

TELOMEROS, TELOMERASA, SENESCENCIA Y CANCER *

MARÍA CASCALES ANGOSTO

INTRODUCCIÓN

En la mayoría de las células somáticas derivadas de tejidos normales, la pérdida de la capacidad replicativa, que conlleva a la senescencia celular, se debe al acortamiento de los telómeros asociado con la ausencia de actividad telomerasa. Los telómeros y la telomerasa presentan un gran interés a la hora de encontrar explicación, no sólo a los cambios relacionados con el envejecimiento, sino también a los relativos a la tumorigénesis. Son numerosas las alteraciones en la expresión genética que afectan la diferente capacidad de las células para dividirse y que se encuentran implicadas en los mecanismos que conducen, tanto al envejecimiento como al cáncer.

Los telómeros son esenciales para el mantenimiento de la estructura y función de los cromosomas y para la viabilidad de las células. Sin embargo, en el proceso de la división celular, que implica la replicación (síntesis) del DNA, los telómeros de las células somáticas normales no pueden replicarse en su totalidad por el complejo convencional DNA polimerasa y esto se debe a la diferencia en la replicación de las dos cadenas, la conductora y la rezagada. Para solucionar este problema de replicación terminal la mayoría de las células eucariotas utilizan, la telomerasa, una ribonucleoproteína con actividad de retrotranscriptasa. Esta enzima actúa alargando los extremos de los cromosomas, con una secuencia telomérica específica, utilizando como molde una porción de su propio componente integral RNA.

El conocimiento actual de los telómeros deriva en su mayor parte de estudios bioquímicos y genéticos en eucariotas tan simples como el ciliado unicelular *Tetrahymena*. La caracterización de proteínas asociadas a los telómeros en diversos organismos, la clonación del componente RNA de la telomerasa del *Tetrahymena*, levadura, ratón y humanos, y la caracterización de los componentes proteicos de la telomerasa del *Tetrahymena*, han proporcionado el marco molecular de la biología de los telómeros. El incesante estudio de la dinámica de los telómeros está desentrañando interesantes vías de influencia sobre el comportamiento celular y la regulación del estado proliferativo de las células de mamíferos.

* Conferencia pronunciada en la Real Academia de Doctores el 16 de Diciembre de 1998.

Es un hecho conocido, que la acumulación de alteraciones en el DNA, debida a agentes que lesionan la propia molécula y/o a errores en su síntesis, se relaciona con el proceso del envejecimiento. Entre los diferentes tipos de las alteraciones que conducen a la inestabilidad genética y se deben a la edad, el acortamiento de los telómeros representa uno de los cambios estructurales más importantes. Se ha detectado una disminución en la longitud de los telómeros en células de donantes de edad elevada y de cultivos celulares senescentes, lo que indica que el acortamiento telomérico puede considerarse como un marcador significativo del envejecimiento.

El estudio de las bases moleculares o fisiológicas de los telómeros despierta hoy gran interés entre los investigadores comprometidos en el envejecimiento y en la inmortalidad a nivel celular. El envejecimiento porque supone la **pérdida** de la capacidad replicativa celular, y la inmortalidad porque supone la **ganancia** de un potencial replicativo celular ilimitado. La importancia de la relación entre envejecimiento e inmortalidad se encuentra reforzada por el hecho de que una elevada proporción de células de tumores expresan actividad telomerasa, mientras que la mayor parte de células de tejidos somáticos normales muestran una ausencia casi total de esta actividad. El que la actividad de la telomerasa se considere una de las características de las células tumorales, hace de este enzima un objetivo potencial terapéutico y de diagnóstico.

TELÓMEROS Y TELOMERASA. EL PROBLEMA DE LA REPLICACIÓN TERMINAL

La idea de que los cromosomas lineales de las células eucariotas poseen estructuras terminales especializadas surgió, por primera vez, de los experimentos de Muller en 1938, quien encontró que, por efecto del tratamiento con rayos X, los cromosomas de la mosca *Drosophila* sufrían deleciones terminales o inversiones. Pocos años después McClintock en 1941, amplió esta idea al observar que los extremos físicos de los cromosomas eran necesarios para su estabilidad y posicionamiento, y los denominó telómeros. Casi treinta años después Blackburn y Gall (1978) describieron la existencia de un motivo extraño presente en el extremo de los cromosomas en *Tetrahymena*, que estaba formado por secuencias repetitivas ricas en guanina, que se unían a proteínas y formaban estructuras heterocromatínicas. Este fue el primer descubrimiento sobre la estructura molecular de los telómeros. Observaciones más recientes (Garvik *et al.*, 1995 y van Steensel *et al.*, 1998), sobre estos terminales y las proteínas que se unen a ellos, han confirmado estos hallazgos y han demostrado que una de las misiones primordiales de los telómeros es proteger las regiones adyacentes del DNA, aislando las terminaciones cromosómicas para prevenirlas de la fusión con otras terminaciones y de la digestión nucleolítica (Figura 1)

Los telómeros de eucariotas son secuencias hexaméricas repetidas de DNA, potencialmente expansionables y no codificables, que aparecen en el extremo de los cromosomas lineales y son esenciales para el mantenimiento de la estabilidad cromosómica. Consisten generalmente en ordenamientos especializados de secuencias repetitivas ricas en guanina (G) que se desarrollan en dirección 5' → 3', al extremo de los cromosomas, con la cadena complementaria, rica en citidina (C). Las secuencias teloméricas pueden variar entre las especies, pero cada organismo posee la misma secuencia repetitiva en todos sus telómeros. En humanos y en ratón dicha secuencia es TTAGGG. En

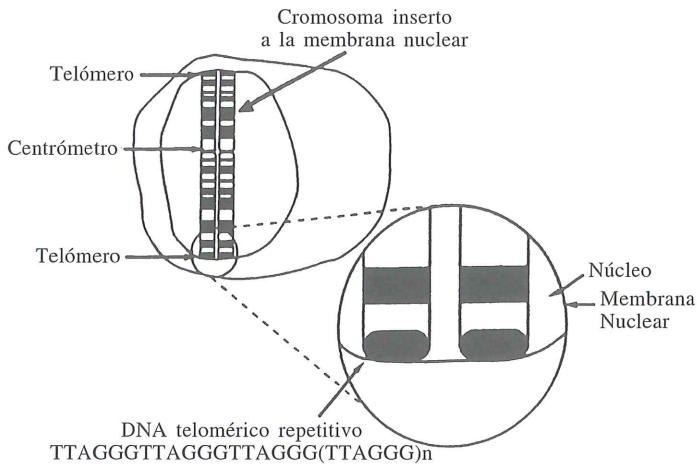


FIGURA 1. Estructura y localización de los telómeros en células humanas. Los 92 cromosomas, uno a cada extremo de cada cromosoma, se consideran esenciales para el mantenimiento de la estructura y función cromosómica.

la tabla 1 se muestra la composición en bases de los telómeros procedentes de diversas especies, así como la secuencia de las bases del RNA de la telomerasa que ha de servir como molde para el alargamiento de los telómeros.

En el momento del nacimiento los telómeros de las células somáticas humanas consisten en aproximadamente 15.000 bases del fragmento TTAGGG. En cada división celular se pierden de 25 a 200 bases de los extremos teloméricos, Cuando este acortamiento ocurre entre 80 a 100 veces, la célula deja de dividirse y envejece.

En los telómeros humanos la secuencia TTAGGG posee longitud variable según las diferentes células. Por ejemplo, los de las células germinales fluctúan entre 10.000 a 15.000 bases, mientras que en los leucocitos de sangre periférica fluctúan entre 5.000 y 12.000 bases. El mantenimiento de la longitud de los telómeros supone un dilema para la maquinaria de replicación celular porque la síntesis de la cadena conductora de la célula hija llega hasta el final del extremo 5' de la cadena del DNA de la célula madre, mientras que la síntesis de la cadena rezagada, al ser discontinua, no puede replicarse hasta el final. El acortamiento telomérico en condiciones extremas puede conducir a fusiones entre los cromosomas, reordenamientos del DNA, inestabilidad

<i>Telómeros y RNA componentes de la telomerasa</i>			
<i>Organismo</i>	<i>Secuencia telomérica</i>	<i>Molde RNA</i>	<i>Tamaño</i>
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	CAACCCCAA	160
<i>Euplotes</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	CAAAACCCCAAAACC	190
Humano	TTAGGG	CUAACCCUAAC	450
Ratón	TTAGGG	CCUAACCCU	450
<i>S. cerevisiae</i>	TG(1-3)	CACCACCCACACAC	1300

TABLA 1. Secuencia telomérica y región RNA molde (template) de la telomerasa en los organismos eucariotas indicados. El tamaño indica la longitud del RNA en nucleótidos.

genómica y cambios en el cariotipo. Tales alteraciones se han detectado con frecuencia en una serie de cánceres humanos y en la actualidad se especula y se trata de profundizar en el conocimiento del papel que juegan los telómeros en la progresión del cáncer.

Los telómeros funcionan, no sólo como caperuzas protectoras en los extremos de los cromosomas, sino también facilitando la replicación de dichos cromosomas. Es necesario insistir en que la maquinaria convencional replicativa del DNA utiliza un cebador (primer) de RNA, necesario para que se inicie la síntesis del DNA por acción de la DNA polimerasa. La síntesis del DNA se realiza siempre en dirección 5'→3' y en el caso de la cadena conductora al verificarse de manera continua las secuencias teloméricas pueden replicarse en su totalidad hasta el extremo 3'. En la cadena rezagada, sin embargo, la síntesis del DNA se verifica de manera discontinua dando lugar a los fragmentos Okazaki. Éstos al necesitar la síntesis de un «primer» de RNA por cada fragmento, no permiten que las secuencias teloméricas terminales no puedan estar representadas en su totalidad en el extremo 5' de la cadena hija, después de que se haya eliminado el RNA «primer» terminal de cada fragmento (Figura 2). Esto trae consigo

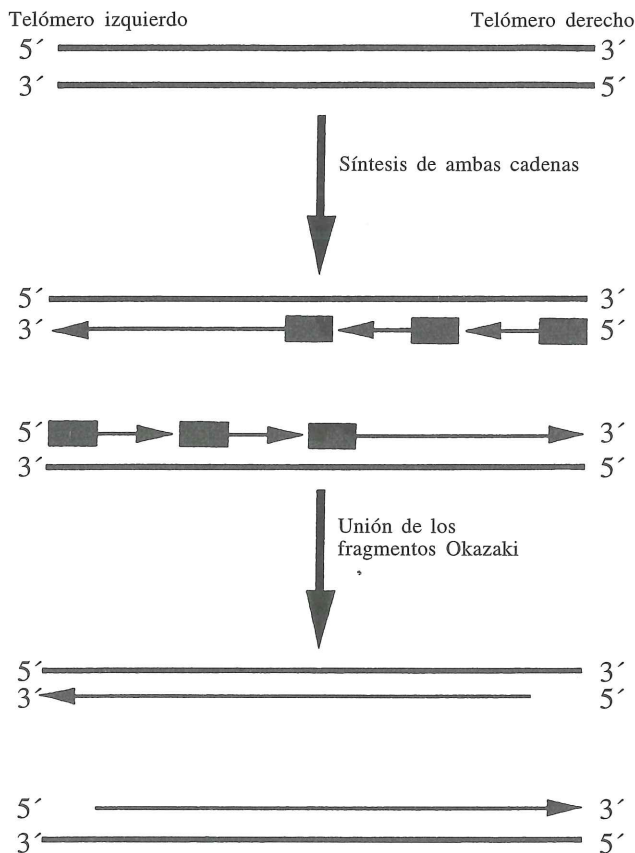


FIGURA 2. El problema de la replicación terminal. La cadena conductora es continua, mientras que la cadena rezagada es discontinua y consiste en fragmentos Okazaki. Después de la eliminación del RNA de cada fragmento y la unión de los fragmentos por la DNA ligasa, la cadena resultará incompleta ya que el último RNA «primer» no puede ser sintetizado.

un acortamiento inevitable de los cromosomas con cada ronda de división celular, llegando a un momento en el que estos extremos serán tan cortos que no podrán proporcionar la función protectora necesaria para el mantenimiento de la estabilidad genómica. Para solventar este problema de replicación terminal, la solución que han adoptado la mayoría de los organismos es usar una DNA polimerasa específica de los telómeros, denominada telomerasa, que alarga el extremo 3' de la secuencia telomérica de la cadena del DNA de la célula que va a sufrir la división celular.

La telomerasa es una ribonucleoproteína denominada, transferasa-telómero terminal, que actúa como retrotranscriptasa cuya misión es el mantenimiento de la longitud telomérica equilibrando su acortamiento con una neta elongación previa en el extremo 3' del DNA materno. La telomerasa fue caracterizada por Greider y Blackburn (1985) en extractos de *Tetrahymena*, y estos mismos autores clonaron los genes que codifican sus componentes RNA y proteínas. El componente RNA esencial de la telomerasa tiene la misión de unirse al extremo 3' de los cromosomas maternos y actuar como molde (template) para la extensión del telómero. Contiene de 9 a 30 nucleótidos en la región molde o región responsable de dictar la síntesis de las repeticiones teloméricas de la cadena de DNA complementaria. Esta propiedad hace de la telomerasa la única polimerasa conocida que acarrea su propio molde. De las dos proteínas que se unen al RNA y participan en la polimerización de nucleótidos, caracterizadas en *Tetrahymena*, ninguna de ellas presenta identidad sustancial con otras DNA polimerasas conocidas. Poco después Morin *et al* (1989) identificaron una actividad similar en la línea celular inmortal HeLa. Se ha identificado la telomerasa también en otros organismos como *Xenopus laevis*, levadura, ratón y hombre. En 1991 se han clonado las telomerasas de ratón y humano.

La telomerasa por su naturaleza ribonucleoprotéica utiliza su componente RNA interno (complementario de la cadena telomérica sencilla) como molde para sintetizar *de novo* el DNA telomérico (TTAGGG)_n en los extremos de los cromosomas. Esto ocurre en células de tejidos germinales normales, en la mayoría de las células tumorales y en eucariotas unicelulares inmortales. La extensión del DNA materno en su extremo 3', permite la replicación adicional del extremo 5' de la cadena rezagada, compensando así el problema de la replicación terminal, protegiendo y estabilizando los telómeros. La telomerasa para actuar tiene que unirse al extremo telomérico del cromosoma y alinearse reconociendo al RNA de la telomerasa. Esto se verifica en un lugar de la enzima denominado sitio de anclaje. El terminal 3' del cromosoma se alarga con seis nucleótidos complementarios a los del RNA para crear la repetición telomérica mediante la polimerización. La traslocación supone un reposición del extremo telomérico a la posición inicial para repetir la polimerización (Figura 3).

Los telómeros pueden visualizarse mediante técnicas de hibridación *in situ* con fluorocromos utilizando una sonda específica de la secuencia telomérica. Para ensayos cuantitativos, la longitud de los telómeros se mide por el tamaño de sus fragmentos terminales de restricción (TRF), que se evalúa mediante digestión del DNA con enzimas de restricción que poseen lugares de reconocimiento de bases, de modo que la mayor parte del DNA se reduce a fragmentos cortos. Como las repeticiones teloméricas no son palindrómicas y carecen de sitios de restricción, permanecen como fragmentos terminales de restricción largos que pueden ser identificados con sondas utilizando oligonucleótidos teloméricos marcados. Un ensayo muy sensible para medir la

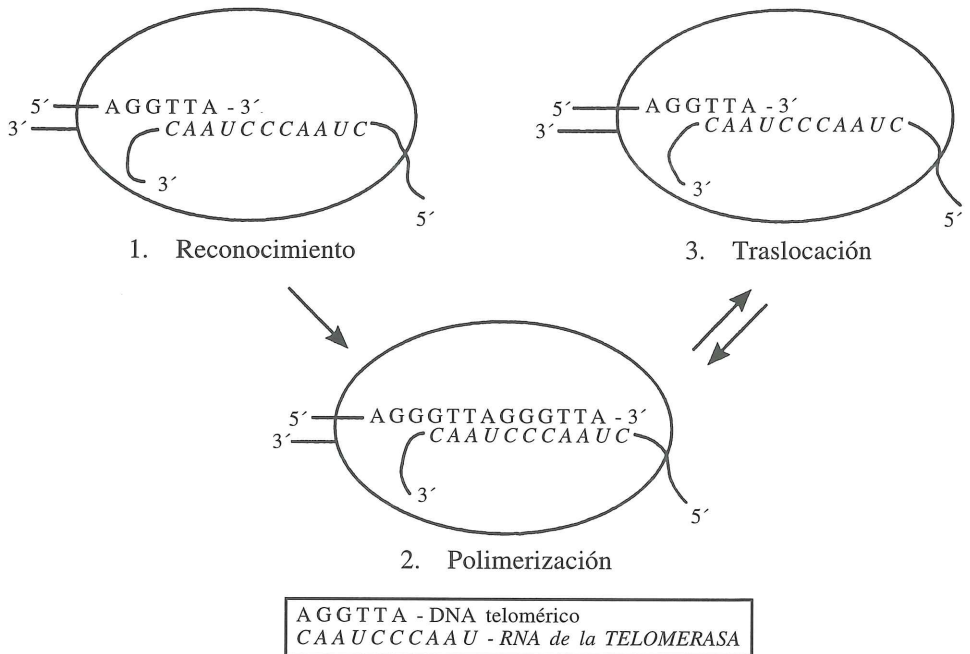


FIGURA 3. Mecanismo de acción de la telomerasa. 1. Alineamiento inicial, el DNA telomérico se empareja con el sitio molde del RNA de la telomerasa. 2. El extremo 3' del DNA se alarga sobre el molde RNA. 3. el extremo 3' del DNA se trasloca a la posición inicial para permitir la síntesis de una nueva repetición telomérica.

actividad telomerasa, que se basa en la reacción de la polimerasa es el Protocolo de Amplificación de las Repeticiones Teloméricas (TRAP).

Está claro que el problema de la replicación terminal, descubierto por Watson en 1972, se debe a que el mecanismo de replicación del DNA en los cromosomas lineales es diferente para cada una de las dos cadenas, denominadas conductora o continua y rezagada o discontinua. La replicación del DNA requiere la síntesis sobre la propia cadena del DNA, de un RNA «primer» o cebador, para que se inicie la polimerización del DNA en dirección 5'→ 3'. Después de la polimerización del DNA, los RNA «primer» se degradan y se reemplazan por DNA sintetizado por un «primer» adelantado. Así, el extremo 3' de la cadena retrasada perderá algunos nucleótidos cada vez que la célula replique su DNA (Figuras 2 y 3). El DNA de algunos virus y bacterias y el de las mitocondrias que poseen DNA circular, no presentan este problema porque sus cromosomas no tienen extremos.

El progresivo acortamiento de los telómeros con cada ronda de división celular puede afectar a genes esenciales, lo que conduce a la emisión de señales que van a originar la parada del ciclo celular y con ello la inhibición irreversible de la proliferación celular. Se ha considerado que los telómeros son el «talón de Aquiles» de la doble hélice. Este concepto fué emitido por Olonikov en 1973, quien además propuso, que un «oligonucleótido informativo» incorporado en el DNA después de un telogén y controlando la síntesis de un represor de la diferenciación, pudiera servir como medio de contar las mitosis en el curso de la morfogénesis.

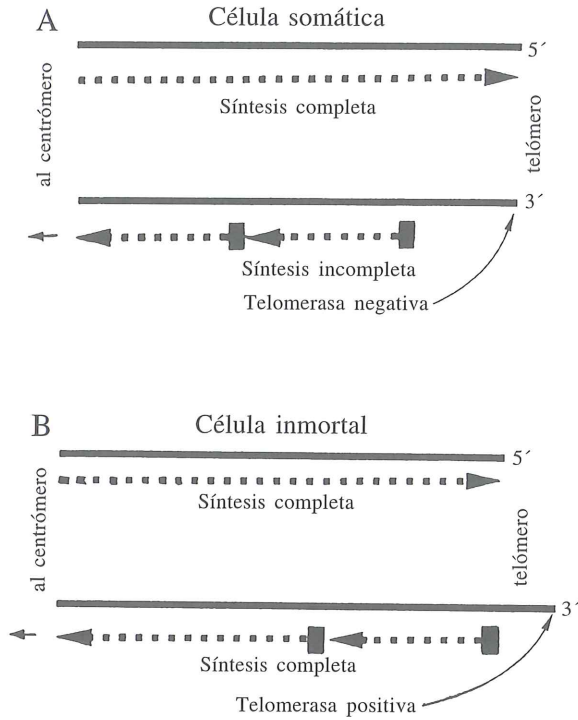


FIGURA 4. Diferencias en la replicación de las células somáticas y las inmortales. La replicación del DNA se verifica de manera diferente en la cadena conductora y en la cadena rezagada. La eliminación de los RNA «primer» en la cadena rezagada origina un hueco que se llena por extensión del fragmento Okazaki siguiente. Como no hay DNA más allá del terminal 5' del cromosoma que pueda servir como molde para el fragmento Okazaki siguiente, se crea un hueco al final del cromosoma. (A) Acortamiento de telómeros en la cadena rezagada en células somáticas que no poseen actividad telomerasa, que se transmite a las células hijas en cada ronda de división celular. (B) Las células que poseen actividad telomerasa pueden ampliar la longitud telomérica en el terminal 3' del DNA materno compensando así la replicación incompleta de la región telomérica.

ENVEJECIMIENTO Y ACORTAMIENTO DE TELÓMEROS

Hayflick y Moorhead, en los años sesenta, demostraron que los fibroblastos humanos normales en cultivo exhibían una capacidad limitada de dividirse y que después de un número definido de divisiones dejaban de proliferar y entraban en la senescencia celular. Este momento final de la vida proliferativa fue demostrado por estos autores también en otros tipos de células somáticas y ellos mismos lo denominaron «límite Hayflick», y fijaron entre 50 y 100 la capacidad de duplicación que una célula somática podía sufrir. La senescencia celular en el límite Hayflick se caracteriza por la inestabilidad cromosómica y la salida del ciclo celular, además de diversos cambios bioquímicos y morfológicos. Las células senescentes post-mitóticas, una vez que atraviesan el límite Hayflick, pueden permanecer metabólicamente activas, y mantener su viabilidad por períodos amplios de tiempo, siempre que se mantengan las condiciones apropiadas de cultivo. La senescencia replicativa se ha demostrado también *in vivo* en

células de donantes de diferentes edades, lo que refleja la presencia de un «reloj mitótico» que contabiliza el número de divisiones celulares.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos moleculares que regulan la senescencia replicativa, sin embargo se sabe, que el estado senescente puede ser retrasado y en algunos casos eludido, permitiendo así a la célula entrar en la inmortalidad. Se ha propuesto un modelo de dos fases para controlar el ciclo celular (Figura 5). Al llegar al límite de mortalidad 1 (M1) o límite de Hayflick, las células tienen que salir del estado proliferativo (ciclo celular) y entrar en el estado senescente. En presencia de oncogenes víricos las células pueden sufrir una transformación, probablemente por inhibición de los genes supresores de tumores, el p53 y el pRB, escapar de la senescencia y adquirir una ampliación de su periodo replicativo en el que siguen perdiéndose telómeros. Esa ampliación no es ilimitada y finaliza en el estado de mortalidad 2 (M2) o estado de crisis, que se asocia con una inestabilidad cromosómica y la muerte celular. Algunas células pueden emerger de la crisis, y al activarse en ellas la telomerasa, es cuando adquieren la inmortalidad. Por tanto, el estado M1 es el primero de los dos mecanismos independientes, responsable de la senescencia celular normal, estado en el que aún quedan repeticiones teloméricas suficientes. Si M1 se sobrepasa, se evade la entrada en senescencia, pero el acortamiento telomérico prosigue y conduce a las células al estado de mortalidad 2 o estado de crisis donde los cromosomas han perdido ya la función protectora de los telómeros, se vuelven inestables y es cuando la célula ha de morir. La reactivación de la actividad telomerasa estabiliza el acortamiento de los telómeros, resultando en un escape de M2 y la entrada en la inmortalidad celular.

La hipótesis de la inmortalidad y la telomerasa no explica en su totalidad dos de las características de las células tumorales: (1) la inmortalidad no es la única característica de las células tumorales, ya que las células germinales también la poseen, y (2) la mayoría de cánceres poseen telómeros muy cortos y elevada actividad telomerasa. De todas formas, la hipótesis M1/M2 explica la dinámica telomérica que conlleva a la senescencia o a la inmortalidad.

Como ya se ha mencionado anteriormente, Watson (1972) y Olonikov (1973) sugirieron que en ausencia de mecanismos especiales, los cromosomas lineales no pueden replicarse en su totalidad y que esto crea el problema de replicación terminal que predice que el terminal 5' de las cadenas hijas se acortará en cada división (Figuras 3 y 4). De no existir algún mecanismo compensador tendrá lugar una pérdida neta del extremo del DNA cromosómico en función del número de divisiones celulares. En la mayor parte de las células inmortales eucariotas, la telomerasa funciona como mecanismo compensatorio para mantener la longitud de los telómeros. La hipótesis de la senescencia e inmortalidad celular (figura 5) sugiere que el acortamiento de los telómeros, en ausencia de telomerasa, es el reloj mitótico para la senescencia replicativa en células somáticas normales. El número de divisiones celulares se registra por la pérdida gradual de las secuencias teloméricas. Así que, a medida que el acortamiento de los telómeros llega a una longitud crítica (M1), se inducen señales antiproliferativas que van a conducir a la salida del ciclo celular y a la senescencia celular. El control M1 puede ser evitado (transformación por virus) y las células continúan dividiéndose y perdiendo telómeros. En el punto de crisis (M2), la telomerasa se reactiva. Esto permite a la célula a mantener estables sus telómeros, evitando la crisis y adquiriendo una capacidad replicativa ilimitada y con ello la inmortalidad.

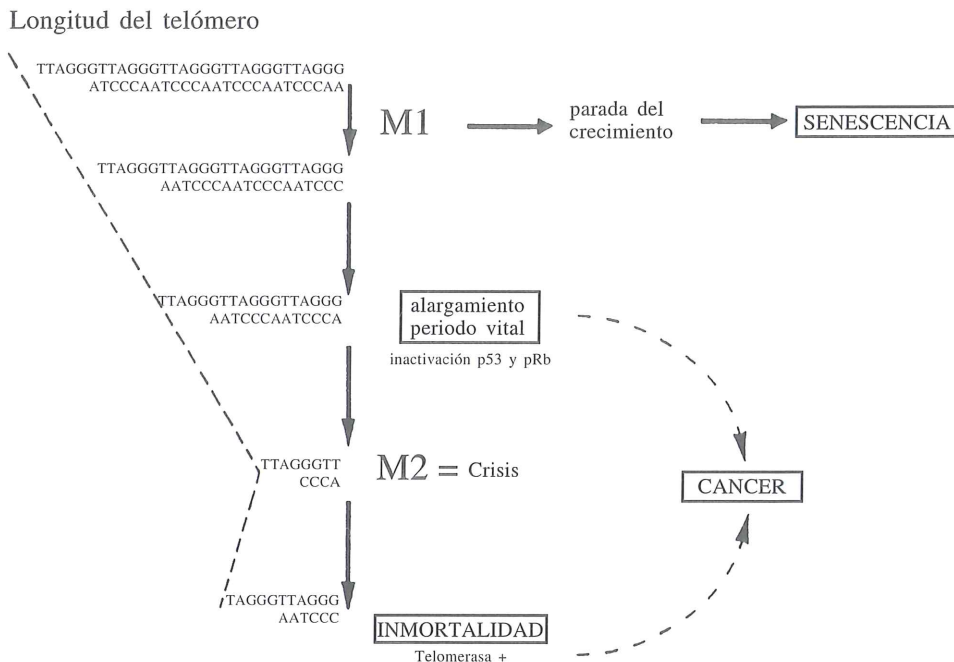


FIGURA 5. La hipótesis de la implicación de los telómeros en la senescencia e inmortalidad celular. La telomerasa es activa en células germinales, pero se encuentra reprimida en la mayor parte de las células somáticas normales. En ausencia de telomerasa, los telómeros se acortan en cada división. El estado de mortalidad 1 (M1) o límite Hayflick, se inicia cuando aún permanecen varias kilobases de repeticiones teloméricas y las células entran en senescencia por parada del crecimiento. El estímulo que induce a la parada del crecimiento son las señales de lesión del DNA que se emiten como respuesta a la pérdida telomérica. En estas condiciones, si se inactivan las proteínas p53 y pRB, las células pueden continuar dividiéndose y acortando sus telómeros hasta llegar a un estado de crisis o estado de mortalidad 2 (M2) que conlleva a la muerte celular. Si en este momento se activa la telomerasa la célula puede evadirse del estado M2, mantener sus telómeros y convertirse en inmortal.

El progresivo acortamiento de telómeros resulta en la pérdida de parte de los 92 telómeros que se encuentran en una célula diploide humana, la cual resulta desprovista de algunas repeticiones teloméricas. Aunque aún permanezcan una proporción de varias kilobases en cada uno de los telómeros, como las repeticiones teloméricas tienen la misión de proteger los extremos de los cromosomas, sólo la pérdida de alguna de esas repeticiones puede ser motivo suficiente para que la célula, al sentirse desprotegida, emita una señal de lesión del DNA que prevenga la proliferación. Se ha observado que la pérdida de un simple telómero en una célula de *Sacharomyces cerevisiae* causa la parada del ciclo celular. Se considera que dos proteínas por lo menos, la p53 y la p21 se encuentran implicadas en el momento en el que la lesión del DNA controla la progresión del ciclo celular. La expresión de p53 (el guardian del genoma) se induce inmediatamente cuando se lesiona el DNA. El acortamiento telomérico puede hacer sentir a la célula la rotura del DNA en su doble cadena por lo que solicita ayuda para activar la expresión de la proteína p53. Esta proteína induce a su vez la expresión de la proteína p21, que posee capacidad para unirse al antígeno nuclear de proliferación celular (PCNA), e inhibir directamente al complejo de re-

plicación del DNA y la actividad de las quinasas dependientes de ciclina. Además, la fosforilación de factores, como la proteína pRB, por las mencionadas quinasas, es uno de los requerimientos para la progresión del ciclo celular. Contando con todo ello, se postula una triple hipótesis para explicar la inducción del fenotipo senescente o estado M1 (Figura 6):

(1) Un cromosoma que ha perdido secuencias teloméricas se asemeja a un DNA con rotura en sus dos cadenas, y desencadena la emisión de señales de lesión del DNA; esta señal induce la expresión de las proteínas p53 y p21; p21 inhibe la actividad de las quinasas dependientes de ciclina; estas quinasas al estar inhibidas no pueden fosforilar la proteína pRB; y la no fosforilación de pRB, unida a otras acciones de p21 y p53, ocasiona la parada del ciclo celular.

(2) Los telómeros pueden unirse o secuestrar factores de transcripción que activan o reprimen una serie de genes. Así como los telómeros se van acortando, los factores de transcripción quedan en libertad y pueden ser capaces de unirse a sitios intragenómicos importantes donde pueden actuar reprimiendo o activando genes implicados en la progresión del ciclo celular o en la diferenciación. Existe un precedente en levadura que apoya esta idea, donde la proteína Rap1 asociada a los telómeros secuestra factores silenciadores que pueden actuar en sitios no teloméricos cuando quedan liberados. Aunque esta hipótesis puede explicar de algún modo la complejidad del fenotipo senescente, no existen datos en células de mamíferos.

(3) Un tercer modelo indica que la estructura heterocromatínica del DNA cerca de la región telomérica, puede reprimir genes reguladores (por ejemplo, factores de transcripción), que frenan el crecimiento y alteran la diferenciación celular. En tanto cuanto los telómeros se acortan, la heterocromatina disminuye, con lo cual desaparece la represión de los reguladores. También aquí tenemos un precedente en la levadura que silencia el lugar cerca de los telómeros. Una hipótesis relacionada explica que la pérdida de genes silenciadores o cambios en la estructura de la cromatina pueden, independientemente de los telómeros, inducir el fenotipo senescente.

La pérdida de telómeros puede ser un punto de comprobación de entrada en la senescencia, pero es difícil apoyar esta idea ya que existen 92 telómeros, cada uno con una longitud determinada, lo que determina que las células con telómeros más largos pueden dividirse un número mayor de veces.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que las células normales sufren un número finito de divisiones celulares y al final de ellas ingresan en un estado no proliferativo denominado **senescencia celular o replicativa** y se ha propuesto que el acortamiento de los telómeros es el reloj biológico que desencadena la senescencia. Para comprobar esta hipótesis Bodnar *et al.* han investigado recientemente (1998) sobre líneas celulares humanas telomerasa-negativas transfectadas con vectores que codifican la subunidad catalítica de la telomerasa humana y han observado que los clones control telomerasa negativos exhibían acortamiento de telómeros, mientras que los clones transfectados, que expresaban la telomerasa, alargaban sus telómeros, se dividían vigorosamente, mostraban menor actividad β -galactosidasa (biomarcador de la senescencia) y habían sobrepasado su expectativa de vida en 20 divisiones más. Con estos hallazgos se ha establecido una relación causal entre el acortamiento de los telómeros y la senescencia celular *in vitro*. La capacidad de mantener las células

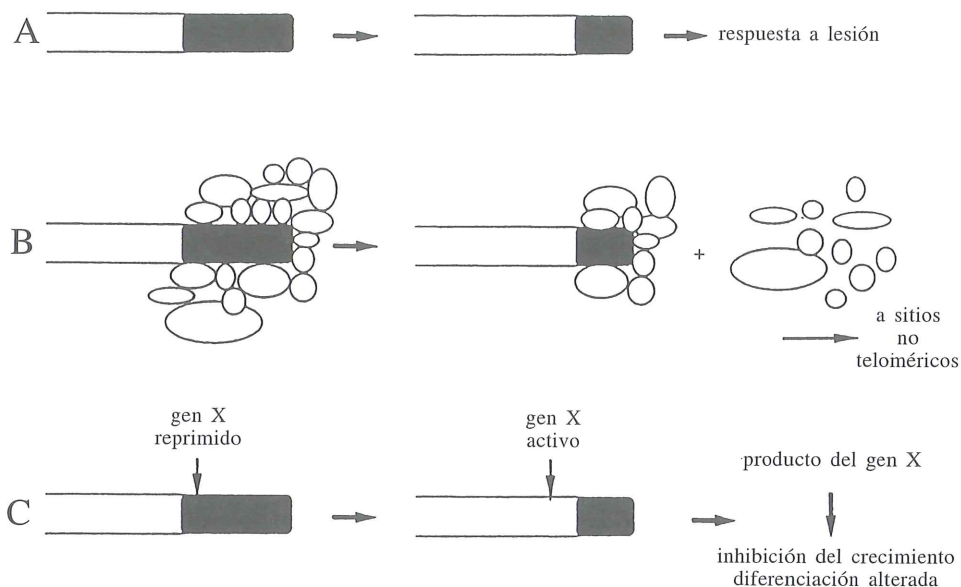


FIGURA 6. Tres modelos que explican como el acortamiento de telómeros induce el fenotipo senescente. Los terminales cromosómicos con las porciones teloméricas y subteloméricas se muestran en negro. (A) Un telómero corto se asemeja a un DNA con rotura en su doble cadena lo cual lleva a la emisión de una señal de DNA lesionado que conduce a una inmediata parada del ciclo celular y a la senescencia. (B) Los telómeros secuestran proteínas que pueden unirse a sitios intragenómicos, donde pueden activar o reprimir la expresión genética. Cuando el telómero se acorta, estas proteínas se liberan y pueden unirse a sitios no teloméricos donde pueden alterar genes afectando el crecimiento y la diferenciación. (C) El campo de la heterocromatina disminuye en cuanto se acorta el telómero. Los genes en el interior de la región heterocromatinica se reprimen y esta represión se elimina con el acortamiento telomérico. Alguno de estos genes puede codificar proteínas que pueden detener el crecimiento y alterar la diferenciación

normales humanas en un estado fenotípico joven puede aportar numerosas aplicaciones a la medicina.

Se ha considerado anteriormente que la replicación incompleta de los extremos de los cromosomas, propuesta por Watson y Olonikow (1972 y 1973), podía ser la causa de la pérdida gradual del potencial proliferativo en la senescencia celular. Sin embargo, la primera evidencia acerca de que la pérdida de los telómeros ocurre durante el envejecimiento celular fue obtenida por Harley *et al.*, (1990 y 1991) analizando fibroblastos humanos en cultivo, en los cuales la longitud media de los fragmentos terminales de restricción decrecía de una manera dependiente de la replicación. Esta disminución se relacionaba también con la senescencia *in vivo*, ya que, tanto en fibroblastos como en linfocitos de sangre periférica, la longitud de estos fragmentos en donantes viejos era más corta que en los donantes más jóvenes. Por el contrario, la longitud de los telómeros no decrecía en células inmortalizadas *in vitro*, en células tumorales o en células germinales, que expresaban la telomerasa. Tales resultados han llevado a proponer que durante las sucesivas rondas de replicación del DNA, la progresiva pérdida de las secuencias teloméricas ocurre en células normales somáticas hasta que un acortamiento

crítico en la longitud de los telómeros llega a percibirse como lesión en el DNA y obliga a las células a salir del ciclo celular. Las células inmortales necesitan un mecanismo que estabilice los extremos de los cromosomas y para ello se necesita la expresión de la telomerasa. Esta hipótesis del envejecimiento relacionada con la longitud de los telómeros es atractiva porque proporciona el mecanismo molecular que contabiliza el número de divisiones celulares en las células somáticas normales.

Sin embargo, estudios recientes han revelado una panorámica más compleja. Se han identificado líneas celulares inmortales telomerasa-negativas y también se ha detectado que el tratamiento de líneas humanas de linfocitos B y T inmortales con inhibidores de la transcriptasa inversa, reduce la actividad de la telomerasa con ningún efecto sobre el fenotipo inmortal. Por otro lado, algunas células somáticas normales poseen actividad telomerasa, aunque sus telómeros continúan acortándose con cada ronda de replicación. La actividad telomerasa en varias células somáticas híbridas no se relaciona con su capacidad para sufrir la senescencia o continuar proliferando, lo que demuestra que algunos híbridos senescentes continúan expresando telomerasa. Estos datos sugieren que la actividad telomerasa por sí misma, no mantiene la longitud de los telómeros, e indican la existencia de mecanismos independientes de la telomerasa, estabilizadores de los extremos de los cromosomas. Existen observaciones adicionales no reconciliadas con la hipótesis de los telómeros, debido a que se ha comprobado que dos células hijas pueden poseer potencial proliferativo muy diferente y diferir hasta en 30 duplicaciones y también se ha detectado, que con una serie de manipulaciones experimentales se puede incrementar significativamente el período vital de fibroblastos humanos

TELOMERASA Y CÁNCER

Para que una célula adquiera la malignidad se necesita que ocurran en ella alteraciones genéticas múltiples y que una vez inmortal proliferen y origine crecimiento tumoral y metástasis. Como resultado la célula requiere mecanismos para mantener la funcionalidad de los telómeros. A estas conclusiones se ha llegado al detectarse actividad telomerasa en muestras tumorales y no en los tejidos adyacentes y ha hecho suponer que las células cancerosas deben reactivar la telomerasa antes de que se establezca una malignidad agresiva. La actividad telomerasa se convierte así en un marcador excelente de la malignidad y proporciona un medio valioso para el diagnóstico de tumores. También se ha sugerido que la telomerasa puede ser un indicador útil para observar la progresión de un cáncer, frente a un tratamiento de quimioterapia, en un determinado paciente. Además de todo esto, la capacidad de la telomerasa para mantener el crecimiento tumoral puede ser interesante, ya que la inhibición de su actividad o de su expresión génica puede originar la reversión del tumor.

Sin embargo, el que la telomerasa sea requerida para la inmortalidad celular o para el crecimiento tumoral es un hecho discutible, pues algunos tumores y líneas celulares inmortales no contienen telomerasa detectable. Por tanto, es probable que la telomerasa no siempre sea necesaria para la inmortalidad celular o para el crecimiento tumoral, a pesar de que más de un 85% de los cánceres humanos estudiados expresen este enzima.

La telomerasa, al igual que otras polimerasas, depende de las interacciones entre sus componentes proteicos con el DNA. Estas interacciones estabilizan el complejo

antes de la iniciación de la polimerización y ayudan a traslocar el telómero recién ampliado para que comience otra ronda de síntesis. Recientemente se ha descubierto la existencia de una desviación clave en el control del envejecimiento celular. En la mayor parte de los tejidos los telómeros se acortan cada vez que la célula se divide hasta que los cromosomas se encuentran tan desprotegidos (deshilachados) que la célula se torna senescente. Pero en las células embrionarias, en aquellas que generan los óvulos y espermatozoides (germinales), y en las cancerosas, la telomerasa reconstruye los telómeros después de cada división manteniendo intacta la longitud telomérica. Investigadores de la Universidad Rockefeller en Nueva York (Lange *et al.*, 1998), han descubierto recientemente en células humanas, la primera proteína enzimática de enlace al DNA específica de los telómeros, que controla la actividad de la telomerasa. Este enzima, que ellos han denominado tankirasa, facilita la acción de la telomerasa porque elimina la proteína que bloquea el acceso de la telomerasa a los extremos de los cromosomas. Si este enzima juega realmente este papel, se ha abierto un interesante camino para desarrollar compuestos que aprovechen la actividad de la tankirasa para controlar el período vital proliferativo. Los compuestos que la activen podrán poner en marcha la actividad telomerasa en células utilizadas en terapias génicas con el objeto de retrasar la entrada en senescencia. Por el contrario, agentes anticáncer podrán trabajar inhibiendo la tankirasa y con ello impidiendo el acceso de la telomerasa al telómero y así devolver la senescencia y la mortalidad a células cancerosas inmortalizadas. Ante estos hallazgos Tomas Lindhal del Imperial Cancer Research Center en Londres, hace el siguiente comentario. «Este descubrimiento ha abierto un nuevo campo, quién sabe si dentro de cinco años los inhibidores de la tankirasa puedan ser tan importantes como se piensa que sean los inhibidores de la telomerasa».

La estructura de la tankirasa proporciona algunos indicios (claves) de como debe actuar. Posee 24 repeticiones ankirina, que en otras proteínas se encuentran implicadas en las interacciones proteína-proteína. Otra sección de la tankirasa se parece catalíticamente a la región activa de otro enzima denominado poli (adenosina-difosfato-ribosa) polimerasa, (PAPR). La PAPR interviene activamente en la reparación del DNA, modificando, por ADP-ribosilación, las proteínas del complejo molecular que generan el DNA nuevo y a si misma. La actividad PAPR se basa en sustraer ADP-ribosa de un nucleótido el NAD⁺ (nicotinamido adenin dinucleótido⁺) y adionarla a proteínas específicas. Para ver si la tankirasa muestra un comportamiento catalítico semejante, estos autores pusieron en contacto en el tubo de ensayo los tres componentes: NAD⁺, TRF-1 (factor de enlace a las repeticiones teloméricas), y la tankirasa y encontraron que nuestro enzima añadía residuos de ADP-ribosa a sí misma y al TRF-1. Normalmente el TRF-1 se encuentra unido al DNA, pero cuando la tankirasa es activa puede ADP ribosilar al TRF-1. Es durante, o quizás después, de la replicación del DNA, cuando la tankirasa modifica el TRF-1 de tal forma que éste abandona los telómeros y permite el acceso a la telomerasa, para que ésta actue reemplazando los telómeros perdidos durante la replicación (Figura 7).

ENVEJECIMIENTO Y CÁNCER

La capacidad limitada de las células a dividirse más allá de un número definido de duplicaciones celulares (potencial de crecimiento definido), conlleva a la senescencia celular o estado de parada irreversible del crecimiento que depende de la edad o de las duplicaciones de una célula. Por ello, la senescencia celular supone la **pérdida de la**

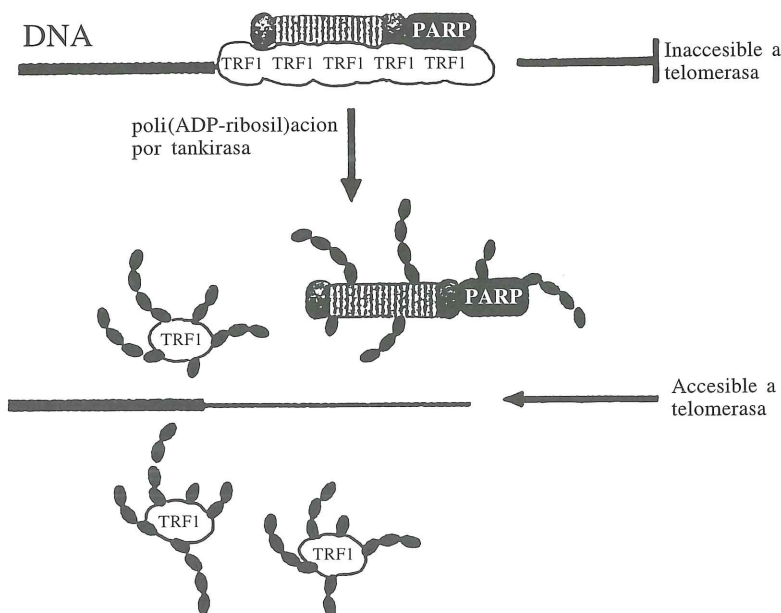


FIGURA 7. La ADP-ribosilación del factor de enlace a las repeticiones teloméricas (TRF-1) por acción de la tankirasa, permite a la telomerasa alcanzar el telómero y reemplazar el DNA perdido en los extremos de los cromosomas.

capacidad replicativa. Por inmortalidad celular se conoce la capacidad celular de proliferación indefinida. En organismos multicelulares de vida larga, la inmortalidad celular o potencial de crecimiento ilimitado, puede ser considerada como una evasión anormal de la senescencia celular. La inmortalidad celular supone, por tanto, **la ganancia de la capacidad replicativa indefinida.**

Cáncer y envejecimiento son a primera vista dos campos completamente separados, con una sola conexión y es que la incidencia del cáncer crece a medida que transcurre la edad. El envejecimiento es un proceso complejo, regulado a nivel genético, en el que se encuentran implicados un gran número de procesos moleculares y fisiológicos. El cáncer es también un proceso complejo y, al igual que en el envejecimiento, no es posible encontrar un mecanismo simple que explique todos los cambios bioquímicos que ocurren durante su desarrollo. El mayor logro ha sido la hipótesis unificada del origen genético de la mayoría de cánceres, ya que hoy no se duda que la mayoría de ellos surge por mutaciones en múltiples genes que afectan al crecimiento normal de una célula

Al enfrentar los conceptos senescencia y cáncer surge la siguiente pregunta ¿Puede la senescencia proteger contra el cáncer?

El cáncer es una enfermedad cuya característica principal es la proliferación celular incontrolada y cualquier mecanismo que pueda frenar este proceso puede, potencialmente, interrumpir su progresión. La inducción natural de la senescencia, mediada por el acortamiento de los telómeros, puede ser un mecanismo ideado a lo largo de la evolución para prevenir el cáncer en especies de larga vida. Sin embargo, el cáncer

surge (su prevalencia es más elevada en la senescencia) por evasión de los controles senescentes mediante la acumulación de mutaciones que afectan a los genes supresores, que son los controladores clave del crecimiento.

La formación de un tumor requiere múltiples cambios genéticos independientes, seguidos de la expansión clonal. Si se considera que la frecuencia de mutaciones espontáneas es aproximadamente 10^{-6} , se necesita al menos un millón de células para que ocurra, con probabilidad razonable, una mutación. Estas mutaciones han de acumularse en la misma célula y por tanto, han de tener lugar una serie de expansiones clonales (figura 8). Como se requiere que la célula se duplique 20 veces para generar un millón de células, cada mutación deberá ir acompañada por 20 divisiones. Asumiendo que sean necesarias 5 mutaciones en una misma célula para que surja el cáncer, dicha célula necesitará dividirse 100 veces para llegar a la malignidad. La pérdida de células por apoptosis o la inhibición de la proliferación por senescencia limitará el número de células en el tumor. Si se tiene en cuenta que la mayoría de las células humanas solo se divide 50 - 70 veces, la senescencia celular actuará a modo de freno efectivo sobre la proliferación de células que han acumulado algunas mutaciones (Figura 8).

Se ha propuesto que la senescencia celular se controla por una familia de genes que se activan al final de la vida proliferativa y conducen a la célula al estado senescente. La inmortalidad sólo ocurre cuando los genes senescentes acumulan defectos y pierden su operatividad, lo cual permitirá a la célula escapar del programa de la senescencia. La telomerasa se re-expresa en la mayoría de los tumores y líneas celulares inmortalizadas, mientras que en la mayoría de células normales somáticas no posee actividad porque existe un mecanismo genético represor de la actividad telomerasa. Las células tumorales y las inmortales han perdido o inactivado el gen represor putativo (Figura 9). En apoyo de estas hipótesis, Oshimura y Barret, 1997 han conseguido experimentalmente la restauración de la senescencia celular en células de carcinoma renal (RCC23) mediante la introducción de un cromosoma 3 normal.

La senescencia celular presenta consecuencias fisiológicas muy interesantes. La senescencia celular es un mecanismo supresor de tumores, ya que previene a la célula de la adquisición de mutaciones múltiples que la llevarían a la transformación maligna. Muchos tumores poseen células con un potencial indefinido de división de modo que el proceso tumorigénico selecciona a aquellas células que pueden total o parcialmente evadir la senescencia. Ciertos oncogenes (celulares o víricos) actúan ampliando el período de vida proliferativo. Por ello las mutaciones oncogénicas y las estrategias de los virus oncogénicos acarrear la activación de mecanismos que pueden evadir el estado senescente. Entre los genes necesarios para establecer y mantener la senescencia están el p53 y el pRB, genes supresores de tumores, ya citados con anterioridad, que son los que se pierden más fácilmente en la mayoría de tumores humanos. La supresión tumoral es el valor adaptable de la senescencia ya que, cualquier proceso limitante del crecimiento puede suprimir la tumorigénesis.

La senescencia celular o replicativa es una parada irreversible de la proliferación celular unida a una alteración en la función celular. La senescencia celular se encuentra controlada por múltiples genes y no depende del tiempo sino del número de divisiones celulares. Las células senescentes adquieren tres características: (1) frenan el creci-

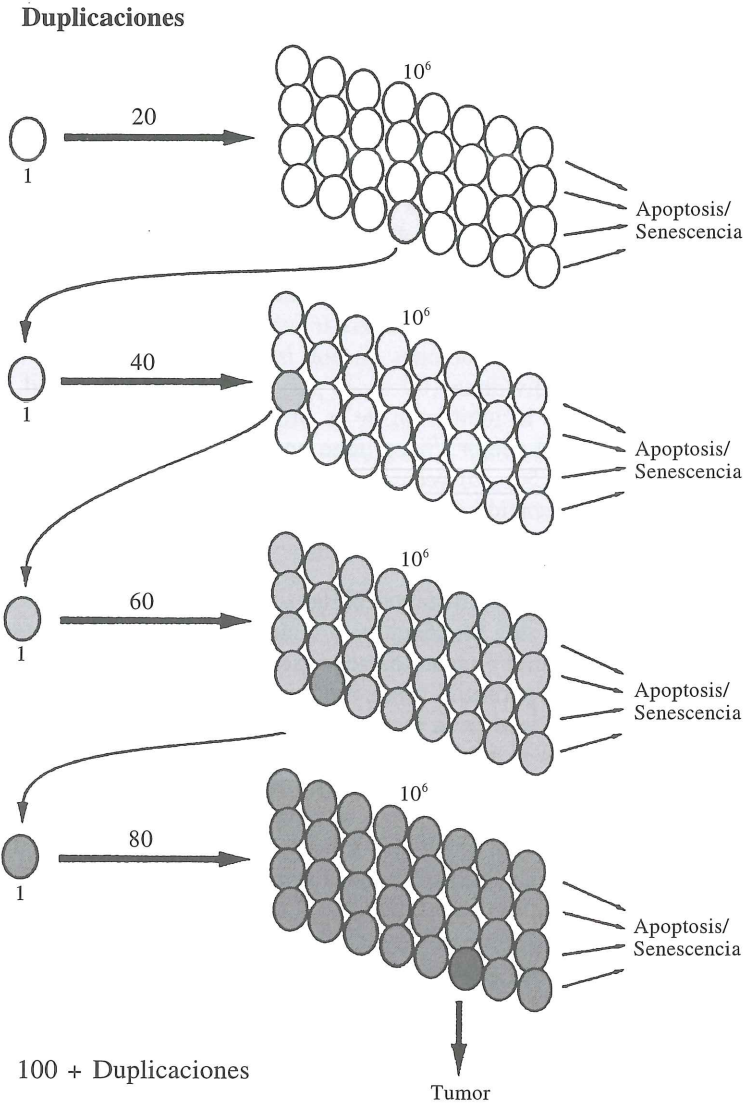


FIGURA 8. La formación de un tumor requiere muchos cambios genéticos independientes y expansión clonal.

miento cuando se encuentran en la fase G1 del ciclo celular y poseen un contenido diploide de DNA, por pérdida de la capacidad de entrar en la fase S (síntesis del DNA) del ciclo celular en respuesta a mitógenos. Las células senescentes permanecen activas metabólicamente y aunque muchos genes se mantienen todavía inducibles, existen represiones en genes reguladores clave del crecimiento o superexpresiones en otros genes como la del inhibidor de la kinasa dependiente de ciclina. (2) Las células senescentes por su estado no proliferativo irreversible, se asemejan a las células diferenciadas terminales y (3) las células senescentes adquieren resistencia a la apoptosis y son bastante estables.

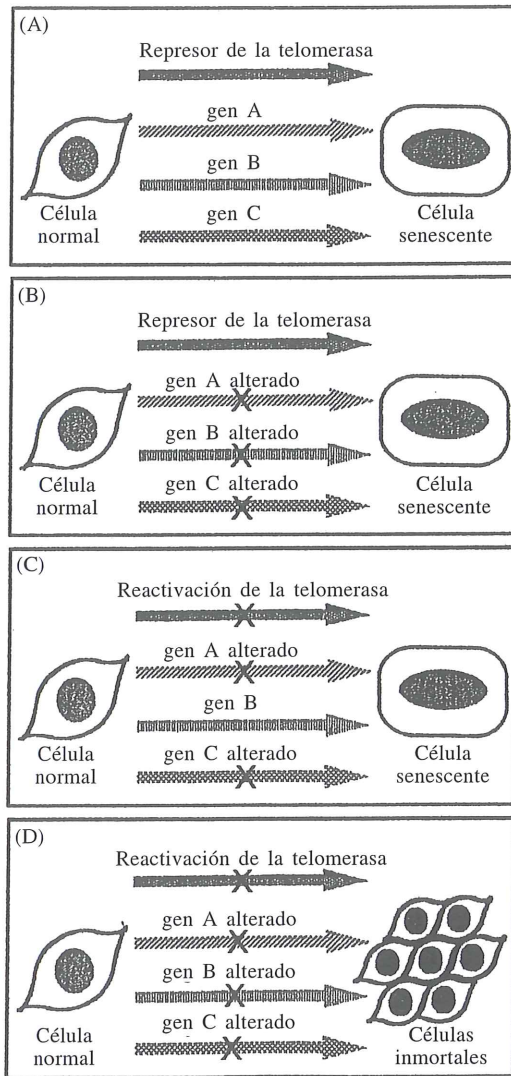


FIGURA 9. Vías múltiples hacia la senescencia celular. (A) En las células normales la actividad telomerasa está reprimida por el gen represor de la telomerasa. Las otras vías funcionan normalmente conduciendo a la senescencia. (B) Aunque algunas vías están alteradas (los genes A, B y C están alterados), las células aún envejecen porque la actividad telomerasa se encuentra reprimida. (C) La alteración del gen represor de la telomerasa activa la telomerasa, sin embargo, como el gen B de senescencia funciona normalmente la célula envejece. (D) Todas las vías se encuentran alteradas y funciona la telomerasa lo cual conduce a la inmortalidad celular.

La conexión entre la senescencia replicativa, la immortalización y el acortamiento de telómeros se encuentra en la actualidad sometida a una intensa investigación. No está claro el mecanismo que utiliza la célula para frenar la proliferación una vez que la longitud de los telómeros ha alcanzado el estado de mortalidad 1 (límite Hayfick), como tampoco lo está cómo se activa la telomerasa en el momento crítico del estado de mortalidad 2 para que las células inmortales mantengan su longitud telomérica. La

posibilidad de que la manipulación de la longitud de los telómeros pudiera alterar la entrada en el estado senescente y afectar las enfermedades degenerativas del envejecimiento, presenta un escenario atractivo en el que se necesita encontrar explicación al papel todavía misterioso de este fascinante elemento de los cromosomas.

La posibilidad de rejuvenecer las células con telomerasa abre nuevas vías de investigación, y aquí surge la pregunta ¿podrá la manipulación de la telomerasa permitir cambios en la expectativa de vida? El tiempo lo dirá, pero ya se puede adelantar que el reajuste del reloj telomérico ha de tener un precio y es que la inducción de la inmortalidad celular eleva la probabilidad de tumorigénesis en una población de células genéticamente alterada.

También es importante la implicación de la telomerasa en la investigación del cáncer. Los nuevos avances científicos indican que la activación de la telomerasa en tumores humanos es un medio de evadir la entrada en el estado senescente y es un requerimiento para la progresión tumoral. Por ello, el estudio de la regulación de la telomerasa supone un tema de inmediato interés y se sugieren dos posibilidades: que sean los genes supresores de tumores los que previenen la activación de la telomerasa o que el acortamiento telomérico sea un mecanismo supresor de tumores en células humanas normales. En el momento presente son varios los grupos de investigadores que se ocupan de profundizar en los inhibidores de la telomerasa como potenciales agentes anti-cáncer, pero son muchos los asuntos que permanecen sin resolver entre ellos la posibilidad de que existan, además de la telomerasa, otros mecanismos para conservar los telómeros.

BIBLIOGRAFIA

- Autexier C y Greider CW (1996) Telomerase and cancer: revisiting the telomere hypothesis. *Trends in Biological Sciences* 21, 387-391
- Banks DA y Fossel M (1997) Telomeres, cancer and aging. *J Am Med Assoc* 278, 1345-1348
- Blackburn EH (1991) Structure and function of telomeres. *Nature* 350, 569-573
- Blackburn EH (1992) Telomeres. *Ann Rev Biochem* 61, 113-129
- Blackburn EH y Gall JG (1978) A tandemly repeated sequence at the termini of the extrachromosomal ribosomal RNA genes in *Tetrahymena*. *J Mol Biol* 120, 33-53.
- Bodnar AG, Oullette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu C-P, Morin GB, Harley CB, Shay JW, Lichtseiner S, y Wright WE (1998) Extension of life span by introduction of telomerase into normal cells. *Science* 279: 349-352.
- Chiu C-P y Harley CB (1997). Replicative Senescence and Cell Immortality: The role of Telomeres and Telomerase. *PSEBM* 214, 99-106.
- Goldstein S (1990) Replicative senescence: the human fibroblast comes of age. *Science* 249, 1129-1133
- Greider CW (1996) Telomere length regulation. *Annu Rev Biochem* 65, 337-365
- Greider CW y Blackburn EH (1985) Identification at a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 43, 405-413.
- Köning P y Rhodes D (1997) Recognition of telomeric DNA. *Trends Biol Sci* 22, 43-47

- Hamilton SE y Corey DR (1996) Telomerase: Anti-cancer target or just a fascinating enzyme? *Chemistry & Biology* 3, 863-867.
- Hayflick L (1965) The limited *in vitro* lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 37, 614-636.
- Hayflick L y Moorhead PS (1961) the serial cultivation of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 25, 585-621.
- Ishikawa F (1997) Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Biochem Biophys Res Commun* 230, 1-6.
- Kruk PA, Rampino NJ y Bohr VA (1995) DNA damage and repair in telomeres: Relation to aging. *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 258-262.
- Kormann-Bortolotto MH, Bossato B y Smith MAC (1996) Telomere shortening, ageing and chromosome damage. *Mech Ageing and development* 89, 45-49
- Mc Clintock B (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea Mays*. *Genetics* 41, 234-282.
- Morin GB (1989) The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesises TTAGGG repeats. *Cell* 59, 521-529
- Muller HJ (1938). The remaking of chromosomes. *The Collecting Net*. Woods Hole, 13, 181-1998.
- Nugent CI y Lundblad V (1998) The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes & Development* 12: 1073-1085
- Oshimura M y Barret JC (1997) Multiple pathways to cellular senescence: role of telomerase repressors. *Eur J Cancer* 33, 710-715.
- Preston RJ (1997) Telomeres, telomerase and chromosome stability *Radiation Res* 147, 529- 534.
- Shay JW (1995) Aging and cancer: are telomeres and telomerase the connection? *Molecular Medicine Today* 1, 378-384
- Shay JW y Gazdar AF (1997) Telomerase in the early detection of cancer. *J Clin Pathol* 50, 106-109.
- Wright WE y Shay JW (1995) Time, telomeres and tumors: is cellular senescence more than an anticancer mechanism? *Trends in Cell Biol* 5, 293-297.
- Yang Z, Kodama S, Suzuki K y Watanabe M (1998) Telomerase activity, telomere length and chromosome aberrations in the extension of life span of human embryo cells induced by low- dose X-rays. *J Radiat Res* 39, 35-51.
- Smith S, Giriat I, Schmitt A & de Lange T (1998) Tankyrase, a poly(ADP-ribose) polymerase at human telomeres. *Science* 282, 1484-1490