

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BARCELONA

Departamento de Medicina

Facultad de Medicina

**Telomerasa: regulación,
diana terapéutica y significado clínico en
neoplasias humanas**

Memoria para optar al grado de Doctor en Medicina y Cirugía

Joan Albanell Mestres

Directores de la tesis:

Dr. Joseph M. Baselga Torres

Dr. Malcom A.S. Moore

Servicio de Oncología

Hospital Universitari Vall d'Hebron

Barcelona, octubre 2000

A Begoña, Irene i Joan

Als meus pares, germans i nebots

ÍNDICE

PREÁMBULO	4
ANTECEDENTES	7
Introducción	8
Senescencia replicativa como mecanismo de supresión tumoral: El límite de Hayflick	8
Telómeros, problema de replicación terminal y telomerasa	10
Telomerasa, telómeros e inmortalización celular	15
Expresión de telomerasa en tejido normal y tumoral humano	19
Modelos murinos	22
TRABAJOS EXPERIMENTALES INICIALES	26
Inhibidores de telomerasa en modelos preclínicos	29
Regulación de telomerasa en cultivos celulares Regulación de telomerasa durante la diferenciación de células tumorales	36
Regulación de telomerasa y telómeros en cultivos hematopoyéticos	39

Importancia de la composición histológica de tumores humanos en la determinación de telomerasa y longitud telomérica	41
ARTÍCULOS DE TESIS _____	43
<i>High telomerase activity in primary lung cancers; increased proliferation rates and advanced stage.</i>	
J Natl Cancer Inst, 1997	45
<i>Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas.</i> J Natl Cancer Inst, 1999	46
Resultados y discusión	47
Telomerasa y cáncer de pulmón	47
Telomerasa y tumores de células germinales	54
CONCLUSIONES _____	58
BIBLIOGRAFÍA _____	62
APÉNDICE: OTRAS PUBLICACIONES _____	78

PREÁMBULO

PREÁMBULO

Una serie de observaciones experimentales, tanto *in vitro* como *in vivo*, que asociaban telomerasa, inmortalidad celular y cáncer (1), llevaron a mediados de la década de los años 90 al concepto de telomerasa como una nueva molécula implicada en la adquisición del fenotipo maligno y expresada en la mayoría de tumores. Los siguientes pasos en el campo a nivel de investigación translacional incluyeron entre otros la caracterización de mecanismos reguladores de su activación, la caracterización de su expresión en tumores, y su valor potencial en diagnóstico y pronóstico de los distintos tipos de neoplasias sólidas y hematológicas. Además, el hecho de que la actividad telomerasa estuviera expresada en tumores malignos, pero no en la mayoría de células normales, convirtió a esta enzima en una diana terapéutica atractiva. La remortalización de los tumores malignos mediante inhibición de telomerasa debería contar con dos características importantes: amplio espectro antitumoral y alta especificidad.

En 1995 se iniciaron una serie de líneas de investigación sobre telomerasa en el *James Ewing Laboratory of Developmental Hematopoiesis* (Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center). Durante mi estancia en este laboratorio participé en diversos de los proyectos sobre telomerasa, cuyos resultados constituyen esta memoria.

La memoria consta de tres apartados. En un primer apartado se revisan brevemente los antecedentes sobre telomerasa, telómeros, inmortalidad celular y cáncer.

En el segundo apartado se presentan una serie de trabajos experimentales en los que analizamos aspectos de regulación de telomerasa en cultivos celulares, potencial como diana terapéutica y estudios iniciales en tumores humanos. Las publicaciones derivadas de estos estudios se presentan en un apéndice de la memoria.

El tercer apartado consiste en la presentación de los dos artículos de tesis que siguen las líneas de investigación previas en las que participé. En estos dos trabajos se caracteriza la expresión de actividad telomerasa en tumores pulmonares (2) y en tumores de células germinales (3). La presentación de los dos artículos se acompaña de una breve discusión de los resultados de los mismos.

ANTECEDENTES

ANTECEDENTES

Introducción

El cáncer es el resultado de múltiples alteraciones genéticas sucesivas que confieren a las células transformadas una serie de características que las distinguen de las células no transformadas. Estas características incluyen; capacidad de crecimiento autónomo, evasión de apoptosis, insensibilidad a señales antiproliferativas, capacidad de invasión tisular y formación de metástasis, e inducción y mantenimiento de la angiogénesis (4). Además, las células malignas deben adquirir un potencial de replicación ilimitado (inmortalidad celular) para la formación de tumores avanzados en humanos.

Senescencia replicativa como mecanismo de supresión tumoral: El límite de Hayflick

Hace más de 30 años Hayflick y Moorhead describieron que los fibroblastos humanos normales tienen una capacidad de replicación limitada en cultivo (5-7). Otros tipos de células, tales como células epiteliales, mioblastos, astrocitos, y linfocitos, también presentan una capacidad limitada de proliferación (8-10). Estas observaciones llevaron a formular la hipótesis de que las células somáticas normales tienen un “reloj mitótico” que cuenta el número de divisiones celulares, y que las células pierden su capacidad proliferativa tras un número crítico de divisiones. La máxima capacidad de división en cultivo de

células somáticas humanas procedentes de donantes jóvenes oscila entre 50 y 100 duplicaciones, y este límite (conocido como el límite de Hayflick) se reduce a medida que la edad del donante aumenta, presumiblemente debido a la historia replicativa de las células *in vivo*. Cuando una célula normal agota su capacidad de replicación, adquiere un estado de senescencia celular asociado a un bloqueo irreversible del crecimiento.

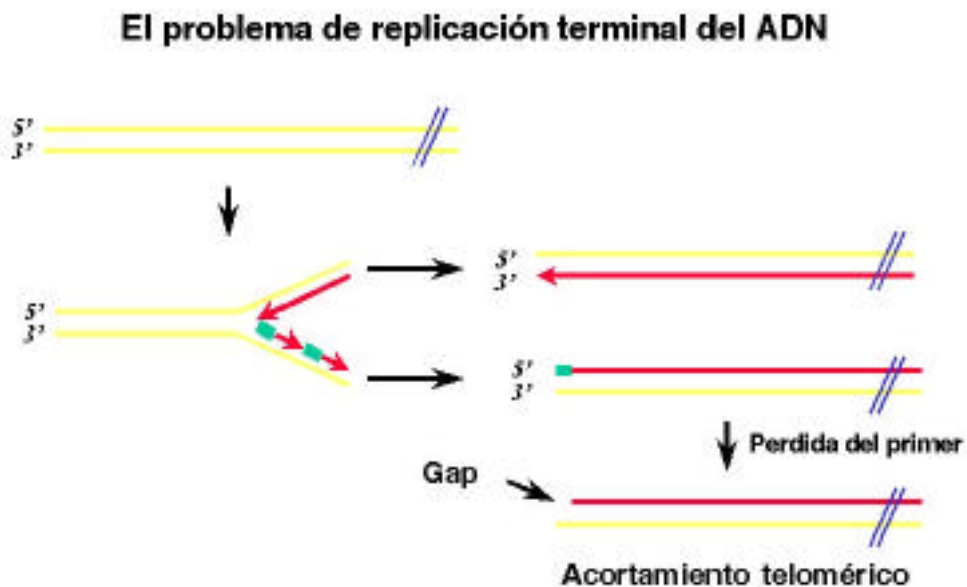
La selección y expansión clonal necesaria para la formación de tumores avanzados requiere, con algunas excepciones, que las células se dividan un número de veces muy superior al límite de Hayflick (11, 12). Sin embargo, el crecimiento exponencial de una célula durante 50 a 100 duplicaciones puede generar una masa de 10^{12} a 10^{18} kilogramos. Por tanto, *a priori* el límite de Hayflick no debería limitar la formación de tumores letales. Esta paradoja se resuelve si consideramos dos características importantes del crecimiento tumoral. En primer lugar, la naturaleza de la tumorigénesis, basada en múltiples sucesos independientes sugiere que pueden requerirse varias rondas de 20 o más divisiones celulares en cada expansión clonal sucesiva durante la tumorigénesis. En segundo lugar, la fracción de crecimiento es generalmente baja, la fracción de muerte celular (por apoptosis o necrosis) es alta, y la división de los tumores es asincrónica; por ello, la tasa de recambio de las células cancerosas es mucho más rápida que la tasa de doblamiento tumoral. Estos factores mantienen la masa tumoral con un valor mucho menor que su valor teórico. Así, es probable que sean necesarias más de 50 o 100 divisiones celulares para completar el proceso de tumorigénesis, lo que sugiere que uno de los pasos claves en la patogénesis de la mayoría de neoplasias es la

adquisición de inmortalidad celular y que el límite generacional de las células somáticas normales se convierte en un mecanismo supresor de tumor.

Telómeros, problema de replicación terminal y telomerasa

Recientemente se ha establecido que el mecanismo que cuenta las divisiones celulares son los telómeros, tal como se había propuesto en los años 70 (12-14). Los telómeros humanos son estructuras nucleoprotéicas esenciales situadas en los extremos de los cromosomas, compuestos de varios centenares de repeticiones de la secuencia 5'-TTAGGG-3' (5-15 kilo pares de bases [kbp]) (11, 12, 15, 16) asociados a proteínas (17, 18). Los telómeros distinguen entre los extremos naturales de los cromosomas y puntos de ruptura, y estabilizan a los cromosomas frente a problemas de degradación o de recombinación ilegítima. Los telómeros también pueden estar implicados en la organización de los cromosomas dentro del núcleo (15). No obstante, los extremos del ADN lineal no pueden ser replicados completamente por el complejo de ADN polimerasa convencional, que requiere un *primer* de ARN lábil para iniciar la síntesis de ADN en la dirección 5' a 3' (Figura 1). En ausencia de un mecanismo capaz de compensar este problema de replicación terminal, en cada división celular se pierden 50-100 pares de bases de ADN telomérico. La erosión sucesiva de los telómeros en cada división celular finalmente resulta en la pérdida de su capacidad para proteger los extremos de los cromosomas y en pérdida de material genético.

Figura 1. El problema de replicación terminal del ADN. La parte superior del diagrama muestra una doble cadena de ADN lineal (*líneas amarillas*). A medida que la horquilla de replicación avanza, la síntesis de la cadena delantera es continua (*flecha roja continua*) y procede en la dirección 5' a 3' hasta el final del extremo 3' de la cadena original. La síntesis de la cadena rezagada es discontinua, y consiste en fragmentos de Okazaki (*flechas rojas discontinuas*), que se inician a partir de un *primer* de ARN lábil (*rectángulos verdes*). Después de la eliminación del *primer* de ARN y de la extensión y ligación del fragmento de Okazaki, el fragmento de Okazaki localizado más próximo al extremo 3' es incompleto, dado que el último *primer* de ARN no puede sustituirse por ADN. El efecto neto es la pérdida de una pequeña cantidad de ADN en el extremo 5' del ADN sintetizado *de novo* (gap) en cada ronda de división celular (50-100 pares de bases/división).



La mayoría de especies eucariotas utilizan una transcriptasa reversa especializada, la telomerasa, para compensar el problema de replicación terminal y regenerar el ADN telomérico *de novo* (Figura 2 y 3) (19, 20). Esta enzima es una ADN polimerasa dependiente de ARN (transcriptasa reversa) que lleva su propia plantilla de ARN para la síntesis de ADN. El centro catalítico de la telomerasa humana está compuesto de una subunidad de ARN (hTR; *human Telomerase RNA*)(21) que sirve de plantilla para la adición de secuencias teloméricas y una proteína (hTERT; *human Telomerase Reverse Transcriptase*)(22) que cataliza la reacción de síntesis *de novo* de GGTTAG en el extremo del cromosoma (20) (Figura 2). Se cree que la subunidad de ARN se une al fragmento de ADN telomérico del extremo distal del cromosoma, y después la transcriptasa reversa cataliza la adición de deoxinucleótidos en el extremo 3' de la secuencia repetitiva. Entonces, la subunidad de ARN se transloca al extremo 3' de ADN telomérico sintetizado *de novo* (Figura 3). Además de la hTR y hTERT, se ha clonado el gen de otra proteína asociada a telomerasa de función desconocida, denominada TP1 (23). Estudios de reconstitución *in vitro* han demostrado que los componentes de ARN (hTR) y la transcriptasa reversa (hTERT) son suficientes para reconstituir la actividad de la telomerasa (24, 25) y se ha establecido que hTERT es el componente limitante de esta actividad.

Figura 2. Representación esquemática de la telomerasa.

Telomerasa

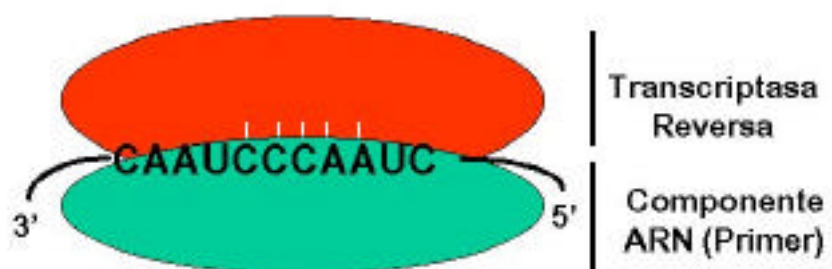
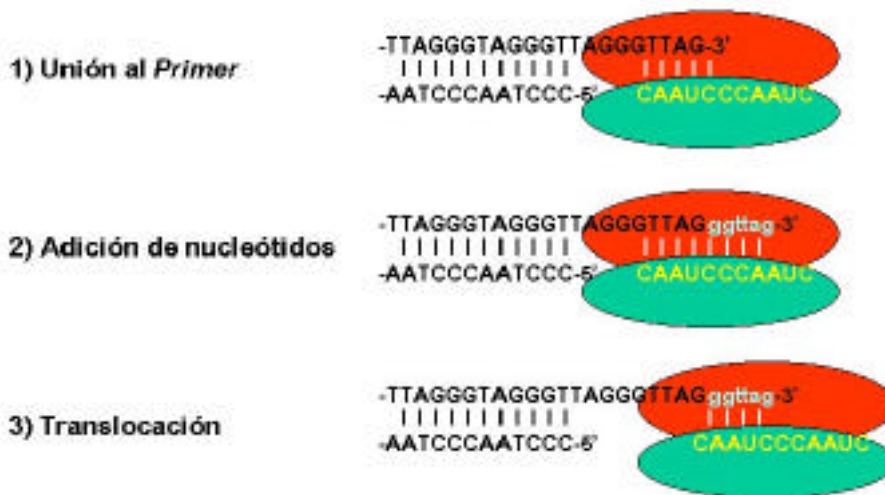


Figura 3. Modelo de acción procesivo de la telomerasa para compensar el problema de replicación terminal. El dominio de copia del componente de ARN de la telomerasa humana se muestra alineado frente a un extremo 3' arbitrario de un telómero humano. Esta configuración *primer*-plantilla de ADN permite la extensión del telómero (*letras minúsculas*) en la primera ronda de elongación hasta que el producto extendido alcanza el extremo 3' del dominio de copia. Posteriormente la translocación traslada al ADN extendido hacia atrás, hasta la posición que corresponde a una secuencia telomérica repetitiva menos, y así queda en posición para otra ronda de elongación en la que se añade una secuencia repetitiva completa (ggtag) al extremo 3' del cromosoma.

Mecanismo de acción de la telomerasa



Telomerasa, telómeros e inmortalización celular

Múltiples líneas de evidencia han establecido una asociación entre telomerasa, telómeros e inmortalidad celular. La expresión específica de telomerasa en células inmortales, pero no en la mayoría de células mortales, fue descrita inicialmente *in vitro* utilizando células embriónicas renales humanas transformadas por el antígeno T, y linfocitos B humanos transformados por el virus de Epstein-Barr (VEB) (26, 27). En estos estudios, los extractos de células somáticas normales no mostraron actividad de telomerasa, y sufrían una pérdida gradual del ADN telomérico a medida que las células se replicaban. Los extractos obtenidos a partir de células transfectadas (antígeno T) o infectadas (VEB) fueron también negativas en cuanto a detección de actividad de telomerasa durante las primeras 60 a 100 divisiones celulares, indicando que el agente transformante inicial no activaba por sí mismo la telomerasa. Los telómeros se acortaban con cada división celular, más allá de la longitud límite a partir de la que las células somáticas normales presentan senescencia. Finalmente, una subpoblación celular, quizás procedente de una sola clona celular, sobrevivió a una "crisis" de la población celular y estabilizó la longitud de sus telómeros concomitantemente con la activación de telomerasa.

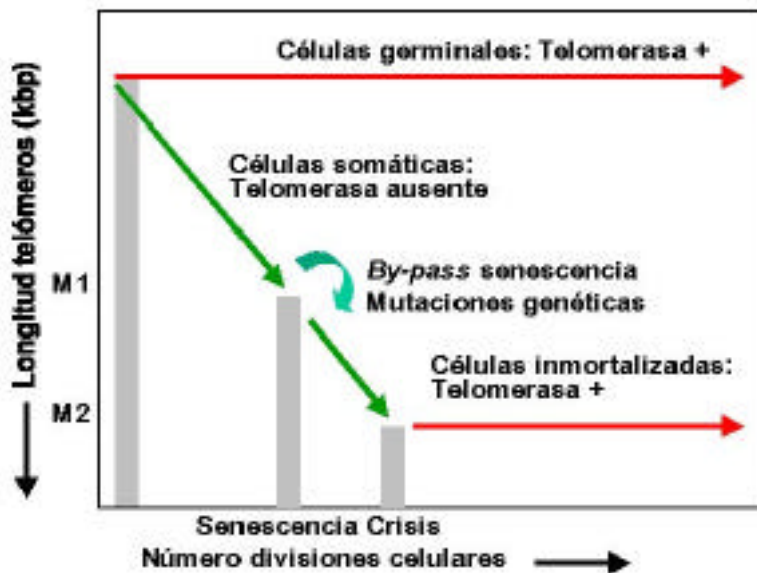
Hay evidencias *in vivo* que confirman el concepto de una asociación entre telomerasa, telómeros y potencial replicativo. Las células y tejidos somáticos normales, que mayoritariamente no tienen actividad telomerasa, experimentan un acortamiento progresivo de los telómeros (8, 9), y la longitud de los telómeros con frecuencia refleja su historia replicativa (9, 10, 28). En cambio, las células y tejidos germinales y la mayoría de líneas celulares humanas

inmortalizadas muestran actividad de telomerasa y una longitud estable de los telómeros (1, 11, 27). Además, la mayoría de tumores humanos exhiben actividad de telomerasa (1, 29). Colectivamente, estas evidencias sugerían que la activación de la telomerasa estaba asociada a la adquisición del fenotipo maligno y llevaron a formular la hipótesis de la telomerasa e inmortalización celular.

En base a esta hipótesis, existe una primera etapa en la que las células somáticas normales, que carecen de actividad telomerasa, pierden longitud telomérica con cada división celular y tras un número limitado de divisiones (50-100; límite de Hayflick) entran en un estado de senescencia celular (fase de mortalidad M1) (Figura 4) (30). Esta fase M1 probablemente ocurre cuando unos pocos telómeros se acortan lo suficiente como para que los extremos distales de los cromosomas dejen de estar totalmente enmascarados y entonces son reconocidos como roturas de la doble cadena que necesitan ser reparadas (16, 31). La senescencia de las células en cultivo puede superarse mediante la inactivación del gen supresor de tumor p53 y pRb, lo que capacita a las células para extender (pero no ilimitadamente) su capacidad replicativa hasta que entran en una segunda fase de mortalidad denominada crisis (M2). La fase de crisis se caracteriza por muerte celular masiva, alteraciones cariotípicas asociadas a fusiones cromosómicas, apoptosis, y a la aparición ocasional (1 en 10^7) de una célula que ha adquirido un potencial replicativo indefinido (inmortalidad).

Figura 4. Hipótesis de la telomerasa e inmortalización celular. La telomerasa es activa en células germinales y mantiene la longitud de los telómeros estable (longitud de los fragmentos de restricción terminal [TRF] de aproximadamente 15 kpb). No obstante, la actividad de telomerasa está reprimida en la mayoría de células somáticas normales y como consecuencia las células pierden longitud en sus telómeros a medida que se dividen (aproximadamente 50 a 100 pares de bases por división celular) hasta que se alcanza la fase 1 de mortalidad (M1, o límite de Hayflick). Al alcanzar la fase M1, la pérdida telomérica crítica de uno, o quizás varios, cromosomas señala una detención irreversible del ciclo celular (longitud de telómeros estimada [TRF] de 5 a 7 kpb). Los eventos transformantes, tales como la expresión de oncogenes o la inactivación de genes supresores de tumor, pueden permitir que las células superen la fase M1 sin activar la telomerasa. Cuando los telómeros se acortan críticamente en un gran número de cromosomas, las células entran en crisis (M2), momento en el que existe gran inestabilidad genética. Sólo clonas aisladas que activan la telomerasa escapan de la fase M2, estabilizan los cromosomas, y adquieren una capacidad de crecimiento indefinida.

Telomerasa, telómeros e inmortalidad celular



Posteriormente a la formulación de esta hipótesis, se ha demostrado experimentalmente el papel de la telomerasa en la inmortalización celular. La expresión ectópica del componente catalítico de la telomerasa humana (hTERT), que es el componente limitante de la actividad telomerasa, confiere un potencial de replicación indefinido a una variedad de tipos celulares presenescentes (32). Además, la actividad telomerasa es suficiente para que células transformadas proliferen más allá del estadio de mortalidad M2 sin evidencia de crisis. Sin embargo, la inmortalidad celular no es universal en células con expresión ectópica de hTERT (33). Finalmente, la inhibición de actividad telomerasa por expresión de ARN antisentido (21) y, sobretodo, por la expresión de una forma dominante negativa de hTERT, induce acortamiento telomérico y remortalización celular (34). Notablemente, la inhibición de telomerasa suprime el crecimiento de células malignas humanas *in vivo* en modelos animales (34). Además, la expresión ectópica de telomerasa en células humanas somáticas normales en cultivo, en conjunción con una serie limitada de cambios oncogénicos, contribuye a la transformación maligna (34-36).

Se ha descrito que una minoría de líneas celulares inmortalizadas mantienen los telómeros por un mecanismo independiente de telomerasa, ya que carecen de niveles detectables de esta actividad enzimática y presentan telómeros anormalmente largos (37-39). Este mecanismo se denomina elongación alternativa de los telómeros y podría deberse a fenómenos de recombinación genética. Algunos tipos de cánceres humanos incluyen una

población minoritaria de tumores que carecen de actividad telomerasa y presumiblemente podrían haber adquirido este mecanismo alternativo de inmortalización (37-39).

Expresión de telomerasa en tejido normal y tumoral humano

El primer estudio de actividad de telomerasa en una serie amplia de células y tejidos humanos normales y malignos mostró que se podía detectar esta actividad en prácticamente todos los tumores y líneas inmortales humanas mientras que no se detectaba en los tejidos normales, excepto en las células germinales de ovario y testículos (1). La actividad telomerasa se determinó por un método desarrollado por los autores basado en PCR denominado TRAP (*Telomerase Repeat Amplification Protocol*) (Figura 5) (1). La expresión de telomerasa en la mayoría de tumores humanos fue confirmada posteriormente por otros grupos (29, 40-53).

Además de la expresión de telomerasa en tumores, se observó posteriormente al estudio pivotal (1) que muchos tejidos normales con alta capacidad regenerativa, como células progenitoras hematopoyéticas, queratinocitos basales o células crípticas intestinales, presentan también actividad de telomerasa, en general a niveles más bajos que en tumores (54, 55). En el caso de las células hematopoyéticas, se ha detectado un nivel bajo de actividad telomerasa en algunos subtipos de células hematopoyéticas (9). Sin embargo, experimentos realizados en cultivos *ex vivo* de células hematopoyéticas humanas demostraron que la presencia de un nivel bajo de

actividad telomerasa en células hematopoyéticas reduce, más que evita, la pérdida de ADN asociada a la proliferación celular y por lo tanto parece que la telomerasa puede prolongar (pero no indefinidamente) el potencial replicativo celular (Ver Apéndice, Ref. (55)). En cambio, la mayoría de células neoplásicas inmortales tienen alta actividad de telomerasa y una longitud estable de los telómeros.

Figura 5. Protocolo de amplificación de las secuencias repetitivas teloméricas (TRAP, *Telomeric Repeat Amplification Protocol*) (1). El TRAP es un método de dos etapas que utiliza la actividad de la telomerasa *in vitro* y la reacción de la polimerasa en cadena (PCR). En la primera etapa, la telomerasa reconoce un oligonucleótido no telomérico (TS) como sustrato y extiende el oligonucleótido con secuencias teloméricas repetitivas de novo durante un período de incubación de 10 minutos a temperatura ambiente. Al inicio de la segunda etapa, la telomerasa se inactiva mediante exposición a altas temperaturas a medida que se inicia el ciclo de PCR y el *primer* de retorno (CX) complementario a la secuencia telomérica se une al producto de la telomerasa. Entonces la Taq polimerasa de ADN sintetiza la segunda cadena de ADN. Los productos de dos cadenas (duplex) se amplifican posteriormente durante 25 a 35 ciclos de PCR, durante los cuales el oligonucleótido TS, que está presente en exceso, se utiliza como *primer* delantero. Dado que la telomerasa es una enzima procesiva, los productos de la posterior reacción de PCR aparecen en los geles como una escalera de bandas a intervalos de seis nucleótidos (1ª banda, ---(GGTTAG)x1, 2ª banda, ---(GGTTAG)x2, etc). Los productos de PCR pueden detectarse mediante la incorporación de nucleótidos radioactivos o tinción con colorantes intercalantes (ver p.ej. figuras en artículos en pags. 43 a 46).

Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP)

PRIMER PASO: Reacción enzimática

Extracto celular/tisular + Primer A (Sustrato TS)

5' AATCCGTCGAGCAGATT 3'



5' AATCCGTCGAGCAGATT AG GGTTAG GGTTAG (GGTTAG)_n 3'

SEGUNDO PASO: Amplificación por PCR

Producto enzimático + Primer A (Sustrato TS) + Primer B (CX)

5' AATCCGTCGAGCAGATTAGGGTTAGGGTTAGGGTTAG GGTTAGGGT 3'

← 3' AATCCATTCCATTCCATTCC 5'

Modelos murinos

Los telómeros de los ratones son muchos más largos (40-60 kbp) que los humanos (5-15 kbp) y los ratones expresan de forma más general actividad telomerasa. Además, tanto las células murinas de ratón salvajes (competentes para actividad de telomerasa) como las células murinas telomerasa-negativas dejan de dividirse en cultivo tras 10-15 divisiones, antes de que se aprecie erosión significativa de los telómeros, lo que sugiere que la senescencia de células murinas *ex vivo* (a diferencia de lo que ocurre en células humanas) es independiente de los telómeros y de la telomerasa (56). A pesar de estas diferencias, una serie de estudios llevados a cabo en modelos murinos han contribuido significativamente al conocimiento de la relación entre telomerasa, telómeros e inmortalidad celular y especialmente a caracterizar *in vivo* los efectos de la inhibición crónica de telomerasa en ratones transgénicos sobre tejidos normales y sobre el desarrollo de cánceres (57, 58).

En dos modelos de ratones transgénicos de tumorigénesis, uno de carcinoma de células insulares de páncreas y uno de carcinoma de células escamosas de piel, se examinó la actividad de telomerasa y la expresión del componente de ARNm de telomerasa murino (mTR, *murine Telomerase RNA*) (59, 60). En los dos modelos examinados, sólo se detectó actividad telomerasa en los tumores más avanzados, mientras que en lesiones preneoplásicas se detectaban mayores niveles de expresión de mTR que los tejidos normales, y esta expresión aumentaba en tumores avanzados.

Los niveles de mTR no seguían una correlación con la actividad de telomerasa y su expresión precedió a la reactivación de la actividad telomerasa (60). De forma similar, se ha descrito que la subunidad catalítica de la

telomerasa murina (mTERT, *mouse Telomerase Reverse Transcriptase*), se expresa durante el desarrollo embrionario, sobretodo en las regiones más proliferativas. La expresión de ARNm de mTERT es independiente de la expresión del componente de ARN de la telomerasa murina (mTR) y colocaliza con la presencia de actividad de telomerasa (61).

En ratones transgénicos con ausencia del componente de ARN de telomerasa murino (mTR), la pérdida progresiva de longitud de los telómeros limita el crecimiento celular. Dependiendo del entorno genético, los ratones deficientes en mTR sobreviven entre 4 y 6 generaciones sin cambios detectables en su fenotipo. En cada generación sucesiva se estima la pérdida de unos 100 pares de bases de ADN telomérico por división celular (56). A partir de la cuarta-sexta generación, un número suficiente de telómeros alcanzan una longitud crítica como para demostrar que el mantenimiento de los telómeros es esencial para una serie de órganos. En generaciones posteriores, los ratones presentan anomalías en órganos con alta tasa proliferativa, tales como testículos, médula ósea y bazo, y pierden su capacidad para reproducirse (62). Estos ratones muestran además una reacción inmunológica alterada, sugiriendo un papel de la actividad de telomerasa y regulación de los telómeros en la respuesta mediada por anticuerpos (63). El largo intervalo entre la pérdida de actividad telomerasa y la aparición de un fenotipo alterado parece estar en relación a que los telómeros de los ratones son muy largos y por lo tanto deben sufrir múltiples rondas de replicación antes de que se acorten de forma crítica. En algunos entornos genéticos, se constata un aumento de defectos del tubo neural y una limitación de viabilidad tras sólo cuatro generaciones (64, 65).

La ausencia de actividad telomerasa en ratones transgénicos puede ser una barrera al inicio del cáncer. Sin embargo, los modelos murinos han añadido mayor complejidad al campo, dado que dependiendo del tipo celular y del entorno genético, la ausencia de actividad de telomerasa puede facilitar o prevenir el cáncer. En ratones deficientes en telomerasa, no hay evidencia de inhibición de la formación de tumores en las primeras generaciones. En generaciones tardías, los ratones deficientes en telomerasa muestran un moderado aumento en la incidencia de tumores espontáneas caracterizados por alta tasa de proliferación tales como linfomas y tumores germinales, posiblemente en relación a la inestabilidad cromosómica (66). Los efectos de la ausencia crónica de telomerasa sobre la formación de tumores parece depender además del tipo histológico tumoral. Recientemente se ha demostrado que ratones deficientes en telomerasa son resistentes al desarrollo de tumores de piel (67), especialmente en generaciones tardías. Esta reducción de la formación de tumores de piel estaba asociada a un acortamiento de los telómeros (67). En la misma línea de evidencia, en ratones deficientes en telomerasa y en el gen supresor de tumor INK4A (una mutación que confieren mayor riesgo de formación de tumores), las primeras generaciones siguen siendo muy propensos al desarrollo de cáncer, mientras que en generaciones más tardías estos ratones muestran telómeros disfuncionales y son más resistentes al cáncer (68). Notablemente, la reintroducción de mTR restaura significativamente el potencial oncogénico (68).

La pérdida de p53 aumenta la supervivencia celular en un contexto de disfunción persistente de los telómeros, permitiendo un acortamiento telomérico continuado y acumulación de aberraciones cromosómicas y aneuploidía. A

diferencia de los experimentos con ratones INK4 en los que el acortamiento de los telómeros inhibió la transformación maligna (68), la disfunción de los telómeros en fibroblastos p53 $-/-$ aumentó la eficiencia de transformación por oncogenes celulares (69). De forma similar, en ratones mutantes para p53 y deficientes en telomerasa, la disfunción de los telómeros aceleró el inicio del cáncer (70). De hecho, la crisis basada en el acortamiento telomérico en ratones heterocigotos para p53 promueve un marcado incremento en cánceres epiteliales, tales como carcinomas de mama, piel y colon (70). Estos resultados llevaron a los autores a proponer dos estadios independientes de crisis que difieren según la integridad de la vía de p53 de respuesta a daño sobre el ADN (57). A medida que las células entran en crisis, la disfunción de los telómeros activa p53, lo que resulta en inducción de quiescencia proliferativa o apoptosis. Alternativamente, la atenuación de este punto de control permite que las células se dividan adicionalmente y los telómeros se sigan acortando hasta llegar a una situación de catástrofe genética, en la que la marcada inestabilidad cromosómica resulta en cambios genómicos secundarios que pueden facilitar la carcinogénesis. La supervivencia celular tras la catástrofe genética requiere la adquisición de mecanismos de mantenimiento de los telómeros como la activación de telomerasa o la adquisición de mecanismos alternativos de elongación telomérica (37-39). Sin embargo, en cultivos de células tumorales humanas, la remortalización celular mediante inhibición de telomerasa fue independiente de p53, lo que sugiere que puede haber diferencias en los efectos de la inhibición de telomerasa y cáncer entre humanos y ratones (34).

TRABAJOS EXPERIMENTALES INICIALES

TRABAJOS EXPERIMENTALES INICIALES

En el *James Ewing Laboratory of Developmental Hematopoiesis*, (Sloan-Kettering Institute, Memorial Sloan-Kettering Cancer Center) participé en una serie de líneas de investigación sobre telomerasa con los siguientes objetivos:

1. Analizar inhibidores de telomerasa en modelos preclínicos.

- Desarrollar modelos preclínicos para el estudio de inhibidores de telomerasa; análisis de la longitud telomérica y de la actividad de telomerasa en un panel amplio de células tumorales humanas *in vitro* y en xenoinjertos tumorales.

- Investigar inhibidores de telomerasa en los modelos desarrollados a partir de los experimentos del punto anterior; screening *in vitro* de cambios de longitud telomérica y remortalización de líneas tumorales representativas de los principales tipos de tumores sólidos y leucemias; screening de cambios de longitud telomérica en tumores humanos trasplantados a ratones SCID tratados con inhibidores de telomerasa a distintas dosis/períodos/vías/esquemas. Determinar la capacidad para inhibir el desarrollo de tumores, regresión de tumores establecidos con/sin quimioterapia/agentes de diferenciación, y/o prevención de metástasis.

2. Investigar la regulación de telomerasa en cultivos celulares.

- Efecto de agentes diferenciadores y de ribozimas dirigidas contra los componentes de PML/RAR en células de leucemia promielocítica aguda, y sus efectos sobre telomerasa. Efecto de agentes diferenciaciones en células de cáncer embrionario sobre telomerasa.
- Regulación de telomerasa en cultivos hematopoyéticos *ex vivo*.

3. Analizar la expresión de telomerasa en una serie de tumores humanos.

- Caracterizar la influencia de la composición tumoral sobre la actividad telomerasa y longitud telomérica en un panel de tumores humanos.
- Caracterizar la actividad de telomerasa en cáncer de pulmón y determinar sus asociaciones clínicopatológicas.
- Caracterizar la actividad de telomerasa en cáncer de células germinales y en teratomas como modelo de diferenciación *in vivo*.

A continuación se resumen los resultados obtenidos de los distintos objetivos planteados. Los trabajos publicados como consecuencia de los resultados que se presentan en esta apartado constan en el Apéndice. Los dos trabajos que conforman la presentación de tesis en forma de recogida de artículos se presentan en un apartado independiente.

Inhibidores de telomerasa en modelos preclínicos

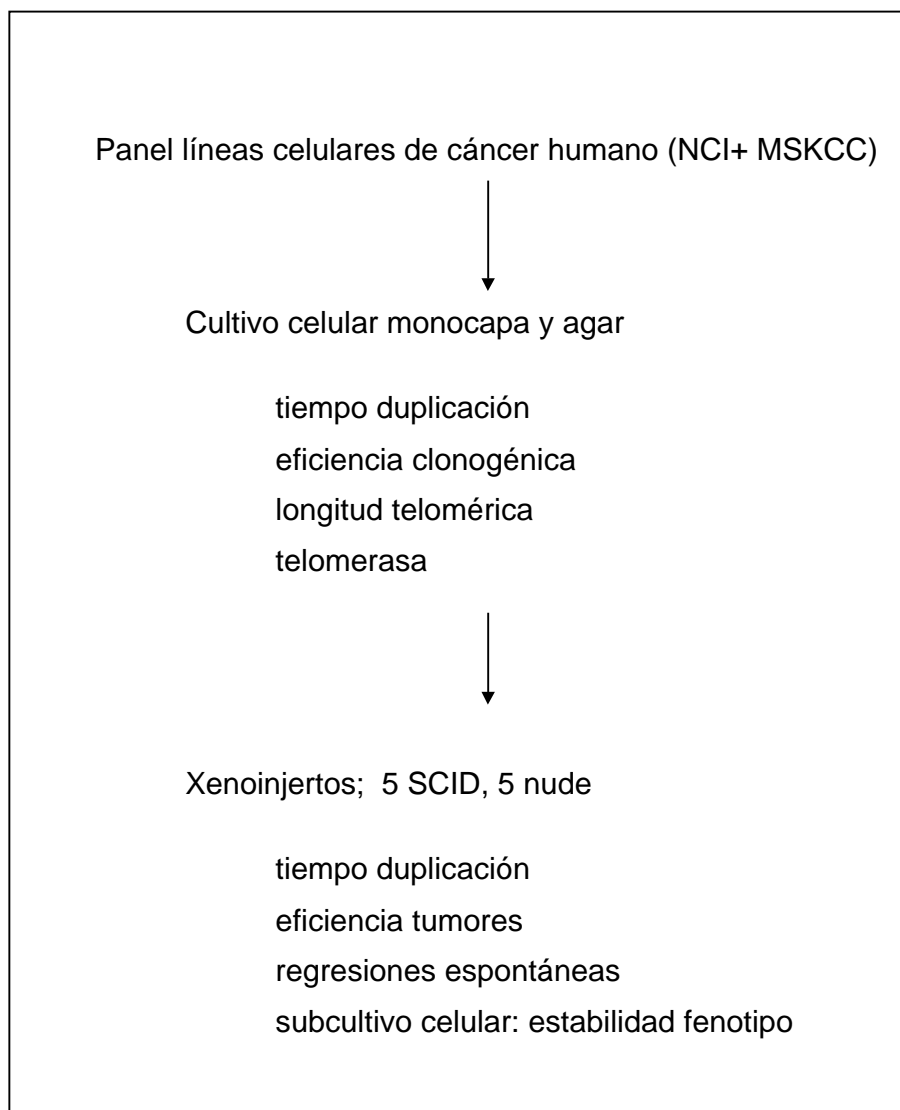
Considerando que la inmortalidad celular juega un papel central en cáncer, y que la telomerasa tiene el potencial de conferir a las células un potencial replicativo ilimitado (32), la inhibición de telomerasa sería una arma terapéutica importante para el tratamiento de las neoplasias. La remortalización de las células cancerosas debería reiniciar el acortamiento de los telómeros, y tras una serie adicional de duplicaciones celulares, estas deberían entrar en crisis (fase M2 de mortalidad celular).

Nuestro laboratorio fue designado para el estudio preclínico de inhibidores putativos de telomerasa para proporcionar las bases para que los compuestos más activos y prometedores fueron posteriormente analizados en ensayos clínicos en pacientes con cáncer. La compañía Geron Corporation (Menlo Park, CA, USA) realizaba un screening *in vitro* de compuestos candidatos y se seleccionaban aquellos más prometedores. Una vez que los compuestos seleccionados eran producidos a escala suficiente, se transferían al laboratorio del Dr. Malcolm Moore. Durante mi estancia en su laboratorio, tuve responsabilidad principal en el desarrollo de modelos preclínicos para investigar inhibidores putativos de telomerasa, y en el posterior screening en cultivo e *in vivo* de inhibidores de telomerasa.

Las células tratadas con un inhibidor de telomerasa entrarían en crisis sólo después de un número de divisiones celulares relacionado directamente con la longitud de los telómeros en el momento de iniciar el tratamiento (11), es decir la predicción era que células con telómeros cortos entrarían en crisis después

de pocas divisiones, mientras que células con telómeros largos precisarían mayor número de divisiones en presencia de inhibidor de telomerasa para que la erosión gradual de los telómeros llegara a la longitud crítica. Por lo tanto, el estudio preclínico de inhibidores de telomerasa precisaba la identificación de modelos óptimos para investigar los compuestos de Geron de forma eficiente. En anticipación de estos estudios, uno de los esfuerzos del laboratorio fue la selección de modelos. La Figura 6 presenta esquemáticamente el plan de screening para identificar y seleccionar estos modelos.

Figura 6. Plan de screening para optimizar modelos preclínicos para investigar compuestos inhibidores de telomerasa.



Las líneas celulares caracterizadas incluyen 54 líneas de cáncer de la colección del NCI, junto con 20 líneas adicionales de la colección del Memorial Sloan-Kettering Cancer Center. Cada línea celular fue caracterizada para determinar las condiciones óptimas de crecimiento en nuestros medios de cultivo, con determinación de la cinética de crecimiento (fase lag, tiempo de duplicación y densidad de plateau), eficiencia de crecimiento clonal en agar semisólido, nivel de actividad de telomerasa utilizando el método TRAP (Figura 4 y 5, ver p.e.j. figuras en artículos pags 43-46, Refs. (2, 3)), y estimación de la longitud telomérica. La longitud de los telómeros se analiza mediante digestión del ADN con una enzima de restricción que corta el ADN cromosómico justo a nivel proximal de los telómeros y libera los fragmentos de restricción terminal (TRF, *Terminal Restriction Fragments*) (8, 9). Posteriormente se realiza un *Southern blot* en el que los fragmentos de ADN se hibridan con un oligonucleótido radioactivo específico para las secuencias teloméricas de los fragmentos de restricción terminal. Los fragmentos de restricción terminales aparecen en los carriles de los geles como una banda amplia (*smear*) que refleja las variaciones de longitud de los TRFs de los distintos cromosomas y células presentes en cada muestra (ver p.e.j. figuras en artículos pags 43-46, Refs. (2, 3)). La longitud de los telómeros se estima en general a partir de la longitud promedio de los TRFs.

Identificamos una serie de líneas celulares representativas de los principales tipos de tumores con un tiempo de duplicación corto, elevada eficiencia de formación de colonias en agar y TRF corto. Estas líneas fueron seleccionadas para investigar los efectos inhibidores de telomerasa *in vitro*.

Analizamos en paralelo a los estudios de cultivo celular una serie de líneas para determinar si podían servir de buenos modelos para el estudio de inhibidores de telomerasa *in vivo*. Comparamos la eficiencia para el establecimiento de xenoinjertos de las líneas celulares tumorales humanas en ratones SCID *versus* ratones desnudos. Los ratones SCID exhibieron una mayor tasa de establecimiento de tumores, un crecimiento más rápido y una tasa de remisiones espontáneas inferior que los ratones desnudos. A partir de esta observación se decidió enfocar los estudios *in vivo* utilizando ratones SCID. Seleccionamos las líneas celulares con una eficiencia de formación de tumores del 100%, ausencia de regresiones espontáneas y crecimiento reproducible. Identificamos además líneas celulares productoras de metástasis en ratones. La Tabla 1 muestra las tres líneas celulares que reúnen todos los criterios anticipados para optimizar la investigación de inhibidores putativos de telomerasa, y estas líneas fueron utilizadas para el screening preclínico de los compuestos. Estas líneas deberían permitir el análisis de la inducción de “crisis” celular tras tiempos de exposición a los compuestos inhibidores de telomerasa inferiores a las dos semanas.

Durante mi estancia en el laboratorio realizamos el screening de siete compuestos candidatos inhibidores de telomerasa, identificados en sistemas *in vitro* en Geron, en los modelos desarrollados. Los resultados de los estudios con estos compuestos son hasta el momento confidenciales. Sin embargo,

evidencias posteriores derivadas de la utilización de dominantes negativos del componente catalítico de la telomerasa humana, o la inhibición de telomerasa por compuestos antisentido o ácidos nucleicos peptídicos en líneas de cáncer humano confirman la posibilidad de remortalizar las células neoplásicas mediante inhibición de telomerasa (34-36).

Tabla 1. Líneas celulares seleccionadas para la investigación preclínica de inhibidores de telomerasa.

	OVCAR-5	PC-3	NCI-H460
Origen	Ovario	Próstata	Pulmón (NSCLC)
IN VITRO			
Telomerasa	Positiva	Positiva	Positiva
TRF (kbp)	< 4	< 4	< 4
Duplicaciones/día	0.83	0.85	1.1
Número potencial de duplicaciones en sistema delta (3 semanas)	15	18	24
Densidad de plateau (cells/cm²)	1.9x10 ⁵	2.9x10 ⁵	1.1x10 ⁶
Eficiencia agar	10%	13%	4.4%
Tamaño colonias (células/colonia)	> 50	25-50	> 50
IN VIVO (SCID)			
Eficiencia implantación	100%	100%	100%
Regresiones	0	0	0
Tiempo promedio hasta 1 gramo	35 días	32 días	16 días

Regulación de telomerasa en cultivos celulares

Regulación de telomerasa durante la diferenciación de células tumorales

En diversas líneas de cáncer humano, la exposición a agentes diferenciadores provoca su maduración morfológica, suprime su proliferación y reduce su crecimiento clonogénico y tumorigenicidad. Estos cambios fenotípicos están asociados a cambios en la expresión de importantes genes reguladores que incluyen factores de transcripción, oncogenes, genes supresores de tumor y factores de crecimiento y sus receptores (71-75).

Nosotros formulamos la hipótesis de que la diferenciación de líneas celulares malignas podría reducir o suprimir la actividad de telomerasa de forma concomitante a la reducción del potencial tumorigénico de las células maduras. Para determinar los efectos de la diferenciación inducida de células tumorales sobre la actividad telomerasa, estudiamos inicialmente dos modelos tumorales humanos. Estos modelos eran:

- Clones celulares derivados de la línea de leucemia promielocítica aguda NB4; una sublínea sensible a la diferenciación con ácido *all-trans*-retinóico y otra resistente.

- Una línea celular de carcinoma embrionario multipotencial sensible a la diferenciación por ácido *all-trans*-retinóico y por hexametileno bisacetamida (HMBA) (denominado NTERA-2 clón D1, abreviado como NT2/D1), y dos de sus clones resistentes a diferenciación.

Los estudios realizados en estos modelos mostraron que la actividad telomerasa se reprime durante la diferenciación inducida de líneas celulares tumorales sensibles a la maduración, pero no en líneas resistentes (Ref (76), ver Apéndice). Se observó una relación dosis-respuesta entre agente inductor de diferenciación e inhibición de telomerasa. Los estudios de cinética sugirieron una relación mecanística entre la iniciación del programa de diferenciación tumoral y la regulación de la actividad de telomerasa. El compromiso de las células tumorales a diferenciarse tras la exposición a agentes inductores probablemente ocurre en las primeras 24-72 horas de exposición, precediendo al inicio de la inhibición de la actividad de telomerasa. Sin embargo, el inicio en la reducción en la actividad de telomerasa se observó antes de que se constatará maduración morfológica y puede ocurrir mientras las células todavía están proliferando, precediendo a la diferenciación terminal. Estos sugiere que la reducción de actividad está relacionada indirectamente con las acciones de cada agente diferenciador durante la progresión de cada programa de maduración. En estos modelos, los estados de diferenciación inducidos se correlacionaron inversamente con la actividad de telomerasa, es decir, las células más diferenciadas tenían menor actividad. Estos estudios mostraron que las células resistentes a la diferenciación no exhibían reducción de actividad de telomerasa cuando se exponían a ácido *all-trans*-retinóico o hexametileno bisacetamida, dos agentes que actúan por vías muy distintas (71, 77). Esto fue consistente tanto en células de leucemia promielocítica aguda como en células de carcinoma embrionario. Colectivamente, estas observaciones indicaron que la telomerasa es una enzima regulada durante la diferenciación de células humanas tumorales (76). En un trabajo posterior

caracterizamos la persistencia de actividad de telomerasa como un defecto común en una serie de células de leucemia promielocítica aguda derivadas de la línea NB4 (74) resistentes al ácido *all-trans*-retinóico (Ref. (78), ver Apéndice).

Siguiendo esta misma línea de trabajo, analizamos la relación entre diferenciación celular, telomerasa y expresión de la proteína asociada a telomerasa TP-1 (23) (Ref. (79), ver Apéndice). Para estos experimentos utilizamos una serie de sublíneas derivadas de la línea de leucemia promielocítica aguda humana, HL60, con distintos grados de resistencia a la diferenciación tras exposición a la 1,25D₃-dihidroxitamina D₃, pero sensible a otros inductores. En estos estudios, utilizando una variedad de agentes diferenciadores (ácido *all-trans*-retinóico, DMSO, TPA, D₃), la inhibición de la actividad de telomerasa en células sensibles a la diferenciación se asoció a una mayor expresión de la proteína asociada a telomerasa TP-1. Sin embargo, el papel fisiológico de esta proteína no está bien caracterizado y por lo tanto el significado de esta observación no queda aún definido (23).

Regulación de telomerasa y telómeros en cultivos hematopoyéticos

Si bien la mayoría de células somáticas carecen de actividad telomerasa, una serie de observaciones mostraron que las células hematopoyéticas primitivas humanas tienen actividad de telomerasa, si bien a niveles bajos (43, 80). Sin embargo, se había descrito un acortamiento de la longitud de los telómeros en leucocitos con el envejecimiento (10).

Esta observación, aparentemente discordante con el papel de la telomerasa en la estabilización de los telómeros, nos llevó a estudiar la regulación de telomerasa y de la longitud de los telómeros en células progenitoras hematopoyéticas humanas (Ref. (55), ver Apéndice). Analizamos células hematopoyéticas de distintos orígenes, tales como hígado fetal, sangre de cordón umbilical, sangre periférica, y médula ósea. Se detectó actividad de telomerasa en células CD34+/CD38+, y, en menor intensidad, en células CD34+/CD38-, CD34- , y células mononucleares. Cuando las células hematopoyéticas seleccionadas CD34+ se cultivaban *ex vivo* en sistemas de expansión delta en presencia de combinaciones de citocinas (KL, interleucina-3, interleucina-6, eritropoyetina, factor estimulante de colonias de granulocitos), la actividad de telomerasa incrementaba a las 48-72 horas, llegaba a un máximo al cabo de una semana de cultivo, y volvía a niveles basales o por debajo de nuestro límite de detección después de 3 o 4 semanas. La inhibición de telomerasa en las semanas 3 y 4 de expansión *ex vivo* estaba asociada a una reducción de la proliferación y a una mayor expansión de subgrupos celulares más maduros. Se constató una correlación entre actividad de telomerasa, ciclo celular determinado por incorporación de BrdU, e inducción de proteína de

retinoblastoma fosforilada, CDC2, CDK2, ciclina D1, y ciclina A, pero no con ciclina E y B1 después de 72 horas de cultivo en presencia de la adición exógena de múltiples citocinas. En cambio, la adición de citocinas antiproliferativas, tales como factor de crecimiento transformante-beta1 y altas concentraciones de ácido all-*trans*-retinóico, resultó en la reducción de la actividad de telomerasa.

En el sistema de expansión delta utilizado en estos estudios (81-83), las células hematopoyéticas son subcultivadas a intervalos semanales. Este sistema proporciona una expansión acumulativa de células totales y progenitoras, y por tanto duplicaciones celulares, superior a la que se consigue con otros sistemas. Por ello, pudimos analizar, además de la actividad de telomerasa, la longitud de los telómeros durante el crecimiento *ex vivo*. Las longitudes promedio de los telómeros fueron 10.4 kbp en células CD34+ obtenidas de sangre de cordón umbilical, 7.4 kbp en sangre periférica, y 7.6 kbp en médula ósea. En cultivos *ex vivo* delta, se observó una reducción en la longitud de los telómeros de 1 a 2 kbp durante las 4 semanas de cultivo delta. Sin embargo, la tasa de pérdida de pares de bases por duplicación celular fue significativamente menor durante las primeras dos semanas (cuando la actividad de telomerasa está aumentada), en comparación con las semanas 3 y 4 de cultivo (cuando la actividad de telomerasa vuelve a niveles basales o indetectables). En conjunto, estos estudios sugieren que la actividad telomerasa en células hematopoyéticas reduce, pero no previene completamente, el acortamiento de los telómeros asociado a la proliferación celular.

Importancia de la composición histológica de tumores humanos en la determinación de telomerasa y longitud telomérica

Una limitación potencial de los ensayos moleculares que utilizan homogenados tisulares es la inclusión de células no neoplásicas que pueden artefactar los resultados, especialmente si se quieren analizar los resultados de forma semicuantitativa o cuantitativa. Dado el interés creciente en la investigación de telomerasa y de la longitud telomérica como marcadores diagnósticos y pronósticos potenciales en tumores humanos, planteamos un estudio para determinar la contribución relativa de las células neoplásicas versus células normales, que co-existen en proporciones variables en los tumores, sobre la determinación de telomerasa y longitud telomérica (Ref. (44), ver Apéndice).

Para llevar a cabo este análisis, se seleccionaron tres clases de tumores humanos; sarcoma, cáncer de colon, y cáncer de próstata. En este estudio integramos los datos anatomopatológicos de los tumores junto con las determinaciones de telomerasa y de la longitud de los telómeros. Analizamos un total de 153 muestras: 51 bloques de tumores sólidos; 51 cortes en criostato; y 51 tejidos normales adyacentes a los tumores. Estas muestras se recogieron de pacientes con sarcoma ($n = 10$), cáncer colorectal ($n = 11$) y cáncer de próstata ($n = 30$). Se detectó actividad de telomerasa en todos los tumores colorectales y sarcomas. En los cánceres de próstata, en cambio, se detectó con menor frecuencia la actividad de telomerasa ($14/30$, 47%). La intensidad de la actividad de telomerasa fue también menor en cáncer de próstata en comparación con los sarcomas y tumores colorectales analizados.

En los cortes de criostato se determinó el porcentaje de células tumorales versus células normales que formaban los tumores en los cortes analizados. El porcentaje medio de células tumorales versus células no tumorales en los tejidos neoplásicos fue significativamente superior en sarcomas (65%) y colon (30%) en comparación con los cáncer de próstata (5%). Se constató una correlación significativa entre infiltración por células neoplásicas y actividad de telomerasa determinada por el método TRAP. Los fragmentos de restricción terminales (TRF), como medida de la longitud de los telómeros, en los tumores analizados fueron más cortos que los tejidos adyacentes normales, con diferencias en el pico de TRF en colon, sarcoma, y próstata de 1.8, 2.8, y 1 kbps, respectivamente. De forma análoga a lo descrito para telomerasa, demostramos que la cantidad de células tumorales también afecta al análisis de los fragmentos de restricción terminales. Por lo tanto, en aquellos tumores en los que las células no neoplásicas predominan sobre las células neoplásicas, la determinación de actividad de telomerasa en muestras tumorales puede no reflejar el fenotipo maligno, y la pérdida telomérica puede estar infra-estimada. En la serie analizada, este fenómeno fue más evidente en cáncer de próstata. Estos resultados tienen implicaciones para estudios futuros en los que se plantee la determinación de actividad de telomerasa y longitud telomérica para screening, diagnóstico y pronóstico, y apuntan a la necesidad de integrar cuidadosamente las características histológicas de los tumores, especialmente en aquellos en los que hay presencia alta de células no neoplásicas tal como es el caso de muchos cánceres de próstata.

ARTICULOS DE TESIS

ARTICULOS DE TESIS

Los trabajos presentados en los artículos de tesis siguen la línea de trabajo iniciada previamente sobre la caracterización de la actividad telomerasa y longitud telomérica en células y tumores humanos. En estos trabajos planteamos:

- Caracterizar la actividad de telomerasa y longitud telomérica en un banco de cánceres de pulmón y determinar sus asociaciones clínicopatológicas .
- Caracterizar la actividad de telomerasa y longitud telomérica en cáncer de células germinales y en teratomas como modelo de diferenciación *in vivo*.

Artículo de tesis (1). *High telomerase activity in primary lung cancers; increased proliferation rates and advanced stage.* J Natl Cancer Inst, 1997

(vegeu jam2de3.pdf)

Artículo de tesis (2). *Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas.* J Natl Cancer Inst, 1999

(vegeu jam3de3.pdf)

Resultados y discusión

Telomerasa y cáncer de pulmón

El cáncer de pulmón sigue siendo la causa más frecuente de muerte por cáncer en países occidentales. Para mejorar el pronóstico infausto de la mayoría de pacientes con cáncer de pulmón, es crítico un mejor conocimiento de la biología de estos tumores y la identificación de nuevos marcadores o de nuevas dianas terapéuticas. La telomerasa tiene el potencial de ser uno de tales marcadores. En un estudio seminal, se detectó actividad telomerasa en un 78.4% de cánceres de pulmón de célula no pequeña y en un 100% de los cánceres de pulmón de célula pequeña examinados (46). Los niveles detectados de actividad telomerasa variaban en distintos tumores de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña y se detectó una elevada actividad en lesiones metastásicas, incluso en casos en los que los tumores primarios no tenían actividad detectable. Esta observación sugería que la expresión de telomerasa podría contribuir al desarrollo de metástasis (46).

Nosotros planteamos investigar en una serie bien caracterizada de tumores de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña la asociación entre actividad telomerasa y estadio patológico, proliferación de las células tumorales, longitud telomérica y evolución clínica (2). La serie de tumores analizados procedía de pacientes con un seguimiento clínico completo (84). Para analizar asociaciones potenciales entre los parámetros analizados y el nivel de expresión de telomerasa, utilizamos un método de detección basado en PCR (TRAP)

modificado que aumenta la fiabilidad del ensayo, permite la expresión de niveles relativos de actividad de telomerasa e identifica la presencia de inhibidores de actividad de Taq polimerasa (85).

En este estudio analizamos un total de 105 cánceres de pulmón de célula no pequeña obtenidos de 105 pacientes. También analizamos tejido pulmonar histológicamente benigno adyacente a 34 de los casos de cáncer de pulmón. Se detectó actividad telomerasa, a niveles variables, en un 84 (84.8%) de 99 tumores obtenidos de pacientes tratados con resección quirúrgica como única modalidad de tratamiento. En 15 de estos 99 (15.2%) tumores, sin embargo, no se detectó actividad telomerasa y todos los tejidos pulmonares histológicamente benignos adyacentes a los tumores también fueron negativos.

Previamente habíamos observado que en otros tipos de tumores que presentaban gran variabilidad en cuanto a su composición histológica (sarcoma, cáncer de próstata y cáncer de colon), era importante integrar los hallazgos anatomopatológicos con las determinaciones de actividad de telomerasa (44). En la presente serie de cáncer de pulmón, se revisaron las características anatomopatológicas de 81 casos. La mayoría de estos tumores presentaban una proporción de células tumorales versus no tumorales superior al 50% y, consecuentemente, no observamos asociaciones significativas entre actividad telomerasa y el porcentaje de células tumorales versus no neoplásicas que componen el tumor. Tampoco observamos asociación entre grado de necrosis, infiltración linfocitaria o grado de diferenciación (2). En nuestra serie, la actividad telomerasa no se asoció con el sexo del paciente ni con el tipo histológico. En cambio, se observó una correlación inversa significativa entre edad y actividad telomerasa.

Una pequeña proporción de tumores humanos no presentan actividad detectable de telomerasa (29, 86). En nuestro estudio fueron negativos para telomerasa un 15.2% de las cánceres primarios pulmonares tratados exclusivamente con cirugía. En un estudio en retinoblastoma, un tumor pediátrico que precisa sólo un número limitado de mutaciones asociadas, la actividad telomerasa estuvo ausente en un 50% de los tumores (87). Es razonable pensar que el requerimiento de la activación de telomerasa en la tumorigénesis dependa de la longitud de los telómeros de la célula precursora y del número de expansiones clonales necesarios para la formación de un tumor avanzado macroscópico (86). Otras explicaciones sobre la existencia de tumores con ausencia de actividad de telomerasa incluyen la activación de este enzima seguido de represión tras alcanzar una elongación telomérica, inhibición de telomerasa asociada a quiescencia celular, actividad por debajo del límite de detección con los ensayos utilizados, o la presencia de mecanismos alternativos de elongación de los telómeros. La existencia de una vía alternativa se ha descrito en líneas celulares inmortalizadas y en algunos tumores humanos, y se caracterizan por la asociación de ausencia de telomerasa con telómeros muy largos (37-39). Sin embargo, en nuestra serie de 15 cánceres de pulmón con ausencia de telomerasa, no detectamos telómeros muy largos en ninguno de ellos.

Además de la serie de 99 pacientes con cáncer de pulmón intervenidos quirúrgicamente como única modalidad de tratamiento, analizamos 6 tumores adicionales de pacientes con cáncer de pulmón de célula no pequeña localmente avanzados (estadio IIIA) obtenidos tras la administración de tratamiento preoperatorio con quimioterapia. De estos seis casos, detectamos actividad

telomerasa en sólo tres. Notablemente, los tres tumores con ausencia de actividad de telomerasa presentaban una respuesta mayor a la quimioterapia de inducción confirmada anatomopatológicamente. Los otros tres tumores en los que se detectó actividad, la respuesta a la quimioterapia de inducción había sido menor. Esta observación abre la posibilidad de plantear que la actividad de telomerasa puede inhibirse mediante tratamientos de quimioterapia efectivos y que la persistencia de actividad telomerasa se comporta como un marcador de enfermedad maligna residual.

Nuestro grupo y otros habíamos observado que existe una asociación entre actividad telomerasa y proliferación en diversos contextos celulares (55, 76, 88-91). Dentro de la presente serie de cáncer de pulmón, decidimos analizar si la correlación observada entre telomerasa y proliferación también sucedía *in vivo*. Para analizar la fracción de células tumorales proliferantes en la serie de cánceres de pulmón estudiados (2), realizamos estudios inmunohistoquímicos sobre la expresión de Ki-67, un antígeno que está presente sólo en células proliferantes (92). Nuestros resultados mostraron una asociación significativa entre mayor actividad de telomerasa y mayor índice proliferativo tumoral. En los tumores negativos para telomerasa, el porcentaje de células neoplásicas positivas para Ki67 fue del 22%, en tumores con actividad telomerasa baja/moderada fue del 32%, y en tumores con actividad telomerasa alta fue del 49%. Esta observación sugiere que la actividad telomerasa aumenta en cáncer de pulmón cuando se activan las señales proliferativas. El patrón que observamos de actividad telomerasa y de expresión Ki67 sugiere que pueden existir distintas subpoblaciones de cánceres de pulmón, dado que las muestras con actividad baja o ausente presentaban una asociación menor con el índice proliferativo que las

muestras con mayor actividad telomerasa. La asociación entre telomerasa e índice proliferativo en cáncer de pulmón ha sido confirmada por otros autores (93). Otros estudios (3, 94), pero no todos (95), muestran una asociación *in vivo* entre actividad telomerasa y proliferación en otros tumores humanos.

En estudios previos se había detectado una asociación entre actividad telomerasa y estadio tumoral en neuroblastoma (47), cáncer de mama (48), cáncer gástrico (45) y leucemias (43). Sin embargo, en otros estudios en cáncer de células renales (96), cáncer de mama (95, 97), tumores ginecológicos (98) o carcinoma hepatocelular (99), no se observó esta asociación. En nuestra serie de 99 casos de cáncer de pulmón de célula no pequeña tratados con cirugía sola, se detectó actividad telomerasa en un 95% de los tumores T1 (T1 = tumor primario menor de 3 cm), un 80.3% de los T2 (T2 = tumor primario mayor de 3 cm) y en un 92.3% de los tumores T3 (T3 = cualquier tamaño con extensión directa a la pared torácica, diafragma o la pleura mediastínica o tumores pericárdicos). El nivel de actividad telomerasa promedio fue significativamente superior en los tumores T3 comparado con los tumores T1/T2. Se observó también una asociación significativa entre actividad telomerasa y metástasis ganglionares. Detectamos actividad telomerasa en un 79.3% de los N0 (N0 = no metástasis demostrables a los ganglios linfáticos regionales), en un 95% de N1 (N1 = metástasis en los ganglios linfáticos de la región hilar peribronquiales o ipsilaterales) y en un 93.7% de los N2 (N2 = metástasis a ganglios subcarinales y mediastínicos ipsilaterales). La actividad telomerasa promedio fue superior en los casos con afectación ganglionar más avanzada (N2). En los tumores con ausencia de actividad telomerasa, fue infrecuente la presencia de metástasis ganglionares en el momento del diagnóstico. Esta observación podría estar relacionada con la

necesidad de un potencial proliferativo amplio para la formación de metástasis a partir de clones individuales. La expansión clonal necesaria para este proceso podría dar lugar a un acortamiento crítico de los telómeros en ausencia de reactivación de la actividad telomerasa, limitando el potencial de progresión metastásica. La actividad telomerasa se asoció significativamente al estadio tumoral, que combina la clasificación del tumor primario y de las metástasis ganglionares. Los niveles de actividad aumentaron progresivamente en tumores estadio I (I = T1-2N0) < II (II = T1-2N1) < IIIA (IIIA = T3N0-1, T1-3N2). La alta expresión de telomerasa en cáncer de pulmón ha motivado también su estudio en lavados bronquiales y como método diagnóstico auxiliar de cáncer de pulmón (ver Apéndice, (100, 101)).

En la presente serie de cánceres de pulmón, estimamos la longitud de los telómeros mediante análisis por *Southern blot* de los fragmentos de restricción terminales (8, 9). En estos tumores, no observamos asociación entre la longitud de los fragmentos de restricción terminales de los tumores con la actividad de telomerasa. De manera similar, en líneas celulares derivadas de tumores no se había observado asociación entre la longitud de los tumores y la actividad telomerasa (46). La longitud de los telómeros tampoco se asoció con el tamaño tumoral, la presencia de metástasis ganglionares o el estadio. La longitud media de los fragmentos de restricción terminales osciló entre 6.2 y 10.4 kbps en 14 tumores que no tenían actividad telomerasa detectable y osciló entre 5.5 y 23 kbp en 30 tumores con presencia de actividad telomerasa. En 34 casos, se analizaron los fragmentos de restricción terminales tanto en tejido tumoral como en tejido pulmonar adyacente histológicamente benigno: la media de los fragmentos de restricción terminales fueron similares en 26 casos (76%), menor

en tumores en 6 (18%) y elongados en 2 (6%). Diversos estudios han descrito observaciones similares en diversos tumores sobre la similitud en muchos casos entre la longitud de los telómeros de los tumores y tejido benigno adyacente, si bien en otras series se ha observado en general una reducción de la longitud de los telómeros en tejido tumoral versus normal (44, 45, 47, 86, 102).

En el presente estudio, la supervivencia libre de enfermedad a los 3 años fue del 57% en pacientes con tumores telomerasa-negativos y del 40% en aquellos pacientes con tumores telomerasa-positivos. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, posiblemente debido al poder estadístico limitado del estudio para detectar diferencias pronósticas (2). Estudios posteriores indican una asociación significativa entre actividad de telomerasa y pronóstico en pacientes con cáncer de pulmón (103, 104). El valor pronóstico potencial de la actividad telomerasa ha sido analizada también en otros tumores humanos. Por ejemplo, en neuroblastomas, carcinoma gástrico y carcinoma de mama, la actividad de telomerasa se asoció a mal pronóstico (45, 47, 94). Sin embargo, en otros estudios no se ha constatado tal asociación (96).

En resumen, nuestros resultados muestran que los cánceres de pulmón de célula no pequeña con alto nivel de actividad telomerasa se asocian a un alto índice proliferativo y con estadíos avanzados. Estos hallazgos indican que la actividad telomerasa puede contribuir a la tumorigénesis pulmonar y a su progresión. Estas observaciones apoyan el concepto de telomerasa como una diana terapéutica atractiva en cáncer de pulmón (2).

Telomerasa y tumores de células germinales

Nuestro grupo y otros habíamos descrito una relación inversa entre la presencia de actividad telomerasa y la inducción de diferenciación en líneas celulares de tumores humanos, incluyendo líneas de tumores de células germinales (76, 78, 88, 105). Particularmente, se había descrito que la exposición a agentes inductores de la diferenciación se asocia a represión de actividad de telomerasa en líneas de tumores de células germinales humanos sensibles a la diferenciación, pero no en líneas resistentes a la diferenciación (76).

Los tumores de células germinales masculinos son tumores con frecuencia curables que suelen afectar a varones jóvenes o de mediana edad. Estos tumores se clasifican en dos grandes grupos, seminomas y no seminomas. Los no seminomas incluyen carcinoma embrionario, carcinoma de saco vitelino, coriocarcinoma, teratoma, y combinaciones de estos subtipos. El riesgo de metástasis es mínimo para los teratomas y es máximo para los coriocarcinomas. El riesgo en los otros tipos histológicos es intermedio. Los tumores de células germinales de testículo son un modelo clínico atractivo para caracterizar *in vivo* si existe asociación entre actividad telomerasa y diferenciación, dado que las células progenitoras germinales normales presentan alta actividad telomerasa (106, 107) y los carcinomas embrionarios pueden diferenciarse a teratomas maduros (108). A diferencia de los carcinomas embrionarios de los que derivan los teratomas, los teratomas

maduros tienen una capacidad de proliferación limitada, si bien puede ocurrir transformación maligna (109). Esta característica biológica proporciona una oportunidad única para investigar la relación entre telomerasa y diferenciación *in vivo*. Además, los estudios sobre actividad telomerasa en tumores de células germinales son también relevantes dado que las células progenitoras germinales de las que derivan expresan constitutivamente actividad telomerasa para regular la longitud de los telómeros (1, 8, 9, 106).

Para investigar la relación entre actividad telomerasa y estado de diferenciación de los tumores *in vivo*, analizamos la actividad telomerasa en cánceres de células germinales (seminomas, no seminomas, y tumores de células germinales mixtos) y la comparamos con la actividad en teratomas maduros o inmaduros. La actividad telomerasa se determinó mediante TRAP modificado, al igual que utilizamos en el estudio previo en cáncer de pulmón (2, 85). En nuestra serie, detectamos altos niveles de actividad telomerasa en todos los cánceres de células germinales examinados (n=27) y en los tejidos testiculares benignos (n=4). En cambio, no detectamos actividad telomerasa en ninguno de los teratomas maduros analizados (n=7) (3). Se descartó experimentalmente que esta represión de telomerasa fuera debida a la presencia de un factor inhibidor en los extractos protéicos. La ausencia de actividad telomerasa en teratomas maduros ha sido confirmada posteriormente en otro estudio (110) así como la represión del componente de ARN de telomerasa (hTR) (111). Esta ausencia de actividad telomerasa es un reflejo de la represión somática de esta enzima y quizás puede contribuir a la capacidad proliferativa limitada de los teratomas maduros. En nuestro estudio analizamos también un teratoma inmaduro, con transformación maligna, que en contraste

con los teratomas maduros, tenía alta actividad telomerasa (3). En conclusión, la enzima telomerasa está activada en cánceres de células germinales y está reprimida en los teratomas maduros. Estas observaciones apoyan la existencia de una relación inversa entre actividad telomerasa y el estado de diferenciación en tumores de células germinales humanos *in vivo*.

En este estudio también estimamos la longitud de los telómeros mediante digestión del ADN genómico y *Southern blot* de los fragmentos de restricción terminal (TRF) (3). La longitud de los telómeros no se correlacionó con la actividad telomerasa. Las longitudes promedio de los TRF fueron en general largas en los teratomas maduros (TRF 19.09 ± 9.41 kb, SD; rango, 6.17-34.5 kb). Las longitudes promedio de los TRF de los seminomas (TRF 10.71 ± 1.6 kb, SD; rango, 8.73-13.3 kb), fueron más cortas que en los teratomas maduros. Hubo diferencias marginalmente significativas de longitud de los telómeros en función del subtipo histológico. Se detectaron telómeros largos (TRF >20 kb) en siete tumores de células germinales; 4 teratomas maduros, dos carcinomas embrionarios y un tumor mixto de células germinales. La existencia de teratomas maduros telomerasa-negativos con largos telómeros recuerda a los mecanismos alternativos de elongación de los telómeros (37-39). Sin embargo, otros teratomas telomerasa-negativos tenían una longitud de los telómeros similar o menor que la observada en tejido testicular benigno (TRF 14.3 kb; rango, 12.52-14.4 kb). Por lo tanto, la activación de un mecanismo alternativo no explica de forma consistente los hallazgos observados en teratomas. Más bien, la observación de que los teratomas maduros pueden tener telómeros muy largos es consistente con la represión tardía de actividad telomerasa durante la formación de teratoma. En esperma y en tejidos fetales se han

descrito longitudes de TRF \geq 20 kb (8, 9). Las diferencias observadas en la longitud de los telómeros en distintos tipos histológicos de tumores de células germinales ha sido confirmada en un estudio posterior (110) y puede reflejar los distintos estadios de espermatogénesis de los que derivan estos tumores.

En resumen, este estudio demuestra la expresión de actividad telomerasa en todos los cánceres de células germinales examinados. En cambio, no se detectó actividad telomerasa en ningún teratoma maduro. Estos hallazgos indican que existe una correlación inversa *in vivo* entre actividad de telomerasa y el estado de diferenciación de los tumores de células germinales.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los resultados de los estudios presentados en esta memoria permiten establecer una serie de conclusiones:

- 1) La telomerasa es una enzima regulable en células humanas.

La maduración de células neoplásicas de diversa estirpe inducida por agentes diferenciadores se asocia a inhibición de telomerasa (76, 78, 79). El grado de inhibición de telomerasa se correlaciona inversamente con el grado de diferenciación celular en los modelos experimentales analizados. Esta correlación inversa entre actividad de telomerasa y el estado de diferenciación existe también *in vivo* en tumores de células germinales masculinos (3).

La telomerasa está presente en células hematopoyéticas humanas y es activable *ex vivo* en cultivos hematopoyéticos. Esta actividad parece reducir, más que evitar, la pérdida telomérica asociada a la proliferación celular (55).

- 2) La telomerasa es una diana antitumoral atractiva.

La mayoría de tumores que analizamos expresan actividad telomerasa mientras que los tejidos normales adyacentes a los tumores carecen de actividad telomerasa detectable (2, 3, 50). Esta observación apoya el concepto de la inhibición de telomerasa como una terapia atractiva del cáncer porque debería contar con dos características importantes; amplio espectro antitumoral

y escasa toxicidad. En los modelos preclínicos desarrollados se realizó el screening de una serie de compuestos candidatos inhibidores de telomerasa *in vitro* e *in vivo*. Es de esperar que en un futuro cercano se identifiquen compuestos que puedan ser investigados clínicamente.

3) La mayoría de tumores humanos expresan actividad telomerasa y su expresión se asocia a estadio tumoral, índice proliferativo y diferenciación.

En tumores humanos de diversa estirpe se establece la importancia de la integración de los datos anatomopatológicos del tumor (especialmente de la proporción de células tumorales versus no tumorales que forman los tumores) en la interpretación de los análisis de telomerasa y longitud de los telómeros (44).

Los cánceres de pulmón de célula no pequeña con alto nivel de actividad telomerasa se asocian a un alto índice proliferativo y con estadios avanzados (3, 101). Estos hallazgos indican que la actividad telomerasa puede contribuir a la tumorigénesis pulmonar y a su progresión. Estas observaciones apoyan el concepto de telomerasa como una diana terapéutica atractiva en cáncer de pulmón.

En tumores de células germinales masculinos, la actividad telomerasa se expresa en todos los cánceres de células germinales examinados (3). En cambio, no se detecta actividad telomerasa en ningún teratoma maduro. Estos hallazgos indican que existe una correlación inversa *in vivo* entre actividad de telomerasa y el estado de diferenciación de los tumores de células germinales.

Colectivamente, los trabajos presentados muestran que la telomerasa es una enzima regulable en células tumorales humanas, tanto *in vitro* como *in vivo* y que en la mayoría de tumores humanos analizados se detecta actividad telomerasa. Diversos grupos han demostrado que la inhibición de telomerasa utilizando diversas estrategias induce acortamiento telomérico y remortalización celular en células tumorales humanas (34-36). Estudios en modelos murinos apoyan el concepto de inhibición de telomerasa como estrategia para prevenir la formación de cánceres (67). Esperamos con ansiedad la identificación de compuestos inhibidores de telomerasa que puedan ser investigados clínicamente en el tratamiento de pacientes con cáncer.

BIBLIOGRAFÍA

BIBLIOGRAFÍA

1. Kim, N. W., Piatyszek, M. A., Prowse, K. R., Harley, C. B., West, M. D., Ho, P. L. C., Coviello, G. M., Wright, W. E., Weinrich, S. L., Shay, J. W. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer, *Science*. 266: 2011-2015, 1994.
2. Albanell, J., Lonardo, F., Rusch, V., Engelhardt, M., Langenfeld, J., Han, W., Klimstra, D., Venkatraman, E., Moore, M. A., Dmitrovsky, E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage, *J Natl Cancer Inst*. 89: 1609-1615, 1997.
3. Albanell, J., Bosl, G.J., Reuter, V.E., Engelhardt, M., Franco, S., Moore, M.A.S., Dmitrovsky, E. Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas, *J Natl Cancer Inst*. 91: 1321-1326, 1999.
4. Hanahan, D. Weinberg, R. A. The hallmarks of cancer, *Cell*. 100: 57-70, 2000.
5. Hayflick, L. Moorhead, P. S. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains, *Exp. Cell Res*. 25: 585–621, 1961.
6. Hayflick, L. The cell biology of human aging, *N Engl J Med*. 295: 1302-1308, 1976.

7. Hayflick, L. Mortality and immortality at the cellular level, *Biochemistry*. 62: 1180–1190, 1997.
8. Hastie, N.D., Dempster, M., Dunlop, M.G., Thompson, A.M., Green, D.K., Allshire, R. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing, *Nature*. 346: 866-868, 1990.
9. Allsopp, R. C., Varizi, H., Patterson, C., Goldstein, S., Younglai, E. V., Futcher, B. A., Greider, C. W., Harley, C. B. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89: 10114-10118, 1992.
10. Varizi, H., Dragowska, W., Allsopp, R. C., Thomas, T. E., Harley, C. B., Landsdorp, P. M. Evidence for a mitotic clock in human hematopoietic stem cells: loss of telomeric DNA with age, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 9857-9860, 1994.
11. Harley, C. B., Kim, N. W., Prowse, K. R., Weinrich, S. L., Hirsch, K. S., West, M. D., Bacchetti, S., Hirte, H. W., Counter, C. M., Greider, C. W., Piatyszek, M. A., Wright, W. E., Shay, J. W. Telomerase, cell immortality, and cancer, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* LIX: 307-315, 1994.
12. Rhyu, M. Telomeres, telomerase and immortality, *J Natl Cancer Inst.* 87: 884-891, 1995.
13. Olovnikov, A. A theory of marginotomy. The incomplete copying of template margin in enzymic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon, *J Theor Biol.* 41: 181-90, 1973.
14. Olovnikov, A. Telomeres, telomerase, and aging: origin of the theory, *Exp Gerontol.* 31: 443-8, 1996.

15. Blackburn, E. H. Structure and function of telomeres, *Nature*. 266:, 1991.
16. Harley, C. B. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb?, *Mutat. Res.* 256: 271–282, 1991.
17. Broccoli, D., Smogorzewska, A., Chong, L., de Lange, T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2, *Nat Genet.* 17: 231-5, 1997.
18. van Steensel, B.C., de Lange, T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1, *Nature* . 385: 740–3, 1997.
19. Greider, C. Blackburn, E. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts, *Cell.* 43: 405-13, 1985.
20. Morin, G. The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats, *Cell.* 59: 521-529, 1989.
21. Feng, J., Funk, W. D., Wang, S. S., Weinrich, S. L., Avilion, A. A., Chiu, C. P., Adams, R. R., Chang, E., Allsopp, R. C., Yu, J., Le, S., West, M. D., Harley, C. B., Andrews, W. H., Greider, C. W., Villeponteau, B. The RNA component of human telomerase, *Science.* 269: 1236-41, 1995.
22. Harrington, L., Zhou, W., McPhail, T., Oulton, R., Yeung, D.S., Mar, V., Bass, M.B., Robinson, M. Human telomerase contains evolutionary conserved catalytic and structural subunits, *Genes & Develop.* 11: 3109-3115, 1997.
23. Harrington, L., McPhail Mar, V., Zhou, W., Oulton, R., Bass, M.B., Arruda, I., Robinson, M. A mammalian telomerase associated protein, *Science.* 275: 973-977, 1997.

24. Weinrich, S. L., 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, G. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTRT, *Nature Genet.* 17: 498–502, 1997.
25. Beattie, T.L., Zhou, W., Robinson, M.O., Harrington, L. Reconstitution of human telomerase activity in vitro, *Curr Biol.* 8: 177-180, 1998.
26. Counter, C.M., Botelho, F.M., Wang, P., Harley, C.B., Bacchetti, S. Stabilization of short telomeres and telomerase activity accompany immortalization of Epstein-Barr virus-transformed human B lymphocytes, *J Virol.* 68: 3410-3414, 1994.
27. Counter, C. M., Avilion, A. A., LeFeuvre, C. E., Stewart, N. G., Greider, C. W., Harley, C. B., Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity, *EMBO J.* 11: 1921-1929, 1992.
28. Harley, C., Futcher, A., Greider, C. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts, *Nature.* 345: 458-450, 1990.
29. Shay, J. Bacchetti, S. A survey of telomerase activity in human cancer, *Eur J Cancer.* 33: 787-791, 1997.
30. Wright, W. E., Shay, J. W. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization, *Exp. Gerontol.* 27: 383–389, 1992.
31. Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P., Blasco, M. Telomere length dynamics and chromosomal instability in cells derived from telomerase null mice, *J Cell Biol.* 144: 589-601, 1999.

32. Bodnar, A.G., Ouellette, M., Frolkis, M., Holt, S.E., Chiu, C.P., Morin, G.B., Harley, C.B., Shay, J.W., Lichtsteiner, S., Wright, W. Extension of life span by introduction of telomerase into normal cells, *Science*. 279: 349-352, 1998.
33. MacKenzie, K., Franco, S., May, C., Sadelain, M., Moore, M. Mass cultured human fibroblasts overexpressing hTERT encounter a growth crisis following an extended period of proliferation, *Exp Cell Res*. 259: 336-50, 2000.
34. Hahn, W., Stewart, S., Brooks, M., York, S., Eaton, E., Kurachi, A., Beijersbergen, R., Knoll, J., Meyerson, M., Weinberg, R. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells, *Nat Med*. 5: 164 - 1170, 1999.
35. Herbert, B.-S., Pitts, A. E., Baker, S. I., Hamilton, S. E., Wright, W. E., Shay, J. W., Corey, D. R. Inhibition of human telomerase in immortal human cells leads to progressive telomere shortening and cell death, *PNAS*. 96: 14276–14281, 1999.
36. Shamas, M., Simmons, C., Corey, D., Reis, R. Telomerase inhibition by peptide nucleic acids reverses 'immortality' of transformed human cells, *Oncogene*. 18: 6191-200, 1999.
37. Bryan, T., Englezou, A., Dalla-Pozza, L., Dunham MA, Reddel, R. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines., *Nat Med*. 3: 1271-1274, 1997.
38. Bryan, T. Reddel, R. Telomere dynamics and telomerase activity in *in vitro* immortalized human cells, *Eur J Cancer*. 33: 767-773, 1997.

39. Bryan, T.M., Englezou, A., Gupta, J., Bacchetti, S., Reddel, R. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity, *EMBO J.* 14: 4240–8, 1995.
40. Avilion, A., Piatyszek, M., Gupta, J., Shay, J.W., Bacchetti, S., Greider, C. Human telomerase activity in immortal cell lines and human tumor tissues, *Cancer Res.* 56: 645-650, 1996.
41. Chadeneau, C., Hay, K., Hirte, H. W., Gallinger, S., Bacchetti, S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer, *Cancer Res.* 55: 2533-2536, 1995.
42. Counter, C. M., Hirte, H. W., Bacchetti, S., Harley, C. B. Telomerase activity in human ovarian carcinoma, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 91: 2900-2904, 1994.
43. Counter, C.M., Gupta, J., Harley, C.B., Leber, B., Bacchetti, S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematological malignancies, *Blood.* 85: 2315-2320, 1995.
44. Engelhardt, M., Albanell, J., Drullinsky, P., Han, W., Guillem, J., Scher, H. I., Reuter, V., Moore, M. A. Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma, *Clin Cancer Res.* 3: 1849-1857, 1997.
45. Hiyama, E., Yokoyama, T., Tatsumoto, N., Hiyama, K., Imamura, Y., Murakami, Y., Kodama, T., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Matsuura, Y. Telomerase activity in gastric cancer, *Cancer Res.* 55: 3258-3262, 1995.

46. Hiyama, K., Hiyama, E., Ishioka, S., Yamakido, M., Inai, K., Gazdar, A. F., Piatyszek, M. A., Shay, J. W. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers, *J. Natl. Cancer Inst.* 87: 895-902, 1995.
47. Hiyama, E., Hiyama, K., Yokoyama, T., Matsuura, Y., Piatyszek, M. A., Shay, J. W. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes., *Nature Med.* 1: 249-255, 1995.
48. Hiyama, E., Gollahon, L., Kataoka, T., Kuroi, K., Yokohama, T., Gazdar, A.F., Hiyama, K., Piatyszek, M.A., Shay, J. Telomerase activity in human breast tumors, *J Natl Cancer Inst.* 88: 116-122, 1996.
49. Norrback, K.F., Dahlenborg, K., Carlsson, R., Roos, G. Telomerase activation in normal B lymphocytes and non-Hodgkin's lymphomas, *Blood.* 88: 1996, 1996.
50. Engelhardt, M., Drullinsky, P., Guillem, J., Moore, M. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer, *Clin Cancer Res.* 3: 1931-41, 1997.
51. Engelhardt, M., Ozkaynak, M.F., Drullinsky, P., Sandoval, C., Tugal, O., Jayabose, S., Moore, M. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy, *Leukemia.* 12: 13-24, 1998.
52. Engelhardt, M., Mackenzie, K., Drullinsky, P., Silver, R.T., Moore, M. Telomerase activity and telomere length in acute and chronic leukemia, pre- and post-ex vivo culture, *Cancer Res.* 60: 610-7, 2000.
53. Dalbagni, G., Han W, Zhang ZF, Cordon-Cardo C, Saigo P, Fair WR, Herr H, Kim N, Moore, M. Evaluation of the telomeric repeat amplification

- protocol (TRAP) assay for telomerase as a diagnostic modality in recurrent bladder cancer, *Clin Cancer Res.* 3: 1593-8., 1997.
54. Harle-Bachor, C. Boukamp, P. Telomerase activity in the regenerative basal layer of the epidermis in human skin and immortal and carcinoma derived skin keratinocytes, *Proc Natl Acad Sci USA.* 93: 6476-6481, 1996.
55. Engelhardt, M., Kumar, R., Albanell, J., Pettengell, R., Han, W., Moore, M. A. S. Telomerase regulation, cell cycle, and telomere stability in primitive hematopoietic cells, *Blood.* 90: 182-193, 1997.
56. Blasco, M., Lee, H., Hande, M., Samper, E., Lansdorp, P., DePinho, R., Greider, C. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA., *Cell.* 91: 25-34, 1997.
57. Artandi, S. DePinho, R. Mice without telomerase: what can they teach us about human cancer?, *Nat Med.* 6: 852-5., 2000.
58. Wright, W. Shay, J. Telomere dynamics in cancer progression and prevention: fundamental differences in human and mouse telomere biology, *Nat Med.* 6: 849-51., 2000.
59. Blasco, M., Funk, W., Villeponteau, B., Greider, C. Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA, *Science.* 269: 1267-70, 1995.
60. Blasco, M., Rizen, M., Greider, C., Hanahan, D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis, *Nat Genet.* 12: 200-4, 1996.

61. Martin-Rivera, L., Herrera, E., Albar, J., Blasco, M. Expression of mouse telomerase catalytic subunit in embryos and adult tissues, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 10471-6, 1998.
62. Lee, H., Blasco, M., Gottlieb, G., Horner, J., Greider, C., DePinho, R. Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs, *Nature.* 392: 569-74, 1998.
63. Herrera, E., Martinez, A. C., Blasco, M. Impaired germinal center reaction in mice with short telomeres, *EMBO J.* 19: 472-81, 2000.
64. Herrera, E., Samper, E., Blasco, M. Telomere shortening in mTR^{-/-} embryos is associated with failure to close the neural tube, *EMBO J.* 18: 1172-81, 1999.
65. Herrera, E., Samper, E., Martin-Caballero, J., Flores, J., Lee, H., Blasco, M. Disease states associated with telomerase deficiency appear earlier in mice with short telomeres, *EMBO J.* 18: 2950-60, 1999.
66. Rudolph, K., Chang, S., Lee, H., Blasco, M., Gottlieb, G., Greider, C., DePinho, R. Longevity, stress response, and cancer in aging telomerase-deficient mice, *Cell.* 96: 701-12, 1999.
67. Gonzalez-Suarez, E., Samper, E., Flores, J.M., Blasco, M. Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis, *Nat Genet.* 26: 114-7, 2000.
68. Greenberg, R. A., Chin, L., Femino, A., Lee, K., Gottlieb, G., Singer, R., Greider, C., DePinho, R. Short dysfunctional telomeres impair tumorigenesis in the NK4a(δ 2/3) cancer-prone mouse, *Cell.* 97: 515–525, 1999.

69. Chin, L., Artandi, S.E., Shen, Q., Tam, A., Lee, S.L., Gottlieb, G.J., Greider, C., DePinho, R. p53 deficiency rescues the adverse effects of telomere loss and cooperates with telomere dysfunction to accelerate carcinogenesis, *Cell*. 97: 527-538, 1999.
70. Artandi, S., Chang, S., Lee, S., Alson, S., Gottlieb, G., Chin, L., DePinho, R. Telomere dysfunction promotes non-reciprocal translocations and epithelial cancers in mice, *Nature*. 406: 641-5, 2000.
71. Miller, W. H. J., Maerz, W. J., Kurie, J., Moy, D., Baselga, J., Lucas, D. A., Grippo, J. F., Masui, H., Dmitrovsky, E. All-trans-retinoic acid and hexamethylene bisacetamide (HMBA) regulate TGF- α and *Hst-1*/kFGF expression in differentiation-sensitive but not in resistant human teratocarcinomas, *Differentiation*. 55: 145-152, 1994.
72. Moasser, M. M., DeBlasio, A., Dmitrovsky, E. Response and resistance to retinoic acid are mediated through the retinoic acid nuclear receptor γ in human teratocarcinomas, *Oncogene*. 9: 833-840, 1994.
73. Moasser, M. M., Reuter, V. E., Dmitrovsky, E. Over-expression of the retinoic acid receptor γ directly induces terminal differentiation of human embryonal carcinoma cells, *Oncogene*. 10: 1537-1543, 1995.
74. Lanotte, M., Martin-Thouvenin, V., Najman, S., Balerini, P., Valensi, F., Berger, R. NB4, a maturation inducible cell line with t(15;17) marker isolated from a human acute promyelocytic leukemia (M3), *Blood*. 77: 1080-1086, 1991.
75. Dmitrovsky, E., Moy, D., Miller, W. H. J., Li, A., Masui, H. Retinoic acid causes a decline in TGF- α expression, cloning efficiency, and tumorigenicity in a human embryonal cancer cell line, *Oncogene Res*. 5: 233-239,, 1990.

76. Albanell J, Han W, Mellado B, Gunawardane R, Scher H.I, Dmitrovsky E, Moore, M. A. S. Telomerase activity is repressed during induced differentiation of maturation-sensitive but not resistant human tumor cell lines, *Cancer Research*. 56: 1503-1508, 1996.
77. Andrews, P. W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G. S., Carlin, C., Dracopoli, N., Fogh, J. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2; differentiation *in vivo* and *in vitro*, *Lab. Invest*. 50: 147-162, 1984.
78. Nason-Burchenal, K., Maerz, W., Albanell, J., Allopenna, J., Martin, P., Moore, M.A.S., Dmitrovsky, E. Common defects of different retinoic acid resistant promyelocytic leukemia cells are persistent telomerase activity and nuclear body disorganization, *Differentiation*. 61: 321-331, 1997.
79. Reichman, T.W., Albanell, J., Wang, X., Moore, M.A.S., Studzinski, G. P. Downregulation of telomerase activity in HL60 cells by differentiating agents is accompanied by increased expression of telomerase-associated protein, *J. Cellular Biochemistry*. 67: 13-23, 1997.
80. Hiyama, K., Hirai, Y., Kyoizumi, S., Akiyama, M., Hiyama, E., Piatyszek, M. A., Shay, J. W., Ishioka, S., Yamakido, M. Activation of telomerase in human lymphocytes and hematopoietic progenitor cells, *J. Immunol*. 155: 3711-3715, 1995.
81. Shapiro, F., Yao, T.J., Raptis, G., Reich, L., Norton, L., Moore, M. Optimization of conditions for ex vivo expansion of CD34+ cells from patients with stage IV breast cancer, *Blood*. 84: 3567-74, 1994.

82. Muench, M.O., Firpo, M.T., Moore, M. Bone marrow transplantation with interleukin-1 plus kit-ligand ex vivo expanded bone marrow accelerates hematopoietic reconstitution in mice without the loss of stem cell lineage and proliferative potential, *Blood*. 81: 3463-7, 1993.
83. Moore, M. Stem cell proliferation: ex vivo and in vivo observations, *Stem Cells*. 15 Suppl 1: 239-48, 1997.
84. Rusch, V., Klimstra, D., Venkatraman, E., Pisters, P., Langenfeld, J., Dmitrovsky, E. Overexpression of the EGFR and its ligand, TGF α , is frequent in resectable non-small cell lung cancer, but does not predict tumor progression, *Clin Cancer Res*. 3: 515–22, 1997.
85. Kim, N. Wu, F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP)., *Nucleic Acids Res*. 25: 2595-7, 1997.
86. Bacchetti, S. Counter, C. Telomeres and telomerase in human cancer, *Int J Oncol*. 7: 423-432, 1995.
87. Gupta, J., Han, L.P., Wang, P., Gallie, B.L., Bacchetti, S. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity, *J Natl Cancer Inst*. 88: 1152-7, 1996.
88. Sharma, H. W., Sokoloski, J. A., Perez, J. R., Maltese, J. Y., Sartorelli, A. C., Stein, C. A., Nichols, G., Khaled, Z., Telang, N. T., Narayanan, R. Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92: 12343-12346, 1995.

89. Zhu, X., Kumar, R., Mandal, M., Sharma, N., Sharma, H.W., Dhingra, U., Sokoloski, J.A., Hsiao, R., Narayanan, R. Cell cycle-dependent modulation of telomerase activity in tumor cells, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 93: 6091–5, 1996.
90. Holt, S., Wright, W., Shay, J. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines, *Mol Cell Biol*. 16: 2932-9, 1996.
91. Holt, S.E., Wright, W.E., Shay, J.W. Multiple pathways for the regulation of telomerase activity, . 33: 761-766., 1997.
92. Cattoretti, G., Becker, M.H., Key, G., Duchrow, M., Schlutter, C., Galle, J., Gerdes, J. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen detect proliferating cells in microwave processed, formalin fixed paraffin sections, *J Pathol*. 168: 357-363, 1992.
93. Fujiwara, M., Okayasu, I., Takemura, T., Tanaka, I., Masuda, R., Furuhata, Y., Noji, M., Oritsu, M., Kato, M., Oshimura, M. Telomerase activity significantly correlates with chromosome alterations, cell differentiation, and proliferation in lung adenocarcinomas, *Mod Pathol*. 13: 723-9, 2000.
94. Clark, G.M., Osborne, C.K., Levitt, D., Wu, F., Kim, N. Telomerase activity and survival of patients with node-positive breast cancer, *J Natl Cancer Inst*. 89: 1874-81, 1997.
95. Bednarek, A.K., Sahin, A., Brenner, A.J., Johnston, D.A., Aldaz, C. Analysis of telomerase activity levels in breast cancer: positive detection at the in situ breast carcinoma stage, *Clin Cancer Res*. 3: 11–6, 1997.
96. Mehle, C., Piatyszek, M.A., Ljungberg, B., Shay, J.W., Roos, G. Telomerase activity in human renal cell carcinoma, *Oncogene*. 13: 161–6, 1996.

97. Sugino, T., Yoshida, K., Bolodeoku, J., Tahara, H., Buley, I., Manek, S., Wells, C., Goodison, S., Ide, T., Suzuki, T., Tahara, E., Tarin, D. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates, *Int J Cancer*. 69: 301–6, 1996.
98. Kyo, S., Kanaya, T., Ishikawa, H., Ueno, H., Inoue, M. Telomerase activity in gynecological tumors, *Clin Cancer Res*. 2: 2023–8, 1996.
99. Tahara, H., Nakanishi, T., Kitamoto, M., Nakashio, R., Shay, J.W., Tahara, E., Kajiyama, G., Ide, T. Telomerase activity in human liver tissues: comparison between chronic liver disease and hepatocellular carcinomas, *Cancer Res*. 55: 2734–6, 1995.
100. Yahata, N., Okyashiki, K., Okyashiki, J.K., Iwama, H., Hayashi, S., Ando, K., Hirano, T., Tsuchida, T., Kato, H., Shay, J.W., Toyama, K. Telomerase activity in lung cancer cells obtained from bronchial washings, *J Natl Cancer Inst*. 90: 684-690, 1998.
101. Lonardo, F. Albanell, J. Telomerase in lung cancer. *En: M. J. Pass HI, Johnson DH, Turrisi AT, Minna JD (ed.) Lung Cancer: Principles and Practice.*, 2 edition, Vol. 170-180: Lippincott Williams&Wilkins, 2000.
102. Hiyama, E., Yokohama, T., Hiyama, K., Yamakido, M., Santo, T., Kodama, T. Alterations of telomeric repeat length in adult and childhood solid neoplasias, *Int J Oncol*. 6: 13-16, 1995.
103. Taga, S., Osaki, T., Ohgami, A., Imoto, H., Yasumoto, K. Prognostic impact of telomerase activity in non-small cell lung cancers, *Ann Surg*. 230: 715-20, 1999.

104. Marchetti, A., Bertacca, G., Buttitta, F., Chella, A., Quattrocchio, G., Angeletti, C., Bevilacqua, G. Telomerase activity as a prognostic indicator in stage I non-small cell lung cancer, *Clin Cancer Res.* 5: 2077-81, 1999.
105. Kruk, P.A., Balajee, A.S., Rao, K.S., Bohr, V. Telomere reduction and telomerase inactivation during neuronal cell differentiation, *Biochem Biophys Res Commun.* 224: 487-92, 1996.
106. Wright, W.E., Piatyszek, M.A., Rainey, W.E., Byrd, W., Shay, J. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells, *Dev Genet* 173-9, 1996.
107. Ravindranath, N., Dalal, R., Solomon, B., Djakiew, D., Dym, M. Loss of telomerase activity during male germ cell differentiation, *Endocrinology.* 138: 4026-9, 1997.
108. Hong, W., Wittes, R., Hajdu, S., Cvitkovic, E., Whitmore, W., Golbey, R. The evolution of mature teratoma from malignant testicular tumors, *Cancer.* 40: 2987-92, 1977.
109. Ahmed, T., Bosl, G., Hajdu, S. Teratoma with malignant transformation in germ cell tumors in man, *Cancer.* 56: 860-3, 1985.
110. Nowak, R., Sikora, K., Pietas, A., Skoneczna, I., Chrapusta, S. Germ cell-like telomeric length homeostasis in nonseminomatous testicular germ cell tumor, *Oncogene.* 19: 4075-8, 2000.
111. Delgado, R., Rathi, A., Albores-Saavedra, J., Gazdar, A. Expression of the RNA component of human telomerase in adult testicular germ cell neoplasia, *Cancer.* 86: 1802-11, 1999.