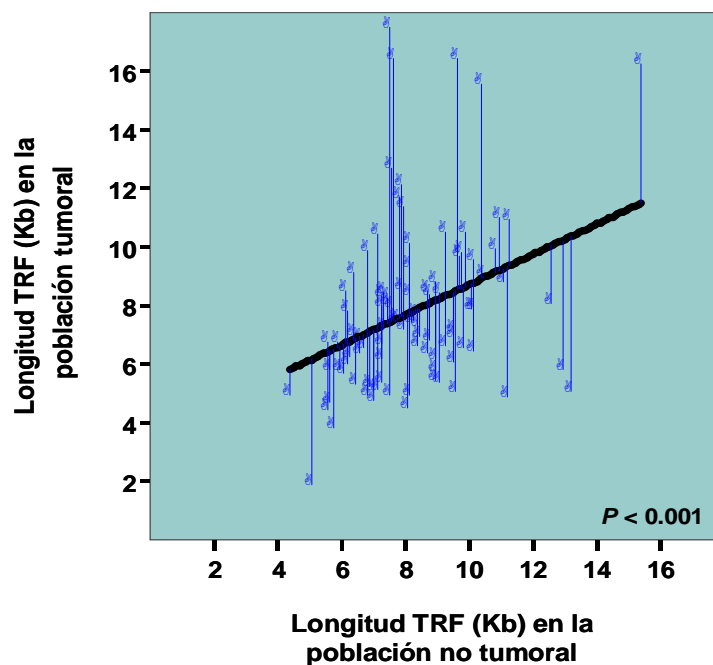


Figura 28. Diagrama de dispersión en el que se muestran las longitudes de los telómeros de los 95 pacientes, tanto en las muestras no tumorales como en las tumorales, en Kilobases.

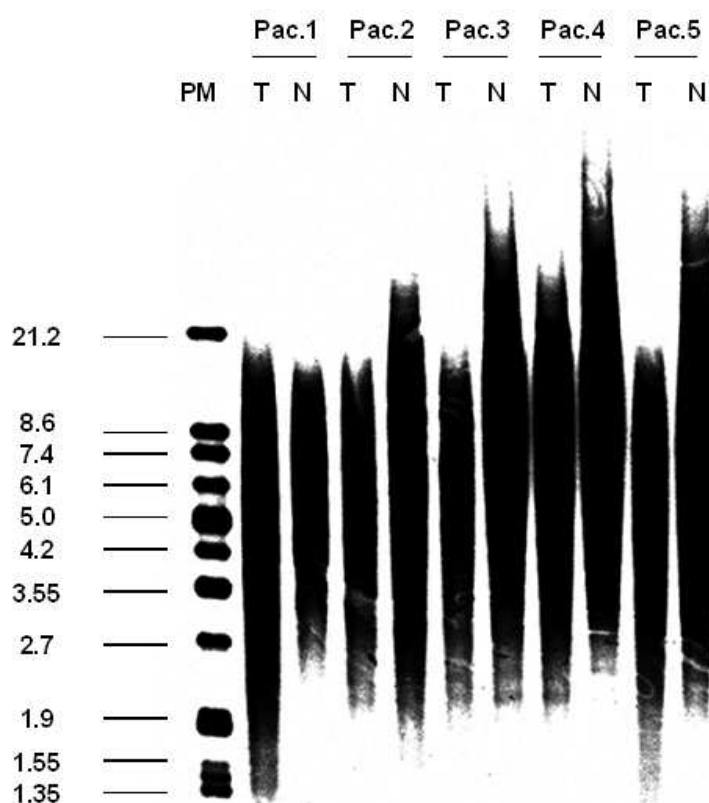


Figura 29. Ejemplo de Southern-blot de ADN telomérico de pacientes afectados por CNMP. En el lado izquierdo se muestra el marcador de peso molecular (PM) empleado para determinar la longitud de los fragmentos teloméricos de las distintas muestras, con sus correspondientes valores expresados en Kilobases (Kb). A continuación, aparecen los fragmentos teloméricos de distintos pacientes (Pac, paciente; T, muestra tumoral; N, muestra no tumoral).

No se observaron diferencias significativas en la longitud de los telómeros entre los tumores con actividad telomerasa y los que resultaron negativos ($P = 0.399$, aplicando la prueba *t de Student*). En el primer caso, la media de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción fue 7.82 Kb (7.20 – 8.43 Kb, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que los tumores sin actividad telomerasa mostraron una longitud media de 7.88 Kb (5.99 – 9.76 Kb, intervalo de confianza del 95% para la media) (Figura 30). Expresados estos resultados como TRF T/TRF N, se obtuvieron los siguientes valores medios: los tumores en los que se detectó actividad enzimática presentaron un TRF T/TRF N medio de 0.98 (0.91 – 1.06, intervalo

de confianza del 95% para la media), frente a 0.92 (0.77 – 1.06, intervalo de confianza del 95% para la media) en el grupo de cánceres sin actividad telomerasa.

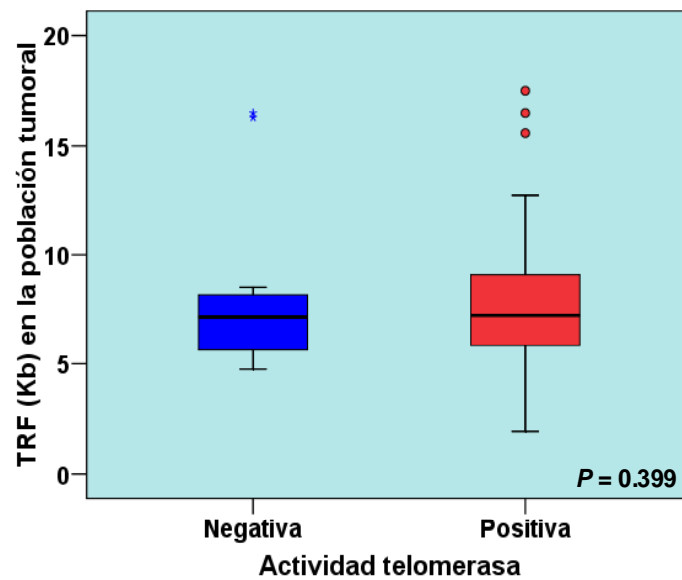


Figura 30. Diagrama de cajas donde están representadas las longitudes de los fragmentos teloméricos de restricción (TRF) de los 95 tumores analizados en esta Tesis, en función de si se ha detectado (derecha) o no (izquierda) actividad telomerasa. En el diagrama están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces a la desviación típica (situadas por encima del diagrama de cajas).

En las Tablas 27 y 28 se resumen los resultados aquí expuestos.

FUNCIÓN TELOMÉRICA	MEDIA TRF EN Kb (Intervalo de confianza del 95% en Kilobases)
Media de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción de las muestras no tumorales	8.19 (7.80 – 8.57)
Media de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción de las muestra tumorales	7.79 (7.21 – 8.37)
Media de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción de las muestra tumorales en las que no se detectó actividad telomerasa	7.86 (5.99 – 9.76)
Media de la longitud de los fragmentos teloméricos de restricción de las muestra tumorales en las que se detectó actividad telomerasa	7.77 (7.18 – 8.39)

Tabla 27. Resumen de los datos de TRF medios, en Kilobaes, obtenidos a partir de la población de 95 pacientes analizada en esta Tesis.

FUNCIÓN TELOMÉRICA	TRF T/TRF N MEDIO
TRF T/TRF N medio	0.97 (0.90 – 1.04)
TRF T/TRF N medio de las muestras tumorales en las que no se detectó actividad telomerasa	0.98 (0.90 – 1.06)
TRF T/TRF N medio de las muestras tumorales en las que se detectó actividad telomerasa	0.92 (0.77 – 1.06)

Tabla 28. Resumen de los datos del ratio medio TRF T/TRF N obtenidos a partir de la población de 95 pacientes analizada en esta Tesis.

1.2 ESTUDIO DEL ESTATUS TELOMÉRICO Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Tras analizar el estatus telomérico en los 95 pacientes afectados de CNMP, se procedió a evaluar la posible relación entre éste y las variables clínico-patológicas.

El estudio del estatus telomérico y el estadio tumoral reveló que los tumores de estadio IV tenían más acortadas las secuencias teloméricas que los tumores del resto de los estadios, si bien estas diferencias no fueron significativas ($P = 0.439$, aplicando la prueba ANOVA). El ratio TRF T/TRF N medio en el primer caso fue de 0.80 (0.47 – 1.13, intervalo de confianza del 95% para la media) y para el resto de los estadios fueron los siguientes: 0.94 (0.87 – 1.01, intervalo de confianza del 95% para la media) para el estadio I, 0.98 (0.65 – 1.31, intervalo de confianza del 95% para la media) para el estadio II, 1.06 (0.90 – 1.23, intervalo de confianza del 95% para la media) para el estadio IIIA y 0.91 (0.22 – 1.59, intervalo de confianza del 95% para la media) para el estadio IIIB (Figura 31A).

Los tumores de mayor tamaño (T4) también mostraron secuencias teloméricas más cortas que aquellos de tamaños T1, T2 o T3, siendo significativas las diferencias encontradas entre las 4 poblaciones estudiadas ($P = 0.017$, aplicando la prueba ANOVA). El valor medio del ratio TRF T/TRF N en los tumores de menor tamaño (T1) fue 1.02 (0.83 – 1.21, intervalo de confianza del 95% para la media); en los tumores de tamaño T2 fue 0.92 (0.85 – 0.99, intervalo de confianza del 95% para la media); en los tumores clasificados como T3 fue 1.18 (0.96 – 1.41, intervalo de confianza del 95% para la media) y en los tumores de mayor tamaño (T4) fue 0.82 (0.44 – 1.20, intervalo de confianza del 95% para la media) (Figura 31B).

Con respecto a la infiltración ganglionar, no se encontraron diferencias significativas en cuanto a la longitud de las secuencias teloméricas ($P = 0.787$, aplicando la prueba ANOVA). El ratio TRF T/TRF N medio en los tumores que

no dieron lugar a infiltración ganglionar fue 0.97 (0.89 – 1.04, intervalo de confianza del 95% para la media); en los tumores con infiltración de grado N1 fue 1.05 (0.77 – 1.33, intervalo de confianza del 95% para la media) y en los tumores N2 fue 0.97 (0.90 – 1.04, intervalo de confianza del 95% para la media) (Figura 31C).

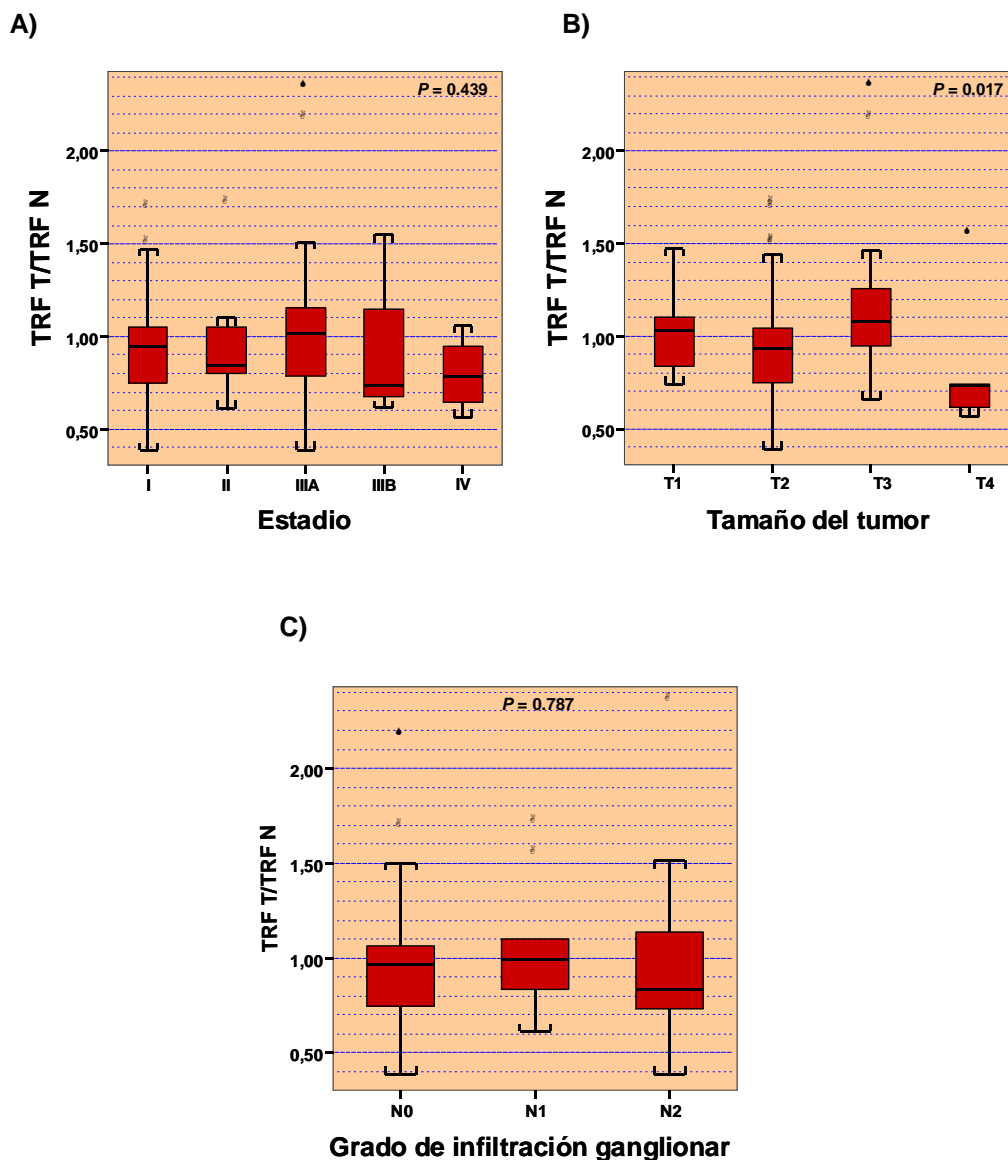


Figura 31. Diagramas de cajas en los que se representan los ratios TRF T/TRF N en la población de 95 CNMPs estudiada en esta Tesis, en función de: A) Estadio tumoral; B) Tamaño del tumor; C) Grado de infiltración ganglionar. En los diagramas están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces la desviación típica.

Teniendo en cuenta el tipo histológico, tampoco se encontraron diferencias significativas en función del estatus telomérico ($P = 0.315$, aplicando la prueba ANOVA), pero cabe destacar el hecho de que los carcinomas indiferenciados de célula grande tenían un ratio TRF T/TRF N medio claramente disminuido con respecto a los tipos histológicos carcinoma epidermoide y adenocarcinoma, lo que significa que la longitud de sus telómeros era menor que en los otros dos tipos histológicos. Los primeros presentaban un ratio medio de 0.73 (0.51 – 0.95, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que los tumores de tipo carcinoma epidermoide y adenocarcinoma tenían, como media, un ratio de 0.99 (0.90 – 1.09, intervalo de confianza del 95% para la media) y 0.97 (0.86 – 1.08, intervalo de confianza del 95% para la media), respectivamente (Figura 32A).

Con respecto a la recurrencia tumoral, no se observaron diferencias significativas en cuanto a la longitud de los telómeros en las dos poblaciones estudiadas ($P = 0.161$, aplicando la prueba U de Mann-Whitney). El grupo de tumores que no recidivó tenía un ratio TRF T/TRF N de 1.00 (0.91 – 1.08, intervalo de confianza del 95% para la media) y el grupo que dio lugar a recurrencias durante el periodo de seguimiento de la serie, de 0.96 (0.83 – 1.10, intervalo de confianza del 95% para la media) (Figura 32B).

Los datos aquí reflejados se resumen en las Tablas 29 y 30.

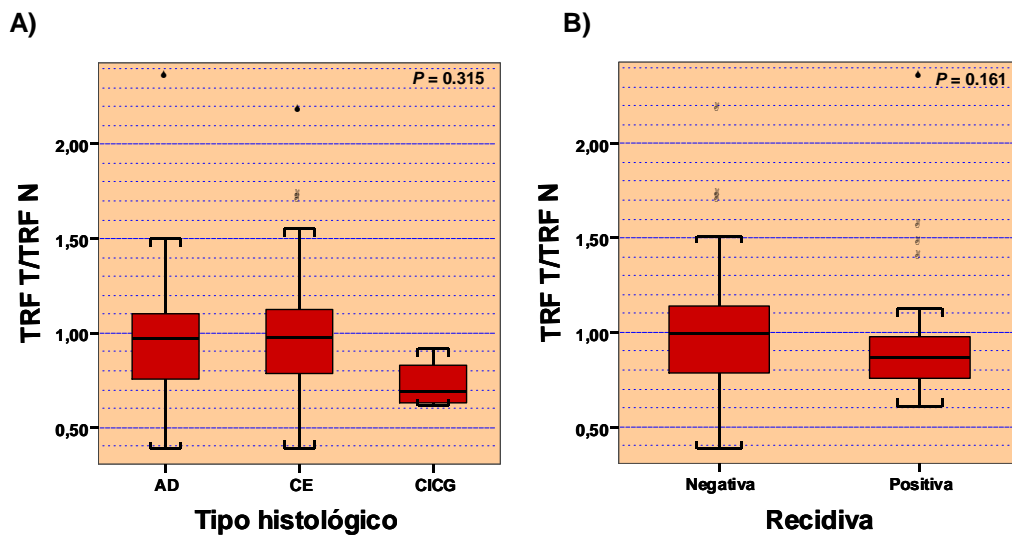


Figura 32. Diagramas de cajas en el que se representan los ratios TRF T/TRF N en la población de 95 CNMPs estudiada en esta Tesis, en función de: A) Tipo histológico del tumor (AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma epidermoide; CICG, carcinoma indiferenciado de célula grande. B) Recidiva tumoral. En los diagramas están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces la desviación típica.

VARIABLE	N° DE CASOS	LONGITUD DE LOS TELÓMEROS (Kb) (Intervalo de confianza del 95% en Kb)			
		MUESTRAS CONTROL (N)	P	MUESTRAS TUMORALES (T)	P
Estadio	95		0.665		0.439
I	51	8.05 (7.55 - 8.55)		7.42 (6.81 - 8.03)	
II	7	8.01 (6.72 - 9.29)		8.05 (4.29 - 11.81)	
IIIA	29	8.45 (7.72 - 9.19)		8.62 (7.43 - 9.81)	
IIIB	4	7.51 (6.65 - 8.37)		6.87 (1.25 - 12.49)	
IV	4	9.14 (2.46 - 15.83)		7.78 (-1.25 - 16.82)	
Tamaño	95		0.401		0.005
T1	8	7.43 (5.88 - 8.97)		7.52 (5.65 - 9.39)	
T2	63	8.25 (7.79 - 8.71)		7.44 (6.83 - 8.06)	
T3	18	8.58 (7.42 - 9.73)		9.86 (8.07 - 11.65)	
T4	6	7.47 (6.87 - 8.08)		6.16 (3.06 - 9.26)	
Infiltración ganglionar	95		0.999		0.603
N0	65	8.20 (7.71 - 8.69)		7.79 (7.13 - 8.44)	
N1	9	8.18 (7.15 - 9.20)		8.71 (5.79 - 11.63)	
N2	21	8.18 (7.30 - 9.07)		7.57 (6.14 - 9.00)	
Tipo histológico	95		0.271		0.345
Adenocarcinoma	38	8.53 (7.84 - 9.22)		8.24 (7.17 - 9.32)	
Carcinoma epidermoide	53	7.91 (7.43 - 8.40)		7.64 (6.92 - 8.36)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	4	8.67 (7.64 - 9.69)		6.31 (4.46 - 8.16)	
Recidiva	90		0.698		0.707
Positiva	29	8.26 (7.59 - 8.94)		7.74 (6.76 - 8.72)	
Negativa	61	8.19 (7.67 - 8.71)		8.04 (7.26 - 8.81)	

Tabla 29. Resumen de los datos de longitud telomérica media en las muestras no tumorales y tumorales de los 95 casos de CNMP estudiados en esta Tesis, en función de distintas variables clínico-patológicas.

VARIABLE	N° DE CASOS	TRF T/TRF N (Intervalo de confianza del 95%)	P
Estadio	95		0.439
I	51	0.94 (0.87 - 1.01)	
II	7	0.98 (0.65 - 1.31)	
IIIA	29	1.06 (0.90 - 1.23)	
IIIB	4	0.91 (0.22 - 1.59)	
IV	4	0.80 (0.47 - 1.13)	
Tamaño	95		0.017
T1	8	1.02 (0.83 - 1.21)	
T2	63	0.92 (0.85 - 0.99)	
T3	18	1.18 (0.96 - 1.41)	
T4	6	0.82 (0.44 - 1.20)	
Infiltración ganglionar	95		0.787
N0	65	0.97 (0.89 - 1.04)	
N1	9	1.05 (0.77 - 1.33)	
N2	21	0.96 (0.77 - 1.15)	
Tipo histológico	95		0.315
Adenocarcinoma	38	0.97 (0.86 - 1.09)	
Carcinoma epidermoide	53	0.99 (0.90 - 1.09)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	4	0.73 (0.51 - 0.95)	
Recidiva	90		0.161
Positiva	29	0.96 (0.83 - 1.10)	
Negativa	61	1.00 (0.91 - 1.08)	

Tabla 30. Resumen de los datos del ratio TRF T/TRF N medio de los 95 CNMPs estudiados en esta Tesis, en función de distintas variables clínico-patológicas.

A continuación, se establecieron dos grupos de tumores en función del ratio TRF T/TRF N. Consideramos acortamiento telomérico cuando el ratio TRF T/TRF N era inferior a 1, mientras que los tumores cuyos ratios eran iguales o mayores de 1 se agruparon como mantenimiento telomérico.

Basándonos en el estatus telomérico, es decir, en si las muestras tumorales mostraban acortamiento o mantenimiento de las secuencias teloméricas en comparación con su correspondiente muestra no tumoral, realizamos el estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad. En total, 85 pacientes formaron parte del estudio. De éstos, 43 presentaron tumores con acortamiento telomérico y en 42 casos los telómeros mantenían su longitud con respecto al control.

Aparecieron recidivas en el 19% de los pacientes que mostraban mantenimiento telomérico. En los casos en los que se detectó acortamiento de las secuencias teloméricas, el porcentaje de recidivas fue del 44.2%. El intervalo libre de enfermedad medio para estos fue de 38.32 meses (29.04 – 47.60 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) frente a 52.60 meses (43.35 – 61.84 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) para el grupo clasificado como mantenimiento telomérico. Las diferencias entre los dos grupos fueron significativas ($P = 0.020$, según la comparación estadística Log Rank) (Figura 33). Esto se traduce en que el acortamiento de las secuencias teloméricas en las muestras tumorales es un factor de pronóstico adverso en cáncer no microcítico de pulmón.

Con objeto de determinar si el acortamiento de los telómeros representaba, en CNMP, un factor de mal pronóstico independiente de otras variables clínico-patológicas, se llevó a cabo un análisis multivariable de Cox. La selección de variables que formaron parte de este análisis se realizó a partir de un análisis univariable, seleccionándose el estadio tumoral y el grado de infiltración ganglionar, pues fueron las únicas variables clínico-patológicas cuyo nivel de significación fue inferior a 0.1. Así, el acortamiento telomérico resultó ser un factor de mal pronóstico independiente del estadio tumoral y del grado de infiltración ganglionar ($P = 0.012$). El riesgo relativo medio de recidiva fue 1.89 veces superior (1.15 – 3.10, intervalo de confianza del 95% para la media) en los pacientes con acortamiento de las secuencias teloméricas (Tabla 31).

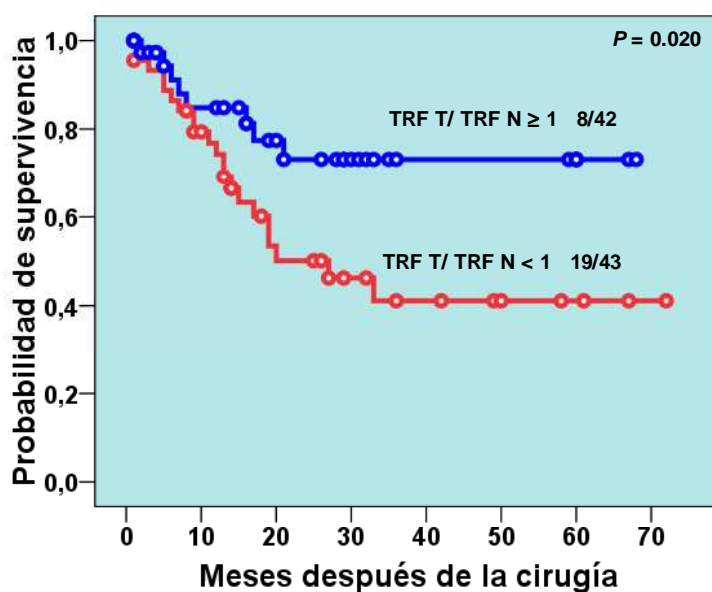


Figura 33. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, de 85 pacientes afectados de CNMP, en relación a la longitud telomérica. En azul se representa el grupo de pacientes con mantenimiento telomérico y en rojo el grupo con telómeros acortados. En cada curva, se indica el número de casos con recidiva respecto al número total de pacientes.

VARIABLE	RIESGO	INTERVALO DE CONFIANZA	P
	RELATIVO	DEL 95%	
Estadio			0.031
II vs I	1.757	0.489 – 6.310	0.338
IIIA vs II	3.139	1.343 – 7.333	0.008
Infiltración ganglionar			
N0 vs N1/N2	0.423	0.169 – 1.059	0.066
TRF T/TRF N < 1)	1.887	1.147 – 3.102	0.012

Tabla 31. Análisis multivariable de Cox considerando las variables clínico-patológicas estadio tumoral y grado de infiltración ganglionar y la longitud de los telómeros.

1.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO- PATOLÓGICAS

Considerando los 5 estadios establecidos en CNMP, no se observaron diferencias significativas en función de la actividad de la enzima telomerasa en los tumores analizados ($P = 0.078$, según la prueba *Chi cuadrado*), si bien sí se apreció una tendencia hacia la falta de actividad en los estadios más avanzados. Los tumores de estadio I mostraron actividad telomerasa en el 82.3% de los casos; los tumores de estadio II en el 85.7%; los tumores de estadio IIIA en el 93.1%; y los tumores de estadio IIIB y IV en el 50% (Figura 34A).

En cuanto al tamaño del tumor, no se obtuvieron diferencias significativas entre las poblaciones estudiadas ($P = 0.121$, según la prueba *Chi cuadrado*). En los tumores de tamaño T1 se detectó actividad telomerasa en el 75% de los casos; en los tumores T2 en el 85.7%; en los tumores T3 en el 88.9% y en los tumores T4 en el 50% (Figura 34B).

Con respecto a la infiltración ganglionar, no se obtuvieron diferencias significativas entre la población tumoral con y sin actividad telomerasa ($P = 0.595$, según la prueba *Chi cuadrado*). Mostraron actividad telomerasa el 84.6%, 88.9% y 76.2% de los tumores sin infiltración ganglionar, con grado N1 de infiltración ganglionar y con grado N2, respectivamente (Figura 34C).

Sin embargo, se encontraron diferencias significativas al considerar la clasificación tumoral en función del tipo histológico ($P = 0.006$, según la prueba *Chi cuadrado*). Así, los adenocarcinomas y los carcinomas epidermoides presentaban, mayoritariamente, actividad telomerasa (32/38 y 46/53, respectivamente) mientras que el 75% de los carcinomas indiferenciados de célula grande carecían de ella (3/4) (Figura 35A).

El análisis de la actividad de telomerasa con relación a la aparición de recidivas mostró la existencia de diferencias significativas ($P = 0.031$, según la

prueba *Chi cuadrado*) entre las poblaciones analizadas. Sólo el 7.1% (1/13) de los tumores que carecían de actividad telomerasa recidivaron, mientras que en los tumores telomerasa positivos, se detectó un 36.8% (28/76) de recidivas (Figura 35B).

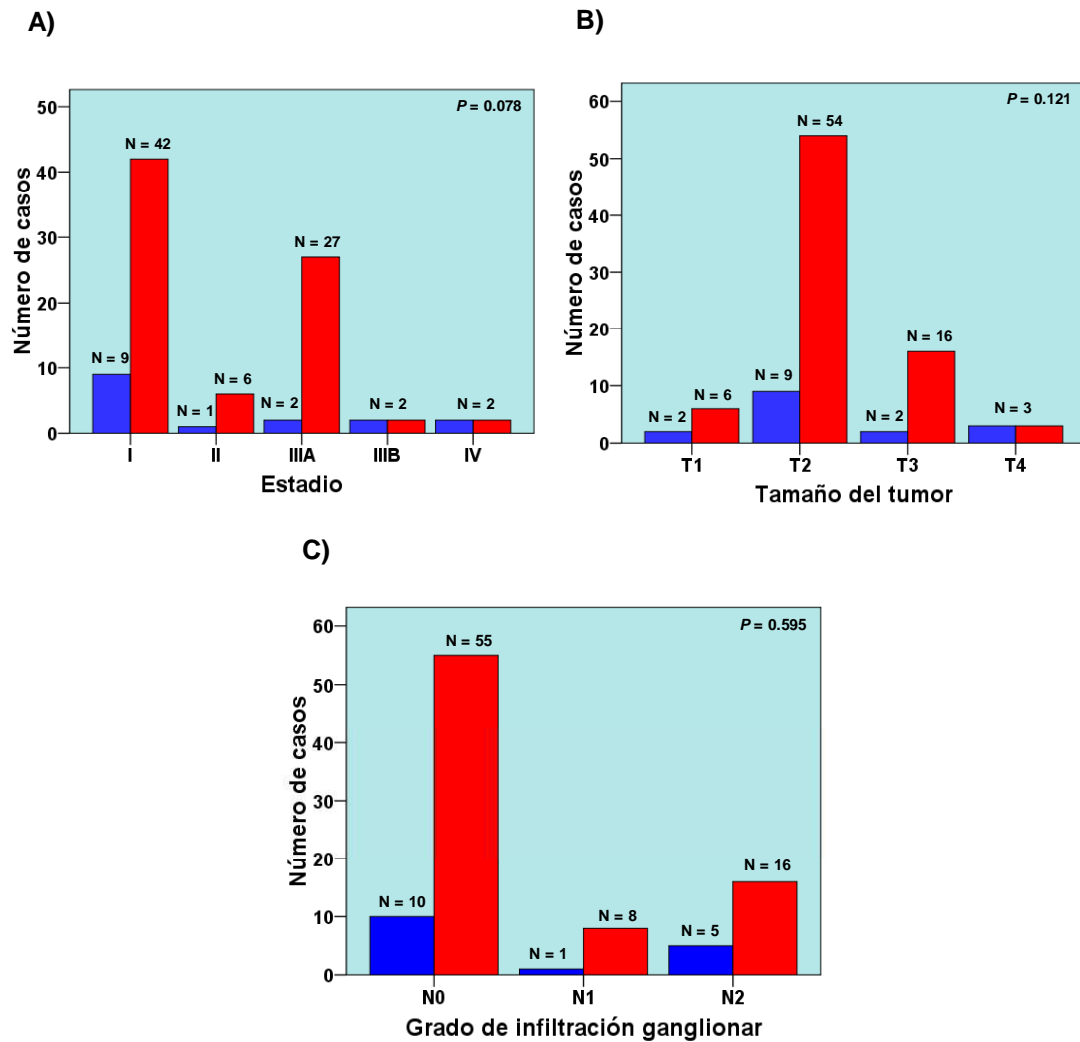


Figura 34. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de actividad telomerasa en función de: A) Estadio tumoral; B) Tamaño del tumor; C) Grado de infiltración ganglionar. En todos los casos, las barras azules indican tumores sin actividad telomerasa y las rojas tumores que en los se detectó actividad enzimática.

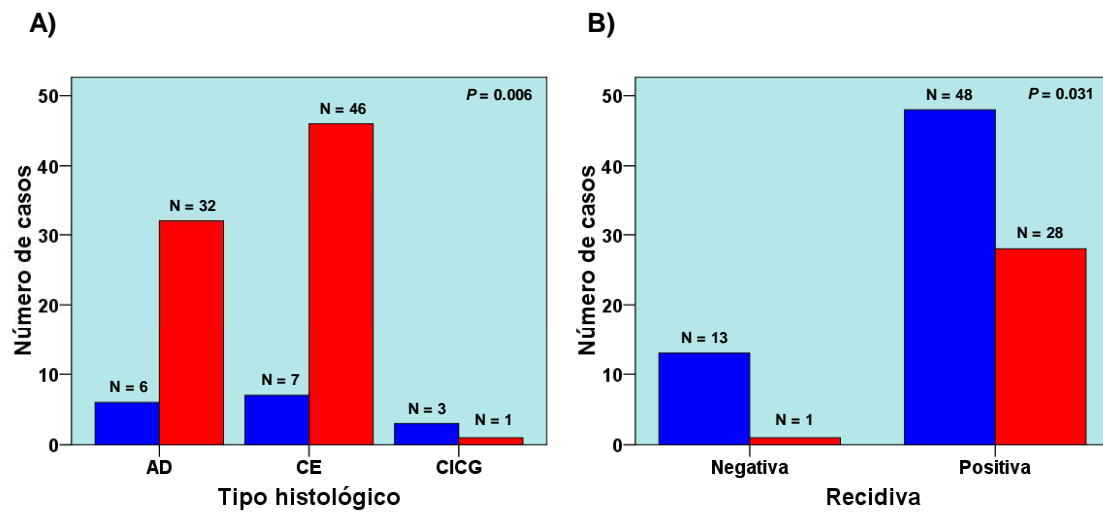


Figura 35. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de actividad telomerasa en función de: A) Tipo histológico del tumor; AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma epidermoide; CICG, carcinoma indiferenciado de célula grande; B) Recidiva tumoral. En ambos casos, las barras azules indican tumores sin actividad telomerasa y las rojas tumores en los se detectó actividad enzimática.

Los datos aquí expuestos quedan resumidos en la Tabla 32.

VARIABLE	N° DE CASOS	ACTIVIDAD TELOMERASA		P
		POSITIVA (%)	NEGATIVA (%)	
Estadio	95			0.078
I	51	42 (82.3)	9 (17.7)	
II	7	6 (85.7)	1 (14.3)	
IIIA	29	27 (93.1)	2 (6.9)	
IIIB	4	2 (50)	2 (50)	
IV	4	2 (50)	2 (50)	
Tamaño	95			0.121
T1	8	6 (75)	2 (25)	
T2	63	54 (85.7)	9 (14.3)	
T3	18	16 (88.9)	2 (11.1)	
T4	6	3 (50)	3 (50)	
Infiltración ganglionar	95			0.595
N0	65	55 (84.6)	10 (15.4)	
N1	9	8 (88.9)	1 (11.1)	
N2	21	16 (76.2)	5 (23.8)	
Tipo histológico	95			0.006
Adenocarcinoma	38	32 (84.2)	6 (15.8)	
Carcinoma epidermoide	53	46 (86.8)	7 (13.2)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	4	1 (25)	3 (75)	
Recidiva	90			0.031
Positiva	29	28 (96.5)	1 (3.5)	
Negativa	61	48 (78.7)	13 (21.3)	

Tabla 32. Resumen de los datos de actividad de la enzima telomerasa en los 95 CNMPs estudiados en esta Tesis y su relación con variables clínico-patológicas.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, reveló que ninguno de los tumores sin actividad telomerasa dio lugar a recidiva durante el periodo de seguimiento de la serie. Sin embargo, se detectaron recidivas en el 37% de los pacientes con tumores telomerasa positivos. Por tanto, la actividad telomerasa parece estar relacionada con un peor pronóstico

y una mayor capacidad del tumor para recidivar ($P = 0.019$, según la comparación estadística *Log Rank*) (Figura 36A).

En este estudio se incluyeron 85 pacientes. De estos , 12 pacientes carecieron de actividad telomerasa en la muestra tumoral y en 73 se detectó actividad enzimática.

Considerando únicamente los pacientes en cuya muestra tumoral se detectó actividad de la enzima telomerasa, 73, el acortamiento telomérico volvió a estar relacionado con un peor pronóstico ($P = 0.026$, según la comparación estadística *Log Rank*). Así, el 51.3% de los pacientes cuyas muestras tumorales mostraron un ratio TRF T/TRF N inferior a 1 presentaron recurrencia tumoral durante el tiempo de seguimiento de la serie, frente al 22.2% de los pacientes cuyo ratio fue igual o superior a 1. El intervalo libre de enfermedad medio para el primer grupo de pacientes fue 32.92 meses (22.93 – 42.92 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) y 50.68 meses (40.49 – 60.87 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) para el grupo de pacientes con tumores que mantuvieron la longitud de las secuencias teloméricas en la muestra tumoral con respecto a su correspondiente muestra no tumoral (Figura 36B).

De los 73 pacientes incluidos en este estudio, 37 acortaban las secuencias teloméricas en la muestra tumoral y 36 mantenían la longitud.

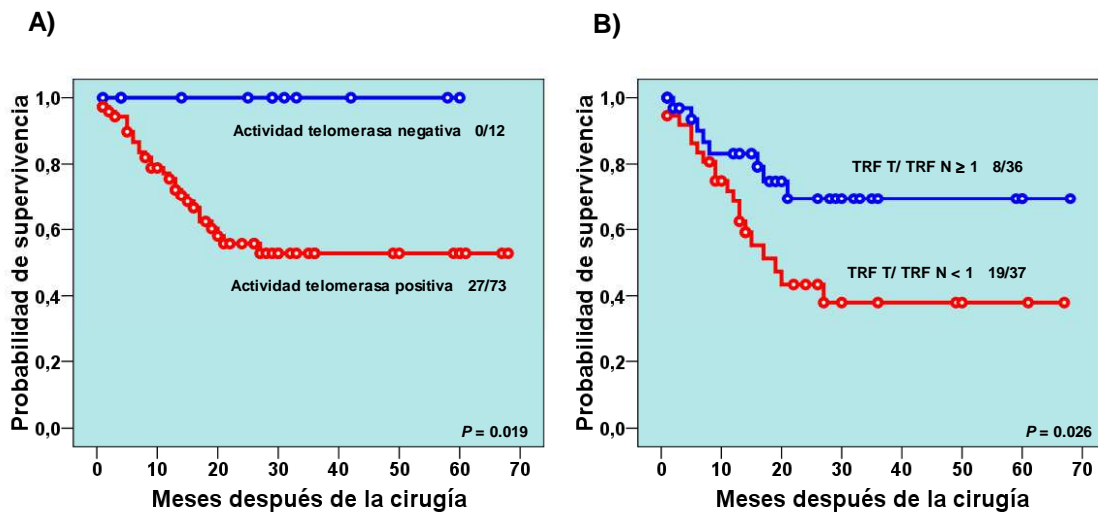


Figura 36. A) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, de 85 pacientes afectados de CNMP, en relación con la actividad telomerasa. En azul se representan los pacientes sin actividad telomerasa en la muestra tumoral y en rojo los pacientes con actividad enzimática. B) Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, de 73 pacientes afectados de CNMP y con actividad telomerasa en la muestra tumoral, en relación con la longitud telomérica. En azul se representa el grupo de pacientes con mantenimiento telomérico y en rojo el grupo con telómeros acortados. En ambos casos, en cada curva se indica el número de casos con recidiva respecto al número total de pacientes.

2. ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE MATRICES DE ADN COMPLEMENTARIO

2.1 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN EN MUESTRAS TUMORALES Y CONTROL

Para el estudio inicial de genes de reparación del ADN con matrices de ADN complementario se seleccionaron 21 muestras tumorales cuyo ARN tenía una integridad óptima, requisito imprescindible para el empleo de esta técnica. Siguiendo criterios establecidos en otros estudios se escogió, como referencia, una mezcla de 8 muestras control.

Con el programa “GEArray Expression Analysis Suite” de Superarray® analizamos los niveles de expresión de ARN mensajero de las 21 muestras tumorales y de la mezcla constituida por 8 muestras no tumorales. Establecimos, como diferencia mínima, que la expresión entre ambos grupos debía diferir, al menos, en dos veces. Los niveles de expresión fueron normalizados con el gen de expresión constitutiva *PPIA* (*CICLOFILINA A*). La Figura 37 representa dos matrices hibridadas, una con el control, y la otra con una muestra tumoral. En la Tabla 33 se recogen los genes incluidos en la matriz en el orden en el que se localizan.

Los genes cuya expresión se vio alterada en la población tumoral con respecto a la mezcla de muestras no tumorales pertenecían a distintas vías de reparación del ADN. En la Tabla 34 están recogidos estos genes junto a los niveles de expresión que mostraban en la población tumoral con respecto a la no tumoral. La Figura 38 representa los genes y el aumento o disminución de expresión en la población tumoral, con respecto al control, en un diagrama de barras.

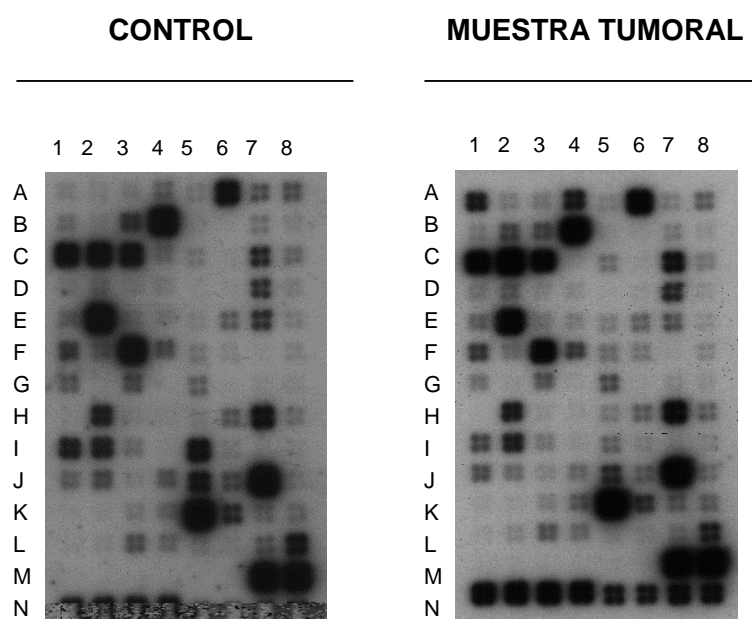


Figura 37. Representación de dos matrices de ADN complementario hibridadas. A la izquierda, autorradiografía de la mezcla de 8 muestras no tumorales; a la derecha, autorradiografía de una muestra tumoral. En ambas, las dos últimas filas se corresponden con los blancos (fila M: posición 1 - 6) y con los genes normalizadores (fila M: posición 7 - 8; fila N: posición 1 - 8).

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	PARP1	PARP2	PARP3	APEX1	APEX2	ATM	ATR	BRCA1
B	BRCA2	CCNH	CDK7	CETN2	ERCC8	DCLRE1A	DCLRE1B	DCLRE1C
C	DDB1	DDB2	DEPC-1	DMC1	DUT	ERCC1	ERCC2	ERCC3
D	ERCC4	ERCC5	ERCC6	EXO1	FEN1	NEIL3	XRCC6	GTF2H1
E	GTF2H2	GTF2H3	GTF2H4	LIG1	LIG3	LIG4	MBD4	MGMT
F	MLH1	MLH3	MNAT1	MRE11A	MSH2	MSH3	MSH4	MSH5
G	MSH6	MUTYH	NBN	NEIL1	NEIL2	NTHL1	OGG1	PMS1
H	PMS2	PMS2L3	PMS2L4	PNKP	PRKDC	RAD18	RAD23A	RAD23B
I	RAD50	RAD51C	RAD51L1	RAD51L3	RAD54B	RAD54L	RECQL4	RECQL5
J	RPA1	RPA2	RPA3	SMUG1	TDG	TERF1	TERF2	TERT
K	TOP3A	TOP3B	UBE2A	UBE2B	UBE2I	UBE2N	UBE2V2	UNG
L	XAB2	XPA	XPC	XRCC1	XRCC2	XRCC3	XRCC4	XRCC5
M	PUC18	PUC18	PUC18	Blank	Blank	Blank	GAPDH	GAPDH
N	PPIA	PPIA	PPIA	PPIA	RPL13A	RPL13A	ACTB	ACTB

Tabla 33. Genes incluidos en la matriz de ADN complementario según su localización en la misma.

GEN	VÍA DE REPARACIÓN	N° DE VECES QUE SE EXPRESA EL GEN CON RESPECTO AL CONTROL
<i>PARP1</i>	BER	4.84
<i>DCLRE1A</i>	ESTABILIDAD	2.69
<i>ERCC1</i>	NER	2.68
<i>FLJ10858</i>	BER	3.71
<i>MSH4</i>	MMR	108.49
<i>OGG1</i>	BER	2.16
<i>RAD23B</i>	NER	2.18
<i>MUTYH</i>	BER	0.42
<i>PMS2</i>	MMR	0.36
<i>RAD54B</i>	HR	0.47
<i>RPA2</i>	NER	0.41

Tabla 34. Valores medios del número de veces que se expresaba cada gen en la población de 21 tumores de CNMP con respecto a la mezcla de 8 muestras no tumorales considerada como referencia. La primera columna indica el gen en el que se detectaron niveles de expresión de ARN mensajero diferente entre ambos grupos. La segunda columna representa la vía de reparación a la que pertenece cada gen (BER, reparación por escisión de bases; ESTABILIDAD, genes relacionados con la estabilidad genómica; HR, recombinación homóloga; MMR, reparación de apareamientos incorrectos de bases; NER, reparación por escisión de nucleótidos). En la tercera columna se indica el número medio de veces que cada gen está aumentado o disminuido en las muestras tumorales con respecto a la mezcla no tumoral.

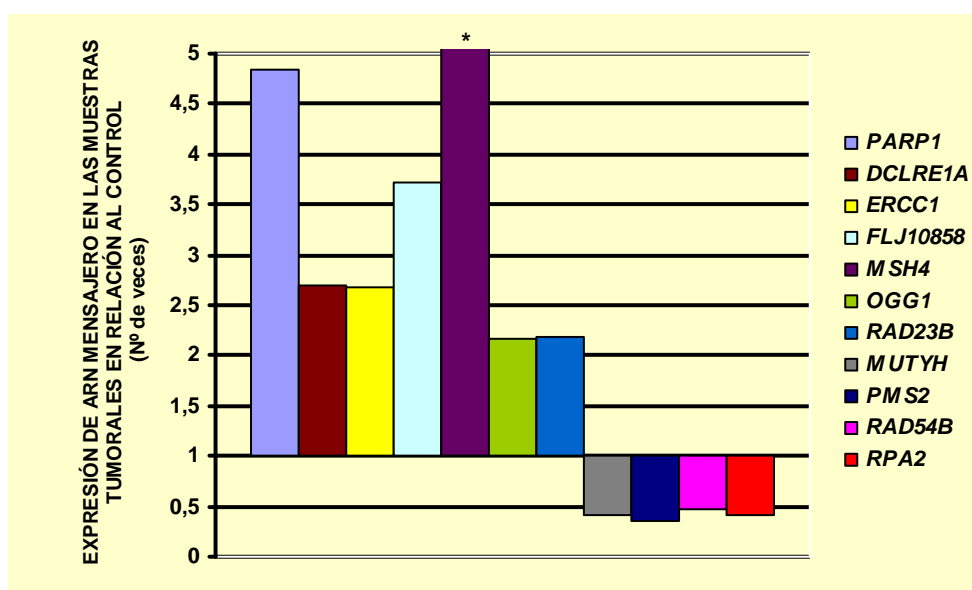


Figura 38. Datos obtenidos a partir del análisis de 21 tumores de CNMP. Los genes representados en el diagrama de barras son aquellos cuya expresión era ± 2 veces la expresión de los mismos en la mezcla no tumoral. Cada dato se normalizó con ciclofilina A. * El gen *MSH4* mostró una expresión 108.5 veces más en las muestras tumorales que en la mezcla de muestras normales.

2.2 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN Y ESTATUS TELOMÉRICO

De las 21 muestras seleccionadas, 11 presentaban acortamiento significativo de las secuencias teloméricas en comparación con su correspondiente muestra control, es decir, la longitud de los telómeros en el tumor era, al menos, un 20% más corta que en la correspondiente muestra no tumoral. Las 10 restantes se clasificaron como mantenimiento de las secuencias teloméricas.

Mediante el programa “GEArray Expression Analysis Suite” de Superarray® seleccionamos los genes que mostraron diferencias de expresión de ARN mensajero de, al menos, 2 veces entre la población que mantenía la longitud de los fragmentos teloméricos y la que los acortaba significativamente, habiendo normalizado previamente los datos obtenidos con el gen PPIA.

Diferentes genes pertenecientes a distintas vías de reparación mostraban variaciones de expresión entre las dos poblaciones estudiadas. En la Tabla 35 se recogen los genes que mostraban estas variaciones, así como la vía de reparación a la que pertenecen y los niveles de significatividad (estadístico t de Student o U de Mann-Whitney) encontrados tras el estudio estadístico. Los niveles de expresión de ARN mensajero de los genes están expresados en unidades arbitrarias. Son los datos obtenidos a partir del análisis de los resultados con el programa de Superarray®.

GEN	VÍA DE REPARACIÓN	MEDIA DE EXPRESIÓN (INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95% PARA LA MEDIA) (U.A.)		P
		Acortamiento telomérico significativo	Mantenimiento telomérico	
ATR	ESTABILIDAD	0.25 (0.12 – 0.39)	0.34 (0.17 – 0.50)	0.342
DCLRE1A	ESTABILIDAD	0.08 (0.04 – 0.11)	0.12 (0.06 – 0.15)	0.233
DCLRE1C	NHEJ	0.05 (0.02 - 0.08)	0.11 (0.8 – 0.18)	0.090
ERCC1	NER	0.07 (0.05 – 0.10)	0.10 (0.06 – 0.15)	0.218
ERCC3	NER	0.13 (0.07 – 0.18)	0.20 (0.12 – 0.27)	0.107
FEN1	ESTABILIDAD	0.03 (0.02 – 0.04)	0.05 (0.03 – 0.08)	0.076
FLJ10858	BER	0.06 (0.04 – 0.08)	0.1 (0.06 – 0.13)	0.053
GTF2H1	NER	0.05 (0.02 – 0.08)	0.12 (0.07 – 0.16)	0.019
LIGASA4	NHEJ	0.33 (0.15 – 0.52)	0.42 (0.22 – 0.61)	0.417
MLH1	MMR	0.33 (0.24 – 0.43)	0.45 (0.28 – 0.63)	0.183
MLH3	MMR	0.24 (0.15 – 0.33)	0.20 (0.12 – 0.28)	0.549
MSH4	MMR	0.04 (0.01 – 0.05)	0.07 (0.04 – 0.10)	0.021
MSH5	MMR	0.27 (0.03 – 0.50)	0.12 (0.07 – 0.18)	0.672
MSH6	MMR	0.22 (0.12 – 0.32)	0.27 (0.16 – 0.38)	0.431

MUYTH	BER	0.06 (0.04 – 0.09)	0.06 (0.03 – 0.10)	0.831
NTHL1	BER	0.04 (0.02 – 0.05)	0.06 (0.3 – 0.10)	0.150
OGG1	BER	0.09 (0.04 – 0.14)	0.15 (0.04 – 0.25)	0.456
<i>PARP1</i>	BER	0.41 (0.20 – 0.61)	0.65 (0.29 – 1.00)	0.214
PARP3	BER	0.10 (0.06 – 0.14)	0.18 (0.11 – 0.25)	0.029
PMS1	MMR	0.06 (0.03 – 0.08)	0.11 (0.06 – 0.17)	0.031
PMS2	MMR	0.02 (0.01 – 0.04)	0.04 (-0.00 – 0.09)	0.829
PMS2L4	MMR	0.27 (0.09 – 0.45)	0.18 (0.02 – 0.33)	0.418
PNKT	ESTABILIDAD	0.05 (0.03 – 0.06)	0.06 (0.03 – 0.08)	0.308
RAD23B	NER	0.53 (0.27 – 0.80)	0.53 (0.23 – 0.83)	0.860
RAD50	NHEJ	0.64 (0.46 – 0.83)	0.56 (0.26 – 0.85)	0.590
RAD54B	HR	0.49 (0.27 – 0.71)	0.47 (0.19 – 0.29)	0.778
RPA2	NER	0.20 (0.11 – 0.29)	0.27 (0.15 – 0.39)	0.302
hTERT	ESTABILIDAD	0.4 (0.23 – 0.58)	0.32 (0.19 – 0.46)	0.417
TOP3B	ESTABILIDAD	0.04 (0.2 – 0.06)	0.07 (0.03 – 0.10)	0.129
TRF2	ESTABILIDAD	1.01 (1.04 – 1.13)	1.14 (1.04 – 1.23)	0.309
XAB2	NER	0.02 (0.00 – 0.03)	0.03 (0.00 – 0.06)	0.467
XPC	NER	0.22 (0.09 – 0.34)	0.32 (0.09 – 0.55)	0.397

Tabla 35. Genes que mostraron diferencias en los niveles de expresión de ARN mensajero de, al menos, ± 2 veces, en la población de 21 CNMPs subdividida en función del estatus telomérico. Las unidades de expresión son arbitrarias (U.A.) y fueron definidas por el programa “GEArray Expression Analysis Suite” de Superarray® empleado en el análisis de datos. La segunda columna representa la vía de reparación a la que pertenece cada gen (BER, reparación por escisión de bases; ESTABILIDAD, genes relacionados con la estabilidad genómica; HR, recombinación homóloga; MMR, reparación de apareamientos incorrectos de bases; NHEJ, recombinación no homóloga; NER, reparación por escisión de nucleótidos). En negrita se representan los genes que, posteriormente, se analizaron por PCR cuantitativa a tiempo real.

2.3 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN Y ACTIVIDAD TELOMERASA

Seguidamente, se procedió a realizar un estudio diferencial de expresión de ARN mensajero entre la población de tumores con actividad telomerasa y el grupo sin actividad. De los 21 tumores evaluados, se detectó actividad enzimática en 15. El análisis de los resultados se llevó a cabo con el programa “GEArray Expression Analysis Suite” de Superarray® y los datos se normalizaron con el gen PPIA.

Inicialmente, se seleccionaron aquellos genes cuyas diferencias de expresión entre ambas poblaciones eran de, al menos, 2 veces. En la Tabla 36 se recogen los datos de estos genes, así como la vía de reparación a la que pertenecen y los niveles de significación (estadístico *U de Mann-Whitney*). Los niveles de ARN mensajero vienen expresados en las unidades arbitrarias dadas por el programa de Superarray®.

GEN	VÍA DE REPARACIÓN	MEDIA DE EXPRESIÓN (INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95% PARA LA MEDIA) (U.A.)		P
		Actividad telomerasa negativa	Actividad telomerasa positiva	
MSH6	MMR	0.14 (-0.01 – 0.30)	0.29 (0.21 – 0.36)	0.021
XAB2	NER	0.01 (-0.01 – 0.03)	0.03 (0.01 – 0.05)	0.108
XPC	NER	0.42 (0.00 – 0.84)	0.21 (0.12 – 0.30)	0.242

Tabla 36. Genes que mostraron diferencias en los niveles de expresión de ARN mensajero de, al menos, ± 2 veces, en la población de 21 CNMPs subdividida en función de la actividad de la enzima telomerasa. Las unidades de expresión son arbitrarias (U.A). La segunda columna representa la vía de reparación a la que pertenece cada gen (MMR, reparación de apareamientos incorrectos de bases; NER, reparación por escisión de nucleótidos). En negrita se representan los genes que, posteriormente, fueron estudiados por PCR cuantitativa a tiempo real.

3. ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN MEDIANTE PCR CUANTITATIVA A TIEMPO REAL

Tras realizar un primer abordaje con las matrices de ADN complementario, se procedió a validar los resultados por la técnica PCR cuantitativa a tiempo real. Para ello, se seleccionaron los genes que podrían estar implicados en la función telomérica. Se eligieron aquellos que mostraron diferencias significativas de expresión de ARN mensajero entre las poblaciones estudiadas, según la función telomérica, así como aquellos cuyas diferencias de expresión presentaban un nivel de significación estadística en torno a 0.1. En las Tablas 35 y 36 quedan reflejados en negrita los genes incluidos en este estudio. Asimismo, se analizaron los genes *PARP1*, *PRKDC*, *hTERT*, *TRF1*, *TRF2* y *XRCC5*, ya que, si bien no mostraron diferencias significativas de expresión entre las poblaciones estudiadas, su implicación en la función telomérica está definida en la literatura.

Se consideraron 37 tumores, incluidos los 21 analizados con las matrices de ADN complementario, así como la mezcla de muestras no tumorales, que ejerció como calibradora. El gen *PPIA* fue el elegido para normalizar los resultados obtenidos.

3.1 ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN EN CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN

El análisis de los datos de PCR cuantitativa a tiempo real reveló que la población tumoral tendía a expresar menores niveles de ARN mensajero de los genes *DCLRE1C*, *GTF2H1* y *TRF2*, en comparación con la mezcla de muestras no tumorales. De esta manera, el 75.7%, 63.9% y 50% de los tumores presentaban niveles disminuidos de estos genes, respectivamente (Figura 39A, 39B y 39C).

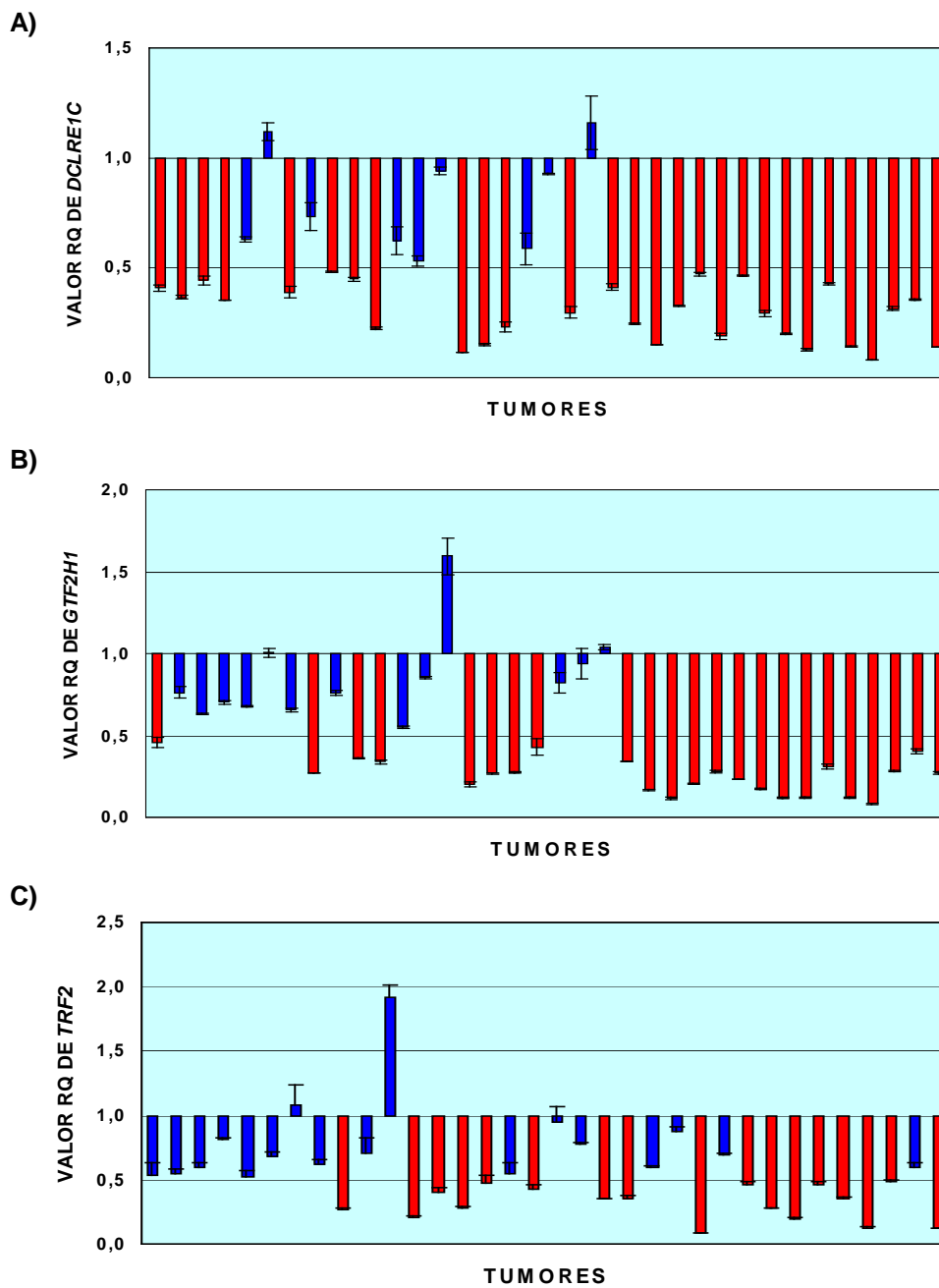


Figura 39. Representación gráfica de la expresión de ARN mensajero (RQ), en las muestras tumorales analizadas, de los genes A) *DCLRE1C*; B) *GTF2H1*; C) *TRF2*. Las barras de color azul indican, en las 3 gráficas, muestras con expresión comprendida dentro del rango de normalidad. Las barras en rojo indican una disminución de la expresión de, al menos, 2 veces comparada con la mezcla de muestras no tumorales.

Sólo hubo un gen cuya expresión se encontró aumentada en las muestras tumorales con respecto a la mezcla no tumoral: *FLJ10858* (Figura 40). El 82.9% de los tumores sobre-expresaban este gen.

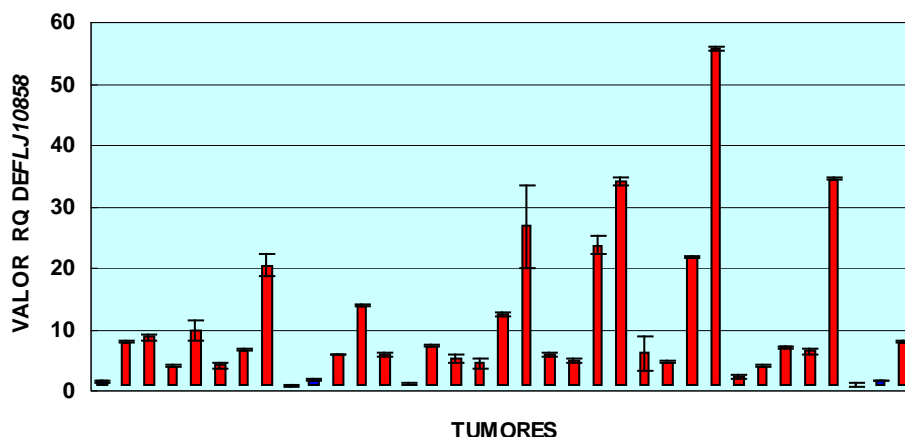


Figura 40. Representación gráfica de la expresión de ARN mensajero (RQ) del gen *FLJ10858* en las muestras tumorales analizadas. Las barras de color azul indican muestras con expresión comprendida dentro del rango de normalidad. Las barras en rojo indican un aumento de la expresión de, al menos, 2 veces comparada con la mezcla de muestras control.

Comparando estos resultados con los obtenidos a partir de las matrices de ADN complementario, se corroboró que el gen *FLJ10858* presentaba niveles de expresión de ARN mensajero superiores al rango considerado como normal en las muestras tumorales con respecto a la mezcla de 8 muestras no tumorales, que funcionó como calibrador.

3.2 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y LAS VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

En un primer abordaje se quiso estudiar la posible relación entre las variaciones en los niveles de ARN mensajero de los genes de reparación del ADN y las distintas variables clínico-patológicas.

El gen *FLJ10858*, cuyos niveles de ARN mensajero se encontraron aumentados más de dos veces en la población tumoral con respecto a la mezcla de muestras no tumorales, mostró mayores niveles en los tumores de estadios más avanzados (IIIB y IV) (RQ medio 12.38; 6.36 – 24.25, intervalo de confianza del 95% para la media) que en los tumores clasificados dentro de los estadios más tempranos (I-III A) (RQ medio 5.90; 3.81 – 9.19, intervalo de confianza del 95% para la media) (la diferencia de medias fue 1.07) ($P = 0.073$, según la prueba t de Student) (Figura 41A).

No se encontró ninguna relación significativa entre la expresión de ARN mensajero de los genes estudiados y las variables clínico-patológicas tamaño del tumor y grado de infiltración ganglionar.

DCLRE1C, implicado en la recombinación no homóloga, presentó niveles normales de expresión en el tipo histológico carcinoma indiferenciado de célula grande (RQ medio 0.69; 0.17 – 2.79, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que la expresión se vio disminuida en los tipos histológicos carcinoma epidermoide y adenocarcinoma (RQ medio 0.28 y 0.41, respectivamente; 0.21 – 0.34 y 0.29 – 0.57, intervalo de confianza del 95% para la media, respectivamente) ($P = 0.031$, según la prueba ANOVA) (Figura 41B).

GTF2H1, que desarrolla su función en la vía de reparación por escisión de nucleótidos, presentó, igualmente, niveles normales de expresión en el tipo histológico carcinoma indiferenciado de célula grande, siendo el RQ medio 1.19 (0.63 – 2.23, intervalo de confianza del 95% para la media). La expresión se vio disminuida en los tipos histológicos carcinoma epidermoide y adenocarcinoma (RQ medio 0.30 y 0.40, respectivamente; 0.21 – 0.43 y 0.26 – 0.61, intervalo de confianza del 95% para la media, respectivamente) ($P = 0.010$, según la prueba ANOVA) (Figura 41C).

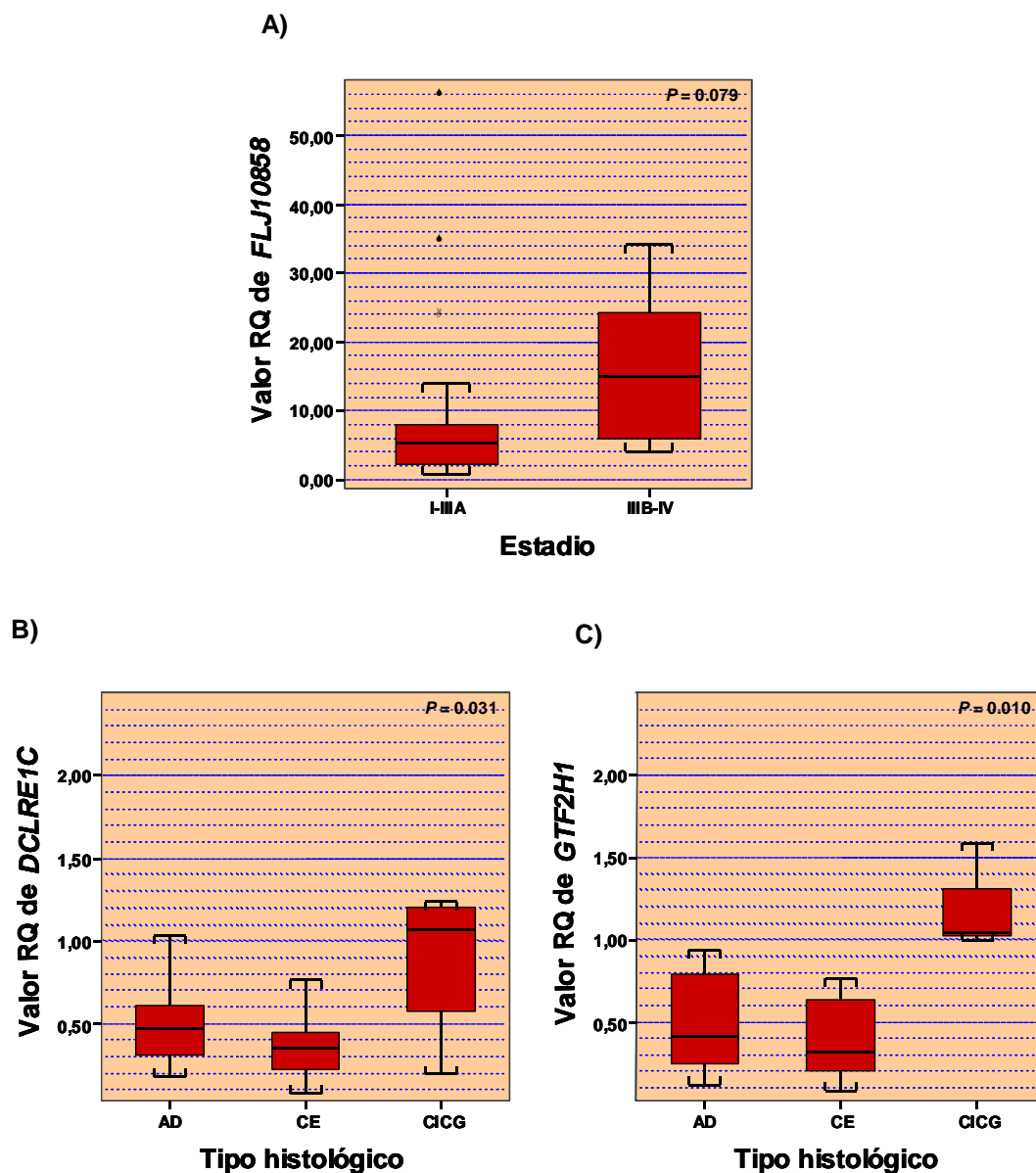


Figura 41. Diagrama de cajas en el que se representa la expresión de ARN mensajero (RQ) de: A) *FLJ10858* en 37 tumores en función del estadio tumoral; B) *DCLRE1C* en 33 tumores en función del tipo histológico; C) *GTF2H1* en 32 tumores en función del tipo histológico. En B) y C) AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma epidermoide; CIGG, carcinoma indiferenciado de célula grande. En los diagramas están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces la desviación típica.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, no reveló resultados concluyentes, pero sí claras tendencias. La población en

estudio fue, como máximo, de 23 pacientes, lo que explica el hecho de que no se obtengan diferencias significativas entre los supuestos establecidos.

En el caso de *hTERT*, la sobre-expresión de ARN mensajero se relacionó con una mayor tendencia a recaer, si bien las diferencias no resultaron significativas: el 46.2% (6/13) de los tumores que presentaban una expresión de *hTERT* al menos dos veces superior a la del control recaer, frente al 16.7% (1/6) de los tumores que presentaban una expresión dentro del rango de normalidad de *hTERT* ($P = 0.424$, según la comparación estadística *Log Rank*). Los niveles de expresión media de ARN mensajero en el caso de los tumores que sobre-expresaban dicho gen fue 4.23 (3.29 – 5.39, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que aquellos que mostraban niveles dentro del rango de normalidad tenían, como RQ medio, 0.96 (0.60 – 1.53, intervalo de confianza del 95% para la media). El periodo medio libre de enfermedad en el primer caso fue de 27.64 meses (18.67 – 36.60 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) y 21 meses en el segundo (15.63 – 26.37 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). En el estudio participaron 20 pacientes (Figura 42A).

La disminución en la expresión de ARN mensajero de *MLH1*, comparándola con la expresión de la mezcla de muestras no tumorales, parecía relacionarse con una mayor tendencia a recaer, si bien las diferencias tampoco fueron significativas ($P = 0.469$, según la comparación estadística *Log Rank*). De esta manera, el 38.5% (5/13) de los tumores que tenían disminuida la expresión de *MLH1* recaer (RQ medio 0.34; 0.29 – 0.41, intervalo de confianza del 95% para la media), frente al 16.7% (1/6) de los tumores que mantenían los niveles de expresión de ARN mensajero dentro del rango de normalidad (RQ medio 0.82; 0.52 – 1.32, intervalo de confianza del 95% para la media). La media de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, fue 26.29 meses en el primer caso (19.00 – 33.59 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) y 36 meses para los pacientes que mantenían dentro del rango de normalidad los niveles de *MLH1* (23.20 – 48.80 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). En el estudio participaron 20 pacientes (Figura 42B).

Cabe, también, destacar el comportamiento de los tumores que presentaban alteraciones en los niveles de expresión de ARN mensajero de *NTHL1*. Sólo el 10% (1/10) de los tumores que presentaban niveles dentro del rango de normalidad recidivaron, frente al 62.5% (5/8) y el 50% (1/2) de los tumores cuyos niveles de *NTHL1* estaban disminuidos o aumentados, respectivamente, más de dos veces con respecto a la mezcla de muestras no tumorales ($P = 0.073$, según la comparación estadística *Log Rank*). El valor RQ medio de expresión de ARN mensajero en el grupo que mantenía niveles normales fue 0.85 (0.63 – 1.16, intervalo de confianza del 95% para la media). En el caso de los tumores que tenían niveles disminuidos fue 0.29 (0.23 – 0.37, intervalo de confianza del 95% para la media) y 3.23 en el caso de aquellos que sobre-expresaban *NTHL1* (1.39 – 7.41, intervalo de confianza del 95% para la media). Los pacientes que mantenían los niveles de *NTHL1* dentro del rango de normalidad presentaban un intervalo libre de enfermedad medio mayor que los que tenían alteraciones en la expresión de ARN mensajero de este gen. Así, éste era 39.50 meses en el primer caso (31.45 – 47.55 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) y 20.5 meses (11.51 – 29.49 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) y 20 meses en el grupo de pacientes cuya expresión de *NTHL1* disminuía o aumentaba, respectivamente. En el estudio participaron 21 pacientes (Figura 42C).

Por último, hacer referencia al gen *PMS1*. De nuevo, el mantenimiento de la expresión de este gen se asoció con un pronóstico clínico más favorable, si bien tampoco en este caso las diferencias encontradas fueron estadísticamente significativas ($P = 0.471$, según la comparación estadística *Log Rank*). Se registraron recidivas tumorales en el 25% de los casos que presentaban niveles de expresión dentro del rango de normalidad (3/12), frente al 40% en el grupo de tumores cuyos niveles estaban aumentados, al menos, dos veces con respecto al control (4/10). El nivel medio de expresión en el primer caso fue 0.97 (0.76 – 1.22, intervalo de confianza del 95% para la media), expresado como RQ, y 3.18 (2.66 – 3.81, intervalo de confianza del 95% para la media) en el segundo grupo de tumores. El intervalo libre de enfermedad medio fue 34.44 meses (25.22 – 43.67 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) para los pacientes cuyos niveles de ARN mensajero de *PMS1* se

encontraban en el rango de normalidad, mientras que éste se reducía a 29.11 meses (18.61 – 39.61 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) en los pacientes en los que la expresión de *PMS1* se encontraba aumentada. En el estudio participaron 23 pacientes (Figura 42D).

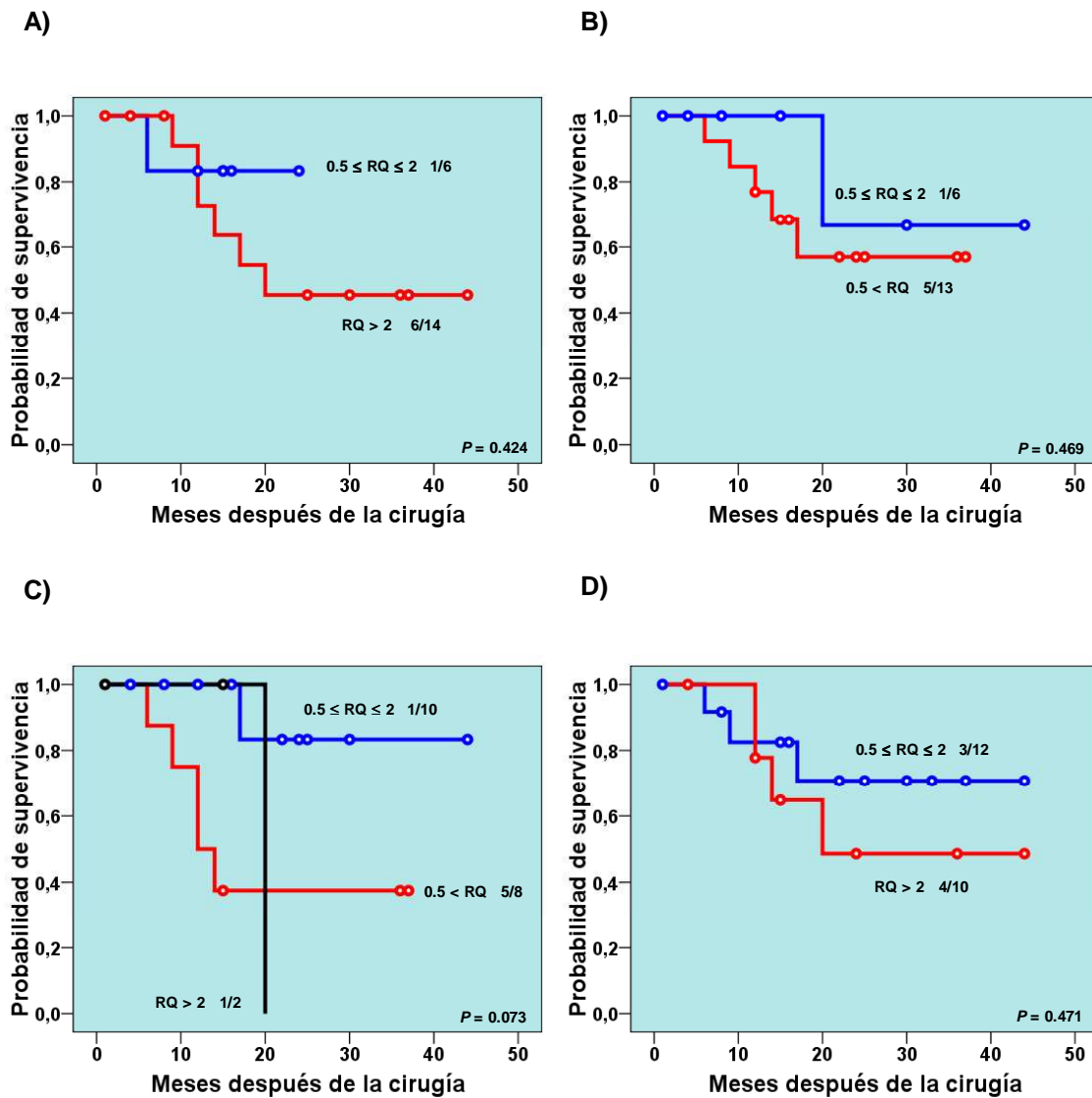


Figura 42. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, según la expresión de ARN mensajero de: A) *hTERT*; B) *MLH1*; C) *NTHL1*; D) *PMS1*. En todas ellas, se representa en color azul la probabilidad de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, de los pacientes en los que la expresión de ARN mensajero del gen objeto de estudio se encontraba dentro del rango de normalidad, según comparación con la mezcla de muestras no tumorales. En rojo o negro las probabilidades cuando la expresión del gen se encontraba alterada.

3.3 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y EL ESTATUS TELOMÉRICO

De las 37 muestras tumorales analizadas, 22 mostraron un acortamiento significativo de las secuencias teloméricas, mientras que 15 mantenían la longitud de éstas. El valor de expresión de ARN mensajero obtenido, en cada caso, se normalizó con *PPIA*, siendo la mezcla de 8 muestras no tumorales la empleada como calibrador.

La expresión génica de *TOP3B* y *PMS1* se correlacionaba positivamente con la longitud de los fragmentos teloméricos de las muestras tumorales ($P = 0.009$ y $P = 0.021$, según la comparación estadística *Rho de Spearman*, respectivamente). En ambos casos, a menor longitud de los telómeros, menor expresión de ARN mensajero (Figura 43A y Figura 43B).

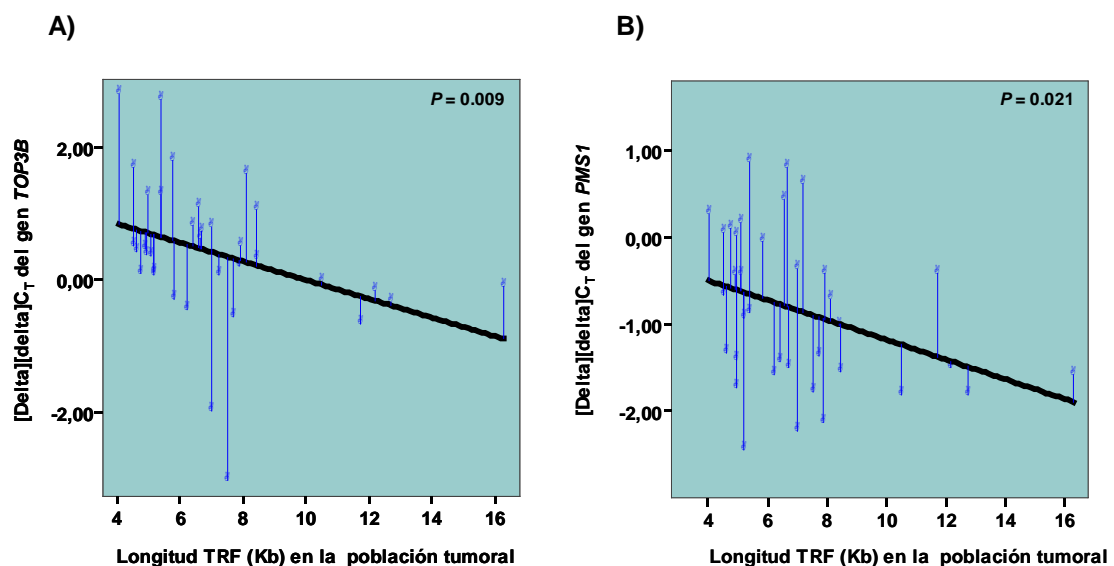


Figura 43. Diagramas de dispersión en los que se representan las longitudes de los fragmentos teloméricos de restricción en las muestras tumorales y la expresión de ARN mensajero, en $[\delta][\delta]C_T$, de los genes A) *TOP3B*; B) *PMS1*.

Sorprendentemente, no se corroboraron los datos obtenidos a partir de las matrices de ADN complementario. Ninguno de los genes seleccionados, así como los incluidos en el estudio por estar descrita su implicación en la función telomérica, presentaron diferencias significativas de expresión de ARN mensajero entre la población de muestras tumorales que acortó significativamente la longitud telomérica y aquella que la mantuvo con respecto a su correspondiente muestra normal.

En la Tabla 37 se muestran los genes que alcanzaron diferencias significativas de expresión en función del estatus telomérico en las matrices de ADN complementario y los resultados obtenidos, tanto con esta metodología, como por la técnica de PCR cuantitativa a tiempo real.

GEN	P (MATRICES)	VALOR RQ MEDIO (INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95% PARA LA MEDIA)		P (qRT-PCR)
		Acortamiento telomérico significativo	Mantenimiento telomérico	
GTF2H1	0.019	0.38 (0.26 – 0.55)	0.34 (0.24 – 0.48)	0.653
MSH4	0.021	1.30 (0.63 – 2.69)	1.54 (0.95 – 2.50)	0.691
PARP3	0.029	0.45 (0.31 – 0.66)	0.43 (0.25 – 0.72)	0.843
PMS1	0.031	0.59 (1.24 – 2.28)	1.96 (1.42 – 2.69)	0.432

Tabla 37. Genes cuya expresión de ARN mensajero presentó valores significativamente diferentes entre la población de tumores que acortaba más de un 20% la longitud de sus telómeros, con respecto a su correspondiente muestra normal, y la que los mantenía, empleando matrices de ADN complementario. A continuación, se muestran los valores medios de expresión de dichos genes en ambas poblaciones, así como los niveles de significación, de acuerdo con los resultados obtenidos por PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR).

3.4 RELACIÓN ENTRE LOS VALORES DE EXPRESIÓN GÉNICA Y LA ACTIVIDAD TELOMERASA

De los 37 tumores que formaron parte del estudio de expresión de ARN mensajero por PCR cuantitativa a tiempo real, 10 eran telomerasa negativos, mientras que en 27 se detectó actividad enzimática. Como calibrador se empleó la mezcla de muestras no tumorales. Cada valor de expresión se normalizó con el gen *PPIA*.

De los genes estudiados, 5 mostraron diferencias significativas de expresión entre la población telomerasa positiva y la población telomerasa negativa: *hTERT*, *DCLRE1C*, *GTF2H1*, *PARP3* y *MLH1*.

hTERT apareció sobre-expresado más de dos veces, con respecto al control no tumoral, en los tumores en los que se detectó actividad telomerasa (RQ medio 3.05; 2.20 – 4.23, intervalo de confianza del 95% para la media). En cambio, los tumores sin actividad telomerasa mostraron un RQ medio comprendido dentro del rango de normalidad (1.55; 0.78 – 3.05, intervalo de confianza del 95% para la media). La diferencia de medias fue 0.98 y ésta mostró significatividad estadística ($P = 0.044$, según la prueba *t de Student*). En el estudio se incluyeron 30 tumores (Figura 44A).

Los niveles de *DCLRE1C* se encontraron disminuidos, con respecto a la mezcla de muestras no tumorales, en la población tumoral con actividad telomerasa (RQ medio 0.28; 0.23 – 0.36, intervalo de confianza del 95% para la media). Sin embargo, los tumores telomerasa negativos presentaron una expresión de ARN mensajero dentro del rango de normalidad (RQ medio 0.55; 0.36 – 0.86, intervalo de confianza del 95% para la media). La diferencia de medias fue 0.96 y, de nuevo, ésta fue significativa ($P = 0.005$, según la prueba *t de Student*) (Figura 44B).

GTF2H1, *PARP3* y *MLH1* mostraron la misma tendencia que *DCLRE1C*. Esto es, los tumores en los que se detectó actividad telomerasa tenían disminuida

la expresión de ARN mensajero de manera significativa con respecto a los tumores en los que no se detectó actividad enzimática. Para *GTF2H1*, el RQ medio en los tumores del primer grupo fue 0.31 (0.24 – 0.41, intervalo de confianza del 95% para la media). Los tumores sin actividad telomerasa presentaron un RQ medio de 0.54 (0.30 – 0.98, intervalo de confianza del 95% para la media). La diferencia de medias fue 0.80 y la significación estadística $P = 0.042$ (según la prueba *t de Student*) (Figura 44C).

El RQ medio de *PARP3* en los tumores con actividad telomerasa fue 0.36 (0.25 – 0.50, intervalo de confianza del 95% para la media) y en los tumores sin actividad enzimática 0.82 (0.51 – 1.32, intervalo de confianza del 95% para la media). La diferencia de medias entre ambas poblaciones fue 1.21 siendo ésta estadísticamente significativa ($P = 0.009$, según la prueba *t de Student*) (Figura 44D).

En el caso de *MLH1*, el RQ medio de los tumores en los que se detectó actividad telomerasa fue 0.41 (0.34 – 0.50, intervalo de confianza del 95% para la media). Los tumores sin actividad telomerasa mostraron un RQ medio de 0.79 (0.51 – 1.25, intervalo de confianza del 95% para la media). De nuevo, la diferencia entre ambas poblaciones fue significativa ($P = 0.003$, según la prueba *t de Student*). La diferencia de medias fue 0.94 (Figura 44E).

Al igual que ocurrió al analizar la expresión de ARN mensajero de los genes seleccionados en función del estatus telomérico, no se corroboraron los resultados obtenidos mediante la técnica de matrices de ADN complementario. En la Tabla 38 se muestran los genes analizados mediante ambas técnicas, los valores obtenidos y los niveles de significación estadística.

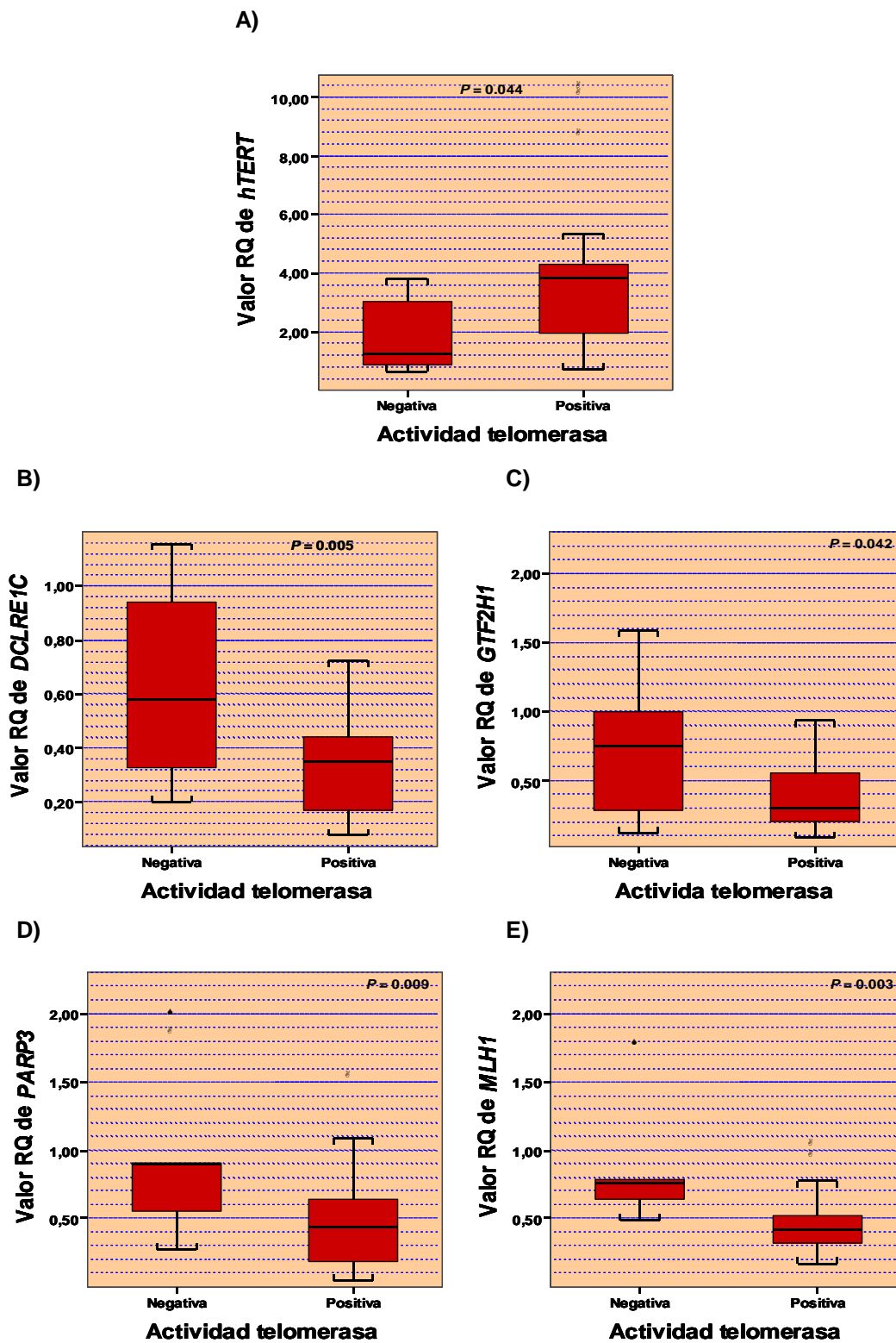


Figura 44. Diagramas de cajas en los que se representan la expresión de ARN mensajero (RQ), en función de la actividad de telomerasa, de los genes A) *hTERT* en 30 tumores; B) *DCLRE1C* en 37 tumores; C) *GTF2H1* en 36 tumores; D) *PARP3* en 34 tumores. En los diagramas están representados los valores extremos, la mediana y las muestras cuyas longitudes superan en 2 veces la desviación típica.

GEN	P (MATRICES)	VALOR RQ MEDIO (INTERVALO DE CONFIANZA DEL 95% PARA LA MEDIA)		P (qRT-PCR)
		Actividad telomerasa negativa	Actividad telomerasa positiva	
DCLRE1C	-----	0.55 (0.36 – 0.86)	0.28 (0.23 – 0.36)	0.005
GTF2H1	-----	0.54 (0.30 – 0.98)	0.31 (0.24 – 0.41)	0.042
MLH1	-----	0.79 (0.51 – 1.25)	0.41 (0.34 – 0.50)	0.003
MSH6	0.021	0.53 (0.41 – 0.70)	0.86 (0.59 – 1.26)	0.022
PARP3	-----	0.82 (0.51 – 1.32)	0.36 (0.25 – 0.50)	0.026
hTERT	-----	1.55 (0.78 – 3.05)	3.05 (2.20 – 4.23)	0.044

Tabla 39. Genes en los que se detectaron diferencias significativas de expresión en relación con la actividad telomerasa, tanto en el estudio con matrices de ADN complementario, como mediante la técnica PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR). Se indican, también, los niveles de significación estadística en ambos casos.

4. ACTIVIDAD TELOMERASA Y PARP3

4.1 DETERMINACIÓN DE PÉRDIDAS DE HETEROZIGOSIDAD (LOHs) EN LOCI CERCANOS A PARP3

Para el estudio de LOHs se evaluó el ADN de los 95 pacientes incluidos en el estudio de la función telomérica. Se analizaron dos marcadores distintos, según lo descrito en el apartado de Material y Métodos “9.1 Determinación de pérdidas de heterozigosidad (LOHs) en *loci* cercanos a *PARP3*”, siendo únicamente válidos para el estudio los tumores que mostraron heterozigosidad para el marcador evaluado en la muestra control.

En la Figura 45 se incluyen ejemplos del estudio de LOHs llevado a cabo, considerando los marcadores polimórficos D3S3026 y D3S3561.

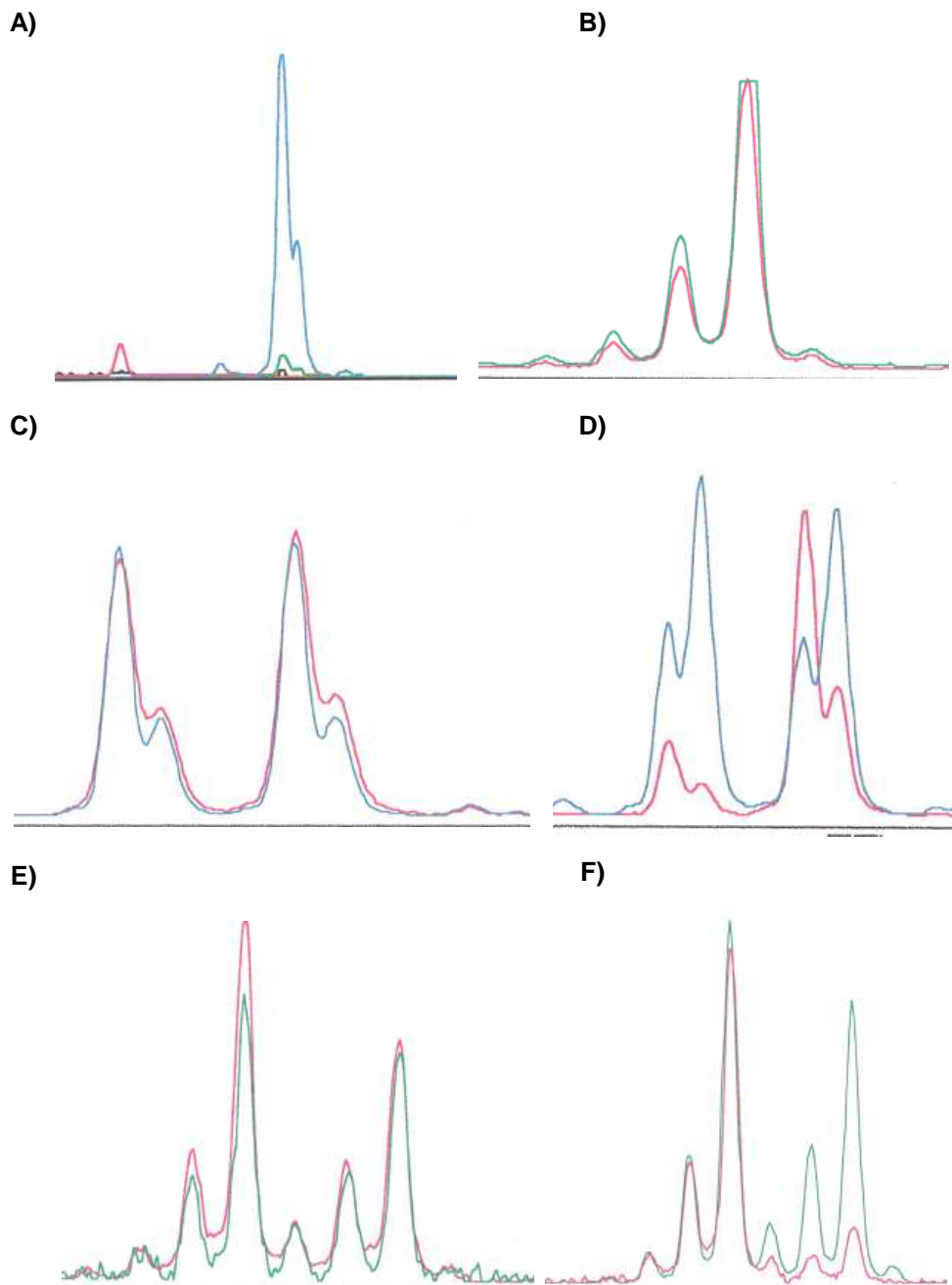


Figura 47. Representación de los perfiles del marcador D3S3026 (azul) y D3S3561 (verde) en las muestras no tumorales y en sus correspondientes muestras tumorales (rojo). A) Ejemplo de muestra control homocigota para el marcador D3S3026. B) Ejemplo de muestra control homocigota para el marcador D3S3561. C) Ejemplo de muestra control heterocigota para el marcador D3S3026 y sin LOH en la muestra tumoral. D) Ejemplo de muestra control heterocigota para el marcador D3S3026 y con LOH en la muestra tumoral. E) Ejemplo de muestra normal heterocigota para el marcador D3S3561 y sin LOH en la muestra tumoral. F) Ejemplo de muestra normal heterocigota para el marcador y con LOH en la muestra tumoral.

4.1.1 LOHs EN D3S3026

De los 95 tumores incluidos en este estudio, 31 fueron no informativos, es decir, eran homocigotos para el marcador estudiado en la muestra control, lo que redujo la población a 64 pacientes. De éstos, 54 mostraron actividad telomerasa en la muestra tumoral, frente a 10 en los que no se detectó actividad. No se obtuvieron diferencias significativas entre ambas poblaciones y la aparición de LOHs para el marcador D3S3026 ($P = 1.000$, según la prueba *Chi cuadrado*). De los 10 pacientes sin actividad enzimática en la muestra tumoral, 6 mostraron LOHs en el *locus* aquí estudiado (60%), frente a 30/54 (55.5%) en el caso de los pacientes con actividad telomerasa en la muestra tumoral (Figura 46A).

El análisis de ARN mensajero de *PARP3* se llevó a cabo en 34 tumores y, de éstos, sólo 21 resultaron informativos. Los tumores que tenían LOHs en D3S3026 ($N = 11$) mostraron un valor RQ medio de 0.32 (0.16 – 0.65, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que los que mantenían la integridad en dicho *locus* ($N = 10$) presentaban un valor RQ medio de 0.61 (0.35 – 1.06, intervalo de confianza del 95% para la media). Las diferencias entre ambas poblaciones carecieron de significación estadística ($P = 0.133$, según la prueba *t de Student*; la diferencia de medias fue 0.92) (Figura 47A).

4.1.2 LOHs EN D3S3561

En el caso del marcador D3S3561, 26 tumores resultaron no informativos, esto es, se incluyeron en el estudio 69 casos. Se detectó actividad telomerasa en 58 tumores, de los cuales 24 presentaron pérdidas alélicas en el *locus* estudiado (41.4%). En los tumores que carecieron de actividad enzimática ($N = 11$), sólo 1 presentó LOHs (9.1%). Ambas poblaciones resultaron ser independientes, es decir, parece que la pérdida del fragmento cromosómico situado en el *locus* de D3S3561 se relaciona con la actividad telomerasa en las muestras tumorales ($P = 0.047$, según la prueba *Chi cuadrado*) (Figura 46B).

El estudio de LOHs en el *locus* de D3S3561 y la expresión de ARN mensajero de *PARP3* se pudo realizar en 17 pacientes. El valor RQ medio de los tumores con LOHs (N = 11) fue 0.39 (0.17 – 0.87, intervalo de confianza del 95% para la media). En el caso de los tumores sin pérdida del fragmento cromosómico, el valor RQ medio fue 0.72 (0.46 – 1.13, intervalo de confianza del 95% para la media). La diferencia entre ambas poblaciones no alcanzó significación estadística ($P = 0.106$, según la prueba *t de Student*; la diferencia de medias fue 0.89) (Figura 47B).

4.1.3 LOHs EN D3S3026 Y D3S3561

El estudio de pérdidas de heterocigosidad para los dos marcadores de manera simultánea implicó que las muestras no tumorales fueran informativas para ambos. En total, 50 tumores cumplieron este requisito. De éstos, 37 casos mostraron coincidencia en la pérdida o mantenimiento de los fragmentos cromosómicos aquí estudiados. En 4 de ellos no se detectó actividad de la enzima telomerasa en la muestra tumoral y ninguno (0%) mostró LOHs en los *loci* estudiados. Sin embargo, de los 33 restantes, 14 perdieron ambos fragmentos cromosómicos (42.4%). No obstante, las diferencias entre ambas poblaciones carecieron de significación estadística ($P = 0.276$, según la prueba *Chi cuadrado*) (Figura 46C).

Sólo se contó con 11 casos que mantuvieran o perdieran los dos marcadores polimórficos, de manera simultánea, y de los que se dispusiera de los datos de expresión de ARN mensajero de *PARP3*. El valor RQ medio de los tumores que mantuvieron ambos fragmentos cromosómicos (N = 6) fue 0.87 (0.49 – 1.56, intervalo de confianza del 95% para la media). Los tumores que perdieron ambos (N = 5) mostraron un valor RQ medio de 0.38 (0.13 – 1.10, intervalo de confianza del 95% para la media). Si bien no se alcanzó la significación estadística, sí se apreció una clara tendencia: los tumores que presentaban niveles disminuidos de ARN mensajero de *PARP3* tendían a perder los fragmentos cromosómicos analizados y, probablemente, el gen *PARP3* por

situarse entre ambos ($P = 0.085$, según la prueba *t de Student*; la diferencia de medias fue 1.19) (Figura 47C).

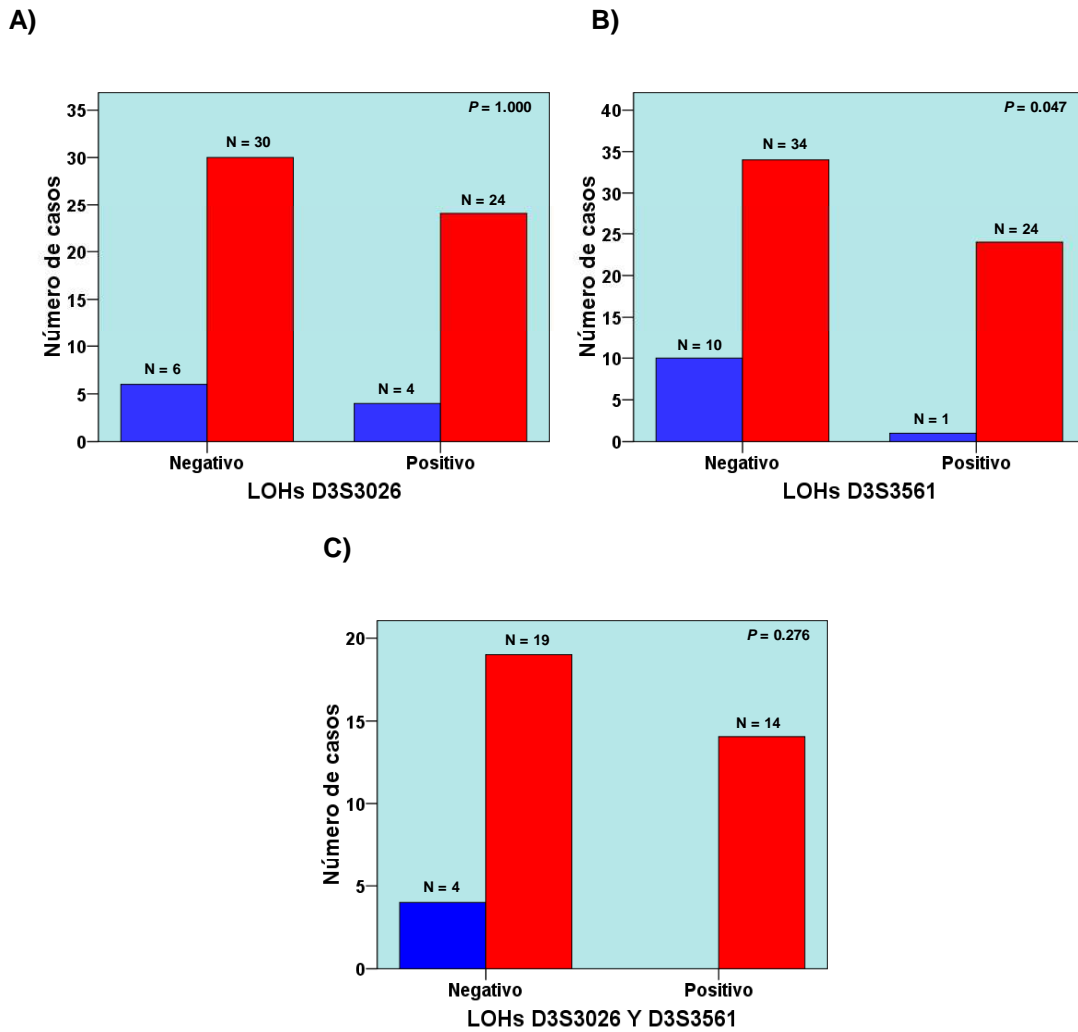


Figura 46. Diagramas de barras en los que se representan la frecuencia de LOHs, en función de la actividad telomerasa, para los marcadores: A) D3S3026; B) D3S3561; C) D3S3026 y D3S3561, simultáneamente. En los tres casos, se representa en color azul las muestras tumorales telomerasa negativa y en rojo aquellas en las que se detectó actividad telomerasa.

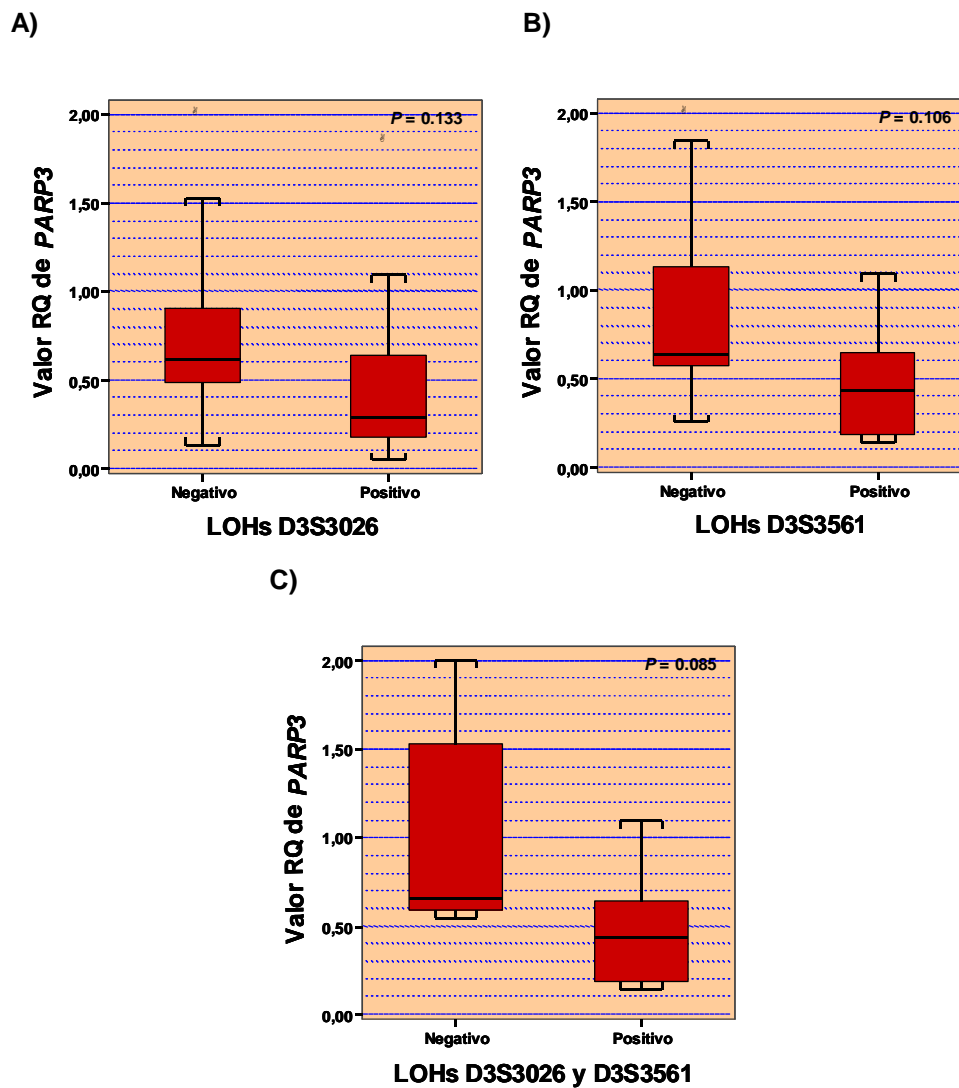


Figura 47. Diagramas de cajas en los que se representan la expresión de ARN mensajero (RQ) de *PARP3* en función de LOHs en los marcadores: A) D3S3026; B) D3S3561; C) D3S3026 y D3S3561, simultáneamente.

4.1.4 LOHs EN D3S3026 Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

De los 64 tumores que formaron parte de este estudio, el 43.7% (28/64) mostraron LOHs en el *locus* 51882304-51882524, donde se localiza el marcador D3S3026.

Al considerar el estadio no se encontraron diferencias significativas entre la población con y sin LOHs ($P = 0.448$, según la prueba *Chi cuadrado*). Presentaron pérdidas de heterozigosis el 44.7% (17/38) de los tumores en estadio I, el 50% (2/4) de los tumores en estadio II, el 44.4 % (8/18) de los tumores en estadio IIIA, el 100% (1/1) de los tumores en estadio IIIB y el 0% (0/3) de los tumores en estadio IV (Figura 48A).

Con respecto al tamaño tumoral, tampoco se observó relación alguna entre esta variable y la aparición de LOHs en el *locus* aquí estudiado ($P = 0.507$, según la prueba *Chi cuadrado*). Se detectaron LOHs en el 16.7% (1/6) de los tumores clasificados como T1, en el 48.7% (19/39) de los tumores T2, en el 40% (6/15) de los tumores T3 y en el 50% (2/4) de los tumores T4 (Figura 48B).

Asimismo, se evaluó la relación entre la presencia de LOHs en D3S3026 y el grado de infiltración ganglionar. No se observó asociación entre esta variable y la pérdida del fragmento cromosómico aquí estudiado ($P = 0.899$, según la prueba *Chi cuadrado*). De los tumores sin infiltración ganglionar, el 43.2% (19/44) mostraron LOHs; el 33.3% (1/3) de los tumores clasificados como N1 y el 47% (8/17) de los clasificados como N2 resultaron, también, positivos en este análisis (Figura 48C).

Tampoco el tipo histológico parece relacionado con la pérdida de heterozigosis en el *locus* considerado ($P = 0.424$, según la prueba *Chi cuadrado*). Se encontró LOHs en el 42.8% (12/28) de los tumores de tipo adenocarcinoma, en el 66.7% (16/34) de los carcinomas epidermoides y en el 0% (0/2) de los carcinomas indiferenciados de célula grande (Figura 49A).

La pérdida de este fragmento cromosómico no se relaciona con una mayor tendencia a recidivar ($P = 1.000$, según la prueba *Chi cuadrado*). De los 60 tumores que formaron parte de este estudio, hubo recurrencia en el 25% (15/60) y, de estos, 46.7% (7/15) perdieron el fragmento estudiado. Con respecto al grupo de tumores que no recidivó, 20/45 (44.4%) mostraron LOHs (Figura 49B).

En la Tabla 39 se recogen los resultados aquí expuestos en relación a la pérdida de heterocigosidad en el marcador D3S3026 y las distintas variables clínico-patológicas estudiadas.

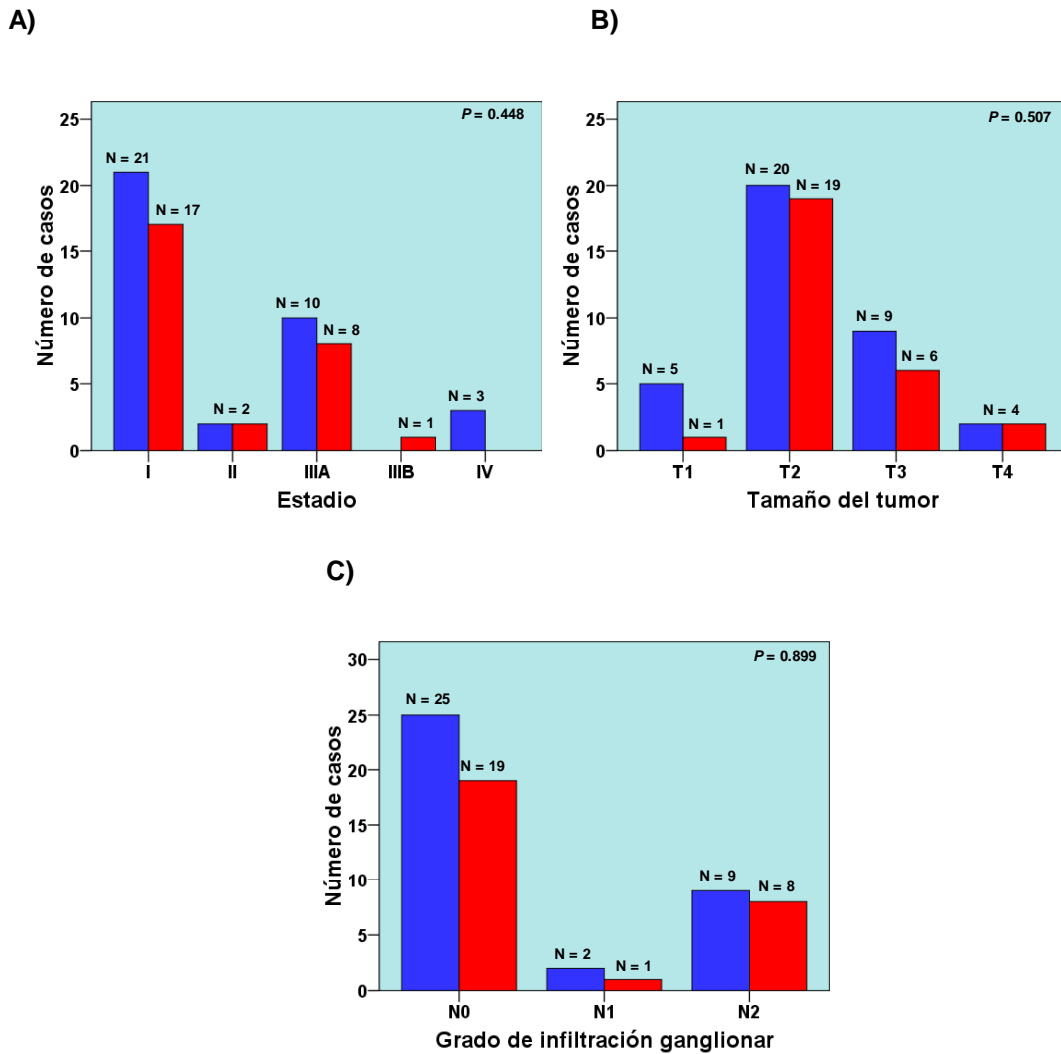


Figura 48. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para el marcador D3S3026 en función de: A) Estadio tumoral; B) Tamaño del tumor; C) Grado de infiltración ganglionar. En todos los casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en el marcador D3S3026 y las rojas aquellos que sí.

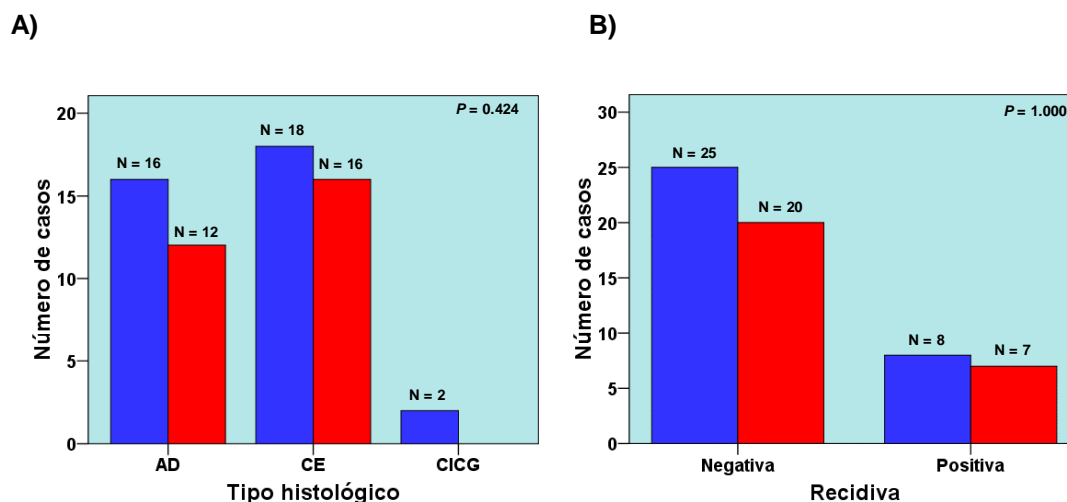


Figura 49. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para el marcador D3S3026 en función de: **A) Tipo histológico del tumor;** AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma apidermoide; CIGG, carcinoma indiferenciado de célula grande; **B) Recidiva tumoral.** En ambos casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en el marcador D3S3026 y las rojas aquellos que sí.

Se realizó un estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, para evaluar la posible influencia de las pérdidas de heterocigosidad del marcador D3S3026 en la probabilidad de recaer. El número de pacientes que formaron parte de este estudio fue 58. Los pacientes en los que el tumor recidivó y que mostraron LOHs fueron el 26.9% (7/26) de la población, siendo el intervalo libre de enfermedad medio 41.6 meses (30.8 – 52.4 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). Los pacientes en los que el tumor recidivó pero no presentaban LOHs fueron 8/32, el 25%. El intervalo libre de enfermedad medio fue de 45.47 meses (36.77 – 54.16 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) (Figura 50). Las diferencias entre ambas poblaciones no fueron significativas ($P = 0.533$, según la comparación estadística Log Rank).

VARIABLE	N° DE CASOS	LOHs EN D3S3026		P
		POSITIVA (%)	NEGATIVA (%)	
Estadio	64			0.448
I	38	17 (44.7)	21 (55.3)	
II	4	2 (50)	2 (50)	
IIIA	18	8 (44.4)	10 (55.6)	
IIIB	1	1 (100)	0 (0)	
IV	3	0 (0)	3 (100)	
Tamaño	64			0.507
T1	6	1 (16.7)	5 (83.8)	
T2	39	19 (48.7)	20 (51.3)	
T3	15	6 (40)	9 (60)	
T4	4	2 (50)	2 (50)	
Infiltración ganglionar	64			0.899
N0	44	19 (43.2)	25 (56.8)	
N1	3	1 (33.3)	2 (66.7)	
N2	17	8 (47)	9 (53)	
Tipo histológico	64			0.424
Adenocarcinoma	28	12 (42.8)	16 (57.2)	
Carcinoma epidermoide	34	16 (66.7)	18 (33.3)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	2	0 (0)	2 (100)	
Recidiva	60			1.000
Positiva	15	7 (46.7)	8 (53.3)	
Negativa	45	20 (44.4)	25 (55.5)	

Tabla 39. Resumen de los datos de LOHs en D3S3026 en los 64 CNMPs estudiados en esta Tesis y su relación con variables clínico-patológicas.

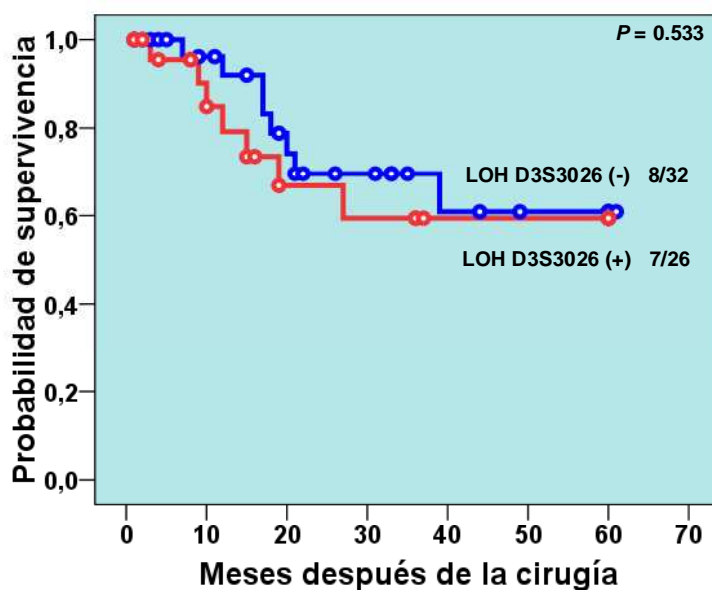


Figura 50. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, de 58 pacientes con CNMP. El color azul indica tumores que no presentaron LOHs en D3S3026 y el rojo aquellos que sí.

4.1.5 LOHs EN D3S3561 Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

De los 69 pacientes que resultaron informativos para el marcador D3S3561, sólo el 36.2% (25/69) mostraron LOHs en la región 52316909-52317131.

No se obtuvo relación entre el estadio tumoral y la aparición de LOHs en el *locus* estudiado ($P = 0.611$, según la prueba Chi cuadrado). Los tumores de estadio I mostraron una frecuencia de LOHs del 36.8% (14/38); los tumores de estadio II, 50% (2/4); los tumores de estadio IIIA, 39.1% (9/23) y los tumores IIIB y IV, 0% (0/1 y 0/3, respectivamente) (Figura 51A). Curiosamente, los tumores de estadios más avanzados mostraron una menor tendencia a perder el fragmento cromosómico estudiado, si bien, tampoco se encontraron diferencias significativas al dividir a la población en dos grupos, en función del estadio: aquella con estadios iguales o menores a IIIA y aquella con estadios más avanzados (IIIB y IV) ($P = 0.289$, según la prueba *Chi cuadrado*).

El tamaño del tumor no se relacionó con las pérdidas de heterocigocidad ($P = 0.450$, según la prueba *Chi cuadrado*). Los tumores de tamaño más pequeño, T1, presentaron una frecuencia de LOHs del 0% (0/3); los tumores T2, 41.9% (18/43); los tumores T3, 31.2% (5/16) y los tumores T4, 28.6% (2/7) (Figura 51B).

El grado de infiltración ganglionar no reveló asociación alguna con la presencia de LOHs en D3S3561 ($P = 0.923$, según la prueba *Chi cuadrado*). Los tumores sin infiltración ganglionar mostraron una frecuencia de LOHs del 38.1% (16/42); los tumores de grado N1, 33.3% (2/6) y los tumores N2, 33.3% (7/21) (Figura 51C).

Tampoco se obtuvo relación entre el tipo histológico y la existencia de LOHs en el marcador estudiado ($P = 0.444$, según la prueba *Chi cuadrado*). Los tumores del tipo histológico adenocarcinoma mostraron una frecuencia del 26.9% (7/26), los carcinomas epidermoides del 41.5% (17/41) y los carcinomas indiferenciados de célula grande del 50% (1/2) (Figura 52A).

No se obtuvieron diferencias significativas ($P = 1.000$, según la prueba *Chi cuadrado*) entre la población con LOHs y la que no perdió el fragmento cromosómico, en función de la recidiva tumoral. Los tumores que no recidivaron mostraron una frecuencia de LOHs del 37.2% (16/43) y los que recidivaron del 33.3% (7/21) (Figura 52B).

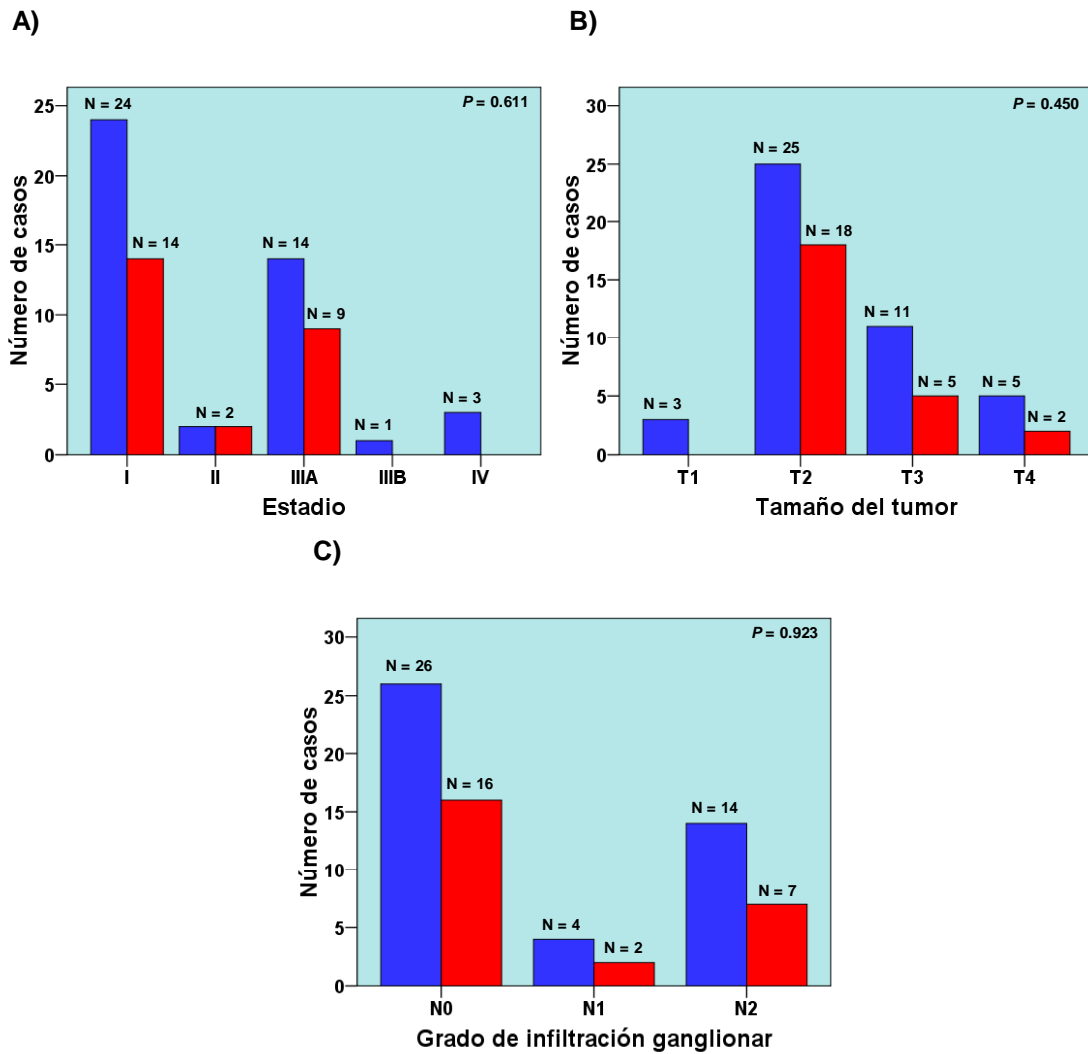


Figura 51. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para el marcador D3S3561 en función de; A) Estadio tumoral; B) Tamaño del tumor; C) Grado de infiltración ganglionar. En todos los casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en el marcador D3S3561 y las rojas aquellos que sí.

En la Tabla 40 se recogen los resultados aquí expuestos en relación a la pérdida de heterocigosidad en el locus 52316909-52317131, donde se localiza el marcador D3S3561, y las distintas variables clínico-patológicas estudiadas.

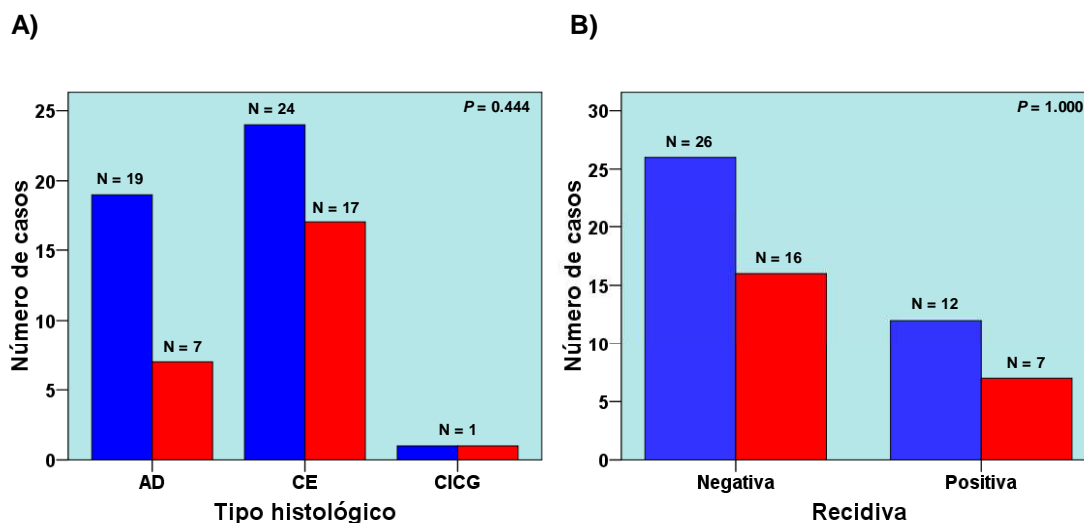


Figura 52. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para el marcador D3S3561 en función de: A) Tipo histológico del tumor; AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma apidermoide; CICG, carcinoma indiferenciado de célula grande; B) Recidiva tumoral. En ambos casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en el marcador D3S35261 y las rojas aquellos que sí.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, no reveló diferencias significativas entre la población que perdía el fragmento cromosómico estudiado y la que no ($P = 0.990$, según la comparación estadística *Log Rank*). Formaron parte del estudio 60 pacientes. El porcentaje de pacientes cuyos tumores recidivaron, con y sin LOHs fue semejante: 30.4% (7/16) y 32.4% (12/25), respectivamente. El intervalo libre de enfermedad medio de los pacientes con LOHs fue de 40.90 meses (30.16 – 51.64 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). El mismo intervalo medio presentaron los pacientes sin LOHs en el marcador D3S3561, si bien, el intervalo de confianza del 95% para la media fue, en este caso, de 32.62 – 49.24 meses (Figura 53).

VARIABLE	N° DE CASOS	LOHs EN D3S3561		P
		POSITIVA (%)	NEGATIVA (%)	
Estadio	69			0.611
I	38	14 (36.8)	24 (63.2)	
II	4	2 (50)	2 (50)	
IIIA	23	9 (39.1)	14 (60.9)	
IIIB	1	0 (0)	1 (100)	
IV	3	0 (0)	3 (100)	
Tamaño	69			0.450
T1	3	0 (0)	3 (100)	
T2	43	18 (41.9)	25 (58.1)	
T3	16	5 (31.2)	11 (68.8)	
T4	7	2 (28.6)	5 (71.4)	
Infiltración ganglionar	69			0.923
N0	42	16 (38.1)	26 (61.9)	
N1	6	2 (33.3)	4 (66.7)	
N2	21	7 (33.3)	14 (66.7)	
Tipo histológico	69			0.444
Adenocarcinoma	26	7 (26.9)	19 (73.1)	
Carcinoma epidermoide	41	17 (41.5)	24 (58.5)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	2	1 (50)	1 (50)	
Recidiva	64			1.000
Positiva	21	7 (33.3)	14 (66.7)	
Negativa	43	16 (37.2)	27 (62.8)	

Tabla 40. Resumen de los datos de LOH en el marcador D3S3561 en los 69 CNMPs estudiados en esta Tesis y su relación con variables clínico-patológicas.

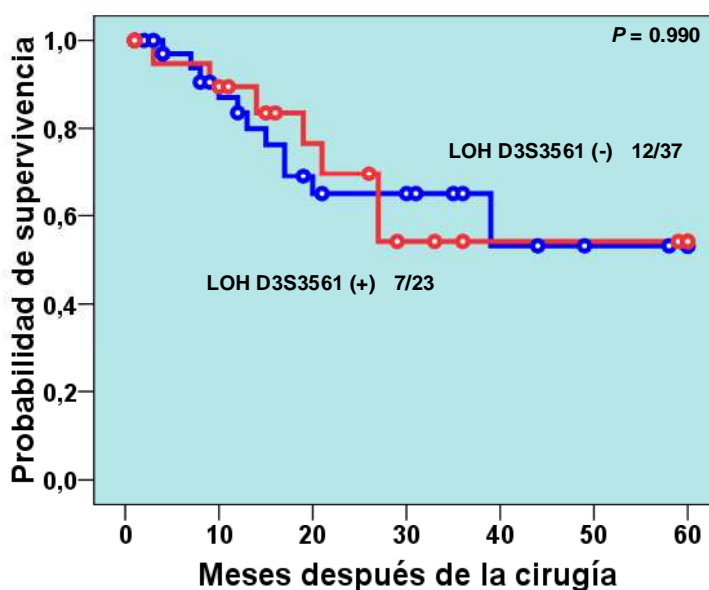


Figura 53. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad, de 60 pacientes con CNMP. El color azul indica tumores que no presentaron LOHs en el marcador D3S3561 y el rojo aquellos que sí.

4.1.6 LOHs EN D3S3026 Y D3S3561 Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

Sólo 37 pacientes formaron parte de este estudio, por las razones expuestas en el apartado “4.1.3 LOHs en D3S3026 y D3S3561”.

El estadio no se asoció con las pérdidas de heterocigosidad en los loci aquí estudiados ($P = 0.616$, según la prueba *Chi cuadrado*). Sufrieron LOHs el 35% (7/20) de los tumores de estadio I; el 50% (1/2) de los tumores de estadio II; el 46.1% (6/13) de los tumores de estadio IIIA y ninguno de los tumores de estadio IV (0/2) (Figura 54A).

Con respecto al tamaño del tumor, ninguno de los tumores de menor tamaño (T1) mostró LOHs (0/2) simultáneas. En el 43.5% (10/23) de los tumores de tamaño T2 y en el 36.4% (4/11) de los tumores T3 se detectaron LOHs en

ambos marcadores. En cambio, el único caso de tamaño T4 que formó parte del estudio carecía de pérdidas de heterocigosidad (Figura 54B). Las diferencias entre las 4 poblaciones no fueron estadísticamente significativas ($P = 0.542$, según la prueba *Chi cuadrado*).

El grado de infiltración ganglionar no se relacionó con las pérdidas de heterocigosidad simultáneas en los dos marcadores analizados ($P = 0.710$, según la prueba *Chi cuadrado*). Los tumores sin infiltración ganglionar sufrieron LOHs con una frecuencia del 37.5% (9/24); aquellos clasificados como N1, mostraron LOHs en el 41.7% de los casos (5/12). Sólo hubo un caso con infiltración de grado N2 y no presentó LOHs (0/1) (Figura 54C).

Con respecto al tipo histológico, no se obtuvieron diferencias significativas entre la población con pérdidas de heterocigosidad, en los dos marcadores de manera simultánea, y la que no ($P = 0.618$, según la prueba *Chi cuadrado*). Los tumores del tipo histológico adenocarcinoma mostraron LOHs con una frecuencia del 33.3% (5/15); los carcinomas epidermoides mostraron LOHs en un 42.8% de los casos (9/21) y los carcinomas indiferenciados de célula grande, en un 0% (0/1) (Figura 55A).

Por último, tampoco se encontraron diferencias significativas entre la población compuesta por tumores que recidivaron y la que no ($P = 1.000$, según la prueba *Chi cuadrado*). El 41.7% (10/24) de los tumores que recidivaron mostraron LOHs en ambos loci, así como el 40% (4/10) de los tumores que no presentaron recurrencia (Figura 55B).

En la Tabla 41 se recogen los datos aquí expuestos en relación a la presencia de LOHs en los marcadores D3S3026 y D3S3561 y las variables clínico-patológicas evaluadas.

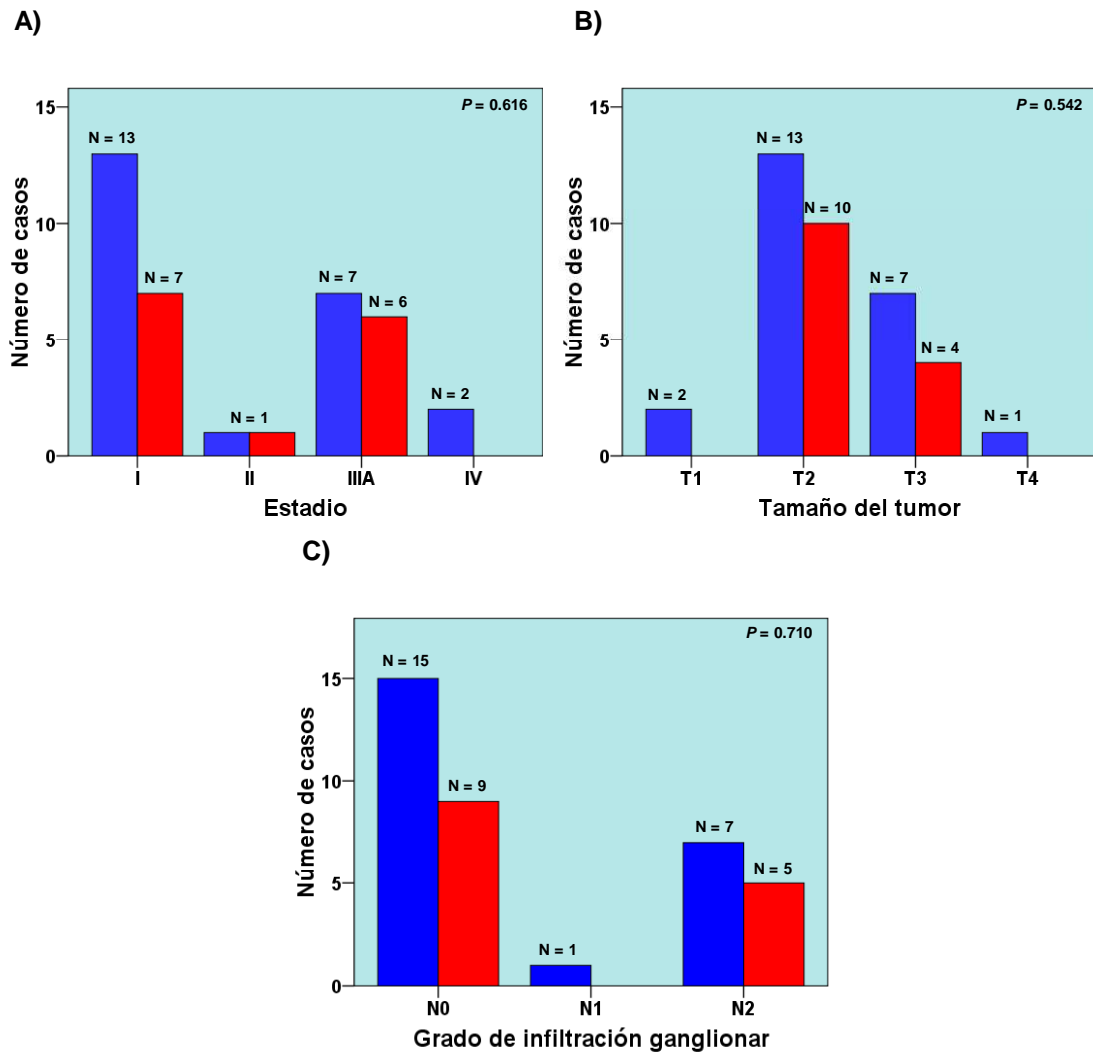


Figura 54. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para los marcadores D3S3026 y D3S3561, de manera simultánea, en función de; A) Estadio tumoral; B) Tamaño del tumor; C) Grado de infiltración ganglionar. En todos los casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en los marcadores D3S3026 y D3S3561, de manera simultánea, y las rojas aquellos que sí.

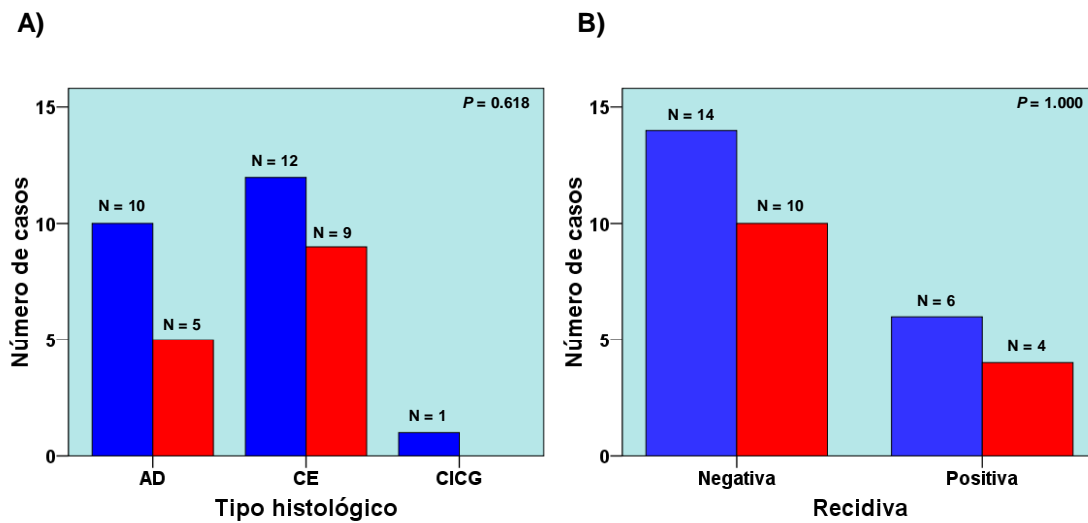


Figura 55. Figura 52. Diagramas de barras en los que se representa la frecuencia de LOHs para los marcadores D3S3026 y D3S3561, de manera simultánea, en función de: A) Tipo histológico del tumor; AD, adenocarcinoma; CE, carcinoma apidermoide; CIG, carcinoma indiferenciado de célula grande; B) Recidiva tumoral. En ambos casos, las barras azules indican tumores que no presentaron LOHs en los marcadores D3S3026 y D3S3561, de manera simultánea, y las rojas aquellos que sí.

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, se realizó en 34 pacientes. El porcentaje de pacientes que recidivaron, tanto con LOHs como sin esta alteración en los dos *loci* estudiados, fue prácticamente el mismo: 28.6% (4/14) y 30% (6/20), respectivamente (Figura 56). El intervalo libre de enfermedad medio para los pacientes con LOHs fue de 37.36 meses (21.24 – 53.48 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). Los que no presentaron LOHs, tuvieron un intervalo libre de enfermedad medio de 40.97 meses (29.48 – 52.47 meses, intervalo de confianza del 95% para la media). Las diferencias entre ambas poblaciones carecieron de significación estadística ($P = 0.668$, según la comparación estadística *Log Rank*).

VARIABLE	N° DE CASOS	LOHs EN D3S3026 Y D3S3561		P
		POSITIVA (%)	NEGATIVA (%)	
Estadio	37			0.616
I	20	7 (35)	13 (65)	
II	2	1 (50)	1 (50)	
IIIA	13	6 (46.1)	7 (53.9)	
IIIB	0	-----	-----	
IV	2	0 (0)	2 (100)	
Tamaño	37			0.542
T1	2	2 (100)	0 (0)	
T2	23	10 (43.5)	13 (56.5)	
T3	11	4 (36.4)	7 (63.6)	
T4	1	0 (0)	1 (100)	
Infiltración ganglionar	37			0.710
N0	24	9 (37.5)	15 (62.5)	
N1	12	5 (41.7)	7 (58.3)	
N2	1	0 (0)	1 (100)	
Tipo histológico	37			0.618
Adenocarcinoma	15	5 (33.3)	10 (66.7)	
Carcinoma epidermoide	21	9 (42.8)	12 (57.2)	
Carcinoma indiferenciado de célula grande	1	0 (0)	1 (100)	
Recidiva	34			1.000
Positiva	10	4 (40)	6 (60)	
Negativa	24	10 (41.7)	14 (58.3)	

Tabla 41. Resumen de los datos de LOHs en los marcadores D3S3026 y D3S3561 en los 37 CNMPs estudiados en esta Tesis y su relación con variables clínico-patológicas.

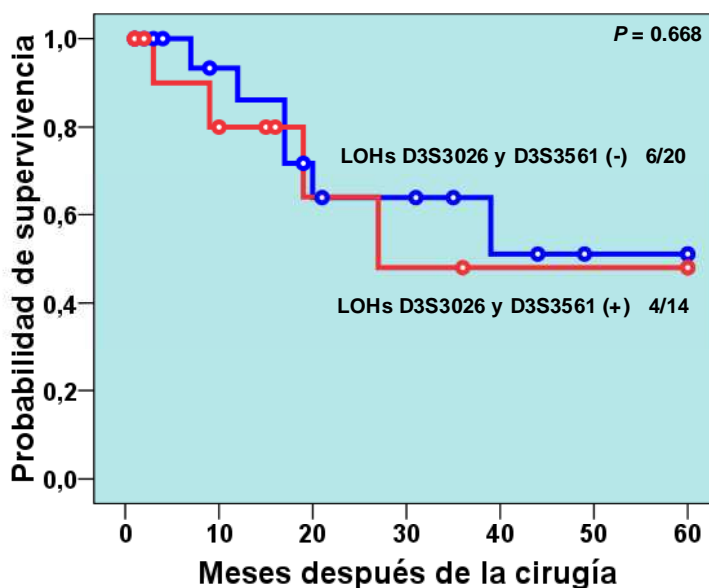


Figura 56. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier, medidas como intervalo libre de enfermedad. El color azul indica tumores que no presentaron LOHs en los marcadores D3S3026 y D3S3561, de manera simultánea, y el rojo aquellos que sí.

4.2 DETERMINACIÓN DE POLIMORFISMOS DE UN SOLO NUCLEÓTIDO (SNPs) EN EL GEN PARP3

Debido a la asociación encontrada in vivo entre *PARP3* y la actividad telomerasa, quisimos profundizar en el estudio de este gen y ver si la existencia de SNPs podría estar relacionada con la actividad telomerasa. Se evaluaron dos SNPs, según lo descrito en el apartado de Material y Métodos “9.2 Determinación de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs) en el gen *PARP3*”.

De las 94 muestras no tumorales analizadas, 3 mostraron SNPs en las posiciones estudiadas y eran heterocigotas (2.8%). Curiosamente, los pacientes que mostraron SNP en Rs 323868, también lo mostraron en Rs 188953. No se detectó ningún caso homocigoto para el alelo minoritario, siendo su frecuencia de 1.6%.

El estudio estadístico no reveló diferencias significativas entre la población con y sin SNPs, con respecto a la actividad telomerasa, si bien sólo se contó con 3 pacientes en el primer grupo ($P = 0.432$, según la prueba *Chi cuadrado*). Entre éstos, 2/3 (66.7%) mostraron actividad enzimática; la población que careció de polimorfismos en las posiciones estudiadas también mostró, mayoritariamente, actividad telomerasa (76/91, esto es, 83.5%) (Figura 57).

No se pudo evaluar la posible relación entre los SNPs en Rs 323868 y Rs 188953 y la expresión de ARN mensajero del gen *PARP3*, ya que sólo se dispuso de un caso con SNPs del que se tuviera el dato de expresión. Su RQ medio fue de 0.27.

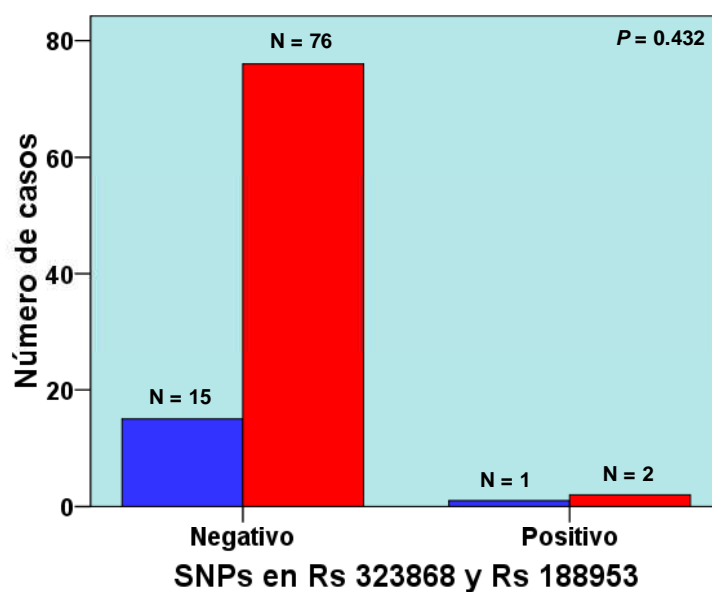


Figura 57. Diagrama de barras en el que se representa la frecuencia de actividad de la enzima telomerasa en función de los SNPs en Rs 323868 y Rs 188953, localizados en el gen *PARP3*. Las barras azules indican tumores que no mostraron actividad enzimática y las rojas aquellos que sí.

4.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA EN LA LÍNEA CELULAR A549

4.3.1 CARACTERIZACIÓN DE LA LÍNEA CELULAR A549

Inicialmente, se evaluaron los niveles del ARN mensajero de *PARP3* mediante PCR cuantitativa a tiempo real. De esta forma, quisimos comprobar las características de las células con objeto de tener unos valores de referencia. El valor medio $[\Delta]C_T$ fue 8.86 (8.65 – 9.07, intervalo de confianza del 95% para la media).

El estudio de la actividad telomerasa en la línea celular A549, reveló que la enzima se encontraba altamente activa en las células.

Debido a los resultados encontrados, se determinó que el abordaje más indicado era sobre-expresar *PARP3* en la línea celular y comprobar si la actividad telomerasa disminuía.

4.3.2 TRANSFECCIÓN TRANSITORIA DE LA LÍNEA CELULAR A549

La determinación de los niveles de expresión del ARN mensajero de *PARP3* en células transfectadas con los vectores pcDNA-DEST53 y pcDNA/GW-53/*PARP3* y en células no transfectadas, reveló que la expresión génica de *PARP3* no se alteraba, a lo largo del tiempo, en las células transfectadas con el vector pcDNA-DEST53. Sin embargo, las células transfectadas con pcDNA/GW-53/*PARP3* sobre-expresaban *PARP3*, de manera decreciente a lo largo del tiempo. A las 24 horas post-transfección, los niveles de expresión génica de *PARP3* eran, aproximadamente, 65 veces superiores a las células no transfectadas. A las 48 horas post-transfección, 52 veces y a las 96 horas post-transfección, la expresión de *PARP3* caía a niveles cercanos a las células sin transfectar. Los valores RQ de las células transfectadas con el

vector pcDNA-DEST53 estuvieron en torno a 1 en los distintos tiempos evaluados (Figura 58).

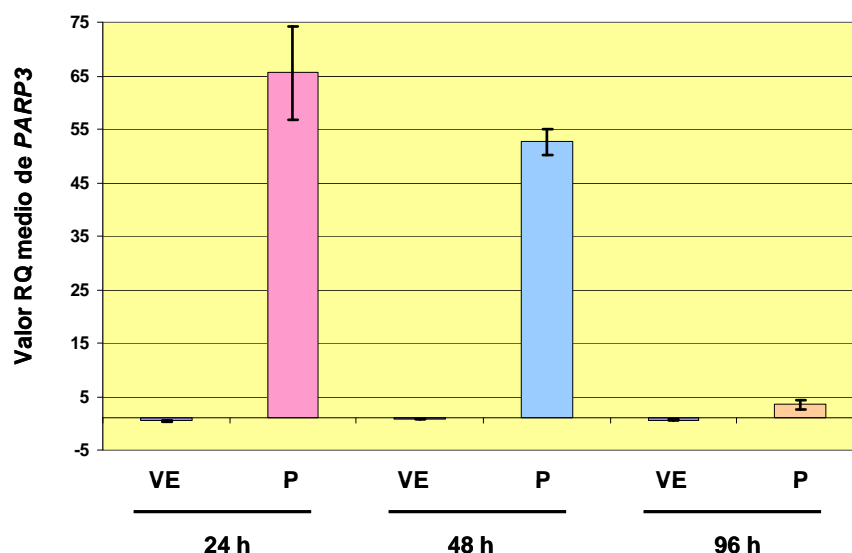


Figura 58. Diagrama de barras en el que se representan los valores medios de RQ de PARP3 en la línea celular A549 a distintos tiempos. VE, células transfectadas con el vector pcDNA-DEST53; P, células transfectadas con el vector pcDNA/GW-53/PARP3.

A continuación, evaluamos la actividad telomerasa, a partir de los extractos proteicos, en células transfectadas con el vector pcDNA-DEST53 y con el vector pcDNA/GW-53/PARP3 a distintos tiempos.

A las 24 horas post-transfección no se detectó variación entre los niveles de actividad enzimática en los extractos proteicos pcDNA-DEST53 y los extractos pcDNA/GW-53/PARP3. El ratio medio de la absorbancia de los extractos proteicos pcDNA/GW-53/PARP3/absorbancia de los extractos proteicos pcDNA-DEST53, fue 1.08 (0.92 – 1.24, intervalo de confianza del 95% para la media). En cambio, a las 48 horas post-transfección el ratio descendió a 0.67 (0.66 – 0.67, intervalo de confianza del 95% para la media), lo que significa que la actividad telomerasa disminuyó un 40.6%. De hecho, las diferencias de actividad enzimática a las 24 y 48 horas post-transfección fueron estadísticamente significativas ($P = 0.034$, según la prueba *U* de

Mann-Whitney). A las 96 horas post-transfección, se observó un ligero aumento en la actividad telomerasa, siendo el ratio 0.74 (0.55 – 0.92, intervalo de confianza del 95% para la media). De nuevo, las diferencias entre la actividad enzimática a las 24 y a las 96 horas post-transfección fueron significativas ($P = 0.005$, según la prueba *t de Student*). Sin embargo, no se encontraron diferencias entre los niveles de actividad a las 48 y 96 horas post-transfección ($P = 0.289$, según la prueba *U de Mann-Whitney*) (Figura 59).

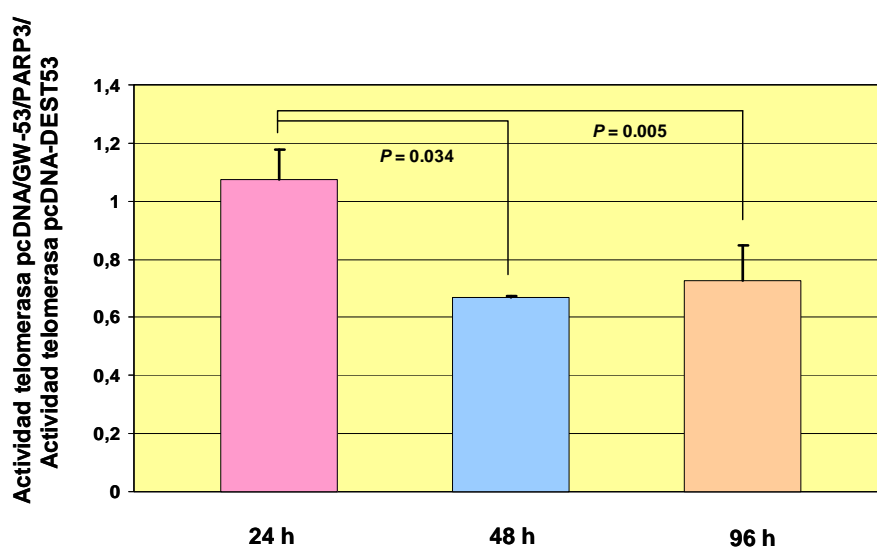


Figura 59. Diagrama de barras en el que se representan los ratios medios absorbancia de los extractos proteicos pcDNA/GW-53/PARP3/absorbancia de los extractos proteicos pcDNA-DEST53, a distintos tiempos.

Los fragmentos teloméricos obtenidos tras la amplificación, durante el ensayo TRAP, se separaron mediante electroforesis (Figura 60).

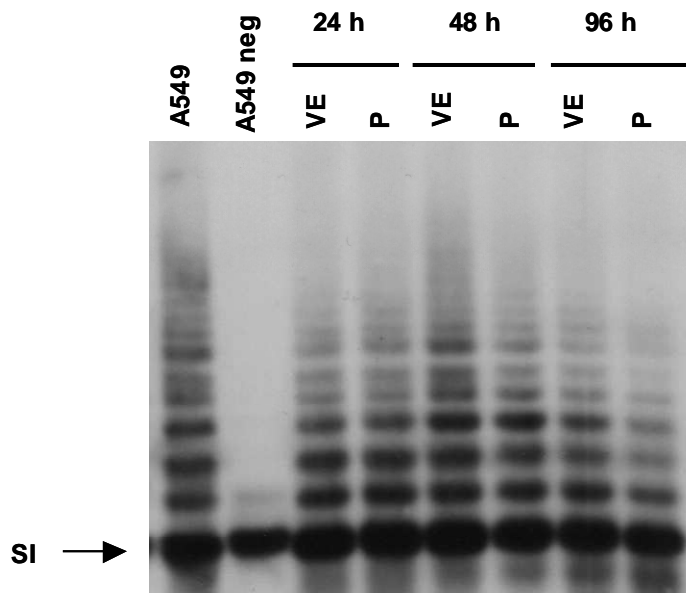


Figura 60. Electroforesis de las secuencias teloméricas añadidas por la enzima telomerasa, mediante el ensayo TRAP. A549, extracto proteico de la línea celular; A549 neg, extracto proteico de la línea celular en el que se ha inactivado el componente ARN; VE, células transfectadas con el vector pcDNA-DEST53; P, células transfectadas con el vector pcDNA/GW-53/PARP3; SI, secuencia interna.

DISCUSIÓN

El desarrollo del cáncer lleva asociado la alteración de genes fundamentales que controlan las principales vías reguladoras del ciclo celular, transducción de señales, reparación del ADN y apoptosis.

El cáncer de pulmón es el resultado final de la acción de múltiples factores que lesionan el epitelio bronquial y representa el tipo tumoral que da lugar a mayor mortalidad en el mundo. El principal problema que conlleva el desarrollo de esta enfermedad es que no se ha encontrado una terapia que pueda ser considerada eficaz para paliarla y, en este sentido, cabe destacar la relevancia que están adquiriendo los estudios sobre los mecanismos moleculares implicados en la carcinogénesis pulmonar. Estas investigaciones van dirigidas, fundamentalmente, a la identificación de marcadores moleculares relacionados con la progresión tumoral, que puedan ser empleados como factores pronóstico útiles para el establecimiento de protocolos terapéuticos adecuados. Asimismo, se han dirigido a evaluar la relación entre la actividad reparadora del ADN y la predisposición al desarrollo de cáncer de pulmón. A este respecto, hay que considerar que el principal factor etiológico del cáncer de pulmón es el consumo de tabaco, reflejado por el hecho de que el 80-90% de los casos diagnosticados corresponden a individuos con hábito tabáquico. Sin embargo, del total de individuos fumadores, desarrollan la enfermedad alrededor del 10-15%, lo cual indica que el efecto carcinogénico del humo del tabaco no afecta por igual a todos los fumadores; más bien es necesario considerar diferencias genéticas que predisponen al cáncer de pulmón, y que se relacionan, entre otras, con mecanismos de reparación del ADN, pues los individuos afectados por esta patología presentan una menor capacidad reparadora que los individuos sanos (Spitz et al., 1999; Bartsch et al., 2000; Wei et al., 2000; Gackowski et al., 2003; Paz-Elizur et al., 2003). No obstante, hay que considerar que esta disminución en la capacidad de reparación en pacientes afectados de cáncer, cuando se compara con individuos sanos, puede ser un efecto de la enfermedad, más que un factor de predisposición (revisado por Paz-Elizur et al., 2008).

La resección quirúrgica, en los estadios tempranos de la enfermedad, es el tratamiento de elección para los cánceres no microcíticos de pulmón (CNMPs). Sin embargo, las tasas de supervivencia continúan siendo bajas, por lo que se requiere la identificación de nuevos factores pronóstico y dianas terapéuticas con objeto de desarrollar nuevas estrategias de terapias adyuvantes.

1. ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA EN CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El acortamiento de los telómeros en las células somáticas, como consecuencia del “problema de la replicación terminal”, evita la pérdida de genes localizados en la parte próxima a los extremos cromosómicos, actuando como reloj mitótico y regulando el número de divisiones de la célula. Cuando los telómeros alcanzan una longitud crítica y no pueden proteger la parte final de los cromosomas mediante la estructura de *T-loop*, la célula entra en senescencia o apoptosis. Por tanto, la pérdida progresiva del ADN telomérico en humanos se ha definido como un mecanismo supresor de tumores, capaz de limitar la proliferación. No obstante, hay células capaces de evitar este mecanismo de regulación y continúan proliferando, lo que da lugar a telómeros extremadamente cortos. Esta pérdida de la homeostasis telomérica se traduce en fusiones y roturas cromosómicas, translocaciones, aneuploidía.... En definitiva, en una elevada inestabilidad genómica. Ésta permite a la célula adquirir nuevas alteraciones que potenciarán su crecimiento incontrolado. Para ello, es fundamental que mantengan un número de repeticiones teloméricas, lo que se consigue mediante la actividad de la enzima telomerasa o por el mecanismo alternativo de elongación telomérica.

Por tanto, pese a que el acortamiento de los telómeros actúa como un mecanismo supresor de tumores, también favorece la expansión tumoral mediante la selección de células con alteraciones en los puntos de control del ciclo celular y en los factores de reparación del ADN. La vías de p53 y p16/Rb son las encargadas, en último término, de dirigir la entrada en senescencia o apoptosis de la célula, una vez los telómeros han alcanzado la longitud crítica.

1.1 ESTUDIO DE LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

El análisis de la longitud de los telómeros en la población de CNMP incluida en esta Tesis se realizó mediante Southern-blot, de manera que se obtuvo la longitud telomérica media de los cromosomas de todas las células contenidas en cada muestra tisular de pulmón. Los resultados determinaron que los tumores presentaban una longitud media menor que las muestras de tejido control, si bien las diferencias carecieron de significación estadística. Esto no debe resultar extraño si tenemos en cuenta que las células tumorales sufren un mayor número de divisiones que las células sanas y la tasa de recambio es más rápida.

Se han realizado pocos trabajos en los que se haya estudiado, en CNMP, el estatus telomérico y su relación con variables clínico-patológicas. Sin embargo, los grupos que han evaluado la longitud de las secuencias teloméricas en muestras tumorales y no tumorales han llegado a la misma conclusión. Hsu et al. (2004, 2007) encontraron telómeros más cortos en las muestras tumorales que en las no tumorales. Estas diferencias, al contrario que las obtenidas en esta Tesis, fueron estadísticamente significativas. Un estudio llevado a cabo en lesiones preinvasivas y carcinomas invasivos de pulmón, determinó que los telómeros se acortaban conforme avanzaba el proceso neoplásico (Lantuejoul et al., 2005).

Existen resultados en la bibliografía, referentes a otros tipos tumorales, como tumores de próstata, hígado, vejiga, estómago, colorrectal, riñón, cabeza y cuello, en los que también se ha detectado acortamiento telomérico (Meeker et al., 2002a y 2002b; Wu X et al., 2003; Broberg et al., 2005; García-Aranda et al., 2006).

Los resultados obtenidos en esta Tesis ponen de manifiesto una correlación significativa y positiva entre la longitud de los telómeros en las muestras no tumorales y tumorales, esto es, a menor longitud telomérica en la muestra control, menor longitud en la correspondiente muestra tumoral. Este hecho podría explicarse porque la pérdida de secuencias teloméricas es un proceso

gradual y paulatino, que tiene lugar en cada ciclo celular y que viene determinado por la longitud original de los telómeros, así como por el estilo de vida de cada individuo.

La medición de la actividad telomerasa, mediante el ensayo TRAP, reveló que la mayoría de los tumores tenían actividad enzimática, en concreto el 83.2%. Estos resultados muestran concordancia con los obtenidos por otros grupos, y con datos previos del nuestro, no sólo en cáncer de pulmón, sino también en otros tipos tumorales, pues la detección de actividad telomerasa en células cancerígenas es un hecho característico de esta enfermedad, por lo descrito anteriormente: las células necesitan mantener un mínimo de secuencias teloméricas para poder dividirse (Kim et al., 1994; Shay y Wright, 1996; Breslow et al., 1997; Umbritch et al., 1999; Taga et al., 1999; Osaki et al., 2000; Hara et al., 2001; Gonzalez-Quevedo et al., 2002; revisado por Hahn, 2003; Wu TC et al., 2003; Lantuejoul et al., 2004; Lantuejoul et al., 2005; Oh et al., 2005; Garcia-Aranda et al., 2006; revisado por Lantuejoul et al., 2007; revisado por Harley, 2008). El hecho de que el resto de tumores analizados careciera de actividad enzimática (16.8%), puede ser debido a la existencia de mecanismos alternativos de elongación telomérica, o bien a que no desarrollen ningún mecanismo de mantenimiento telomérico, como ha sido descrito para algunos tumores, los cuales presentan un pronóstico más favorable (Ulaner et al., 2003; revisado por Bollman, 2007).

Los tumores en los que se detectó actividad telomerasa presentaban una longitud telomérica media muy similar a la del grupo de tumores carentes de actividad enzimática. La función de los mecanismos de mantenimiento de las secuencias teloméricas es lograr que los telómeros, simplemente, mantengan una longitud que permita a la célula continuar dividiéndose de manera indefinida, lo que se refleja en nuestra población. Otra posible explicación es que la enzima telomerasa tiende a elongar, preferentemente, los telómeros más cortos, de manera que aquellos extremos cromosómicos que mantienen un número determinado de secuencias teloméricas no son sustrato de la enzima. Además, no debemos olvidar que el resultado de TRF es la media de la longitud telomérica de distintas cromosomas y de distintas células. Esta falta

de asociación entre la longitud telomérica y la actividad telomerasa ya había sido descrita en CNMP (Hirashima et al., 2000; Hsu et al., 2004, 2007).

1.2 ESTUDIO DEL ESTATUS TELOMÉRICO Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El estudio de la longitud telomérica en relación con variables clínico-patológicas, determinó que los tumores de estadios más avanzado (IIIB y IV) y de mayor tamaño (T4) mostraban secuencias teloméricas de menor longitud, obteniéndose, en este último caso, diferencias estadísticamente significativas. La falta de asociación estadística entre la longitud de los telómeros y el estadio ha sido, también, referida por otro grupo, si bien, consideran que la mayor división celular, inherente a tumores más avanzados, lleva a una mayor pérdida de secuencias teloméricas (Hsu et al., 2004).

También se detectaron telómeros claramente más cortos en el tipo histológico carcinoma indiferenciado de célula grande. No es posible llegar a ninguna conclusión, pues sólo se dispuso de 4 muestras pertenecientes a este grupo. No obstante, sería interesante profundizar en su estudio ya que, aunque se trata del tipo histológico minoritario de CNMP, su pronóstico es el más desfavorable (Iyoda et al., 2006), y el acortamiento telomérico puede ser una de las causas.

Para poder realizar un estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, dividimos a la población de pacientes en dos grupos en función del estatus telomérico: los pacientes con tumores cuyo ratio TRF T/TRF N era inferior a 1 se agruparon como pacientes con acortamiento telomérico, mientras que si el ratio era igual o superior a 1, se clasificaron en el grupo de mantenimiento de la longitud de las secuencias teloméricas. El ratio TRF T/TRF N evita posibles sesgos en relación a la edad, sexo, hábito tabáquico, longitud de las secuencias teloméricas originales.....

El acortamiento de los telómeros en la población de tumores no microcíticos de pulmón evaluada en esta Tesis, constituye un factor de mal pronóstico, siendo éste independiente del estadio tumoral y del grado de infiltración ganglionar, como demostró el análisis multivariante de Cox ($P = 0.012$). En nuestro estudio, los pacientes que acortaban la longitud de las secuencias teloméricas en la muestra tumoral, con respecto a la muestra no tumoral, presentaron un intervalo libre de enfermedad medio de 38.32 meses (29.04 – 47.60 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) frente a 52.60 meses (43.35 – 61.84 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) en aquellos pacientes clasificados en el grupo de mantenimiento telomérico ($P = 0.020$). Además, en casi la mitad de los pacientes con acortamiento de las secuencias teloméricas (44.2%) el tumor recidivó durante el periodo de seguimiento, frente al 19% en el caso de los pacientes cuyo TRF T/TRF N fue superior o igual a 1.

Recientemente, ha sido descrito que el acortamiento de los telómeros, en CNMP, es un factor de riesgo para su desarrollo y, por tanto, puede ser empleado como marcador de susceptibilidad (Jang et al., 2008). Asimismo, un estudio realizado en pacientes con cáncer de vejiga, en el que se evaluó el estatus telomérico y su relación con el tabaco, también determinó que el acortamiento de las secuencias teloméricas, unido al hábito tabáquico, constituía un riesgo en el desarrollo de cáncer de vejiga 6 veces superior al de los sujetos que no fumaban y tenían telómeros largos. Por tanto, en cáncer de vejiga y, probablemente, en cáncer de pulmón, existe un efecto sinérgico entre la longitud de las secuencias teloméricas y el tabaco (Broberg et al., 2005). Es más, estudios realizados en otros tumores relacionados con el tabaco, como el cáncer de cabeza y cuello y riñón, arrojaron las mismas conclusiones: el acortamiento de los telómeros se asocia a un mayor riesgo de desarrollar estos tipos de cáncer, riesgo que se ve aumentado en individuos fumadores, existiendo, por tanto, grupos poblacionales genéticamente más susceptibles de padecer esta patología (Wu X et al., 2003).

Estos datos clínicos apoyan la teoría del papel dual de los telómeros: por un lado, su acortamiento limita la capacidad proliferativa de la célula, induciendo

su entrada en senescencia o muerte por apoptosis. Sin embargo, la no protección de los extremos cromosómicos lleva asociada una fuerte inestabilidad genómica que, si no desemboca en la muerte celular, es responsable de numerosas alteraciones que contribuyen al desarrollo tumorigénico.

Estudios realizados en nuestro grupo con tumores de diferentes orígenes, colorrectal y gástrico en concreto, revelaron que el acortamiento de los telómeros resultaba en un pronóstico más favorable que el mantenimiento, pues estaba actuando como mecanismo supresor de tumores (García-Aranda et al., 2006). Estos datos reflejan la importancia de las vías p53 y p16/Rb en el papel dual de los telómeros, así como, posiblemente, de las distintas proteínas teloméricas y factores de reparación del ADN.

Las alteraciones en p53 son una característica común en la mayoría de los tumores. En concreto, esta proteína está mutada, muy frecuentemente, en CNMP (Gazzeri et al., 1994; Franklin et al., 1997; revisado por Wislez et al., 2006; revisado por Huang et al., 2007; Gao K et al., 2008). En ratones, el acortamiento telomérico, unido a la falta de p53, promueve la tumorigénesis (Artandi et al., 2000). Además, confiere ventajas proliferativas a la célula, pues causa inestabilidad genómica y pérdida de los mecanismos de control de daño en el ADN, senescencia y apoptosis (Vogelstein et al., 2000).

Resultados semejantes se han encontrado asociados a la falta de p16: ésta, junto a la actividad telomerasa, es capaz de inmortalizar eficientemente a las células epiteliales (Kiyono et al., 1998). Nuestro grupo, y otros, han demostrado que las alteraciones en p16 son frecuentes en CNMP y se correlacionan con un peor pronóstico en los pacientes estudiados (Fong et al., 1999; Groeger et al., 1999; González-Quevedo et al., 2002; Wikenheiser-Brokamp, 2006; Capkova et al., 2007). De hecho, se han detectado hipermetilaciones en el promotor de *p16* en fumadores crónicos antes de cualquier evidencia clínica de enfermedad (Kersting et al., 2000).

Por tanto, parece claro que la alteración en CNMP de las vías implicadas en la entrada de la célula en senescencia y muerte por apoptosis, constituye un evento frecuente. Esto se traduce en que el acortamiento de los telómeros no es reconocido como ADN dañado, no se activan estos mecanismos, y se favorece la continua división celular que, finalmente, se traduce en una elevada inestabilidad genómica, muy positiva para el desarrollo tumoral.

1.3 ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA Y SU RELACIÓN CON VARIABLES CLÍNICO-PATOLÓGICAS

El estudio de la actividad de la enzima telomerasa en relación con distintos parámetros clínico-patológicos, no reveló, en esta Tesis, ningún tipo de asociación estadística. El mayor porcentaje de tumores en los que se detectó actividad telomerasa, se correspondía con tumores menos avanzados y de menor tamaño.

En la bibliografía aparecen datos contradictorios con respecto al estudio de la actividad telomerasa y su asociación con variables clínico-patológicas en cáncer no microcítico de pulmón. Mientras que algunos autores afirman que no existen asociaciones, otros las confirman, no estando establecido un criterio claro (Marchetti et al., 1999; Taga et al., 1999; Hara et al., 2001; Kumaki et al., 2001; Marchetti et al., 2002; Hsu et al., 2004; revisado por Shin et al., 2006; revisado por Lantuejoul et al., 2007). Hay que tener en cuenta que, en muchos de estos estudios, no se incluyen todos los estadios tumorales y que el estudio estadístico se ha realizado agrupando a los pacientes según distintos criterios.

De nuevo, el tipo histológico carcinoma indiferenciado de célula grande se comportó de forma diferente al resto de los subtipos histológicos estudiados en esta Tesis: de los 4 tumores incluidos en este grupo, sólo 1 (25%) mostró actividad telomerasa, frente al 84.2% y 86.8% de los tumores de tipo adenocarcinoma y carcinoma epidermoide, respectivamente, lo que determinó que los resultados alcanzasen significatividad estadística. Sin embargo, una

vez más, no debemos olvidar el bajo número muestral, siendo interesante ampliar esta población para confirmar los datos y, de ser así, buscar la posible causa molecular de este comportamiento. Estos resultados son contrarios a los descritos por otros grupos, en los que este tipo histológico mostraba los mayores índices de actividad telomerasa o, simplemente, no se encontró asociación entre la actividad telomerasa y el tipo histológico (Marchetti et al., 1999; Taga et al., 1999; Hara et al., 2001; Kumaki et al., 2001; Lantuejoul et al., 2004).

El estudio de supervivencia, medida como intervalo libre de enfermedad, reveló que ninguno de los tumores sin actividad telomerasa recidivó, frente al 37% de los casos que mostraron actividad telomerasa en la muestra tumoral, lo que relaciona, claramente, a la actividad telomerasa detectada mediante el ensayo TRAP en las muestras tumorales, con un peor pronóstico. Este resultado, obtenido anteriormente por nuestro grupo a partir de una serie diferente de CNMP, y por otros grupos, no es exclusivo de este tipo tumoral (Marchetti et al., 1999; Taga et al., 1999; Hara et al., 2001; González-Quevedo et al., 2002; Marchetti et al., 2002; Wu TC et al., 2003). Numerosos estudios clínicos relacionan la presencia de actividad telomerasa en la muestra tumoral con recidivas del tumor y, por tanto, con un peor pronóstico para pacientes con cáncer colorrectal, de mama, gástrico, cervical, carcinoma hepatocelular, leucemias, neuroblastomas y meningiomas (Hiyama et al., 1995a; Hiyama et al., 1995b; Breslow et al., 1997; Clark et al., 1997; Langford et al., 1997; Shimada et al., 2000; Tatsumoto et al., 2000; Wisman et al., 2000; revisado por Shin et al., 2006). Esta asociación tan evidente entre la detección de actividad telomerasa en la muestra tumoral y la evolución de los pacientes, ha hecho que se considere su utilidad en la práctica clínica, tanto como marcador pronóstico, como en el sector farmacéutico, diseñándose fármacos capaces de evitar la elongación de los telómeros por la enzima telomerasa en las células tumorales.

Debido a la relación encontrada entre la actividad telomerasa, el estatus telomérico y el intervalo libre de enfermedad, quisimos profundizar en ello y ver qué impacto pronóstico tenía el acortamiento de las secuencias teloméricas

entre los pacientes con tumores telomerasa positivos, subgrupo que presentó peor pronóstico. El acortamiento telomérico fue, una vez más, causa de un mayor porcentaje de recidivas, de manera que, aproximadamente, en la mitad de los pacientes que mostraron actividad telomerasa y TRF T/TRF N inferior a 1 en la muestra tumoral, el tumor recidivó, siendo el intervalo libre de enfermedad medio 32.92 meses (22.93 – 42.92 meses, intervalo de confianza del 95% para la media), frente a 50.68 meses (40.49 – 60.87 meses, intervalo de confianza del 95% para la media) para aquellos pacientes que mantuvieron la longitud de las secuencias teloméricas en la muestra tumoral, con respecto a su correspondiente muestra no tumoral ($P = 0.026$).

2. ANÁLISIS DE LOS GENES DE REPARACIÓN DEL ADN EN CÁNCER NO MICROCÍTICO DE PULMÓN Y SU RELACIÓN CON LA FUNCIÓN TELOMÉRICA

Mediante el uso de matrices de ADN complementario de genes que participan en la reparación del ADN y en la estabilidad genómica, realizamos un estudio encaminado a seleccionar cuáles de ellos podrían estar relacionados con el desarrollo del CNMP y con la homeostasis telomérica. Posteriormente, y como está descrito en la bibliografía, este análisis se corroboró por PCR cuantitativa a tiempo real, técnica más sensible y reproducible.

En general, los resultados obtenidos a partir de las matrices no se validaron en el análisis por PCR cuantitativa. La razón de esto podría ser que las matrices empleadas contenían secuencias de ADN bastante largas, lo que, según consideró la propia empresa que las comercializó, pudo crear problemas en la hibridación. Actualmente, esta casa comercial ha sustituido el ADN complementario por unas secuencias de oligonucleótidos específicas de cada gen que muestran mejores resultados, como hemos podido comprobar en nuestro grupo (Ortega et al., 2008).

Para estudiar la posible implicación de los factores de reparación del ADN en la homeostasis telomérica, se seleccionaron los genes que mostraron diferencias medias de expresión de ARN mensajero, significativas o cercanas a la significación estadística, de, al menos, 2 veces entre la población tumoral con acortamiento telomérico superior al 20%, con respecto a su correspondiente muestra control, y el grupo de tumores que mantenía la longitud de los telómeros. También se llevaron a cabo estudios de expresión génica en relación con la actividad telomerasa.

Asimismo, y aunque no mostraron diferencias de expresión génica en ninguna de las situaciones mencionadas anteriormente, se incluyeron en el estudio por PCR cuantitativa a tiempo real genes claramente implicados en la función telomérica, de acuerdo con la bibliografía existente.

De esta manera, y tras analizar por PCR cuantitativa a tiempo real los niveles de ARN mensajero de 19 genes en los 37 tumores de los que se dispuso, sólo aparecieron diferencias de expresión entre la población tumoral y la mezcla de muestras no tumorales en 4 casos: *DCLRE1C*, *GTF2H1*, *TRF2* y *FLJ10858*. En los tres primeros, la expresión génica se encontraba disminuida en la mayoría de las muestras tumorales. En concreto, 75.7%, 63.9% y 50% de los casos analizados mostraron niveles de expresión inferiores a la mitad de los registrados en el control. En el caso de *FLJ10858* los niveles de ARN mensajero superaban el rango considerado como normal en el 82.9% de los tumores analizados, corroborándose en este caso el resultado obtenido a partir de las matrices de ADN complementario. Además, *FLJ10858* mostró diferencias de expresión cercanas a la significación estadística en función del estadio tumoral. Si bien los niveles de ARN mensajero se encontraban elevados, tanto en estadios tempranos como en estadios más avanzados, la sobre-expresión de *FLJ10858* fue más acusada en los estadios IIIB y IV.

FLJ10858, también conocida como *NEIL3* y *hFPG2*, forma parte de la vía de reparación del ADN por escisión de bases, siendo una de las 5 ADN glicosilasas que forman parte de esta vía y que reparan el daño oxidativo en el ADN. Estudios llevados a cabo en tejidos sanos determinaron, mediante Northern-blot, que la expresión de *FLJ10858* se limitaba al timo y testículos. En la población analizada en esta Tesis detectamos expresión en el tejido pulmonar sano, si bien los niveles fueron bajos, pues el C_T medio inter-experimental fue 35.05. *FLJ10858* se colocaliza con RPA, lo que ha llevado a postular su implicación en la reparación de daños oxidativos en el ADN en los que RPA participa (Morland et al., 2002; Hailer et al., 2005).

Otra glicosilasa de la vía de reparación por escisión de bases evaluada en esta Tesis fue *NTHL1*. Ésta se expresa de manera ubicua, si bien sus niveles son bajos en tejido pulmonar (Aspinwall et al., 1997; Imai et al., 1998). *NTHL1* repara las oxidaciones en pirimidina (Ikeda et al., 1998; Sarker et al., 1998). Nuestros resultados indican diferencias en las recurrencias tumorales en función de la expresión génica de *NTHL1*. Dentro del grupo con expresión alterada de este gen, recidivaron el 60% de los tumores analizados, frente al

10% de recurrencias en el grupo tumoral en el que la expresión génica de *NTHL1* se evaluó como normal. Las diferencias entre los intervalos libre de enfermedad medios eran cercanas a la significación estadística ($P = 0.073$). A pesar del bajo número muestral, estos resultados sugieren que las alteraciones en los niveles de *NTHL1* pueden tener un fuerte impacto pronóstico.

Diversos estudios han demostrado que el daño oxidativo en el ADN y la capacidad de reparación varían entre los distintos tejidos (Karahalil et al., 2002). Las enzimas ADN glicosilasas evaluadas en esta Tesis presentan bajos niveles de expresión génica en el tejido pulmonar normal. Éste, cuando está sometido a la acción de los carcinógenos del tabaco, es susceptible de sufrir un gran daño oxidativo por lo que, alteraciones en los mecanismos reparadores de estas lesiones, podrían estar contribuyendo a la no subsanación de los daños en el ADN. En el caso de *FLJ10858* sería interesante evaluar si su sobre-expresión en el tumor es el resultado de un mecanismo compensatorio por parte de la célula, de manera que responde al daño oxidativo que está sufriendo con un aumento de expresión de esta glicosilasa para intentar paliarlo.

En un trabajo reciente realizado en la línea celular de cáncer de mama MCF7, los autores demostraron que la inhibición de *NTHL1*, mediante ARN de interferencia, sensibilizaba a las células frente a cisplatino, molécula empleada en el tratamiento del cáncer de pulmón, tanto en la línea celular transfectada sólo con ARN de interferencia, como en células que sobre-expresaban YB-1, proteína que, en niveles elevados, está asociada con resistencias a este compuesto. Estos resultados han llevado a los autores a sugerir que la inhibición de la actividad de esta glicosilasa podría ser una diana potencial para sensibilizar a las células frente al tratamiento con cisplatino (Guay et al., 2008). Estos datos explican, quizá, por qué los pacientes que sobre-expresan *NTHL1*, en la población evaluada en esta Tesis, presentan un pronóstico más desfavorable que aquellos cuyos niveles de expresión están comprendidos dentro del rango considerado como normal.

TRF2 es una proteína que se une directamente al ADN telomérico, participando en la formación del *T-loop*. Blasco et al. (2007), a partir de estudios llevados a cabo en ratones deficientes en telomerasa, han definido a TRF2 como un potente factor oncogénico. Su sobre-expresión contribuye a la inestabilidad genómica y al desarrollo tumorigénico, pues es responsable del acortamiento de los telómeros de manera independiente de su longitud y de la actividad telomerasa. En nuestro estudio, el acortamiento telomérico constituye un factor de pronóstico desfavorable como consecuencia, probablemente, de la inestabilidad genómica y de la pérdida de las proteínas que forman parte de las vías de senescencia y apoptosis. Por ello, cabría esperar que los niveles de *TRF2* fueran elevados en la población tumoral que forma parte de este estudio, contribuyendo así a esta inestabilidad. Sin embargo, los niveles de ARN mensajero se encontraron dentro del rango establecido como normal en el 50% de los casos analizados, y disminuidos en la otra mitad de los tumores. Una posible explicación sería que, al disminuir TRF2, se vería comprometida la formación del *T-loop* y, por tanto, la inhibición de ATM, favoreciendo las fusiones cromosómicas y la consiguiente inestabilidad genómica derivada de estos procesos. Hsu et al. (2004, 2007) y Lin et al. (2006) han determinado, a partir de muestras de pacientes afectados de CNMP, que no existen alteraciones en la expresión de *TRF2* en las muestras tumorales, con respecto a las muestras control. Sin embargo, resultados contradictorios se han obtenido con respecto al papel de los genes teloméricos en distintos cánceres, pues hay estudios en los que sus niveles aparecen aumentados, mientras que otros afirman que disminuyen (revisado por Cookson y Laughton, 2008).

Curiosamente, no se observaron diferencias significativas en la expresión de los genes evaluados en esta Tesis entre los tumores que mostraron un acortamiento telomérico superior al 20% y los que mantuvieron las secuencias teloméricas. Dos factores importantes deben considerarse en la explicación de este hecho. Por un lado, el bajo número muestral: 22 tumores incluidos en el primer grupo y 15 en el segundo. Por otro lado, tal vez, el criterio que establecimos en función del estatus telomérico fue muy restrictivo. Hsu et al. (2007) determinaron que los tumores pulmonares con acortamiento

telomérico, sin tener en cuenta el grado, mostraban mayores niveles de ARN mensajero de *TRF2*, *TRF1* y *hTERT*, contribuyendo, los dos primeros, a la protección de los telómeros previa a la activación de la enzima telomerasa. Sin embargo, Lin et al. (2006) no encontraron ninguna asociación entre la longitud telomérica y la expresión de genes asociados a los telómeros en cánceres no microcíticos de pulmón.

En los tumores evaluados, la longitud de los fragmentos teloméricos se correlacionó positiva y significativamente con los niveles de ARN mensajero de *TOP3B* y *PMS1*, de manera que, a menor expresión génica, menor longitud telomérica.

TOP3B pertenece a la familia de las enzimas ADN topoisomerasas, implicadas en la resolución de super-enrollamientos del ADN durante la replicación, transcripción y la reparación del ADN por mecanismos de recombinación y por formación de *Holliday junctions*. Asimismo, esta familia de proteínas también interviene en la compactación de la cromatina y en la segregación cromosómica. Por otro lado, son diana de fármacos anti-tumorales. Ha sido descrito que algunas topoisomerasas interaccionan con proteínas de la familia de las RecQ helicasas, a la que pertenecen WRN y BLM, proteínas implicadas en la función telomérica (revisado por Champoux, 2001; revisado por Wang JC, 2002; revisado por Laursen et al., 2003).

Trabajos llevados a cabo en ratones deficientes en *TOP3B* demostraron que, si bien no se producían anormalidades embrionarias o neonatales aparentes, los animales mutados tenían una vida media inferior a la de los animales sin ninguna alteración y los machos mostraban infertilidad (Kwan y Wang, 2001; Kwan et al., 2003). En levaduras derivadas de la cepa YPH501 en las que se mutó el gen *TOP3*, se observó acortamiento telomérico dependiente de *TOP3*, tras la comparación de la longitud de los extremos cromosómicos con la cepa no mutada. Los experimentos llevados a cabo determinaron que *TOP3* es necesaria para el mantenimiento de la longitud de las secuencias teloméricas, tanto en células con actividad telomerasa, como en células que desarrollan un mantenimiento alternativo de los telómeros (Kim et al., 1995; Tsa et al., 2006).

En humanos, existen dos isoenzimas, TOP3A y TOP3B. Parece que TOP3A es la equivalente funcional a la proteína de levaduras TOP3, pues la introducción de ARN de interferencia de *TOP3B* en la línea celular telomerasa positiva HeLa, y en la línea celular Saos-2, que presenta el mecanismo ALT, no alteró el patrón de longitud telomérica observado en las líneas celulares transfectadas con el vector control. En cambio, en las células Saos-2 en las que se silenció la isoenzima TOP3A, se detectó actividad telomerasa, lo que no se produjo al evaluar la actividad catalítica en las células control. Este hecho llevó a los autores de este trabajo a postular una posible función de TOP3A en los mecanismos de recombinación homóloga encaminados a mantener la longitud de los telómeros. Según los autores, TOP3, junto con proteínas de la familia RecQ helicasas, podrían estar colaborando en la resolución de *Holliday junctions* durante las recombinaciones teloméricas, de manera que, la no resolución de estas estructuras, causaría roturas cromosómicas, fusiones y acortamiento de los telómeros, incluso en células telomerasa positivas (Tsa et al., 2006). La implicación de TOP3B en estos procesos no debe descartarse, pues ha sido descrito que participa en la resolución de *Holliday junctions* durante la meiosis en células germinales de ratón (Kwan et al., 2003). Bien es cierto que ambas isoenzimas tienen promotores con baja homología y, pese a tener características enzimáticas similares, no pueden sustituirse completamente, pero hay que tener en cuenta que el patrón de expresión de estas proteínas en los distintos tejidos no está bien definido. Por otro lado, TOP3 presenta una homología del 48.5% con TOP3B (Ng et al., 1999; Kwan y Wang, 2001; Cho et al., 2004).

Recientemente, ha sido descrito en una línea celular de melanoma que la resistencia a irinotecán cursa con pérdidas en el *loci* de *TOP3B*, entre otras alteraciones (Gao W et al., 2008). Esta molécula perteneciente a la familia de captotecinas y se emplea en el tratamiento de cáncer colorrectal, fundamentalmente, si bien también puede emplearse en el tratamiento de tumores de diferente origen, como pulmón, estómago, páncreas, ovario y gliomas, En el caso de que esto pudiera aplicarse a tumores pulmonares, TOP3B no sólo estaría favoreciendo la inestabilidad genómica, derivada del acortamiento de los telómeros, sino que, además, estaría dando lugar a

resistencias farmacológicas y, por tanto, contribuyendo a un pronóstico más desfavorable para el paciente.

PMS1, la otra molécula cuyos niveles de expresión génica se correlacionaban positiva y significativamente con la longitud de los telómeros, pertenece a la vía de reparación de apareamientos incorrectos de bases en el ADN. Se asocia a MLH1, formando un complejo que reconoce los apareamientos erróneos generados durante la replicación del ADN. Las secuencias teloméricas son altamente repetitivas, lo que podría dar lugar, tras la replicación, a errores en el apareamiento. Esto podría explicar el hecho de que se haya detectado una correlación significativa y positiva entre la longitud telomérica y la expresión génica de *PMS1*: cuanto más largos son los telómeros, mayor número de moléculas de PMS1 se requieren para reparar los errores post-replicativos de apareamientos incorrectos de bases. De hecho, se han encontrado mutaciones en los telómeros de muestras de cáncer colorectal (Pickett et al., 2004). Recientemente, se ha relacionado la existencia de polimorfismos en *PMS1* con el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón y cáncer de cabeza y cuello (Michiels et al., 2007).

En relación con la actividad telomerasa, los niveles de ARN mensajero de los genes *DCLRE1C*, *GTF2H1*, *PARP3* y *MLH1* se vieron significativamente disminuidos, más de dos veces, en los tumores telomerasa positivos. Sin embargo, los tumores negativos para telomerasa, mostraban niveles comprendidos dentro del rango considerado como normal.

DCLRE1C y *GTF2H1* presentaban niveles de expresión génica claramente disminuidos en la mayoría de los tumores. Sin embargo, cuando se llevó a cabo el estudio en función de la actividad telomerasa, los resultados revelaron que sólo el subgrupo tumoral en el que se detectó actividad telomerasa tenía disminuida la expresión. Estos mostraron un RQ medio de 0.28 (0.23 – 0.36, intervalo de confianza del 95% para la media), en el caso de *DCLRE1C*, y de 0.31 (0.24 – 0.41, intervalo de confianza del 95% para la media) para *GTF2H1*. Estos mismos genes mostraron diferencias significativas de expresión en función del tipo histológico tumoral, de manera que los tumores

indiferenciados de célula grande presentaron niveles de ARN mensajero dentro del rango comprendido como normal, mientras que los adenocarcinomas y los carcinomas epidermoides mostraban niveles disminuidos. No es de extrañar esta asociación si tenemos en cuenta que, en estos últimos, detectamos actividad telomerasa en más del 80% de los tumores, frente al 25% de los tumores indiferenciados de célula grande. Por tanto, las diferencias de expresión encontradas en función del tipo histológico podrían corresponder, realmente, a diferencias en función de la actividad telomerasa.

DCLRE1C da lugar a una proteína denominada Artemis, implicada en la reparación del ADN por el mecanismo de recombinación no homóloga. Ha sido descrito que, deficiencias en esta vía, conducen a la inestabilidad genómica y a un aumento de la tumorigénesis. Es más, la presencia de alelos hipomórficos de *DCLRE1C* parece estar asociada con una mayor predisposición a desarrollar linfomas (Moshous et al., 2003; Ege et al., 2005). En un estudio llevado a cabo en ratones se determinó que la deficiencia en Artemis aceleraba la tumorigénesis en diversos tejidos, de manera que la vía de reparación por recombinación no homóloga actuaba como supresora tumoral, pues Artemis colaboraba con p53 en la supresión tumorigénica. Estos autores también afirmaron que Artemis era importante en la prevención de ciertas pérdidas de heterocigosidad (Woo et al., 2007).

Proteínas que forman parte de la misma ruta de reparación que Artemis, están asociadas con la protección y el mantenimiento telomérico, como Ku70/80 y ADN-PKc. Estudios llevados a cabo en líneas celulares embrionarias de ratón en las que se delecionó el gen *DCLRE1C*, mostraron niveles elevados de anomalías cromosómicas, tales como fragmentaciones y fusiones teloméricas, lo que llevó a los autores de este trabajo a postular que Artemis podría estar implicada en la protección de los extremos cromosómicos (Rooney et al., 2003). Por ello, quizá, su deficiencia puede asociarse a tumores en los que se detecta actividad telomerasa, ya que la no protección de los telómeros, por parte de esta proteína, favorecería el acceso de la enzima telomerasa. Además, la carencia de Artemis estaría contribuyendo a la inestabilidad genómica, tan perjudicial para los pacientes afectados de CNMP.

Recientemente, ha sido publicado un trabajo, realizado en la línea celular de pollo DT4, en el que los autores afirmaban que Artemis podría estar implicada en mecanismos pro-apoptóticos, independientes de p53, más que en la reparación del ADN (Abe et al., 2008). Si esto es así, su deficiencia en tumores telomerasa positivos daría lugar a resistencias al tratamiento quimioterápico, pues los autores del trabajo anteriormente señalado, demostraron que las células DT4 Artemis $-/-$ eran resistentes a altas dosis de etopósido, inhibidor de la topoisomerasa 2 y molécula empleada en el tratamiento de tumores de pulmón, testiculares, leucemias y linfomas. En cambio, Musio et al. (2005) y Darroudi et al. (2007) hallaron que fibroblastos humanos con mutaciones en *DCLRE1C*, obtenidos a partir de pacientes, mostraban niveles de sensibilidad variables en función del tratamiento. También observaron que la tasa de aberraciones cromosómicas era semejante en fibroblastos mutados y en fibroblastos normales, si bien, es probable que la carga genética de cada paciente pueda influir en la tendencia hacia mayores niveles de inestabilidad genética. Otros autores que afirman que Artemis no es requerida para la reparación de daño en el ADN causado por etopósido, lo que podría explicar la baja sensibilidad de las células deficientes en Artemis a este compuesto, pues las lesiones en el ADN son fácilmente reparadas sin necesidad de ser procesadas. Sin embargo, sí desempeñaría un papel destacado cuando el daño es causado por radiación ionizante, ya sea mediante la reparación del ADN, o bien, participando en los puntos de control del ciclo celular G1/S y/o G2/M (Zhang et al., 2004; revisado por Jeggo y Löbrich, 2005; Musio et al., 2005; Wang J et al., 2005).

GTF2H1, también conocida como p62, forma parte de un complejo proteico, TFIIH, implicado en la reparación del ADN por escisión de nucleótidos y en el inicio de la transcripción. Este complejo está constituido por 10 subunidades, formando parte GTF2H1 del grupo de proteínas reguladoras de la actividad del complejo. Ésta participa en la transcripción, modula la transactivación de distintos genes e interacciona con E2F1 y Rb, compitiendo ambas por su unión a GTF2H1, lo que ha llevado a sugerir que éste es el mecanismo mediante el cual Rb inhibe la transactivación. Asimismo, también interacciona con p53, regulando ésta, a su vez, la actividad reparadora de TFIIH. GTF2H1

es una de las moléculas que interacciona con el dominio de transactivación de p53, reclutándola así hacia el complejo TFIIH. Esta interacción se correlaciona con la capacidad de p53 para estimular la transcripción, de manera que alteraciones en TFIIH podrían afectar a la regulación transcripcional mediada por p53 (Xiao et al., 1994; Blau et al., 1996; Léveillard et al., 1996; Pearson y Greenblatt, 1997; Frit et al., 1999; Gervais et al., 2004; Di Lello et al., 2006). El hecho de que en la población de tumores telomerasa positivos, evaluada en esta Tesis, los niveles génicos de *GTF2H1* aparezcan disminuidos, podría indicar una posible función de GTF2H1 en la regulación transcripcional de moléculas implicadas en la represión de telomerasa, de manera que la pérdida de GTF2H1 favorecería la actividad catalítica de telomerasa sobre los telómeros. Es más, p53 actúa como regulador negativo de la transcripción de *hTERT*, pudiendo ocurrir que, al no estar unido a p62, no pueda actuar como represor transcripcional de la subunidad catalítica de telomerasa. Además, al ser un hecho común en cáncer las alteraciones en p53, ambas moléculas podrían estar actuando sinérgicamente, favoreciendo la sobre-expresión de *hTERT* y la evasión de los mecanismos de senescencia y apoptosis de la célula tumoral. De hecho, mutaciones en otras proteínas del complejo TFIIH, inhiben la transactivación de determinados genes y la cascada de señales entre el complejo y distintos factores implicados en la transcripción, alterando su función en la regulación transcripcional (revisado por Zurita y Merino, 2003).

Recientemente, ha sido publicado que 3 SNPs en el gen *GTF2H1* se asociaban con un mayor riesgo de desarrollar cáncer de pulmón en la población china, mientras que un polimorfismo diferente confería protección, lo que significa que GTF2H1 juega un papel muy importante en el desarrollo de esta enfermedad (Wu et al., 2008). Esta asociación entre polimorfismos de *GTF2H1* y el riesgo a desarrollar cáncer de pulmón es plausible, ya que la vía de reparación del ADN por escisión de nucleótidos constituye la primera defensa frente a los daños producidos por agentes como los carcinógenos del tabaco. Por tanto, el funcionamiento incorrecto de las proteínas implicadas en esta vía, favorecería la propagación de células con alteraciones en el ADN que, en último término, podrían dar lugar a un tumor (Wei et al., 2000; Lee et al., 2005).

PARP3 y *MLH1* mostraron niveles de expresión génica medios, en los tumores telomerasa positivos, de 0.36 (0.25 – 0.50, intervalo de confianza del 95% para la media) y 0.41 (0.34 – 0.50, intervalo de confianza del 95% para la media), respectivamente. Ambos se localizan en el brazo corto del cromosoma 3, en *loci* muy próximos: 3p21.31-p21.1 y 3p21.3, respectivamente. Ha sido descrito que esta región del cromosoma 3 presenta una importante tendencia a deletarse en CNMP y podría contener genes supresores de tumores y represores de la actividad telomerasa (Loughran et al., 1997; Tanaka et al., 1998; Cuthbert et al., 1999; revisado por Horikawa y Barrett, 2003; Iniesta et al. 2004). Se ha sugerido que los posibles represores de la enzima telomerasa localizados en 3p muestran especificidad de tejido, de manera que la inactivación de alguno/s de ellos en un tipo tumoral, no ocurre en otro, no pudiendo tampoco descartarse la existencia de represores de expresión ubicua (Cheng et al., 1998; revisado por Horikawa y Barrett, 2003; Tanaka et al., 2005b).

Yim et al. (2007) han demostrado la existencia de asociación entre la actividad telomerasa y el humo del tabaco, en células en cultivo de epitelio bronquial normal, de manera que la exposición a estos carcinógenos aumentaba la actividad telomerasa. Dado que se han encontrado pérdidas alélicas en 3p en epitelios normales de individuos fumadores no enfermos de cáncer de pulmón, podría sugerirse que la pérdida de posibles mecanismos represores de la actividad telomerasa localizados en 3p, favorecida por componentes presentes en el humo del tabaco, podría constituir un evento precoz en la patología del CNMP. De hecho, se han descrito niveles elevados de ARN mensajero de *hTERT* en biopsias de epitelio bronquial normal (58%) y con metaplasia y displasia (83%) de individuos fumadores (Capkova et al., 2007). Además, Ohmura et al. (1995) y Horikawa et al. (1998) demostraron que la pérdida de actividad telomerasa, tras la introducción del brazo corto del cromosoma 3 en la línea celular RCC23, se correlacionaba positivamente con la pérdida de ARN mensajero de la subunidad catalítica de telomerasa, medida ésta por RT-PCR y posterior Southern-blot de los productos amplificados. De acuerdo con estos datos, *PARP3* podría considerarse candidata a represora de la actividad telomerasa, de manera que su pérdida favorecería el avance tumoral.

Con respecto a *MLH1*, no debe descartarse, tampoco, una posible función propia en relación con la actividad telomerasa, si bien, no hay nada descrito al respecto.

Debido a la relación encontrada entre pérdidas de heterocigosidad en 3p21, la edad de iniciación en el hábito tabáquico y la presencia de aductos en el ADN, Hirao et al. (2001) determinaron que, en esa región, debía de encontrarse un gen implicado en la reparación del ADN, en concreto, en la reparación de este daño genómico. Evaluaron si *MLH1* podría ser ese gen, aunque su participación en la reparación del ADN no conlleva la resolución de estos daños, y no encontraron asociación alguna, por lo que *PARP3* podría ser el gen candidato, ya que otras moléculas pertenecientes a la vía de reparación del ADN por escisión de bases, también pueden eliminar los aductos en el ADN.

Estudios realizados por inmunohistoquímica determinaron, en 150 tejidos de CNMP, que la expresión reducida de *MLH1* se asociaba significativamente con el hábito tabáquico, de manera que los individuos que fumaban un mayor número de cigarrillos tendían a expresar menos *MLH1*. En este estudio, al igual que en el realizado en la población de tumores incluida en esta Tesis a partir de ARN mensajero, no se encontró correlación alguna entre las variables clínico-patológicas y la expresión de *MLH1*. Sin embargo, sí se correlacionó la expresión proteica con la pérdida de heterocigosidad en el *locus* 3p21, donde *MLH1* se localiza, lo que sugiere que la pérdida de *MLH1* en CNMP se produce por LOH y no por metilación del promotor, como en cáncer colorrectal (Xinarianos et al., 2000).

Los resultados de expresión génica de *MLH1*, mediante PCR cuantitativa a tiempo real, incluidos en esta Tesis, revelaron que los tumores con expresión disminuida de ARN mensajero presentaban una mayor tendencia a recidivar (38.5%) en comparación con los que mostraban niveles comprendidos dentro del rango de normalidad (16.7%). El hecho de que bajos niveles de expresión génica de *MLH1* se asocien con la actividad telomerasa, puede ser la causa de esta tendencia en el estudio de supervivencia.

Asimismo, también se encontró una tendencia a asociación entre la expresión génica aumentada de *PMS1* y la probabilidad tumoral de recaer. Los pacientes con sobre-expresión de dicho gen presentaban un intervalo libre de enfermedad medio menor que el grupo de pacientes con expresión de *PMS1* comprendida dentro del rango de normalidad, encontrándose recaídas en un mayor porcentaje de pacientes (40% frente a 25%).

MLH1 y PMS1 forman un heterodímero que repara errores de apareamiento de bases tras la replicación, por lo que, quizá, la pérdida de regulación en sus niveles cause alteraciones en la maquinaria de reparación del ADN que, incapaz de subsanar los errores, contribuya a la inestabilidad genómica.

Según los resultados presentados en esta Tesis, no se encontraron diferencias de expresión en los genes que codifican para proteínas de unión directa al ADN telomérico, en función de la actividad telomerasa. Estos resultados concuerdan con los presentados por Hsu et al. (2004), quienes realizaron un estudio de expresión de ARN mensajero de los genes *TRF1* y *TRF2* en CNMP, y tampoco encontraron variaciones significativas en los niveles de expresión, en relación con la actividad telomerasa.

Sólo hubo un gen cuya expresión se vio aumentada significativamente en las muestras telomerasa positivas: *hTERT*. Como era de esperar, este subgrupo de tumores tenía mayor expresión de *hTERT*. Si bien hay autores que no han encontrado correlación entre *hTERT* y la actividad telomerasa (Hsu et al., 2004), la mayoría de los trabajos, al igual que el presentado en esta Tesis, sí han detectado esta asociación (Hara et al., 2001; Kumaki et al., 2001; Marchetti et al., 2002; Wu TC et al., 2003; Lantuejoul et al., 2005).

Coincidiendo con los resultados de otros autores, no se encontró asociación alguna entre los niveles de ARN mensajero de *hTERT* y las distintas variables clínico-patológicas evaluadas en esta Tesis (Hara et al., 2001; Marchetti et al., 2002; Wang L et al., 2002; Wu TC et al., 2003). Sin embargo, cabe destacar el hecho de que los tumores que sobre-expresaban *hTERT* tuvieran más tendencia a recaer que aquellos con niveles comprendidos dentro del rango

de normalidad (46.2% frente a 16.7%). Los resultados obtenidos carecieron de significación estadística ($P = 0.424$), probablemente por el bajo número muestral (20 pacientes formaron parte del estudio). Hara et al. (2001) analizaron los niveles de ARN mensajero de *hTERT* de 62 pacientes afectados de CNMP, por RT-PCR, y encontraron que los pacientes con expresión positiva para este gen presentaban un intervalo libre de enfermedad significativamente más corto que aquellos en los que no se detectó expresión génica. Los mismos resultados han sido presentados por Wang L et al. (2002), quienes evaluaron los niveles de expresión de ARN mensajero de *hTERT* en 153 pacientes mediante el uso de una sonda específica capaz de detectar esta molécula en tejidos embebidos en parafina, y por Marchetti et al. (2002), quienes emplearon PCR cuantitativa a tiempo real para su detección. Es más, este último grupo concluyó que los niveles de expresión de ARN mensajero de *hTERT* constituían un factor pronóstico independiente del estadio tumoral y del tipo histológico. Por otro lado, nuestro trabajo ha determinado que en 85 pacientes afectados de CNMP, los tumores telomerasa positivos presentaban una mayor recurrencia que los tumores telomerasa negativos, que no dieron lugar a recidivas durante el periodo de seguimiento. En este caso, las diferencias fueron significativas. Por tanto, es probable que si aumentáramos el número de pacientes dotáramos a nuestros resultados de significación estadística, pues la tendencia que se refleja en esta Tesis es la misma que la obtenida por otros autores.

3. ACTIVIDAD TELOMERASA Y PARP3

3.1 DETERMINACIÓN DE LOHs EN LOCI CERCANOS AL GEN PARP3

Se han descrito diferencias en los niveles de ARN mensajero en pacientes de CNMP fumadores y no fumadores. Una de estas diferencias radica en la pérdida de expresión de genes localizados en la región 3p21.3 en individuos fumadores, con una elevada tasa de LOHs (Miura et al., 2002). Han sido analizados distintos genes contenidos en esta región pero, hasta la fecha, no hay datos en la bibliografía sobre *PARP3*. Debido a la no existencia de marcadores polimórficos en el *locus* de *PARP3*, elegimos las secuencias más próximas que flanqueaban al gen para intentar determinar si la disminución en la expresión génica de *PARP3*, evaluada por PCR cuantitativa a tiempo real, en la población tumoral telomerasa positiva analizada en esta Tesis, era debida a las pérdidas de heterocigosidad, y si existía alguna asociación entre estas deleciones y la detección de actividad telomerasa. Tanto los marcadores evaluados, D3S3026 y D3S3561, como *PARP3*, se localizan en una zona tendente a deleccionarse denominada FER (*Frequent Elimination Region*), que abarca las regiones 3p14.3-21.2 (50.6-58.1 Mb) (revisado por Kost-Almilova e Imreh, 2007).

El estudio del marcador D3S3026 reveló que no existían diferencias significativas en cuanto a la aparición de LOHs en este *locus* y la detección de actividad telomerasa o la disminución en los niveles del ARN mensajero de *PARP3*. Sin embargo, la pérdida de heterocigosidad en el *locus* donde se localiza el marcador D3S3561 se asoció significativamente con la detección de actividad telomerasa ($P = 0.047$), de manera que el 41.4% de los tumores en los que se detectó actividad telomerasa presentaron LOHs a este nivel, mientras que sólo en 1 tumor sin actividad enzimática (9.1%) se detectaron LOHs en D3S3561. El análisis de LOHs y la expresión génica de *PARP3* no reveló asociación estadísticamente significativa entre ambos parámetros, si bien sí se observó una tendencia. Así, los tumores con LOHs en el *locus*

D3S3561 tenían un RQ medio de 0.39 (0.17 – 0.87, intervalo de confianza del 95% para la media), frente a aquellos tumores sin LOHs, cuyo RQ medio fue 0.72 (0.46 – 1.13, intervalo de confianza del 95% para la media) ($P = 0.106$). Cuando se evaluó la pérdida de heterocigosidad simultánea en ambos marcadores, entre los que se encuentra el *locus* de *PARP3*, no se encontraron diferencias significativas entre la actividad telomerasa y los niveles de expresión génica de *PARP3*. Es interesante señalar que, entre los tumores que formaron parte de este estudio y que no mostraron actividad telomerasa ($N = 4$) ninguno presentó LOHs. Sin embargo, el 42.4% (14/33) de los tumores telomerasa positivos presentaron estas deleciones ($P = 0.276$). Asimismo, el RQ medio de *PARP3* de los tumores sin LOHs fue 0.87 (0.49 – 1.56, intervalo de confianza del 95% para la media), mientras que los tumores que perdieron ambas regiones mostraron un RQ medio de 0.38 (0.13 – 1.10, intervalo de confianza del 95% para la media) ($P = 0.085$). Es importante considerar el bajo número muestral de estos estudios (37 y 11 tumores, respectivamente). Probablemente, al aumentar el número de casos, la asociación entre la pérdida de heterocigosidad simultánea en los *loci* D3S3026 y D3S3561, la detección de actividad telomerasa y los niveles de expresión génica de *PARP3*, adquiriría mayor fuerza estadística.

Teniendo en cuenta estos resultados, podríamos considerar que sí existe una asociación entre las pérdidas de heterocigosidad en 3p, en concreto en 3p21, y la detección de actividad telomerasa, tal y como han descrito otros autores, por lo que parece que en esta región podría estar situado un gen represor de telomerasa (Horikawa et al., 1998; Cuthbert et al., 1999; revisado por Horikawa y Barrett, 2003; Iniesta et al. 2004). Si bien el marcador que mostró con mayor claridad en esta asociación fue D3S3561, cuya distancia al *locus* de *PARP3* es de, aproximadamente, 360 Kb, el estudio de pérdidas de heterocigosidad simultáneas de los marcadores D3S3026 y D3S3561, reveló una relación al borde de la significación estadística entre su pérdida por LOHs y la detección de actividad telomerasa; esto es, la pérdida de ambas regiones y quizá, la situada entre ellas, tiende a asociarse con la actividad telomerasa. Además, también se encontraron asociaciones cercanas a la significación estadística entre los niveles de expresión génica de *PARP3* y las pérdidas de

heterozigosidad en las regiones donde se localizan los marcadores estudiados. De nuevo, la delección en D3S3561 mostró una mayor asociación que la del marcador D3S3026. Sin embargo, cuando se evaluaron ambos marcadores de manera simultánea, esta asociación alcanzó mayor fuerza estadística, lo que nos llevó a sugerir que, quizá, *PARP3* podría ser un represor de la actividad telomerasa, cuya pérdida por LOHs en CNMP, podría estar favoreciendo que la enzima telomerasa perdiera uno de sus mecanismos de control.

El estudio de LOHs en los *loci* D3S3026 y D3S3561 y su asociación con variables clínico-patológicas no arrojó ningún dato significativo, tanto al evaluarlos de manera individual como simultánea. Esta falta de asociación ya había sido determinada por otros autores, aunque investigando otros marcadores. Estos datos podrían explicarse teniendo en cuenta que las pérdidas de heterozigosidad en 3p constituyen un evento temprano en la patología de CNMP, de manera que contribuyen a la génesis del tumor, más que a su avance.

Con respecto al tipo histológico, hay autores que no han encontrado relación entre esta variable y la presencia de LOHs en 3p (Woenckhaus et al., 2005). No obstante, un estudio en el que se evaluaron estas delecciones en una población de CNMPs N0, detectó un mayor porcentaje de pérdidas de heterozigosidad en los carcinomas epidermoides (Osaki et al., 2000). En nuestro trabajo, los carcinomas epidermoides mostraron una elevada frecuencia de LOHs, tanto al evaluar los marcadores individualmente, como en el estudio de pérdidas de heterozigosidad simultáneas en ambos *loci* (66.7% para el marcador D3S3056; 41.5% para el marcador D3S3561; 42.8% para ambos marcadores). Este tipo histológico es el que muestra mayor correlación con la exposición a los carcinógenos del tabaco. Por ello, quizá, se detecten LOHs en un elevado porcentaje en los carcinomas epidermoides. Al igual que ocurría al analizar la función telomérica y su relación con variables clínico-patológicas, hay que tener en cuenta las características iniciales de la población objeto de estudio, así como los marcadores analizados, lo que puede llevar a discordancias en los resultados.

Sin embargo, sí se han relacionado LOHs en 3p en muestras de tejido tumoral obtenidas a partir de nódulos linfáticos con metástasis, con un peor pronóstico clínico (Sasatomi et al., 2002).

3.2 DETERMINACIÓN DE SNPs EN EL GEN PARP3

Debido a la asociación encontrada *in vivo* entre *PARP3* y la actividad telomerasa, quisimos profundizar en el estudio de este gen para intentar determinar si la existencia de SNPs podría estar relacionada con la actividad telomerasa. Los marcadores elegidos fueron Rs 323868 y Rs 188953. Pese a que en el estudio se evaluaron 94 muestras, sólo detectamos SNPs en 3 de ellas, que eran, además, heterocigotas para ambos marcadores (2.8%), lo que dificultó el tratamiento estadístico de los datos. La frecuencia del alelo minoritario fue 1.6%. Estos resultados son semejantes a los obtenidos por otros grupos en la población caucásica. Con respecto al marcador Rs 323868, la tasa de heterocigosidad detectada previamente fue del 6.5% y la frecuencia del alelo minoritario del 3.2% (SNP500CANCER). Para el marcador Rs 188953, la frecuencia del alelo minoritario fue del 1%, no existiendo datos de la distribución genotípica (CSHL-HAPMAP). Curiosamente, los tumores en los que se detectó SNP para un marcador, también resultaron polimórficos para el otro. Esto puede deberse a que se trate de un haplotipo.

Como era de esperar, no se encontraron diferencias significativas entre la detección de actividad telomerasa y la presencia de SNPs. El tanto por ciento de tumores en los que se detectó actividad enzimática fue semejante en el grupo de tumores con SNPs y el grupo de tumores sin ellos (66.7% y 83.5%, respectivamente).

No se pudo evaluar la posible relación entre los SNPs y la expresión de ARN mensajero del gen *PARP3*, ya que sólo se dispuso de un caso con SNPs y del que se tuviera el dato de expresión.

Aunque no se puede alcanzar ninguna conclusión a partir de este estudio, sería interesante evaluar si, en una población más amplia, la existencia de polimorfismos en Rs 323868 y Rs 188953, en el gen *PARP3*, se relaciona con la pérdida de expresión de *PARP3* y la actividad telomerasa. La presencia de SNPs puede afectar a la estabilidad y expresión del gen en el que se localizan, contribuyendo al desarrollo y progresión de distintas enfermedades e, incluso, favoreciendo la evolución hacia un determinado tipo histológico, dentro de la patología de cáncer de pulmón (Oh et al., 2007).

3.3 *PARP3*: POSIBLE REPRESOR DE LA ACTIVIDAD TELOMERASA

EL estudio por PCR cuantitativa a tiempo real realizado en la población de CNMP incluida en esta Tesis, reveló que en los tumores en los que se detectaba actividad telomerasa, los niveles medios de expresión génica de *PARP3* se encontraban significativamente disminuidos, con respecto a la población telomerasa negativa. Ésta, presentaba niveles de expresión medios comprendidos dentro del rango establecido como normal. Este dato, unido a la localización de *PARP3* en el locus 3p21 y a la asociación encontrada entre 3p y actividad telomerasa, nos llevó a comprobar si *PARP3* podría ser una molécula represora de esta enzima.

Para ello, empleamos la línea celular de CNMP A549, utilizada por otros grupos para realizar estudios in vitro (Fujiki et al., 2007; Liao et al., 2007; Shervington et al., 2007; Wooten-Blanks et al., 2007). La determinación de los niveles de ARN mensajero en las células, reveló que la expresión de *PARP3* se asemejaba a la población tumoral en la que se detectaba actividad telomerasa. Además, la actividad enzimática en las células era muy elevada, como cabría esperar de una línea celular proveniente de un tumor epitelial. Por tanto, las características de las células A549 sugerían que la sobre-expresión de *PARP3* debería causar una disminución de la actividad telomerasa si, efectivamente, se trataba de un represor de la enzima.

Los ensayos encaminados a comprobar esta hipótesis se realizaron a distintos tiempos post-transfección, de manera que pudiera evaluarse la implicación de *PARP3* en la actividad telomerasa en función de sus niveles de expresión génica. No fue posible determinar los niveles proteicos de *PARP3* tras la transfección, debido a distintas causas. Por un lado, los anticuerpos anti*PARP3* no eran lo suficientemente específicos, lo que nos impidió realizar Western-blot e inmunocitoquímica. Por otro lado, la proteína GFP fusionada con *PARP3* era una forma mutada que no reconocían los anticuerpos convencionales antiGFP, no estando ya disponible en la casa comercial de la que adquirimos el sistema el suero antiCycle 3 GFP. Finalmente, Cycle 3 GFP emite fluorescencia a la misma longitud de onda que GFP no mutada, pero la línea celular A549 transfectada sólo con lipofectamina, sin introducir ningún vector, era capaz de emitir fluorescencia. Como consecuencia, el método utilizado para validar la transfección consistió en medir los niveles del ARN mensajero de *PARP3* en las células transfectadas.

Tal y como cabría esperar, los niveles máximos de expresión de ARN mensajero se detectaron a las 24 horas post-transfección, disminuyendo a lo largo del tiempo. En las células transfectadas con el vector control, es decir, el vector de expresión sin el ADN complementario de *PARP3*, se obtuvieron valores de RQ comprendidos dentro del rango considerado como normal a las 24, 48 y 96 horas post-transfección.

En cambio, la determinación de la actividad telomerasa reveló que, a las 24 horas post-transfección, no había variación entre las células transfectadas con el vector que contenía *PARP3* y las células transfectadas con el vector control, siendo en ambos casos elevada. Sin embargo, a las 48 horas post-transfección, la actividad enzimática disminuyó un 40.6% en las células que sobre-expresaban *PARP3*, con respecto a las células transfectadas con el vector control. Esta disminución se mantuvo hasta las 96 horas post-transfección. Estos resultados parecen indicar una posible función de *PARP3* en la regulación de la actividad telomerasa, si bien debería corroborarse en estudios futuros.

Rouleau et al. (2007), demostraron que PARP3 se colocaliza con el complejo PcG, integrado por proteínas implicadas en el silenciamiento transcripcional. En concreto, con las proteínas encargadas de marcar regiones génicas a las que se unirán otras moléculas que evitarán la transcripción. Esto llevó a los autores de este trabajo a especular que, quizá, la poli ADP-ribosilación llevada a cabo por PARP3 podría regular la actividad de proteínas de PcG y, de esta manera, regular la transcripción génica. Si esto es así, la pérdida de PARP3 en los tumores estaría alterando la expresión génica de las células.

CONCLUSIONES

Las principales conclusiones de este trabajo en cáncer no microcítico de pulmón (CNMP) son las siguientes:

1. Existe una correlación significativa y positiva entre la longitud de las secuencias teloméricas en los tumores y en las muestras no tumorales.
2. El tamaño tumoral se relaciona con la longitud de los telómeros, siendo los tumores de mayor tamaño los que presentan una menor longitud de secuencias teloméricas.
3. El acortamiento de las secuencias teloméricas constituye un factor de pronóstico adverso, independiente del estadio tumoral y del grado de infiltración ganglionar.
4. En los pacientes afectados de CNMP, la actividad telomerasa se relaciona con un intervalo libre de enfermedad significativamente menor que aquellos en los que no se detectó.
5. La expresión de *FLJ10858*, que codifica para una ADN glicosilasa de la vía de reparación por escisión de bases, está claramente incrementada en las muestras de tejido tumoral.
6. La expresión de *TOP3B* y *PMS1* se correlaciona positiva y significativamente con la longitud de los fragmentos teloméricos en CNMP.
7. La actividad telomerasa se asocia con una disminución de la expresión de *DCLRE1C*, *GTF2H1*, *PARP3* y *MLH1*, genes implicados en los mecanismos de reparación de lesiones en el ADN.
8. Las deleciones en el *locus* donde se sitúa el marcador D3S3561, 3p21.1, se asocian significativamente con actividad telomerasa positiva en las muestras tumorales.

9. La sobre-expresión de *PARP3* en la línea celular de CNMP A549 dio lugar a una disminución significativa de la actividad telomerasa.

CONCLUSIÓN FINAL:

De acuerdo con los resultados obtenidos en esta Tesis en cáncer no microcítico de pulmón, la función telomérica está relacionada con factores implicados en las vías de reparación del ADN. Además, tanto el acortamiento telomérico como la actividad telomerasa pueden considerarse parámetros útiles en el establecimiento del pronóstico clínico de la enfermedad objeto de estudio.

BIBLIOGRAFÍA

A

Abe T, Ishiai M, Hosono Y, Yoshimura A, Tada S, Adachi N, Koyama H, Takata M, Takeda S, Enomoto T, Seki M. KU70/80, DNA-PKcs, and Artemis are essential for the rapid induction of apoptosis after massive DSB formation. *Cell Signal* 20(11): 1978-1985 (2008).

Ahmed S, Passos JF, Birket MJ, Beckmann T, Brings S, Peters H, Birch-Machin MA, von Zglinicki T, Saretzki G. Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress. *Journal of Cell Science* 121(Pt 7): 1046-1053 (2008).

Alexandrie AK, Sundberg MI, Seidegård J, Tornling G, Rannug A. Genetic susceptibility to lung cancer with special emphasis on CYP1A1 and GSTM1: a study on host factors in relation to age at onset, gender and histological cancer types. *Carcinogenesis* 15: 1785-1790 (1994).

Allshire RC, Dempster M and Hastie ND. Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Research* 17: 4611-4627 (1989).

Alberg AJ, Broca MV, Samet JM. Epidemiology of lung cancer: looking to the future. *Journal of Clinical Oncology* 23(14): 3175-31785 (2005).

Amiard S, Doudeau M, Pinte S, Poulet A, Lenain C, Faivre-Moskalenko C, Angelov D, Hug N, Vindigni A, Bouvet P, Paoletti J, Gilson E, Giraud-Panis MJ. A topological mechanism for TRF2-enhanced strand invasion. *Nature Structural and Molecular Biology* 14: 147-154 (2007).

Ancelin K, Brunori M, Bauwens S, Koering CE, Brun C, Ricoul M, Pommier JP, Sabatier L, Gilson E. Targeting assay to study the *cis* functions of human telomeric proteins: evidence for inhibition of telomerase by TRF1 and for activation of telomere degradation by TRF2. *Molecular and Cellular Biology* 22(10): 474-3487 (2002).

Angeloni D. Molecular analysis of deletions in human chromosome 3p21 and the role of resident cancer genes in disease. *Briefings in Functional Genomics and Proteomics* 1-21 (2007).

Ara S, Lee PS, Hansen MF, Saya H. Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acids Research* 18: 4961 (1990).

Armanios MY, Chen JJ, Cogan JD, Alder JK, Ingersoll RG, Markin C, Lawson WE, Xie M, Vulto I, Phillips JA 3rd, Lansdorp PM, Greider CW, Loyd JE. Telomerase mutations in families with idiopathic pulmonary fibrosis. *The New England Journal of Medicine* 356: 1317-1326 (2007).

Artandi SE, Chang S, Lee SL, Alson S, Gottlieb GJ, Chin L, DePinho RA. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice. *Nature* 406(6796): 641-645 (2000).

Asakawa T, Esumi M, Endo S, Kida A, Ikeda M. Tongue cancer patients have a high frequency of allelic loss at the von Hippel-Lindau gene and other loci on 3p. *Cancer* 112(3): 527-534 (2008).

Aspinwall R, Rothwell DG, Roldan-Arjona T, Anselmino C, Ward CJ, Cheadle JP, Sampson JR, Lindahl T, Harris PC, Hickson ID. Cloning and characterization of a functional human homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 109-114 (1997).

Atkinson SP, Hoare SF, Glasspool RM, Keith WN. Lack of telomerase gene expression in alternative lengthening of telomere cells is associated with chromatin remodeling of the hTR and hTERT gene promoters. *Cancer Research* 65: 7585-7590 (2005).

Ayouaz A, Raynaud C, Heride C, Revaud D, Sabatier L. Telomeres: hallmarks of radiosensitivity. *Biochimie* 90: 60-72 (2008).

Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriantseva L, Giulotto E, Lingner J. Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* 318(5851): 798-801 (2007).

B

Bailey SM, Meyne J, Chen DJ, Kurimasa A, Li GC, Lehnert BE, Goodwin EH. DNA double-strand break repair proteins are required to cap the ends of mammalian chromosomes. *96*: 14899–14904 (1999).

Bailey SM, Goodwin EH. DNA and telomeres: beginnings and endings. *Cytogenetic and Genome Research*. 104: 109-115 (2004).

Bailey SM, Brenneman MA, Halbrook J, Nickoloff JA, Ullrich RL, Goodwin EH. The kinase activity of DNA-PK is required to protect mammalian telomeres. *DNA Repair* 3(3): 225-233 (2004).

Bakkenist C, Kastan MB. DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature* 421:499-506 (2003).

Banik SS, Counter CM. Characterization of interactions between PinX1 and human telomerase subunits hTERT and hTR. *The Journal of Biological Chemistry* 279(50): 51745-51748 (2004).

Bartek J, Lukas J, Bartkova J. DNA damage response as an anti-cancer barrier. *Cell Cycle* 6(19): 2344-2347 (2007).

Bartkova J, Horejsí Z, Koed K, Krämer A, Tort F, Zieger K, Guldborg P, Sehested M, Nesland JM, Lukas C, Ørntoft T, Lukas J, Bartek J. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature* 434: 864-870 (2005).

Bartsch H, Nair U, Risch A, Rojas M, Wikman H, Alexandrov A. Genetic polymorphism of CYP genes, alone or in combination, as a risk modifier of tobacco-related cancers. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 9: 3-28 (2000).

Baumgartner BL, Lundblad V. Telomere identity crisis. *Genes and Development* 19: 2522-2525 (2005).

Baur JA, Zou Y, Shay JW, Wright WE. Telomere position effect in human cells. *Science* 292: 2075 (2001).

Bearss DJ, Hurley LH, Von Hoff DD. Telomere maintenance mechanisms as a target for drug development. *Oncogene* 19(56): 6632-6634 (2000).

Bechter OE, Zou Y, Walker W, Wright WE, Shay JW. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Research* 64(10): 3444-3451 (2004).

Benetos A, Okuda K, Lajemi M, Kimura M, Thomas F, Skurnick J, Labat C, Bean KE, Aviv A. Telomere length as an indicator of biological aging: the gender effect and relation with pulse pressure and pulse wave velocity. *Hypertension* 37: 381-385 (2001).

Benetos A, Gardner JP, Zureik M, Labat C, Xiaobin L, Adamopoulos C, Temmar M, Bean KE, Thomas F, Aviv A. Short telomeres are associated with increased carotid atherosclerosis in hypertensive subjects. *Hypertension* 43: 182-185 (2004).

Benetti R, García-Cao M, Blasco MA. Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres. *Nature Genetics* 39: 243-250 (2007).

Berwick M, Vineis P. Markers of DNA repair and susceptibility to cancer in humans: an epidemiologic review. *Journal of the National Cancer Institute* 92(11): 874-897 (2000).

Betticher DC, Heighway J, Hasleton PS, Altermatt HJ, Ryder WD, Cerny T, Thatcher N. Prognostic significance of CCND1 (cyclin D1) overexpression in primary resected non-small-cell lung cancer. *British Journal of Cancer* 73: 294-300 (1996).

Bhattacharjee A, Richards WG, Staunton J, Li C, Monti S, Vasa P, Ladd C, Beheshti J, Bueno R, Gillette M, Loda M, Weber G, Mark EJ, Lander ES, Wong W, Johnson BE, Golub TR, Sugarbaker DJ, Meyerson M. Classification of human lung carcinomas by mRNA expression profiling reveals distinct adenocarcinoma subclasses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 13790-13795 (2001).

Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, De Lange T. TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *The EMBO Journal* 8: 5735-5744 (1999).

Bischoff C, Petersen HC, Graakjaer J, Andersen-Ranberg K, Vaupel JW, Bohr VA, Kølvraa S, Christensen K. No association between telomere length and survival among the elderly and oldest old. *Epidemiology* 17: 190-194 (2006).

Blackburn EH. Switching and signaling at the telomere. *Cell* 106: 661-673 (2001).

Blanco R, Muñoz P, Flores JM, Klatt P, Blasco MA. Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis. *Genes and Development* 21: 206-220 (2007).

Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nature Reviews. Genetics* 6: 611-622 (2005).

Blasco MA. The epigenetic regulation of mammalian telomeres. *Nature Review. Genetics* 8: 229-309 (2007).

Blau J, Xiao H, McCracken S, O'Hare P, Greenblatt J, Bentley D. Three functional classes of transcriptional activation domain. *Molecular and Cell Biology* 16(5): 2044-2055 (1996).

Bohr VA. Human premature aging syndromes and genomic instability. *Mechanisms of Ageing and Development* 30;123(8): 987-993 (2002).

Bollman FM. Targeting ALT: the role of alternative lengthening of telomeres in pathogenesis and prevention of cancer. *Cancer Treatment Reviews* 33: 704-709 (2007).

Bollman FM. The many faces of telomerase: emerging extratelomeric effects. *BioEssays* 30(8): 728-732 (2008).

Borcuk AC, Kim HK, Yegen HA, Friedman RA, Powell CA. Lung adenocarcinoma global profiling identifies type II transforming growth factor-beta receptor as a repressor of invasiveness. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 172(6):729-737 (2005).

Boulton SJ, Jackson SP. Identification of a *Saccharomyces cerevisiae* Ku80 homologue: roles in DNA double strand break rejoining and in telomeric maintenance. *Nucleic Acids Research* 24(23): 4639-4648 (1996).

Bradshaw PS, Stavropoulos DJ, Meyn MS. Human telomeric protein TRF2 associates with genomic double-strand breaks as an early response to DNA damage. *Nature Genetics* 37: 193-197 (2005).

Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, Lantuejoul S, Veyrenc S, Brambilla C. Alterations of Rb pathway (Rb-p16INK4-cyclin D1) in preinvasive bronchial lesions. *Clinical Cancer Research* 5: 243-250 (1999).

Breslow RA, Shay JW, Gazdar AF, Srivastava S. Telomerase and early detection of cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 618-623 (1997).

Britt-Compton B, Rowson J, Locke M, Mackenzie I, Kipling DM, Baird DM. Structural stability and chromosome-specific telomere length is governed by *cis*-acting determinants in human. *Human Molecular Genetics* 15: 725-733 (2006).

Broberg K, Björk J, Paulsson K, Höglund M, Albin M. Constitutional short telomeres are strong genetic susceptibility markers for bladder cancer. *Carcinogenesis* 26 (7): 1263-1271 (2005).

Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, De Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins TRF1 and TRF2. *Nature Genetics* 17: 231-235 (1997).

Brody JS, Spira A. Chronic obstructive pulmonary disease, inflammation and lung cancer. *Proceedings of the American Thoracic Society* 3: 535-538 (2006).

Broermann P, Junker K, Brandt BH, Heinecke A, Freitag L, Klink F, Berdel WE, Thomas M. Trimodality treatment in Stage III nonsmall cell lung carcinoma: prognostic impact of K-ras mutations after neoadjuvant therapy. *Cancer* 94(7): 2055-2062 (2002).

Burke L, Flieder DB, Guinee DG, Brambilla E, Freedman AN, Bennett WP, Jones RT, Borkowski A, Caporaso NA, Fleming M, Trastek V, Pairolero P, Tazelaar H, Midthun D, Jett JR, Liotta LA, Travis WD, Harris CC. Prognostic implications of molecular and immunohistochemical profiles of the Rb and p53 cell cycle regulatory pathways in primary non-small cell lung carcinoma. *Clinical Cancer Research* 11(1): 232-241 (2005).

C

Cabuy E, Newton C, Joksic G, Woodbine L, Koller B, Jeggo PA, Slijepcevic P. Accelerated telomere shortening and telomere abnormalities in radiosensitive cell lines. *Radiation Research* 164: 53-62 (2005).

Cao Y, Li H, Deb S, Liu JP. TERT regulates cell survival independent of telomerase enzymatic activity. *Oncogene* 21(20): 3130-3138 (2002).

Capkova L, Kalinova M, Krskova L, Kodetova D, Petrik F, Trefny M, Musil J, Kodet R. Loss of heterozygosity and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression in bronchial mucosa of heavy smokers. *Cancer* 109(11): 2299-2307 (2007).

Carney JP, Maser RS, Olivares H, Davis EM, Le Beau M, Yates JR 3rd, Hays L, Morgan WF, Petrini JH. The hMre11/hRad50 protein complex and Nijmegen breakage syndrome: linkage of double-strand break repair to the cellular DNA damage response. *Cell* 1998 1;93(3): 477-486 (1998).

Carretero J. Carcinógenos y origen del cáncer de pulmón. *Cáncer de pulmón. Curso de la ESO en español*. 17-18 febrero 2005.

Celli GB, Denchi EL, De Lange T. Ku70 stimulates fusion of dysfunctional telomeres yet protects chromosome ends from homologous recombination. *Nature Cell Biology* 8: 885-890 (2006).

Cerone MA, Autexier C, Londono-Vallejo JA, Bachetti S. A human cell line that maintains telomeres in the absence of telomerase and of key markers of ALT. *Oncogene* 24: 7893-7901 (2005).

Cesare AJ, Reddel RR. Telomere uncapping and alternative lengthening of telomeres. *Mechanisms of Ageing and Development* 129: 99-108 (2008).

Chai W, Du Q, Shay JW, Wright WE. Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Molecular Cell* 21: 427-435 (2006a).

Chai W, Sfeir AJ, Hoshiyama H, Shay JW, Wright WE. The involvement of the Mre11/Rad50/Nbs1 complex in the generation of G-overhangs at human telomeres. *EMBO Reports* 7: 225-230 (2006b).

Champoux JJ. DNA topoisomerases: structure, function and mechanism. *Annual Review of Biochemistry* 70: 369-413 (2001).

Chan, SW y Blackburn, EH. New ways not to make ends meet: Telomerase, DNA damage proteins and heterochromatin. *Oncogene* 21: 553-563 (2002).

Chandran UR, Dhir R, Ma C, Michalopoulos G, Becich M, Gilbertson J. Differences in gene expression in prostate cancer, normal appearing prostate tissue adjacent to cancer and prostate tissue from cancer free organ donors. *BMC Cancer* 5: 45 (2005).

Chang P, Coughlin M, Mitchison TJ. Tankyrase-1 polymerization of poly(ADP-ribose) is required for spindle structure and function. *Nature Cell Biology* 7(11): 1133-1139 (2005).

Chang W, Dynek JN, Smith S. TRF1 is degraded by ubiquitin-mediated proteolysis after release from telomeres. *Genes and Development* 17(11): 1328-1333 (2003).

Chen YJ, Hakin-Smith V, Teo M, Xinarianos GE, Jellinek DA, Carroll T, McDowell D, MacFarlane MR, Boet R, Baguley BC, Braithwaite AW, Reddel RR, Royds JA. Association of mutant TP53 with alternative lengthening of telomeres and favorable prognosis in glioma. *Cancer Research* 66: 6473-6476 (2006).

Cheng Y, Poulos NE, Lung ML, Hampton G, Ou B, Lerman MI, Stanbridge EJ. Functional evidence for a nasopharyngeal carcinoma tumor suppressor gene that maps at chromosome 3p21.3. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(6): 3042-3047 (1998).

Cheng L, Spitz MR, Hong WK, Wei Q. Reduced expression levels of nucleotide excision repair genes in lung cancer: a case-control study. *Carcinogenesis* 21: 1527-1530 (2000).

Cherif H, Tarry JL, Ozanne SE, Hales CN. Ageing and telomeres: a study into organ- and gender-specific telomere shortening. *Nucleic Acids Research* 31: 1576-1583 (2003).

Cherkas LF, Aviv A, Valdes AM, Hunkin JL, Gardner JP, Surdulescu GL, Kimura M, Spector TD. The effects of social status on biological aging as measured by white-blood-cell telomere length. *Aging Cell* 5: 361-365 (2006).

Cho YH, Park JY, Han SY, Chung IK. Identification of the functional elements in the promoter region of human DNA topoisomerase IIIbeta gene. *Biochimica et Biophysica Acta* 1679(3): 272-278 (2004).

Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W, Cheung P, Jun S, Artandi MK, Shah N, Kim SK, Artandi SE. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genetics* 4(1): 124-136 (2008).

Chorostowska-Wynimko J, Szpechcinski A. The impact of genetic markers on the diagnosis of lung cancer: a current perspective. *Journal of Thoracic Oncology : Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 2(11): 1044-1051 (2007).

Clark GM, Osborne CK, Levitt D, Wu F, Kim NW. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 89: 1874-1881 (1997).

Colgin LM, Wilkinson C, Englezou A, Kilian A, Robinson MO, Reddel RR. The hTERTalpha splice variant is a dominant negative inhibitor of telomerase activity. *Neoplasia* 2(5): 426-432 (2000).

Conde E, Angulo B, Tang M, Morente M, Torres-Lanzas J, Lopez-Encuentra A, Lopez-Rios F, Sanchez-Céspedes M. Molecular context of the EGFR mutations: evidence for the activation of mTOR/S6K signaling. *Clinical Cancer Research* 12: 710-717 (2006).

Cook BD, Dynek JN, Chang W, Shostak G, Smith S. Role for the related poly(ADP-Ribose) polymerases tankyrase 1 and 2 at human telomeres. *Molecular Cell Biology* 22(1): 332-342 (2002).

Cookson JC, Laughton CA. The levels of telomere-binding proteins in human tumours and therapeutic implications. *European Journal of Cancer* doi: 10.1016/j.ejca.2008.11.014 (2008).

Cosme-Blanco W, Chang S. Dual roles of telomere dysfunction in initiation and suppression of tumorigenesis. *Experimental Cell Research* 314: 1973-1979 (2008).

Court R, Chapman L, Fairall L, Rhodes D. How the human telomeric proteins TRF1 y TRF2 recognize telomeric DNA: A view from high-resolution crystal structures. *EMBO Reports* 6: 39-45 (2005).

Crabbe L, Verdun RE, Haggblom CI, Karlseder J. Defective telomere lagging strand synthesis in cells lacking WRN helicase activity. *Science* 306: 1951-1953 (2004).

Cristofari G, Adolf E, Reichenbach P, Sikora K, Terns RM, Terns MP, Lingner J. Human telomerase RNA accumulation in Cajal bodies facilitates telomerase recruitment to telomeres and telomere elongation. *Molecular Cell* 27: 882-889 (2007).

Cristofari G, Lingner J. Telomere length homeostasis requires that telomerase levels are limiting. *EMBO Journal* 25: 565-574 (2006).

Cross SH, Allshire RC, McKay SJ, McGill NI and Cooke HJ. Cloning of human telomeres by complementation in yeast. *Nature* 338: 771-774 (1989).

Cuthbert AP, Bond J, Trott DA, Gill S, Broni J, Marriott A, Khoudoli G, Parkinson EK, Cooper CS, Newbold RF. Telomerase repressor sequences on chromosome 3 and induction of permanent growth arrest in human breast cancer cells. *Journal of the National Cancer Institute* 91(1): 37-45 (1999).

D

D'Adda di Fagagna F, Hande MP, Tong WM, Roth D, Lansdorp PM, Wang ZQ Jackson SP. Effects of DNA nonhomologous endjoining factors on telomere length and chromosomal stability in mammalian cells. *Current Biology* 11: 1192-1196 (2001).

D'Adda di Fagagna F, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, Saretzki G, Carter NP, Jackson SP. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature* 426(6963): 194-198 (2003).

D'Adda di Fagagna F, Teo SH, Jackson SP. Functional links between telomeres and proteins of the DNA-damage response. *Genes and Development* 18(15):1781-1799 (2004).

Dagarag M, Evazyan T, Rao N, Effros RB. Genetic manipulation of telomerase in HIV-specific CD8⁺ T cells: enhanced antiviral functions accompany the increased proliferative potential and telomere length stabilization. *Journal of Immunology* 173: 6303-6311 (2004).

Darroudi F, Wiegant W, Meijers M, Friedl AA, van der Burg M, Fomina J, van Dongen JJ, van Gent DC, Zdzienicka MZ. Role of Artemis in DSB repair and

guarding chromosomal stability following exposure to ionizing radiation at different stages of cell cycle. *Mutation Research* 615(1-2): 111-124 (2007).

De Lange T. Protection of mammalian telomeres. *Oncogene* 21: 532-534 (2002).

De Lange T. T-Loops and the origin of telomeres. *Nature Reviews of Molecular Cell Biology* 5: 323-329 (2004).

De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes and Development* 19:2100-2110 (2005).

Del Bufalo D et al., Involvement of hTERT in apoptosis induced by interference with Bcl-2 expression and function. *Cell Death and Differentiation* 12: 1429-1438 (2007).

Dessain SK, Yu H, Reddel RR, Beijersbergen RL, Weinberg RA. Methylation of the human telomerase gene CpG island. *Cancer Research* 60(3): 537-541 (2000).

Devereux TR, Horikawa I, Anna CH, Annab LA, Afshari CA, Barrett JC. DNA methylation analysis of the promoter region of the human telomerase reverse transcriptase (hTERT) gene. *Cancer Research* 59(24): 6087-6090 (1999).

Di Lello P, Jenkins LM, Jones TN, Nguyen BD, Hara T, Yamaguchi H, Dikeakos JD, Appella E, Legault P, Omichinski JG. Structure of the Tfb1/p53 complex: Insights into the interaction between the p62/Tfb1 subunit of TFIIF and the activation domain of p53. *Molecular Cell* 22(6): 731-740 (2006).

Digweed M, Sperling K. Nijmegen breakage syndrome: clinical manifestation of defective response to DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)* 3(8-9): 1207-1217 (2004).

Ding H, Schertzer M, Wu X, Gertsenstein M, Selig S, Kammori M, Pourvali R, Poon S, Vulto I, Chavez E, Tam PP, Nagy A, Lansdorp PM. Regulation of murine telomere length by Rtel: an essential gene encoding a helicase-like protein. *Cell* 117: 873-886 (2004).

Drummond MW, Balabanov S, Holyoake TL, Brummendorf TH. Telomere biology in normal and leukemic hematopoietic stem cells. *Stem Cells* 25: 1853-1861 (2007).

Ducrest AL, Szutorisz H, Lingner J, Nabholz M. Regulation of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 21(4): 541-552 (2002).

Dudognon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Ségal-Bendirdjian E. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. [*Oncogene*](#) 23(45): 7469-7474 (2004).

Dynek JN, Smith S. Resolution of sister telomere association is required for progression through mitosis. *Science* 304(5667): 97-100 (2004).

E

Ege M, Ma Y, Manfras B, Kalwak K, Lu H, Lieber MR, Schwarz K, Pannicke U. Omenn syndrome due to ARTEMIS mutations. *Blood* 105: 4179-4186 (2005).

Ellis NA, Groden J, Ye TZ, Straughen J, Lennon DJ, Ciocci S, Proytcheva M, German J. The Bloom's syndrome gene product is homologous to RecQ helicases. *Cell* 17; 83(4): 655-666 (1995).

El-Zein R, Abdel-Rahman SZ, Conforti-Froes N, Alpard SK, Zwischenberger JB. Chromosome aberrations as a predictor of clinical outcome for smoking associated lung cancer. *Cancer Letters* 158(1): 65-71 (2000).

Epel ES, Blackburn EH, Lin J, Dhabhar FS, Adler NE, Morrow JD, Cawthon RM. Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 17312-17315 (2004).

Espejel S, Franco S, Sgura A, Gae D, Bailey SM, Taccioli GE, Blasco MA. Functional interaction between DNA-PKcs and telomerase in telomere length maintenance. *The EMBO Journal* 21(22): 6275-6287 (2002).

F

Fasching CL, Bower K, Reddel RR. Telomerase-independent telomere length maintenance in the absence of alternative lengthening of telomeres-associated promyelocytic leukemia bodies. *Cancer Research* 65(7): 2722-2729 (2005).

Feng J, Funk WD, Wang SS, Weinrich SL, Avilion AA, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 269: 1236-1241 (1995).

Fitzpatrick AL, Kronmal RA, Gardner JP, Psaty BM, Jenny NS, Tracy RP, Walston J, Kimura M, Aviv A. Leukocyte telomere length and cardiovascular disease in the cardiovascular health study. *American Journal of Epidemiology* 165: 14-21 (2007).

Flores I, Canela A, Vera E, Tejera A, Cotsarelis G, Blasco MA. The longest telomeres: a general signature of adult stem cell compartments. *Genes and Development* 22: 654-667 (2008).

Folini M, Bandiera R, Millo E, Gandellini P, Sozzi G, Gasparini P, Longoni N, Binda M, Daidone MG, Berg K, Zaffaroni N. Photochemically enhanced delivery of a cell-penetrating peptide nucleic acid conjugate targeting human telomerase reverse transcriptase: effects on telomere status and proliferative potential of human prostate cancer cells. *Cell Proliferation* 40(6): 905-920 (2007).

Fong KM, Sekido Y, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 118(6): 1136-1152 (1999).

Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A, Boix-Chornet M, Espada J, Schotta G, Bonaldi T, Haydon C, Ropero S, Petrie K, Iyer NG, Pérez-Rosado A, Calvo E, Lopez JA, Cano A, Calasanz MJ, Colomer D, Piris MA, Ahn N, Imhof A, Caldas C, Jenuwein T, Esteller M. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nature Genetics* 37: 391-400 (2005).

Franklin WA, Gazdar AF, Haney J, Wistuba II, La Rosa FG, Kennedy T, Ritchey DM, Miller YE. Widely dispersed p53 mutation in respiratory epithelium. A novel mechanism for field carcinogenesis. *The Journal of Clinical Investigation* 100: 2133-2137 (1997).

Franzese O, Adamo R, Pollicita M, Comandini A, Laudisi A, Perno CF, Aquaro S, Bonmassar E. Telomerase activity, hTERT expression, and phosphorylation are downregulated in CD4(+) T lymphocytes infected with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). *Journal of Medical Virology* 79: 639-646 (2007).

Frit P, Bergmann E, Egly JM. Transcription factor IIH: a key player in the cellular response to DNA damage. *Biochimie* 81: 27-38 (1999).

Fujiki T, Miura T, Maura M, Shiraishi H, Nishimura S, Imada Y, Uehara N, Tashiro K, Shirahata S, Katakura Y. TAK1 represses transcription of the human telomerase reverse transcriptase gene. *Oncogene* 26(36): 5258-5266 (2007).

Fujita T, Kiyama M, Tomizawa Y, Kohno T, Yokota J. Comprehensive analysis of p53 gene mutation characteristics in lung carcinoma with special reference to histological subtypes. *International Journal of Oncology* 15: 927-934 (1999).

G

Gackowski D, Speina E, Zielinska M, Kowalewski J, Rozalski R, Siomek A, Paciorek T, Tudek B, Olinski R. Products of oxidative DNA damage and repair as possible biomarkers of susceptibility to lung cancer. *Cancer Research* 63: 4899-4902 (2003).

Gao K, Lockwood WW, Li J, Lam W, Li G. Genomic analyses identify gene candidates for acquired irinotecan resistance in melanoma cells. *The International Journal of Oncology* 32: 1343-1349 (2008).

Gao W, Mady HH, Melhem MF, Keohavong P. Analysis of p53 mutations in histologically normal lung tissues and lung tumors from non-small cell lung cancer patients. *Molecular Carcinogenesis* (2008).

Garcia-Cao M, Gonzalo S, Dean D, Blasco MA. A role for RB family of proteins in controlling telomere length. *Nature Genetics* 32: 415-419 (2002).

García-Aranda C, de Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M, Iniesta P. Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer* 106(3): 541-551 (2006).

Gazzeri S, Brambilla E, Caron de Fromentel C, Gouyer V, Moro D, Perron P, Berger F, Brambilla C. P53 genetic abnormalities and myc activation in human lung carcinomas. *International Journal of Cancer* 58: 24-32 (1994).

Gervais V, Lamour V, Jawhari A, Frindel F, Wasielewski E, Dubaele S, Egly JM, Thierry JC, Kieffer B, Poterszman A. TFIIH contains a PH domain involved in DNA nucleotide excision repair. *Nature Structural & Molecular Biology* 11(7): 616-622 (2004).

Geserick C, Tejera A, González-Suárez E, Klatt P, Blasco MA. Expression of mTert in primary murine cells links the growth-promoting effects of telomerase

to transforming growth factor-beta signaling. *Oncogene* 25(31): 4310-4319 (2006).

Ghosh U, Bhattacharyya NP. Benzamide and 4-amino 1,8 naphthalimide treatment inhibit telomerase activity by down-regulating the expression of telomerase associated protein and inhibiting the poly(ADP-ribosyl)ation of telomerase reverse transcriptase in cultured cells. *The FEBS Journal* 272(16): 4237-4248 (2005).

Ghosh U, Das N, Bhattacharyya NP. Inhibition of telomerase activity by reduction of poly(ADP-ribosyl)ation of TERT and TEP1/TP1 expression in HeLa cells with knocked down poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) gene. *Mutation Research* 615(1-2): 66-77 (2007).

Gilley D, Tanaka H, Hande MP, Kurimasa A, Li GC, Oshimura M, Chen DJ. DNA-PKcs is critical for telomere capping. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98: 15084–15088 (2001).

Gilley D, Herbert BS, Huda N, Tanaka H, Reed T. Factors impacting human telomere homeostasis and age-related diseases. *Mechanisms of Ageing and Development* 129: 27-34 (2008).

González-Quevedo R, Iniesta P, Morán A, de Juan C, Sánchez-Pernaute A, Fernández C, Torres A, Díaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Cooperative role of telomerase activity and p16 expression in the prognosis of non-small-cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20(1): 254-262 (2002).

Gorgoulis VG, Vassiliou LV, Karakaidos P, Zacharatos P, Kotsinas A, Liloglou T, Venere M, Ditullio RA Jr, Kastrinakis NG, Levy B, Kletsas D, Yoneta A, Herlyn M, Kittas C, Halazonetis TD. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature* 434: 907-913 (2005).

Goytisolo FA, Samper E, Edmonson S, Taccioli GE, Blasco MA. The absence of the dna-dependent protein kinase catalytic subunit in mice results in anaphase bridges and in increased telomeric fusions with normal telomere length and G-strand overhang. *Molecular and Cellular Biology* 21: 3642-3651 (2001).

Graakjaer J, Pascoe L, Der-Sarkissian H, Thomas G, Kolvraa S, Christensen K, Londoño-Vallejo JA. The relative length of individual telomeres are defined in the zygote and strictly maintained during life. *Aging Cell* 3: 97-102 (2004).

Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, Stansel RM, Bianchi A, Moss H, De Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 97: 503-514 (1999).

Groeger AM, Caputi M, Esposito V, De Luca A, Bagella L, Pacilio C, Klepetko W, Giordano GG, Baldi F, Kaiser HE, Wolner E, Giordano A. Independent prognostic role of p16 expression in lung cancer. *The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery* 118(3): 529-535 (1999).

Grossi F, Loprevite M, Chiaramondia M, Ceppa P, Pera C, Ratto GB, Serrano J, Ferrara GB, Costa R, Boni L, Ardizzoni A. Prognostic significance of K-ras, p53, bcl-2, PCNA, CD34 in radically resected non-small cell lung cancers. *European Journal of Cancer* 39(9): 1242-1250 (2003).

Guay D, Garand C, Reddy S, Schmutte C, Lebel M. The human endonuclease III enzyme is a relevant target to potentiate cisplatin cytotoxicity in Y-box-binding protein-1 overexpressing tumor cells. *Cancer Science* 99(4): 762-769 (2008).

Gupta J, Han LP, Wang P, Gallie BL, Bacchetti S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *Journal of the National Cancer Institute* 88(16): 1152-1157 (1996).

H

Haendeler J, Hoffmann J, Brandes RP, Zeiher AM, Dimmeler S. Hydrogen peroxide triggers nuclear export of telomerase reverse transcriptase via Src kinase family-dependent phosphorylation of tyrosine 707. *Molecular and Cellular Biology* 23(13): 4598-4610 (2003).

Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, Beijersbergen RL, Knoll JH, Meyerson M, Weinberg RA. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nature Medicine* 5: 1164-1170 (1999).

Hahn WC. Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *The Journal of Clinical Oncology* 21(10): 20-34-2043 (2003).

Hailer MK, Slade PG, Martin BD, Rosenquist TA, Sugden KD. Recognition of the oxidized lesions spiroiminodihydantoin and guanidinohydantoin in DNA by the mammalian base excision repair glycosylases NEIL1 and NEIL2. *DNA Repair* 4: 41-50 (2005).

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 100: 57-70 (2000).

Hanaoka S, Nagadoi A, Nishimura Y. Comparisons between TRF2 and TRF1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein Science* 14: 119-130 (2005).

Hande MP. DNA repair factors and telomere-chromosome integrity in mammalian cells. *Cytogenet Genome Research* 104: 116-122 (2004).

Hara H, Yamashita K, Shinada J, Yoshimura H, Kameya T. Clinicopathological significance of telomerase activity and hTERT mRNA expression in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34: 219-226 (2001).

Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblast. *Nature* 345: 458-460 (1990).

Harley CB, Kim NW, Prowse KR, Weinrich SL, Hirsch KS, West MD, Bacchetti S, Hirte HW, Counter CM, Greider CW, et al. Telomerase, cell immortality, and cancer. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol.* 59: 307-315 (1994).

Harley CB. Telomerase and cancer therapeutics. *Nature Reviews* 8: 167-179 (2008).

Harrington L, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass MB, Arruda I, Robinson MO. A mammalian telomerase-associated protein. *Science* 275(5302): 973-977 (1997).

Hasegawa Y, Takanashi S, Kanehira Y, Tsushima T, Imai T, Okumura K. Transforming growth factor-beta1 level correlates with angiogenesis, tumor progression, and prognosis in patients with nonsmall cell lung carcinoma. *Cancer* 91(5): 964-971 (2001).

Hashimoto M, Kyo S, Hua X, Tahara H, Nakajima M, Takakura M, Sakaguchi J, Maida Y, Nakamura M, Ikoma T, Mizumoto Y, Inoue M. Role of menin in the regulation of telomerase activity in normal and cancer cells. *The International Journal of Oncology* 33: 333-340 (2008).

Hayflick L. The cell biology of human aging. *The New England Journal of Medicine* 295: 1302-1308 (1976).

Hecht A, Laroche T, Strahl-Bolsinger S, Gasser SM, Grunstein M. Histone H3 y H4 N-termini interact with Sir3 and Sir4 proteins: a molecular model for the formation of heterochromatin in yeast. *Cell* 80: 583-592 (1995).

Henson JD, Neumann AA, Yeager TR, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres in mammalian cells. *Oncogene* 21(4): 598-610 (2002).

Henson JD et al. A robust assay for alternative lengthening of telomeres (ALT) in tumors demonstrates the significance of ALT in sarcomas and astrocytomas. *Clinical Cancer Research* 11: 217-225 (2005).

Herbig U, Jobling WA, Chen BP, Chen DJ, Sedivy JM. Telomere shortening triggers senescence of human cells through a pathway involving ATM, p53, and p21(CIP1), but not p16(INK4a). *Molecular Cell* 14: 501-513 (2004).

Hibi K, Takahashi T, Yamakawa K, Ueda R, Sekido Y, Ariyoshi Y, Suyama M, Takagi H, Nakamura Y, Takahashi T. Three distinct regions involved in 3p deletion in human lung cancer. *Oncogene* 7(3): 445-449 (1992).

Hirao T, Nelson HH, Ashok TD, Wain JC, Mark EJ, Christiani DC, Wiencke JK, Kelsey KT. Tobacco smoke-induced DNA damage and an early age of smoking initiation induce chromosome loss at 3p21 in lung cancer. *Cancer Research* 61: 612-615 (2001).

Hirashima T, Komiya T, Nitta T, Takada Y, Kobayashi M, Masuda N, Matui K, Takada M, Kikui M, Yasumitsu T, Ohno A, Nakagawa K, Fukuoka M, Kawase I. Prognostic significance of telomeric repeat length alterations in pathological stage I-III non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 20(3B): 2181-2187 (2000).

Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nature Medicine* 1: 249-255 (1995a).

Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyszek MA, Shay JW, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancers. *Cancer Research* 55: 3258-3262 (1995b).

Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 21: 643-649 (2002).

Hockemeyer D, Sfeir AJ, Shay JW, Wright WE, De Lange T. POT1 protects telomeres from transient DNA damage responses and determines how human chromosomes end. *EMBO Journal* 20: 2667-2678 (2005).

Hodes RJ, Karen S. Hathcock & Nan-ping Weng. Telomeres in T and B cells. *Nature Reviews Immunology* 2: 699-706 (2002).

Hoeijmakers JHJ. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature* 411: 366-374 (2001).

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science* 253: 49-53 (1991).

Holt SE, Aisner DL, Baur J, Tesmer VM, Dy M, Ouellette M, Trager JB, Morin GB, Toft DO, Shay JW, Wright WE, White MA. Functional requirement of p23 and Hsp90 in telomerase complexes. *Genes and Development* 13(7): 817-826 (1999).

Horikawa I, Oshimura M, Barrett JC. Repression of the telomerase catalytic subunit by a gene on human chromosome 3 that induces cellular senescence. *Molecular Carcinogenesis* 22(2): 65-72 (1998).

Horikawa I, Barrett JC. Transcriptional regulation of the telomerase *hTERT* gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 24(7): 1167-1176 (2003).

Hornsby PJ. Telomerase and the aging process. *Experimental Gerontology* 42(7): 575-581 (2007).

Houghtalin BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A dynamic molecular link between the telomere length regulator TRF1 and the chromosome end protector TRF2. *Current Biology* 14: 1621-1631 (2004).

Hsu CP, Miaw J, Shai SE, Chen CY. Correlation between telomerase expression and terminal restriction fragment length ratio in non-small cell lung cancer; an adjusted measurement and its clinical significance. *European journal of Cardio-Thoracic Surgery* 26(2): 425-431 (2004).

Hsu CP, Ko JL, Shai SE, Lee LW. Modulation of telomere shelterin by TRF1 [corrected] and TRF2 interacts with telomerase to maintain the telomere length in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 58: 310-316 (2007).

Hsu HL, Gilley D, Galande SA, Hande MP, Allen B, Kim SH, Li GC, Campisi J, Kohwi-Shigematsu T, Chen DJ. Ku acts in a unique way at the mammalian telomere to prevent end joining. *Genes and Development* 14: 2807-2812 (2000).

Hu N, Wang C, Hu Y, Yang HH, Kong LH, Lu N, Su H, Wang QH, Goldstein AM, Buetow KH, Emmert-Buck MR, Taylor PR, Lee MP. Genome-wide loss of heterozygosity and copy number alteration in esophageal squamous cell carcinoma using the Affymetrix GeneChip Mapping 10 K array. *BMC Genomics* 7: 299-315 (2006).

Huang CL, Yokomise H, Miyatake A. Clinical significance of the p53 pathway and associated gene therapy in non-small cell lung cancers. *Future Oncology* 3(1): 83-93 (2007).

Huber RM, Stratakis DF. Molecular oncology-perspectives in lung cancer. *Lung Cancer* 45(Suppl 2): S209-S213 (2004).

Huda N, Tanaka H, Herbert BS, Reed T, Gilley D. Shared environmental factors associated with telomere length maintenance in elderly male twins. *Aging Cell* 6: 709-713 (2007).

Hug N, Lingner J. Telomere length homeostasis. *Chromosoma* 115 (6): 413-425 (2006).

Hung J, Kishimoto Y, Sugio K, Virmani A, McIntire DD, Minna JD, Gazdar AF. Allele-specific chromosome 3p deletions occur at an early stage in the pathogenesis of lung carcinoma. *JAMA: the Journal of the American Medical Association* 273(24): 1908 (1995).

Hung RJ et al. A susceptibility locus for lung cancer maps to nicotinic acetylcholine receptor subunit genes on 15q25. *Nature* 452(7187): 633-637 (2008).

I

Ibanez de Caceres I, Frolova N, Varkonyi RJ, Dulaimi E, Meropol NJ, Broccoli D, Cairns P. Telomerase is frequently activated in tumors with microsatellite instability. *Cancer Biology and Therapy* 3(3): 289-292 (2004).

Ikeda S, Biswas T, Roy R, Izumi T, Boldogh I, Kurosky A, Sarker AH, Seki S, Mitra S. Purification and characterization of human NTH1, a homolog of *Escherichia coli* endonuclease III. Direct identification of Lys-212 as the active nucleophilic residue. *The Journal of Biological Chemistry* 273: 21585-21593 (1998).

Imai K, Sarker AH, Akiyama K, Ikeda S, Yao M, Tsutsui K, Shohmori T, Seki S. Genomic structure and sequence of a human homologue (NTHL1/NTH1) of *Escherichia coli* endonuclease III with those of the adjacent parts of TSC2 and SLC9A3R2 genes. *Gene* 222: 287-295 (1998).

Iniesta P, González-Quevedo R, Morán A, García-Aranda C, de Juan C, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Díaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M. Relationship between 3p deletions and telomerase activity in non-small-cell lung cancer: prognostic implications. *British Journal of Cancer* 90(10): 1983-1988 (2004).

Iyoda A, Hiroshima K, Moriya Y, Sekine Y, Shibuya K, Iizasa T, Nakatani Y, Fujisawa T. Prognostic impact of large cell neuroendocrine histology in patients with pathologic stage Ia pulmonary non-small cell carcinoma. *The Journal of thoracic and cardiovascular surgery* 132(2): 312-315 (2006).

J

Jacobs JJJ, De Lange T. p16INK4a as a second effector of the telomere damage pathway. *Cell Cycle* 4:1364-1368 (2005).

Jady BE, Richard P, Bertrand E, Kiss T. Cell cycle-dependent recruitment of telomerase RNA and Cajal bodies to human telomeres. *Molecular Biology of the Cell* 17: 944-954 (2006).

Jang JS, Choi YY, Lee WK, Choi JE, Cha SI, Kim YJ, Kim CH, Kam S, Jung TH, Park JY. Telomere length and the risk of lung cancer. *Cancer Science* 99: 1385-1389 (2008).

Janssen-Heijnen MLG, Coebergh JW. The changing epidemiology of lung cancer in Europe. *Lung Cancer* 41: 245-258 (2003).

Jeanclous E, Schork NJ, Kyvick KO, Kimura M, Skurnick JH, Aviv A. Telomere length inversely correlates with pulse pressure and is highly familial. *Hypertension* 36: 195-200 (2000).

Jeggo PA, Löbrich M. Artemis links ATM to double strand break rejoining. *Cell Cycle* 4(3): 359-362 (2005).

Jeyapalan JN, Varley H, Foxon JL, Pollock RE, Jeffreys AJ, Henson JD, Reddel RR, Royle NJ. Activation of the ALT pathway for telomere maintenance can affect other sequences in the human genome. *Human Molecular Genetics* 14: 1785-1794 (2005).

Ji L, Minna JD, Roth JA. 3p21.3 tumor suppressor cluster: prospect for translational applications. *Future Oncology* 1(1): 79-92 (2005).

Jiang WQ, Zhong ZH, Henson JD, Neumann AA, Chang AC, Reddel RR. Suppression of alternative lengthening of telomeres by Sp100-mediated sequestration of the MRE11/RAD50/NBS1 complex. *Molecular and Cell Biology* 25: 2708-2721 (2005).

Jiang WQ, Zhong ZH, Henson JD, Reddel RR. Identification of candidate alternative lengthening of telomeres genes by methionin restriction and RNA interference. *Oncogene* 26: 4635-4647 (2007).

Johnson JE, Varkonyi RJ, Schwalm J, Cragle R, Klein-Szanto A, Patchefsky A, Cukierman E, von Mehren M, Broccoli D. Multiple mechanisms of telomere maintenance exist in liposarcomas. *Clinical Cancer Research* 11(15): 5347-5355 (2005).

Johnson RD, Jasin M. Sister chromatid gene conversion is a prominent double-strand break repair pathway in mammalian cells. *The EMBO Journal* 9: 3398-3407 (2000).

Jones PA, Baylin SB. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Review. Genetics* 3: 415-428 (2002).

K

Kaminker PG, Kim SH, Taylor RD, Zebarjadian Y, Funk WD, Morin GB, Yaswen P, Campisi J. TANK2, a new TRF1-associated poly(ADP-ribose) polymerase, causes rapid induction of cell death upon overexpression. *The Journal of Biological Chemistry* 276(38): 35891-35899 (2001).

Kaminker P, Plachot C, Kim SH, Chung P, Crippen D, Petersen OW, Bissell MJ, Campisi J, Lelièvre SA. Higher-order nuclear organization in growth arrest of human mammary epithelial cells: a novel role for telomere-associated protein TIN2. *The Journal of Cell Science* 118: 1321-1330 (2005).

Karahalil B, Hogue BA, de Souza-Pinto NC, Bohr VA. Bases excision repair capacity in mitochondria and nuclei: tissue-specific variations. *The FASEB Journal* 16: 1895-1902 (2002).

Karlseder J, Broccoli D, Dai Y, Hardy S, De Lange T. p53- and ATM- dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2. *Science* 283: 1321-1325 (1999).

Karlseder J, Hoke K, Mirzoeva OK, Bakkenist C, Kastan MB, Petrini JH, De Lange T. The telomeric protein TRF2 binds the ATM kinase and can inhibit the ATM-dependent DNA damage response. *PLoS biology* 2(8): E240 (2004).

Kedde M, le Sage C, Duursma A, Zlotorynski E, van Leeuwen B, Nijkamp W, Beijersbergen R, Agami R. Telomerase-independent regulation of ATR by human telomerase RNA. *The Journal of Biological Chemistry* 281(52): 40503-40514 (2006).

Kelland L. Targeting the limitless replicative potential of cancer: the telomerase/telomere pathway. *Clinical Cancer Research* 13: 4960-4963 (2007).

Kersting M, Friedl C, Kraus A, Behn M, Pankow W, Schuermann M. Differential frequencies of p16(INK4a) promoter hypermethylation, p53 mutation, and K-ras mutation in exfoliative material mark the development of lung cancer in symptomatic chronic smokers. *The Journal of Clinical Oncology* 18: 3221-3229 (2000).

Kharbanda S, Kumar V, Dhar S, Pandey P, Chen C, Majumder P, Yuan ZM, Whang Y, Strauss W, Pandita TK, Weaver D, Kufe D. Regulation of the hTERT

telomerase catalytic subunit by the c-Abl tyrosine kinase. *Current Biology* 10(10): 568-575 (2000).

Kikuchi T, Daigo Y, Katagiri T, Tsunoda T, Okada K, Kakiuchi S, Zembutsu H, Furukawa Y, Kawamura M, Kobayashi K, Imai K, Nakamura Y. Expression profiles of non-small cell lung cancers on cDNA microarrays: identification of genes for prediction of lymph-node metastasis and sensitivity to anti-cancer drugs. *Oncogene* 22: 2192-2205 (2003).

Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 266: 2011-2015 (1994).

Kim RA, Caron PR, Wang JC. Effects of yeast DNA topoisomerase III on telomere structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92(7):2667-2671 (1995).

Kim DH, Kim JS, Park JH, Lee SK, Ji YI, Kwon YM, Shim YM, Han J, Park J. Relationship of Ras association domain family 1 methylation and K-ras mutations in primary non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 63(19): 6206-6211 (2003).

Kim SH, Beausejour C, Davalos AR, Kaminker P, Heo SJ, Campisi J. TIN2 mediates functions of TRF2 at human telomeres. *The Journal of Biological Chemistry* 279: 43799-43804 (2004).

Kirk KE, Harmon BP, Reichardt IK, Sedat JW, Blackburn EH. Block in anaphase chromosome separation caused by a telomerase template mutation. *Science* 275(5305): 1478-1481 (1997).

Kiyohara C, Otsu A, Shirakawa T, Fukuda S, Hopkin JM. Genetic polymorphisms and lung cancer susceptibility: a review. *Lung Cancer* 37: 241-256 (2002).

Kiyono T, Foster SA, Koop JI, McDougall JK, Galloway DA, Klingelhutz AJ. Both Rb/p16INK4a inactivation and telomerase activity are required to immortalize human epithelial cells. *Nature* 396(6706): 84-88 (1998).

Koering CE et al. Human telomere position effect is determined by chromosomal context and telomeric chromatin integrity. *EMBO Reports* 3: 1055-1061 (2002).

Kok K, Naylor SL, Buys CH. Deletions of the short arm of chromosome 3 in solid tumors and the search for suppressor genes. *Advances in Cancer Research* 71: 27-92 (1997).

Kost-Almilova M, Imreh S. Modeling non-random deletions in cancer. *Seminars in Cancer Biology* 17: 19-30 (2007).

Kubokura H, Tenjin T, Akiyama H, Koizumi K, Nishimura H, Yamamoto M, Tanaka S. Relations of the c-myc gene and chromosome 8 in non-small cell lung cancer: analysis by fluorescence in situ hybridization. *Annals of Thoracic and Cardiovascular Surgery : Official Journal of the Association of Thoracic and Cardiovascular Surgeons of Asia* 7(4): 197-203 (2001).

Kumaki F, Kawai T, Hiroi S, Shinomiya N, Ozeki Y, Ferrans VJ, Torikata C. Telomerase activity and expression of human telomerase RNA component and human telomerase reverse transcriptase in lung carcinomas. *Human Pathology* 32(2) 188-195 (2001).

Kwan KY, Wang JC. Mice lacking DNA topoisomerase IIIbeta develop to maturity but show a reduced mean lifespan. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98(10):5717-5721 (2001).

Kwan KY, Moens PB, Wang JC. Infertility and aneuploidy in mice lacking a type IA DNA topoisomerase IIIβ. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(5): 2526-2531 (2003).

L

Langford LA, Piatyszek MA, Xu R, Schold SC Jr, Wright WE, Shay JW. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Human Pathology* 28: 416-420 (1997).

Lantuejoul S, Soria JC, Moro-Sibilot D, Morat L, Veyrenc S, Lorimier P, Brichon PY, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Differential expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in lung tumours. *British Journal of Cancer* 90: 1222-1229 (2004).

Lantuejoul S, Soria JC, Morat L, Lorimier P, Moro-Sibilot D, Sabatier L, Brambilla C, Brambilla E. Telomere shortening and telomerase reverse transcriptase expression in preinvasive bronchial lesions. *Clinical Cancer Research* 11: 2074-2082 (2005).

Lantuejoul S, Salon C, Soria JC, Brambilla E. Telomerase expression in lung preneoplasia and neoplasia. *International Journal of Cancer* 120(9):1835-1841 (2007).

Laursen LV, Bjergbaek L, Murray JM, Andersen AH. RecQ helicases and topoisomerase III in cancer and aging. *Biogerontology* 4(5):275-87 (2003).

Lee GY, Jang JS, Lee SY, Jeon HS, Kim KM, Choi JE, et al. XPC polymorphisms and lung cancer risk. *International Journal of Cancer* 115: 807-813 (2005).

Lee ME, Rha SY, Jeung H, Kim TS, Chung HC, Oh B. Variation of the 3' overhang lengths in human cells. *Cancer Letters* 264: 107-118 (2008).

Lerman MI, Minna JD. The 630-kb lung cancer homozygous deletion region on human chromosome 3p21.3: identification and evaluation of the resident candidate tumor suppressor genes. *The International Lung Cancer*

Chromosome 3p21.3 Tumor Suppressor Gene Consortium. *Cancer Research* 60(21): 6116-6133 (2000).

Léveillard T, Andera L, Bissonnette N, Schaeffer L, Bracco L, Egly JM, Wasylyk B. Functional interactions between p53 and the TFIIH complex are affected by tumor-associated mutations. *EMBO Journal* 15: 1615-1624 (1996).

Li B, De Lange T. Rap1 affects the length and heterogeneity of human telomeres. *Molecular Biology of the Cell* 14(12): 5060-5068 (2003).

Li G, Nelsen C, Hendrickson EA. Ku86 is essential in human somatic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99(2): 832-837 (2002).

Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *The Journal of Biological Chemistry* 280(25): 23709-23717 (2005).

Liao CH, Hsiao YM, Sheu GT, Chang JT, Wang PH, Wu MF, Shieh GJ, Hsu CP, Ko JL. Nuclear translocation of telomerase reverse transcriptase and calcium signaling in repression of telomerase activity in human lung cancer cells by fungal immunomodulatory protein from *Ganoderma tsugae*. *Biochemical Pharmacology* 74(10): 1541-1554 (2007).

Lieberman HB. DNA damage repair and response proteins as targets for cancer therapy. *Current Medicinal Chemistry* 15: 360-367 (2008).

Lin S-Y, Elledge SJ. Multiple tumor suppressor pathways negatively regulate telomerase. *Cell* 113: 881-889 (2003).

Lin X, Gu J, Lu C, Spitz MR, Wu X. Expression of telomere-associated genes as prognostic markers for overall survival in patients with non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 12(19): 5720-5725 (2006).

Lingner J, Hughes TR, Shevchenko A, Mann M, Lundblad V, Cech TR. Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science* 276(5312): 561-567 (1997).

Linke SP, Sengupta S, Khabie N, Jeffries BA, Buchhop S, Miska S, Henning W, Pedoux R, Wang XW, Hofseth LJ, Yang Q, Garfield SH, Stürzbecher HW, Harris CC. p53 interacts with hRAD51 and hRAD54, and directly modulates homologous recombination. *Cancer Research* 63(10): 2596-2605 (2003).

Liu D, Safari A, O'Connor MS, Chan DW, Laegeler A, Qin J, Songyang Z. PTPN22 interacts with POT1 and regulates its localization to telomeres. *Nature Cell Biology* 6: 673-680 (2004a).

Liu D, O'Connor MS, Qin J, Songyang Z. Telosome, a mammalian telomere-associated complex formed by multiple telomeric proteins. *Journal of Biological Chemistry* 279(49): 51338-51342 (2004b).

Liu L, Lai S, Andrews LG, Tollefsbol TO. Genetic and epigenetic modulation of telomerase activity in development and disease. *Gene* 340: 1-10 (2004).

Liu Y, Snow BE, Hande MP, Baerlocher G, Kickhoefer VA, Yeung D, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L. Telomerase-associated protein TEP1 is not essential for telomerase activity or telomere length maintenance in vivo. *Molecular and Cellular Biology* 20(21): 8178-8184 (2000a).

Liu Y, Snow BE, Hande MP, Yeung D, Erdmann NJ, Wakeham A, Itie A, Siderovski DP, Lansdorp PM, Robinson MO, Harrington L. The telomerase reverse transcriptase is limiting and necessary for telomerase function in vivo. *Current Biology* 10: 1419-1462 (2000b).

Loayza D, De Lange T. POT1 as a terminal transducer of TRF1 telomere length control. *Nature* 424: 1013-1018 (2003).

Londoño-Vallejo JA. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Letters* 212: 135-144 (2004).

Longhese MP. DNA damage response at functional and dysfunctional telomeres. *Genes and Development* 22: 125-140 (2008).

Loughran O, Clark LJ, Bond J, Baker A, Berry IJ, Edington KG, Ly IS, Simmons R, Haw R, Black DM, Newbold RF, Parkinson EK. Evidence for the inactivation of multiple replicative lifespan genes in immortal human squamous cell carcinoma keratinocytes. *Oncogene* 14(16): 1955-1964 (1997).

Louis EJ. The chromosome ends of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11: 1553-1573 (1995).

Luderus ME, van Steensel B, Chong L, Sibon OC, Cremers FF, De Lange T. Structure, subnuclear distribution, and nuclear matrix association of the mammalian telomeric complex. *The Journal of Cell Biology* 135(4): 867-881 (1996).

Ludovini V, Gregorc V, Pistola L, Mihaylova Z, Floriani I, Darwish S, Stracci F, Tofanetti FR, Ferraldeschi M, Di Carlo L, Ragusa M, Daddi G, Tonato M. Vascular endothelial growth factor, p53, Rb, Bcl-2 expression and response to chemotherapy in advanced non small cell lung cancer. *Lung Cancer* 46(1): 77-85 (2004).

Lukowiak AA, Narayanan A, Li ZH, Terns RM, Terns MP. The snoRNA domain of vertebrate telomerase RNA functions to localize the RNA within the nucleus. *RNA* 7(12): 1833-1844 (2001).

Luiz de Menezes R, Machado ME. Molecular markers in lung cancer: prognostic role and relationship to smoking. *Jornal Brasileiro de Pneumologia* 32(1): 56-65 (2005).

Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *The New England Journal of Medicine* 350(21): 2129-2139 (2004).

M

Machwe A, Xiao L, Orren DK. TRF2 recruits the Werner syndrome (WRN) exonuclease for processing of telomeric DNA. *Oncogene* 8;23(1): 149-156 (2004).

Madhusudan S, Middleton MR. The emerging role of DNA repair proteins as predictive, prognostic and therapeutic targets in cancer. *Cancer Treatment Reviews* 31(8): 603-617 (2005).

Mao L, Lee JS, Kurie JM, Fan YH, Lippman SM, Lee JJ, Ro JY, Broxson A, Yu R, Morice RC, Kemp BL, Khuri FR, Walsh GL, Hittelman WN, Hong WK. Clonal genetic alterations in the lungs of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute* 89(12): 857-862 (1997).

Marchetti A, Bertacca G, Buttitta F, Chella A, Quattrocchio G, Angeletti CA, Bevilacqua G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 5: 2077-2081 (1999).

Marchetti A, Pellegrini C, Buttitta F, Falleni M, Romagnoli S, Felicioni L, Barassi F, Salvatore S, Chella A, Angeletti CA, Roncalli M, Coggi G, Bosari S. Prediction of survival in stage I lung carcinoma patients by telomerase function evaluation. *Laboratory Investigation* 82(6): 729-736 (2002).

Marciniak RA, Cavazos D, Montellano R, Chen Q, Guarente L, Johnson FB. A novel telomere structure in a human alternative lengthening of telomeres cell line. *Cancer Research* 65: 2730-2737 (2005).

Martin SG, Laroche T, Suka N, Grunstein M, Gasser SM. Relocalization of telomeric Ku and SIR proteins in response to DNA strand breaks in yeast. *Cell* 97: 621-633 (1999).

Martens UM., Zijlmans JM, Poon SS, Dragowska W., Yui J, Chavez EA, Ward RK, Lansdorp PM. Short telomeres on human chromosome 17p. *Nature Genetics* 18: 76-80 (1998).

Maser RS, De Pinho RA. Keeping telomerase in its place. *Nature Medicine* 8: 934-936 (2002a).

Maser RS, De Pinho RA. Connecting chromosomes, crisis and cancer. *Science* 297: 565-569 (2002b).

Maser RS, De Pinho RA. Telomeres and the DNA damage response: why the fox is guarding the henhouse? *DNA Repair* 3: 979-988 (2004).

Mason PJ, Wilson DB, Bessler M. Dyskeratosis congenita—a disease of dysfunctional telomere maintenance. *Current Molecular Medicine* 5(2):159-170 (2005).

Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, Ganesan S, Lansdorp PM, Collins K, Hahn WC. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 8222-8227 (2005).

Matsui T, Segall J, Weil PA, Roeder RG. Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *The Journal of Biological Chemistry* 255(24): 11992-11996 (1980).

McCintock B. The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics* 26: 234-282 (1941).

McCord RA, Broccoli D. Telomeric chromatin: Roles in aging, cancer and hereditary disease. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* doi: 10,1016/j.mrf.mmm.2008.05.005 (2008).

Mekeel KL, Tang W, Kachnic LA, Luo CM, DeFrank JS, Powell SN. Inactivation of p53 results in high rates of homologous recombination. *Oncogene* 14(15): 1847-1857 (1997).

Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, March GE, De Marzo AM. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *The American Journal of Pathology* 160(4): 1259-1268 (2002a).

Meeker AK, Hicks JL, Platz EA, March GE, Bennett CJ, Delannoy MJ, De Marzo AM. Telomere shortening is an early somatic DNA alteration in human prostate tumorigenesis. *Cancer Research* 62(22): 6405-6409 (2002b).

Meyerson M, Franklin WA, Kelley MJ. Molecular classification and molecular genetics of human lung cancers. *Seminars in Oncology* 31(suppl 1): 4-19 (2004).

Michiels S, Danoy P, Dessen P, Bera A, Boulet T, Bouchardy C, Lathrop M, Sarasin A, Benhamou S. Polymorphism discovery in 62 DNA repair genes and haplotype associations with risks for lung and head and neck cancers. *Carcinogenesis* 28(8): 1731-1739 (2007).

Minna JD, Fong K, Zöchbauer-Müller S, Gazdar AF. Molecular pathogenesis of lung cancer and potential translational applications. *Cancer Journal* 8 (Suppl 1): S41-S46 (2002).

Mitchell JR, Wood E, Collins KA. A telomerase component is defective in the human disease dyskeratosis congenita. *Nature* 402: 551-555 (1999).

Miura K, Bowman ED, Simon R, Peng AC, Robles AI, Jones RT, Katagiri T, He P, Mizukami H, Charboneau L, Kikuchi T, Liotta LA, Nakamura Y, Harris CC. Laser capture microdissection and microarray expression analysis of lung adenocarcinoma reveals tobacco smoking- and prognosis-related molecular profiles. *Cancer Research* 62: 3244-3250 (2002).

Mohaghegh P, Hickson ID. DNA helicase deficiencies associated with cancer predisposition and premature ageing disorders. *Human Molecular Genetics* 10(7): 741-746 (2001).

Morland I, Rolseth V, Luna L, Rognes T, Bjørås M, Seeberg E. Human DNA glycosylases of the bacterial Fpg/MutM superfamily: an alternative pathway for the repair of 8-oxoguanine and other oxidation products in DNA. *Nucleic Acids Research* 30(22): 4926-4936 (2002).

Moshous D, Pannetier C, Chasseval Rd R, Deist Fl F, Cavazzana-Calvo M, Romana S, Macintyre E, Canioni D, Brousse N, Fischer A, Casanova JL, Villartay JP. Partial T and B lymphocyte immunodeficiency and predisposition to lymphoma in patients with hypomorphic mutations in Artemis. *The Journal of Clinical Investigation* 111: 381-387 (2003).

Mountain CF. Revisions in the international system for staging lung cancer. *Chest* 111: 1710-1717 (1997).

Moyzis RK, Buckingham JM, Cram LS, Dani M, Deaven LI, Jones MD, Mayne J, Ratcliff RL, Wu JR. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of the human chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85: 6622-6626 (1988).

Muller H. The remaking of chromosomes. *The Collecting Net Woods Hole* 13: 181-198 (1938).

Muñoz P, Blanco R, Flores JM, Blasco MA. XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer. *Nature Genetics* 37(19): 1063-1071 (2005).

Muntoni A, Reddel RR. The first molecular details of Alt in human tumor cells. *Human Molecular Genetics* 14: 191-196 (2005).

Musio A, Marrella V, Sobacchi C, Rucci F, Fariselli L, Giliani S, Lanzi G, Notarangelo LD, Delia D, Colombo R, Vezzoni P, Villa A. Damaging-agent sensitivity of Artemis-deficient cell lines. *European Journal of Immunology* 35: 1250-1256 (2005).

Myung K, Ghosh G, Fattah FJ, Li G, Kim H, Dutia A, Pak E, Smith S, Hendrickson EA. Regulation of telomere length and suppression of genomic instability in human somatic cells by Ku86. *Molecular and Cellular Biology* 24(11): 5050-5059 (2004).

N

Nagao K, Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Tabata K, Takai K, Kameyama K, Kitano S, Kawano K, Hibi N, Kanamaru T, Hisatomi H. Expression of hTERT mRNA in a mortal liver cell line during S phase without detectable telomerase activity. *International Journal of Molecular Medicine* 15(4): 683-688 (2005).

Narayanan A, Lukowiak A, Jády BE, Dragon F, Kiss T, Terns RM, Terns MP. Nucleolar localization signals of box H/ACA small nucleolar RNAs. *The EMBO Journal* 18(18): 5120-5130 (1999).

Nawrot TS, Staessen JA, Gardner JP, Aviv A. Telomere length and possible link to X chromosome. *Lancet* 363: 507-510 (2004).

Ng SW, Liu Y, Hasselblatt KT, Mok SC, Berkowitz RS. A new human topoisomerase III that interacts with SGS1 protein. *Nucleic Acids Research* 27(4): 993-1000 (1999).

Nikliński J, Niklińska W, Laudanski J, Chyczewska E, Chyczewski L. Prognostic molecular markers in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 34 (Suppl 2): S53-S58 (2001).

Nittis T, Guittat L, Stewart SA. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection? *Biochimie* 90: 5-12 (2008).

Njajou OT, Cawthon RM, Damcott CM, Wu SH, Ott S, Garant MJ, Blackburn EH, Mitchell BD, Shuldiner AR, Hsueh WC. Telomere length is paternally inherited and associated with parental life-span. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 12135-12139 (2007).

Noda K, Nishiwaki Y, Kawahara M et al. Irinotecan plus cisplatin compared with etoposide plus cisplatin for extensive small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 346: 85-91 (2002).

Nordfjäll K, Larefalk A, Lindgren P, Holmberg D, Roos G. Telomere length and heredity: Indications of paternal inheritance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102: 16374-16378 (2005).

O

Oh BK, Kim YJ, Park C, Park YN. Up-regulation of telomere-binding proteins, TRF1, TRF2, and TIN2 is related to telomere shortening during human multistep hepatocarcinogenesis. *The American Journal of Pathology* 166(1): 73-80 (2005).

Oh JJ, Koegel AK, Phan DT, Razfar A, Slamon DJ. The two single nucleotide polymorphisms in the H37/RBM5 tumour suppressor gene at 3p21.3

correlated with different subtypes of non-small cell lung cancers. *Lung Cancer* 58(1): 7-14 (2007).

Ohmura H, Tahara H, Suzuki M, Ide T, Shimizu M, Yoshida MA, Tahara E, Shay JW, Barrett JC, Oshimura M. Restoration of the cellular senescence program and repression of telomerase by human chromosome 3. *Japanese Journal of Cancer Research : Gann* 86: 899-904 (1995).

Olovnikov AM. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *Journal of Theoretical Biology* 14;41(1): 181-190 (1973).

Opresko PL, Von Kobbe C, Laine JP, Harrigan J, Hickson ID, Kolvraa S, May A, Seidman MM, Bohr VA. Telomere binding protein TRF2 binds to and stimulates the Werner and Bloom syndrome helicases. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 41110-41119 (2002).

Opresko PL, Otterlei M, Graakjaer J, Bruheim P, Dawut L, Kolvraa S, May A, Seidman MM, Bohr VA. The Werner syndrome helicase and exonuclease cooperates to resolve telomeric D loops in a manner regulated by TRF1 and TRF2. *Molecular Cell* 14: 763-774 (2004).

Ortega P, Morán A, de Juan C, Frías C, Hernández S, López-Asenjo JA, Sánchez-Pernaute A, Torres A, Iniesta P, Benito M. Differential Wnt pathway gene expression and E-cadherin truncation in sporadic colorectal cancers with and without microsatellite instability. *Clinical Cancer Research* 14(4): 95-1001 (2008).

Osaki T, Oyama T, Inoue M, Gu CD, Kodate M, Aikawa M, So T, Mizukami M, Mitsudomi T, Yasumoto K. Molecular biological markers and micrometastasis in resected non-small cell lung cancer. *The Japanese Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery : official publication of the Japanese Association for Thoracic Surgery* 49(9): 545-551 (2001).

P

Paez JG, Jänne PA, Lee JC, Tracy S, Greulich H, Gabriel S, Herman P, Kaye FJ, Lindeman N, Boggon TJ, Naoki K, Sasaki H, Fujii Y, Eck MJ, Sellers WR, Johnson BE, Meyerson M. EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-1500 (2004).

Pankiewicz W, Minarowski L, Niklińska W, Naumnik W, Nikliński J, Chyczewski L. Immunohistochemical markers of cancerogenesis in the lung. *Folia Histochemica et Cytobiologica* 45(2): 65-74 (2007).

Park Y, Gerson SL. DNA repair defects in stem cell function and aging. *Annual Review of Medicine* 56: 495-508 (2005).

Passos JF, Saretzki G, von Zglinicki T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection? *Nucleic Acids Research* 35(22): 7505-7513 (2007).

Paz-Elizur T, Krupsky M, Blumenstein S, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. Reduced DNA repair activity for oxidative damage and the risk of lung cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 95: 1312-1319 (2003).

Paz-Elizur T, Krupsky M, Elinger D, Schechtman E, Livneh Z. Repair of oxidative DNA damage 8-oxoguanine as a biomarker for lung cancer risk. *Cancer Biomarkers* 1: 201-205 (2005).

Paz-Elizur T, Ben-Yosef R, Elinger D, Vexler A, Krupsky M, Berrebi A, Shani A, Schechtman E, Freedman L, Livneh Z. Reduced repair of the oxidative 8-oxoguanine DNA damage and the risk of head and neck cancer. *Cancer Research* 66: 11683-11689 (2006).

Paz-Elizur T, Sevilya Z, Leitner-Dagan Y, Elinger D, Roisman LC, Livneh Z. DNA repair of oxidative DNA damage in human carcinogenesis: potential

application for cancer risk assessment and prevention. *Cancer Letters* 266: 60-72 (2008).

Pearson A, Greenblatt J. Modular organization of the E2F1 activation domain and its interaction with general transcription factors TBP and TFIIH. *Oncogen* 15: 2643- 2658 (1997).

Pennaneach V, Putnam CD, Kolodner RD. Chromosome healing by de novo telomere addition in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* 59: 1357-1368 (2006).

Pérez-Rivero G, Ruiz-Torres MP, Díez-Marqués ML, Canela A, López-Novoa JM, Rodríguez-Puyol M, Blasco MA, Rodríguez-Puyol D. Telomerase deficiency promotes oxidative stress by reducing catalase activity. *Free Radical Biology & Medicine* doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.07.017 (2008).

Perrem K, Bryan TM, Englezou A, Hackl T, Moy EL, Reddel RR. Repression of an alternative mechanism for lengthening of telomeres in somatic cell hybrids. *Oncogene* 18: 3383-3390 (1999).

Petursdottir TE, Thorsteinsdottir U, Jonasson JG, Moller PH, Huiping C, Bjornsson J, Egilsson V, Imreh S, Ingvarsson S. Interstitial deletions including chromosome 3 common eliminated region 1 (C3CER1) prevail in human solid tumors from 10 different tissues. *Genes Chromosomes Cancer* 41(3): 232-242 (2004).

Pickett HA, Baird DM, Hoff-Olsen P, Meling GI, Rognum TO, Shaw J, West KP, Royle NJ. Telomere instability detected in sporadic colon cancers, some showing mutations in a mismatch repair gene. *Oncogene* 23: 3434-3443 (2004).

Potts PR, Yu H. The SMC5/6 complex maintains telomere length in ALT cancer cells through SUMOylation of telomere-binding proteins. *Nature Structural and Molecular Biology* 14: 581-590 (2007).

R

Rahman R, Latonen L, Wiman KG. hTERT antagonizes p53-induced apoptosis independently of telomerase activity. *Oncogene* 24(8): 1320-1327 (2005).

Rajaraman S, Choi J, Cheung P, Beaudry V, Moore H, Artandi SE. Telomere uncapping in progenitor cells with critical telomere shortening is coupled to S-phase progression in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 17747-17752 (2007).

Raynaud CM, Sabatier L, Philipot O, Olausson KA, Soria JC. Telomere length, telomeric proteins and genomic instability during the multistep carcinogenic process. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 66: 99-117 (2008).

Riethman H. Human telomere structure and biology. *Annual Review of Genomics and Human Genetics* (2008).

Rom WN, Hay JG, Lee TC, Jiang Y, Tchou-Wong KM. Molecular and genetic aspects of lung cancer. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 161(4 Pt 1): 1355-1367 (2000).

Rooney S, Alt FW, Lombard D, Whitlow S, Eckersdorff M, Fleming J, Fugmann S, Ferguson DO, Schatz DG, Sekiguchi J. Defective DNA repair and increased genomic instability in Artemis-deficient murine cells. *The Journal of Experimental Medicine* 197(5): 553-565 (2003).

Rouleau M, McDonald D, Gagné P, Ouellet ME, Droit A, Hunter JM, Dutertre S, Prigent C, Hendzel MJ, Poirier GG. PARP-3 associates with polycomb group bodies and with components of the DNA damage repair machinery. *Journal of Cellular Biochemistry* 100(2): 385-401 (2007).

Roy B, Beamon J, Balint E, Reisman D. Transactivation of the human p53 tumor suppressor gene by c-Myc/Max contributes to elevated mutant p53

expression in some tumors. *Molecular and Cellular Biology* 14: 7805-7815 (1994).

S

Samper E, Goytisolo FA, Slijepcevic P, van Buul PP, Blasco MA. Mammalian Ku86 protein prevents telomeric fusions independently of the length of TTAGGG repeats and the G-strand overhang. *EMBO Reports* 1: 244–252 (2000).

Sánchez-Céspedes M. Dissecting the genetic alterations involved in lung carcinogenesis. *Lung Cancer* 40: 11-121 (2003).

Sánchez-Céspedes M. The impact of gene expression microarrays in the evaluation of lung carcinoma subtypes and DNA copy number. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* 132: 1562-1565 (2008).

Sandell LL, Gottschling DE, Zakian VA. Transcription of a yeast telomere alleviates telomere position effect without affecting chromosome stability. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91(25): 12061-12065 (1994).

Santos JH, Meyer JN, Skorvaga M, Annab LA, Van Houten B. Mitochondrial hTERT exacerbates free-radical-mediated mtDNA damage. *Aging cell* 3(6): 399-411 (2004).

Santos JH, Meyer JN, Van Houten B. Mitochondrial localization of telomerase as a determinant for hydrogen peroxide-induced mitochondrial DNA damage and apoptosis. *Human Molecular Genetics* 15: 1757-1768 (2006).

Saretzki G, Ludwig A, von Zglinicki T, Runnebaum IB. Ribozyme-mediated telomerase inhibition induces immediate cell loss but not telomere shortening in ovarian cancer cells. *Cancer Gene Therapy* 8(10): 827-834 (2001).

Saretzki G. Telomerase inhibition as cancer therapy. *Cancer Lettes* 194(2): 209-219 (2003).

Sarker AH, Ikeda S, Nakano H, Terato H, Ide H, Imai K, Akiyama K, Tsutsui K, Bo Z, Kubo K, Yamamoto K, Yasui A, Yoshida MC, Seki S. Cloning and characterization of a mouse homologue (mNth1) of *Escherichia coli* endonuclease III. *Journal of Molecular Biology* 282: 761-774 (1998).

Sasatomi E, Finkelstein SD, Woods JD, Bakker A, Swalsky PA, Luketich JD, Fernando HC, Yousem SA. Comparison of accumulated allele loss between primary tumor and lymph node metastasis in stage II non-small cell lung carcinoma: implications for the timing of lymph node metastasis and prognostic value. *Cancer Research* 62: 2681-2689 (2002).

Scagliotti GV, Selvaggi G, Novello S, Hirsch FR. The biology of epidermal growth factor receptor in lung cancer. *Clinical Cancer Research* 10: 4227s-4232s (2004).

Schiller JH, Harrington D, Belani CP et al. Comparison of four chemotherapy regimens for advanced non-small-cell lung cancer. *The New England Journal of Medicine* 346: 92-98 (2002).

Sedivy JM. Can ends justify the means? Telomeres and mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9078-9081 (1997).

Seimiya H, Sawada H, Muramatsu Y, Shimizu M, Ohko K, Yamane K, Tsuruo T. Involvement of 14-3-3 proteins in nuclear localization of telomerase. *EMBO Journal* 19(11): 2652-2661 (2000).

Seimiya H, Muramatsu Y, Ohishi T, Tsuruo T. Tankyrase 1 as a target for telomere-directed molecular cancer therapeutics. *Cancer Cell* 7(1): 25-37 (2005).

Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Progress in understanding the molecular pathogenesis of human lung cancer. *Biochimica et Biophysica Acta* 1378(1): F21-59 (1998).

Sekido Y, Fong KM, Minna JD. Molecular genetics of lung cancer. *Annual Review of Medicine* 54: 73-87 (2003).

Sfeir AJ, Chai W, Shay JW, Wright WE. Telomere-end processing the terminal nucleotides of human chromosomes. *Molecular Cell* 18: 131-138 (2005).

Shay JW, Wright WE, Werbin H. Defining the molecular mechanism of human cell immortalization. *Biochimica et Biophysica Acta* 1072: 1-7 (1991).

Shay JW, Wright WE. Telomerase activity in human cancer. *Current Opinion in Oncology* 8: 66-71 (1996).

Shay JW, Wright WE. Telomerase: a target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2: 257-265 (2002).

Shay JW, Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 26: 867-874 (2005).

Sherr CJ. Principles of tumor suppression. *Cell* 116:235-246 (2004).

Shervington A, Mohammed K, Patel R, Lea R. Identification of a novel co-transcription of P450/1A1 with telomerase in A549. *Gene* 388(1-2): 110-116 (2007).

Shibata Y, Hidaka S, Tagawa Y, Nagayasu T. Bcl-2 protein expression correlates with better prognosis in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Anticancer Research* 24(3b): 1925-1928 (2004).

Shin JS, Hong A, Solomon MJ, Lee CS. The role of telomeres and telomerase in the pathology of human cancer and aging. *Pathology* 38(2): 103-113 (2006).

Shoji T, Tanaka F, Takata T, Yanagihara K, Otake Y, Hanaoka N, Miyahara R, Nakagawa T, Kawano Y, Ishikawa S, Katakura H, Wada H. Clinical significance of p21 expression in non-small cell lung cancer. *Journal of Clinical Oncology* 20(18): 3865-3871 (2002).

Siegfried JM, Weissfeld LA, Singh-Kaw P, Weyant RJ, Testa JR, Landreneau RJ. Association of immunoreactive hepatocyte growth factor with poor survival in resectable non-small cell lung cancer. *Cancer Research* 57(3): 433-439 (1997a).

Siegfried JM, DeMichele MA, Hunt JD, Davis AG, Vohra KP, Pilewski JM. Expression of mRNA for gastrin-releasing peptide receptor by human bronchial epithelial cells. Association with prolonged tobacco exposure and responsiveness to bombesin-like peptides. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 156(2 Pt 1): 358-366 (1997b).

Siegl-Cachedenier I, Flores I, Klatt P, Blasco MA. Telomerase reverses epidermal hair follicle stem cell defects and loss of long-term survival associated with critically short telomeres. *The Journal of Cell Biology* 179(2): 277-90 (2007).

Simpson RJ, Bernhard OK, Greening DW, Moritz RL. Proteomics-driven cancer biomarker discovery: looking to the future. *Current Opinion in Chemical Biology* 12: 72-77 (2008).

Slijepcevic P, Al-Wahiby S. Telomere biology: integrating chromosomal end protection with DNA damage response. *Chromosoma* 114(4): 275-285 (2005).

Slijepcevic P. The role of DNA damage response proteins at telomeres-an "integrative" model. *DNA Repair* 5: 1299-1306 (2006).

Slijepcevic P. DNA damage response, telomere maintenance and ageing in light of the integrative model. *Mechanisms of Ageing and Development* 129: 11-16 (2008).

Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nature Cell Biology* 5(5): 474-479 (2003).

Smith S, Giriati I, Schmitt A, De Lange T. Tankyrase, a poly (ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282: 1484–1487 (1998).

Smith S, De Lange T. Tankyrase promotes telomere elongation in human cells. *Current Biology* 10: 1299–1302 (2000).

Smogorzewska A, Karlseder J, Holtgreve-Grez H, Jauch A, De Lange T. DNA ligase IV-dependent NHEJ of deprotected mammalian telomeres in G1 and G2. *Current Biology* 12(19): 1635-1644 (2002).

Smogorzewska A, De Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annual Review of Biochemistry* 73: 177-208 (2004).

Schneider BJ. Non-small cell lung cancer staging: proposed revisions to the TNM system. *Cancer Imaging* 8: 181-185 (2008).

Sozzi G, Pastorino U, Moiraghi L, Tagliabue E, Pezzella F, Ghirelli C, Torielli S, Sard L, Huebner K, Pierotti MA, Croce CM, Pilotti S. Loss of FHIT function in lung cancer and preinvasive bronchial lesions. *Cancer Research* 58(22): 5032-5037 (1998).

Spira A, Beane J, Shah V, Liu G, Schembri F, Yang X, Palma J, Brody JS. Effect of cigarette smoke on the human airway epithelial cell transcriptome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101(27): 10143-10148 (2004).

Spitz MR, Wei Q, Li G, Wu X. Genetic susceptibility to tobacco carcinogenesis. *Cancer Investigation* 17: 645-659 (1999).

Stansel RM, De Lange T, Griffith JD. T-Loop assembly in vitro involves binding of TRF2 near the 3' telomeric overhang. *The EMBO Journal* 20, E5532-E5540 (2001).

Steels E, Paesmans M, Berghmans T, Branle F, Lemaitre F, Mascaux C, Meert AP, Vallot F, Lafitte JJ, Sculier JP. Role of p53 as a prognostic factor for survival in lung cancer: a systematic review of the literature with a meta-analysis. *The European Respiratory Journal* 18(4): 705-719 (2001).

Stewart SA, Weinberg RA. Telomeres: Cancer to Human Aging. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 22: 531-557 (2006).

Sundaresan V, Ganly P, Hasleton P, Rudd R, Sinha G, Bleehen NM, Rabbitts P. p53 and chromosome 3 abnormalities, characteristic of malignant lung tumours, are detectable in preinvasive lesions of the bronchus. *Oncogene* 7(10): 1989-1997 (1992).

T

Tacke PJ, De Vries JM, Torensma R, Figdor CG. Dendritic-cell immunotherapy: from *ex vivo* loading to *in vivo* targeting. *Nature Reviews of Immunology* 7: 790-802 (2007).

Taga S, Osaki T, Ohgami A, Imoto H, Yasumoto K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers. *Annals of Surgical Oncology* 230: 715-720 (1999).

Tanaka H, Shimizu M, Horikawa I, Kugoh H, Yokota J, Barrett JC, Oshimura M. Evidence for a putative telomerase repressor gene in the 3p14.2-p21.1 region. *Genes Chromosomes Cancer* 23: 123-133 (1998).

Tanaka H, Mendonca MS, Bradshaw PS, Hoelz DJ, Malkas LH, Meyn MS, Gilley D. DNA damage-induced phosphorylation of the human

telomere-associated protein TRF2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(43): 15539-15544 (2005a).

Tanaka H, Horikawa I, Barrett JC, Oshimura M. Evidence for inactivation of distinct telomerase repressor genes in different types of human cancers. *International Journal of Cancer* 115: 653-657 (2005b).

Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay JW, Matsuura Y, Yokoyama T. High telomerase activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 6: 2696-2701 (2000).

Teixeira MT, Arneric M, Sperisen P, Lingner J. Telomere length homeostasis is achieved via a switch between telomerase- extendible and -nonextendible states. *Cell* 117: 323-335 (2004).

Tomlinson RL, Ziegler TD, Supakorndej T, Terns RM, Terns MP. Cell cycle-regulated trafficking of human telomerase to telomeres. *Molecular and Cellular Biology* 17: 955-965 (2006).

Tomlinson RL, Abreu EB, Ziegler T, Ly H, Counter CM, Terns RM, Terns MP. Telomerase reverse transcriptase is required for the localization of telomerase RNA to cajal bodies and telomeres in human cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* 19(9): 3793-3800 (2008).

Travis WD, Giroux DJ, Chansky K, Crowley J, Asamura H, Brambilla E, Jett J, Kennedy C, Rami-Porta R, Rusch VW, Goldstraw P; International Staging Committee and Participating Institutions. The IASLC Lung Cancer Staging Project: proposals for the inclusion of broncho-pulmonary carcinoid tumors in the forthcoming (seventh) edition of the TNM Classification for Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 3(11): 1213-1223 (2008).

Tsai HJ, Huang WH, Li TK, Tsai YL, Wu KJ, Tseng SF, Teng SC. Involvement of topoisomerase III in telomere-telomere recombination. *The Journal of Biological Chemistry* 281(19): 13717-13723 (2006).

Tsakiri KD, Cronkhite JT, Kuan PJ, Xing C, Raghu G, Weissler JC, Rosenblatt RL, Shay JW, Garcia CK. Adult-onset pulmonary fibrosis caused by mutations in telomerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 7552-7557 (2007).

U

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Giudice LC, Hoffman AR. Telomerase activity in human development is regulated by human telomerase reverse transcriptase (hTERT) transcription and by alternate splicing of hTERT transcripts. *Cancer Research* 58(18): 4168-4172 (1998).

Ulaner GA, Hu JF, Vu TH, Oruganti H, Giudice LC, Hoffman AR. Regulation of telomerase by alternate splicing of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in normal and neoplastic ovary, endometrium and myometrium. *International Journal of Cancer* 85(3): 330-335 (2000).

Ulaner GA, Huang HY, Otero J, Zhao Z, Ben-Porat L, Satagopan JM, Gorlick R, Meyers P, Healey JH, Huvos AG, Hoffman AR, Ladanyi M. Absence of a telomere maintenance mechanism as a favorable prognostic factor in patients with osteosarcoma. *Cancer Research* 63(8): 1759-1763 (2003).

Ulaner GA, Hoffman AR, Otero J, Huang HY, Zhao Z, Mazumdar M, Gorlick R, Meyers P, Healey JH, Ladanyi M. Divergent patterns of telomere maintenance mechanisms among human sarcomas: sharply contrasting prevalence of the alternative lengthening of telomeres mechanism in Ewing's sarcomas and osteosarcomas. *Genes Chromosomes Cancer* 41(2): 155-162 (2004).

Umbricht CB, Sherman ME, Dome J, Carey LA, Marks J, Kim N, Sukumar S. Telomerase activity in ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Oncogene* 18: 3407-3414 (1999).

Unryn BM, Cook LS, Riabowol KT. Paternal age is positively linked to telomere length of children. *Aging Cell* 4: 97-101 (2005).

V

Valdes AM, Andrew T, Gardner JP, Kimura M, Oelsner E, Cherkas LF, Aviv A, Spector TD. Obesity, cigarette smoking, and telomere length in women. *Lancet* 366: 662-664 (2005).

Van Steensel B, De Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 20;385(6618): 740-743 (1997).

Van Steensel B, Smogorzewska A, De Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 92: 401-413 (1998).

Verdun RE, Crabbe L, Haggblom C, Karlseder J. Functional human telomeres are recognized as DNA damage in G2 of the cell cycle. *Molecular Cell* 20: 551-561 (2005).

Verdun RE, Karlseder J. The DNA damage machinery and homologous recombination pathway act consecutively to protect human telomeres. *Cell* 127: 709-720 (2006).

Villa R, Porta CD, Folini M, Daidone MG, Zaffaroni N. Possible regulation of telomerase activity by transcription and alternative splicing of telomerase reverse transcriptase in human melanoma. *The Journal of Investigative Dermatology* 116(6): 867-873 (2001).

Vogelstein B, Lane D, Levine AJ. Surfing the p53 network. *Nature* 408(6810): 307-310 (2000).

Von Zglinicki T. Oxidative stress shortens telomeres. *Trends in Biochemical Sciences* 27: 339-344 (2002).

Vulimiri SV, Wu X, Baer-Dubowska W, de Andrade M, Detry M, Spitz M.R et al. Analysis of DNA adducts and 7,8-dihydro-8-oxo-2'-deoxyguanosine in lymphocyte DNA from a case-control study of lung cancer involving minority populations. *Molecular Carcinogenesis* 27: 34-46 (2000).

Vulliamy T, Marrone A, Goldman F, Dearlove A, Bessler M, Mason PJ, Dokal I. The RNA component of telomerase is mutated in autosomal dominant dyskeratosis congenita. *Nature* 413: 432-435 (2001).

Vulliamy T, Marrone A, Szydlo R, Walne A, Mason PJ, Dokal I. Disease anticipation is associated with progressive telomere shortening in families with dyskeratosis congenita due to mutations in TERC. *Nature Genetics* 36: 447-449 (2004).

W

Wang L, Soria JC, Kemp BL, Liu DD, Mao L, Khuri FR. hTERT expression is a prognostic factor of survival in patients with stage I non-small cell lung cancer. *Clinical Cancer Research* 8(9): 2883-2889 (2002).

Wang J, Pluth JM, Cooper PK, Cowan MJ, Chen DJ, Yannone SM. Artemis deficiency confers a DNA double-strand break repair defect and Artemis phosphorylation status is altered by DNA damage and cell cycle progression. *DNA Repair* 4(5): 556-570 (2005).

Wang JC. Cellular roles of DNA topoisomerases: a molecular perspective. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 3(6): 430-440 (2002).

Wang JC, Warner JK, Erdmann N, Lansdorp PM, Harrington L, Dick JE. Dissociation of telomerase activity and telomere length maintenance in primitive human hematopoietic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(40): 14398-14403 (2005).

Wang RC, Smogorzewska A, De Lange T. Homologous recombination generates T-loop-sized deletions at human telomeres. *Cell* 119: 355-368 (2004).

Watson JD. Origin of concatemeric T7 DNA. *Nature: New Biology* 18;239(94):197-201 (1972).

Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR. Reduced DNA repair capacity in lung cancer patients. *Cancer Research* 56: 4103-4107 (1996).

Wei Q, Cheng L, Amos CI, Wang LE, Guo Z, Hong WK, Spitz MR. Repair of tobacco carcinogen-induced DNA adducts and lung cancer risk: a molecular epidemiologic study. *Journal of the National Cancer Institute* 92: 1764-1772 (2000).

Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT. *Nature Genetics* 17(4): 498-502 (1997).

Wikenheiser-Brokamp KA. Retinoblastoma regulatory pathway in lung cancer. *Current Molecular Medicine* 6: 783-793 (2006).

Williams ES, Stap J, Essers J, Ponnaiya B, Luijsterburg MS, Krawczyk PM, Ullrich RL, Aten JA, Bailey SM. DNA double strand-breaks are not sufficient to initiate recruitment of TRF2. *Nature Genetics* 39(6): 696-698 (2007).

Wislez M, Beer DG, Wistuba I, Cadranel J, Saijo N, Johnson BE. Molecular biology, genomics, and proteomics in bronchioloalveolar carcinoma. *Journal of*

Thoracic Oncology: Official Publication of the International Association for the Study of Lung Cancer 1(Sup 1 9): S8-S12 (2006).

Wisman GB, De Jong S, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, de Vries EG, Keith WN, van der Zee AG. Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Human Pathology* 31: 1304-1312 (2000).

Wistuba II, Lam S, Behrens C, Virmani AK, Fong KM, LeRiche J, Samet JM, Srivastava S, Minna JD, Gazdar AF. Molecular damage in the bronchial epithelium of current and former smokers. *Journal of the National Cancer Institute* 89(18): 1366-1373 (1997).

Wistuba II, Behrens C, Milchgrub S, Bryant D, Hung J, Minna JD, Gazdar AF. Sequential molecular abnormalities are involved in the multistage development of squamous cell lung carcinoma. *Oncogene* 18(3): 643-650 (1999).

Wistuba II, Behrens C, Virmani AK, Mele G, Milchgrub S, Girard L, Fondon JW 3rd, Garner HR, McKay B, Latif F, Lerman MI, Lam S, Gazdar AF, Minna JD. High resolution chromosome 3p allelotyping of human lung cancer and preneoplastic/preinvasive bronchial epithelium reveals multiple, discontinuous sites of 3p allele loss and three regions of frequent breakpoints. *Cancer Research* 60(7): 1949-1960 (2000).

Wistuba II, Gazdar AF, Minna JD. Molecular genetics of small cell lung carcinoma. *Seminars in Oncology* 28(Suppl 4): 3-13 (2001).

Woenckhaus M, Grepmeier U, Wild PJ, Merk J, Pfeifer M, Woenckhaus U, Stoelcker B, Blaszyk H, Hofstaedter F, Dietmaier W, Hartmann A. Multitarget FISH and LOH analyses at chromosome 3p in non-small cell lung cancer and adjacent bronchial epithelium. *American Journal of Clinical Pathology* 123: 752-761 (2005).

Woo Y, Wright SM, Maas SA, Alley TL, Caddle LB, Kamdar S, Affourtit J, Foreman O, Akeson EC, Shaffer D, Bronson RT, Morse HC 3rd, Roopenian D,

Mills KD. The nonhomologous end joining factor Artemis suppresses multi-tissue tumor formation and prevents loss of heterozygosity. *Oncogene* 26: 6010-6020 (2007).

Wooten-Blanks LG, Song P, Senkal CE, Ogretmen B. Mechanisms of ceramide-mediated repression of the human telomerase reverse transcriptase promoter via deacetylation of Sp3 by histone deacetylase 1. *The FASEB Journal* 21(12): 3386-3397 (2007).

Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Experimental Gerontology* 27: 383-389 (1992).

Wright WE, Shay JW. Telomere-binding factors and general DNA repair. *Nature Genetics* 37: 116-118 (2005).

Wu G, Lee WH, Chen PL. NBS1 and TRF1 colocalize at promyelocytic leukemia bodies during late S/G2 phases in immortalized telomerase-negative cells: implication of NBS1 in alternative lengthening of telomeres. *The Journal of Biological Chemistry* 275: 30618-30622 (2000).

Wu TC, Lin P, Hsu CP, Huang YJ, Chen CY, Chung WC, Lee H, Ko JL. Loss of telomerase activity may be a potential favorable prognostic marker in lung carcinomas. *Lung Cancer* 41: 163-169 (2003).

Wu W, Liu H, Lei R, Chen D, Zhang S, Lv J, Wang Y, Fan W, Qian J, Jin G, Ma H, Miao R, Hu Z, Wang H, Jin L, Wei Q, Shen H, Huang W, Lu D. Genetic variants in GTF2H1 and risk of lung cancer: A case-control analysis in a Chinese population. *Lung Cancer* doi:10.1016/j.lungcan.2008.05.014 (2008).

Wu X, Amos CI, Zhu Y, Zhao H, Grossman BH, Shay JW, Luo S, Hong WK, Spitz MR. Telomere dysfunction: a potential cancer predisposition factor. *Journal of the National Cancer Institute* 95(16): 1211-1217 (2003).

X

Xi L, Chen G, Zhou J, Xu G, Wang S, Wu P, Zhu T, Zhang A, Yang W, Xu Q, Lu Y, Ma D. Inhibition of telomerase enhances apoptosis induced by sodium butyrate via mitochondrial pathway. *Apoptosis* 11(5): 789-798 (2006).

Xiao H, Pearson A, Coulombe B, Truant R, Zhang S, Regier JL, Triezenberg SJ, Reinberg D, Flores O, Ingles CJ, et al. Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Molecular and Cell Biology* 14: 7013-7024 (1994).

Xinarianos G, Liloglou T, Prime W, Maloney P, Callaghan J, Fielding P, Gosney JR, Field JK. hMLH1 y hMSH2 expression correlates with allelic imbalance on chromosome 3p in non-small cell lung carcinomas. *Cancer Research* 60: 4216-4221 (2000).

Y

Yamaguchi H, Calado RT, Ly H, Kajigaya S, Baerlocher GM, Chanock SJ, Lansdorp PM, Young NS. Mutations in TERT, the gene for telomerase reverse transcriptase, in aplastic anemia. *The New England Journal of Medicine* 352: 1413-1424 (2005).

Yang Q, Zheng YL, Harris CC. POT1 and TRF2 cooperates to maintain telomeric integrity. *Molecular and Cellular Biology* 25: 1070-1080 (2005).

Ye JZ, Hockemeyer AN, Krutchinsky AN, Loayza D, Hooper BT, Chait BT, De Lange T. POT1-interacting protein PIP1: a telomere length regulator that recruits POT1 to the TIN2/TRF1 complex. *Genes and Development* 18: 1649-1654 (2004a).

Ye JZ, Donigian JR, van Overbeek M, Loayza D, Luo Y, Krutchinsky AN, Chait BT, De Lange T. TIN2 binds TRF1 and TRF2 simultaneously and stabilizes the TRF2 complex on telomeres. *The Journal of Biological Chemistry* 279(45): 47264-47271 (2004b).

Yeager TR, Neumann AA, Englezou A, Huschtscha LI, Noble JR, Reddel RR. Telomerase-negative immortalized human cells contain a novel type of promyelocytic leukemia (PML) body. *Cancer Research* 59: 4175-4179 (1999).

Yim HW, Slebos RJ, Randell SH, Umbach DM, Parsons AM, Rivera MP, Detterbeck FC, Taylor JA. Smoking is associated with increased telomerase activity in short-term cultures of human bronchial epithelial cells *Cancer Letters* 246: 24-33 (2007).

Yu CE, Oshima J, Fu YH, Wijsman EM, Hisama F, Alisch R, Matthews S, Nakura J, Miki T, Ouais S, Martin GM, Mulligan J, Schellenberg GD. Positional cloning of the Werner's syndrome gene. *Science* 12;272(5259): 258-262 (1996).

Yuan X, Ishibashi S, Hatakeyama S, Saito M, Nakayama J, Nikaido R, Haruyama T, Watanabe Y, Iwata H, Iida M, Sugimura H, Yamada N, Ishikawa F. Presence of telomeric G-strand tails in the telomerase catalytic subunit TERT knockout mice. *Genes Cells* 4: 563-572 (1999).

Z

Zabarovsky ER, Lerman MI, Minna JD. Tumor suppressor genes on chromosome 3p involved in the pathogenesis of lung and other cancers. *Oncogene* 21(45): 6915-6935 (2002).

Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjöld M, Zetterberg A, Björkholm M,

Gruber A, Xu D. Frequent amplification of the telomerase reverse transcriptase gene in human tumors. *Cancer Research* 60(22): 6230-6235 (2000).

Zhang X, Succi J, Feng Z, Prithivirajasingh S, Story MD, Legerski RJ. Artemis is a phosphorylation target of ATM and ATR and is involved in the G2/M DNA damage checkpoint response. *Molecular and Cell Biology* 24(20): 9207-9220 (2004).

Zhou XZ, Lu KP. The Pin2/TRF1-interacting protein PinX1 is a potent telomerase inhibitor. *Cell* 107(3): 347-359 (2001).

Zhu H, Fu W, Mattson MP. The catalytic subunit of telomerase protects neurons against amyloid beta-peptide-induced apoptosis. *Journal of Neurochemistry* 75(1): 117-124 (2000).

Zhu XD, Küster B, Mann M, Petrini JH, De Lange T. Cell-cycle-regulated association of RAD50/MRE11/NBS1 with TRF2 and human telomeres. *Nature Genetics* 25: 347-352 (2000).

Zhu XD, Niedernhofer L, Kuster B, Mann M, Hoeijmakers JH, de Lange T. ERCC1/XPF removes the 3' overhang from uncapped telomeres and represses formation of telomeric DNA-containing double minute chromosomes. *Molecular Cell* 12: 1489-1498 (2003).

Zhu Y, Tomlinson RL, Lukowiak AA, Terns RM, Terns MP. Telomerase RNA accumulates in Cajal bodies in human cancer cells. *Molecular Biology of the Cell* 15(1): 81-90 (2004).

Zimmermann S, Glaser S, Ketteler R, Waller CF, Klingmüller U, Martens UM. Effects of telomerase modulation in human hematopoietic progenitor cells. *Stem Cells* 22(5): 741-749 (2004).

Zochbauer-Muller S, Gazdar AF, Minna JD. Molecular pathogenesis of lung cancer. *Annual Review of Physiology* 64:681-64708 (2002).

Zurita M, Merino C. The transcriptional complexity of the TFIID complex. *Trends in Genetics* 19(10): 578-584 (2003).