

TELOMEROS Y ACTIVIDAD DE TELOMERASA: SU PARTICIPACION EN EL ENVEJECIMIENTO Y EL DESARROLLO NEOPLASICO

ALEJANDRA S. H. COTTLIAR, IRMA R. SLAVUTSKY

Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Buenos Aires

Resumen Los télómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tandem (TTAGGG)_n y proteínas asociadas, y presentan una estructura especial que previene la fusión y degradación telomérica. Cuando los télómeros alcanzan un tamaño crítico tienen dificultades para separarse durante la mitosis, generando asociaciones teloméricas (tas) e inestabilidad cromosómica. Dicha inestabilidad cromosómica estaría relacionada a un aumento en la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genéticos de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico, tales como amplificación génica y pérdida de heterocigosidad. Los mecanismos que producen las tas son aún desconocidos pero podrían estar asociados a fallas de la actividad de la enzima telomerasa, ribonucleoproteína que sintetiza las secuencias repetitivas de los télómeros, estabilizando así la longitud de los mismos. Se ha observado una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas in vitro, así como en función del envejecimiento celular, in vivo. Recientes estudios mostraron una asociación entre la presencia de tas y el acortamiento telomérico, así como una correlación entre la reducción telomérica y el aumento de los niveles de telomerasa en diferentes tumores sólidos y neoplasias hematológicas. El hecho de que la mayoría de las neoplasias humanas presenten actividad de telomerasa podría indicar a dicha enzima como un marcador tumoral específico y prevalente, constituyendo un muy buen blanco para realizar terapia anti-cáncer utilizando inhibidores de la misma.

Palabras clave: télómeros, telomerasa, longitud telomérica, envejecimiento, neoplasias humanas

Summary *Telomeres and telomerase activity. Their role in senescence and in neoplastic development.*

Telomeres are specialized structures at the ends of eukaryotic chromosomes, composed of tandem repeats of a repetitive DNA sequence (TTAGGG)_n and associated proteins. They have a number of important functions including the protection of chromosomes from end-to-end fusion and degradation. When telomeres become critically short, telomere separation in mitosis cannot be performed properly leading to metaphase telomeric associations (tas) and chromosome instability. This instability can be relevant for neoplastic transformation because it increases the probability of errors that can generate genetic changes critical in the multistep process of transformation, like gene amplification and loss of heterozygosity. The mechanisms involved in tas are unknown, but it could be because of failure in the enzymatic activity of telomerase, a ribonucleoprotein enzyme with an RNA template that directs synthesis of telomeric repeats at chromosome extremities, producing telomeric length stabilization. A progressive telomere shortening with ageing has been shown to occur both in vitro and in vivo. Recent studies have shown an association between the presence of tas and telomeric shortening, and also a correlation between telomere reduction and increased telomerase activity in both solid tumors and hematologic malignancies. The evidence that most human malignancies have telomerase activity would indicate that telomerase could be a prevalent and specific tumor marker, and thus may be a novel and excellent target for anti-cancer therapy.

Key words: telomere, telomerase, telomeric length, ageing, human neoplasias

Los télómeros son regiones de ADN no codificante ubicadas en los extremos de los cromosomas eucarióticos. Están constituidos por secuencias de ADN altamente conservadas, repetidas en tandem (TTAGGG)_n y proteínas asociadas, y presentan una estructura es-

pecial que impide su unión a los extremos de otros cromosomas, previniendo la fusión telomérica¹. Cumplen un rol esencial en la preservación de la integridad cromosómica, protegiendo al ADN codificante de la acción enzimática y la degradación, contribuyendo al mantenimiento de la estabilidad cromosómica; median importantes interacciones entre los cromosomas y la matriz nuclear, pudiendo además ejercer efectos sobre la transcripción de genes situados en regiones subtéloméricas e interactúan con los mecanismos regulatorios del ciclo celular^{2, 3}.

Recibido: 27-IX-2000

Aceptado: 18-X-2000

Dirección postal: Lic. Alejandra Cottliar, Departamento de Genética, Instituto de Investigaciones Hematológicas, Academia Nacional de Medicina, Pacheco de Melo 3081, 1425 Buenos Aires, Argentina
Fax: (54-11) 4803-9475 e-mail: lacuteci@intramed.net.ar

En contraste con las secuencias codificantes que tienen una replicación semiconservativa, los telómeros sufren pérdidas progresivas de sus secuencias repetitivas durante las sucesivas divisiones celulares. Actualmente, se considera que se requiere un mínimo de longitud telomérica para mantener la función de los telómeros, y que cuando los mismos alcanzan un tamaño crítico tienen dificultades para separarse durante la mitosis, generando asociaciones teloméricas (tas) e inestabilidad cromosómica^{4,5}. Dicha inestabilidad cromosómica estaría relacionada a un aumento en la probabilidad de producir errores capaces de generar cambios genéticos de importancia para el proceso de desarrollo neoplásico, tales como amplificación génica y pérdida de heterocigosidad⁶.

Las tas constituyen la unión de los extremos de dos o más cromosomas sin pérdida aparente de material genético⁷ (Figura 1). El análisis de tas es un método citogenético de reciente introducción en el estudio de la inestabilidad cromosómica cuya presencia podría estar asociada con el desarrollo neoplásico. La aparición de estas fusiones aumentaría además con la evolución tumoral, según sean lesiones primarias o metastásicas⁸.

Los mecanismos que producen las tas son aún desconocidos pero podrían estar asociados a fallas de la actividad de la enzima telomerasa, ribonucleoproteína que sintetiza las secuencias repetitivas de ADN características de los telómeros, estabilizando así la longitud de los mismos. Dicha enzima, cuyo rol es mantener la integridad telomérica, estaría reprimida en el tejido somáti-

co normal, a excepción de las células germinales y progenitoras hematopoyéticas, y se reactivaría en el cáncer para mantener la proliferación y el desarrollo de las células tumorales, sugiriendo un rol importante de la reducción telomérica y de la actividad de telomerasa en la carcinogénesis⁹⁻¹².

Las células con un gran número de tas pueden perder regiones repetitivas ricas en guanina, generando rearrreglos cromosómicos que constituirían cambios críticos para el proceso de transformación neoplásica. Se ha propuesto también que la formación de tas estaría asociada a repeticiones defectuosas de los telómeros, lo que llevaría a una constante pérdida de las secuencias teloméricas que favorecería las fusiones¹³.

Las tas han sido raramente encontradas en células normales, debido a que los extremos intactos de los cromosomas no tienden naturalmente a asociarse a expensas de los telómeros que los protegen de estos eventos. Pueden ser de simple o doble cromátide¹⁴, no habiéndose observado diferencias entre sexos¹⁵. Por el contrario, se las ha observado en células infectadas por virus, tumorales o senescentes¹⁶ y en patologías de origen genético como ataxia telangiectasia¹⁷, anemia de Fanconi¹⁸ y los síndromes de Thieberge-Weinssensbach¹⁹ y de Turner²⁰. Simultáneamente fueron descritas en diferentes tipos de cáncer²², tanto en tumores sólidos^{8, 14, 22-24} como en neoplasias hematológicas²⁵⁻²⁸.

Acortamiento telomérico y actividad de telomerasa

La enzima telomerasa cuyo rol es mantener la integridad telomérica, actuaría elongando los extremos cromosómicos erosionados a expensas de un componente de ARN que contiene un dominio que es complementario a la secuencia de ADN telomérico. Ese dominio permite alinear la enzima con el sustrato y provee de un templado para la adición *de novo* de deoxinucleótidos a las secuencias teloméricas. Por retrotranscripción, la telomerasa genera una copia de ADN de su propia copia de ARN, la cual es entonces fusionada al extremo 3' del telómero. La extensión de los telómeros por la telomerasa es requerida para llegar a la contracción normal que ocurre después de cada replicación del ADN²². Se detectó actividad de telomerasa en las fases G₁, S y G₂ del ciclo celular, observándose una represión cuando las células entran en G₀ debido a la carencia de factores de crecimiento, inhibición por contacto de la división celular, inducción de la senescencia por reversión en una línea celular inmortalizada o por diferenciación³.

El tamaño de las secuencias teloméricas terminales, varía dependiendo de diversos procesos biológicos. Se ha observado una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas *in vitro*, así como en función



Figura 1: Metafase con técnica de bandeado G mostrando una asociación telomérica (tas) de simple cromátide.

del envejecimiento celular, *in vivo*^{4,13, 29}. Después de un cierto número de divisiones celulares, la célula adquiere una longitud telomérica crítica, pudiendo resultar en la pérdida de secuencias de regiones subteloméricas que podrían llevar a la muerte celular. La pérdida de estas repeticiones terminales durante la proliferación celular debido a una incompleta replicación puede ser contrarrestada por la elongación de los telómeros por parte de la telomerasa.

Se han identificado cuatro genes que codifican proteínas que controlan el equilibrio entre la elongación por la telomerasa y el acortamiento debido a la actividad de exonucleasa. Una de las proteínas más importantes es TRF1³⁰, ésta se une al ADN telomérico doble cadena y regula negativamente la longitud telomérica³¹ manteniendo la estabilidad cromosómica. Recientemente se ha identificado la proteína TIN2 que interactúa con TRF1 y es esencial en la regulación de la longitud telomérica, demostrándose además que TRF1 sola sería insuficiente para controlar la longitud telomérica en células humanas³². Se ha sugerido que los telómeros que llegan a una longitud mínima crítica no son capaces de reclutar la proteína TRF2, dando como resultado fusiones entre los extremos de los cromosomas³³.

Existen distintas evidencias que indicarían que el acortamiento telomérico durante el envejecimiento de células somáticas normales *in vitro* jugaría un rol causal en la senescencia celular. Una longitud telomérica crítica estaría asociada con un bloqueo en la replicación característico de las células senescentes. Se estudió la longitud telomérica en fibroblastos y linfocitos de personas sanas centenarias, encontrándose un acortamiento telomérico durante la propagación *in vitro* de los fibroblastos, así como una correlación inversa entre las longitudes teloméricas y la edad del donante. También se efectuó un análisis de expresión de genes inducidos durante la senescencia, sólo la expresión de fibronectina mostró una correlación positiva con la edad del donante. Estos resultados sugirieron que el acortamiento telomérico podría jugar un rol diferente en el envejecimiento de distintos tipos celulares³⁴.

El modelo propuesto acerca del rol del acortamiento telomérico, en el envejecimiento y la inmortalidad celular, involucra varios pasos. El ADN telomérico protege a los extremos de los cromosomas de eventos de recombinación y su longitud serviría como un "reloj mitótico", el cual permite la salida del ciclo celular cuando los telómeros llegan a ser suficientemente cortos. La longitud de éstos, en condiciones fisiológicamente normales, declina con las sucesivas divisiones celulares llegando progresivamente a un estadio de reducción crítica característico del proceso de senescencia. Las mutaciones en los genes p53, Rb (Retinoblastoma) o la adición de secuencias de ADN virales, conferiría la capacidad de saltar los signos que ejercen el control del

crecimiento celular que normalmente llevan a un primer estadio de mortalidad. Además, el modelo sugiere que las mutaciones producidas en genes que codifican proteínas que actúan detectando anomalías cromosómicas o regulando el ciclo celular, pueden permitirle a una población clonal escapar de la senescencia y continuar proliferando, causando pérdidas teloméricas continuas, inestabilidad cromosómica y *tas*. Las células que escapan de ese primer estadio de mortalidad celular, llegarían a una segunda etapa, denominada crisis. La mayor parte de las células que ingresan a ese período, morirían, mientras que una pequeña subpoblación con defectos cromosómicos sobreviviría a la misma por renovación en la producción de telomerasa y la consecuente estabilización de sus telómeros, que llevarían a una proliferación indefinida³⁵.

Envejecimiento y telómeros

La senescencia celular es un proceso irreversible de declinación de la proliferación en relación con la edad. Es un proceso activo, genéticamente programado, que responde a una inducción dada por el acortamiento telomérico, generando una señal semejante a la producida por el daño en el ADN. Por el contrario, la quiescencia es un proceso reversible que mediante una estimulación adecuada puede resultar en la continuación de la proliferación³⁶.

El inicio de la senescencia en células humanas involucraría mecanismos comunes mediados por p53 y/o Rb, así como también p21, postulándose que p16 limitaría el crecimiento³⁷. En células presenescentes se ha reportado la presencia de telomerasa enzimáticamente activa, acompañada del mantenimiento de la longitud telomérica y de una demora en el desencadenamiento de la senescencia³⁸.

En individuos normales se detectó una disminución de la longitud telomérica con el avance de la edad, observándose variaciones entre distintos tipos celulares desde 15000-20000 pb en células germinales, 10000 pb en adultos jóvenes y 5000-7000 pb en células de ancianos¹¹. Se sabe que el número de divisiones celulares correlaciona positivamente con la longitud telomérica inicial habiéndose observado una pérdida progresiva de secuencias teloméricas de entre 50 y 200 nucleótidos con cada duplicación de la población celular, calculándose que la pérdida promedio de ADN telomérico en tejido hematopoyético sería de 9pb/año^{7, 11}. En células somáticas en activa división, los telómeros pueden llegar a un acortamiento tal que cese la capacidad proliferativa por disminución de la longitud telomérica a niveles críticos (aproximadamente 2.5 Kb)²¹, situación definida como punto límite de Hayflick³⁹. Esas observaciones llevaron a la hipótesis de que la longitud telomérica

serviría como un reloj biológico regulando la vida de las células normales.

Al presente se han postulado dos teorías que explicarían esta capacidad replicativa limitada de células de mamíferos: 1) acumulación gradual de mutaciones y 2) existencia de un reloj molecular que controle el número de divisiones celulares, siendo ésta última la más aceptada. En referencia al primer punto, sabemos que en células humanas normales no ha sido observada una inmortalización espontánea, siendo necesarias muchas mutaciones para lograr esta situación, mientras que en células de roedores unas pocas o una sola bastarían para producir proliferación indefinida³⁶.

Por otro lado, se considera que si existiera un "reloj molecular" que controlara las divisiones celulares, cuando éste "se quedara sin cuerda", generaría una señal que sería capaz de gatillar el programa de senescencia. La expresión de determinados agentes podría prevenir la senescencia sorteando la señal del reloj o interfiriendo con la maquinaria del envejecimiento. A pesar de existir períodos de inmortalidad aparente, este programa permanece intacto y por remoción del agente que anula la senescencia, es capaz de establecer un rápido cese del crecimiento. Esta hipótesis del reloj molecular está asociada a la degradación de los telómeros²⁹.

Una observación importante es que células senescentes aún poseen telómeros apreciables y que éstos continúan acortándose si se produce una extensión de la vida celular^{4, 37}. Las células en crisis presentan telómeros con longitudes promedio de 3-4Kb, pero por una heterogeneidad en el proceso de degradación, la mayoría de las mismas probablemente contengan al menos un cromosoma con telómeros críticamente acortados o ausentes, generando una inestabilidad cariotípica característica de células en crisis. De hecho, empleando un análisis cuantitativo de intensidad de fluorescencia, se ha observado células en crisis con longitudes teloméricas de 1Kb o menos. Asimismo, se ha sugerido que, como resultado del acortamiento telomérico, se produciría una desrepresión de genes regulatorios del crecimiento en regiones subteloiméricas, situación que protegería a la célula de la inestabilidad genómica³⁶.

Metodología de estudio

El estudio de la longitud telomérica se realiza empleando el análisis de los fragmentos de restricción terminal (TRF)²⁹, obtenidos mediante la digestión de ADN genómico con una enzima de restricción de corte muy frecuente (HinfI), que no corta en el core de las repeticiones teloméricas, sino que por digestión total llega a clivar secuencias cercanas a las mismas. Esta digestión es seguida de un Southern Blot en el cual se hibrida con una sonda complementaria a este motivo, marcada

radiactivamente, detectando de esta forma las poblaciones de longitudes teloméricas de distintos tipos celulares.

El método de TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol)⁹, basado en la técnica de PCR, permite detectar la presencia de actividad de telomerasa en extractos celulares utilizando primers de regiones teloméricas. Bajo estas condiciones, en caso de existir enzima endógena activa, la telomerasa sintetiza un producto de elongación, el cual a su vez sirve como templado para los siguientes ciclos de amplificación. De esta manera, se generan una serie de productos en escalera que difieren en su longitud en múltiplos de hexanucleótidos, producto de la presencia de diferente número de repeticiones teloméricas, que pueden visualizarse en un gel.

Estas regiones teloméricas constituídas por ADN altamente repetitivo pueden evaluarse también mediante técnicas de hibridación in situ. El método de hibridación in situ con fluorescencia (FISH) empleando sondas complementarias a las secuencias teloméricas ha permitido detectar presencia o ausencia de telómeros, así como cuantificar los mismos por célula y por grupo cromosómico. También el FISH cuantitativo permite mostrar el tamaño aproximado de estas secuencias. La metodología PRINS (Primed In Situ Synthesis) utiliza la propiedad de la polimerasa de extender un segmento de ADN a partir de primers complementarios con el agregado de deoxinucleótidos marcados, permitiendo evaluar modificaciones de la longitud telomérica sobre extendidos cromosómicos, mediante el empleo de un microscopio de fluorescencia con los filtros adecuados⁴⁰. Recientemente se desarrolló un método denominado 'flow FISH' que utiliza la citometría de flujo combinada con la técnica de FISH empleando como sonda un PNA (peptide nucleic acid) pan-telomérico y que sería de utilidad para medir, mediante intensidades de fluorescencia, las longitudes teloméricas promedio de los extremos cromosómicos en células individuales⁴¹.

Telómeros y neoplasias

Las asociaciones teloméricas son consideradas como un primer evento en la generación de los rearrreglos cromosómicos específicos observados en células tumorales⁶. Dichas anomalías citogenéticas ocurrirían como resultado de ciclos de ruptura y fusión entre los centrómeros de cromosomas dicéntricos, los que presentarían segregaciones defectuosas durante la mitosis, llevando a desbalances de material genético e inestabilidad genómica³⁵.

Asimismo, se sabe que la presencia de telómeros funcionales es importante para una propagación estable de los cromosomas durante el ciclo celular, función que es dependiente del número de secuencias repetitivas y

de las proteínas que se unen a las mismas. Normalmente, en células en G₁ y G₂, los telómeros se asocian entre sí, orientándose hacia la periferia del núcleo, debiendo activarse un mecanismo específico para resolver dichas asociaciones al progresar hacia la mitosis. Cuando los telómeros llegan a ser críticamente cortos, su separación durante la mitosis no se produciría adecuadamente, llevando a la formación de tas e inestabilidad cromosómica⁵. Estudios recientes con células de ratones deficientes de telomerasa han provisto evidencias concretas de la relación existente entre la pérdida de repeticiones teloméricas y la predisposición a fusiones teloméricas⁴².

Diferentes reportes mostraron asociación entre la presencia de tas y el acortamiento telomérico en diferentes tumores sólidos y líneas celulares⁴³⁻⁴⁵, así como correlación entre la reducción telomérica y el aumento de los niveles de telomerasa en leucemias y preleucemias^{9, 46, 47}.

Asimismo, se ha observado una evolución clonal de las fusiones teloméricas en diferentes neoplasias^{22, 28, 35, 48}, alteraciones que darían origen a una evolución cariotípica, pudiendo constituir lesiones precursoras para otras anomalías estructurales tales como translocaciones inestables, dicéntricos o anillos³⁵. En la Tabla 1 se detallan los estudios de tas, longitud telomérica y actividad de telomerasa efectuados en diferentes tumores sólidos y neoplasias hematológicas.

Estudios de nuestro laboratorio han permitido detectar la presencia de inestabilidad cromosómica evidenciada por el incremento significativo del porcentaje de tas y de células con tas en médula ósea de pacientes con LNH y MM respecto de controles, independientemente del patrón citogenético encontrado. Asimismo, se detectaron diferencias significativas entre las frecuencias observadas en LNH respecto de MM, lo que indicaría la existencia de patrones de inestabilidad cromosómica característicos para cada entidad y permitiría sugerir la presencia de acortamiento telomérico en las mismas¹⁵. Estos hallazgos se correlacionarían con un incremento de la actividad de telomerasa observado previamente en estas patologías¹⁰.

Por otra parte, hemos detectado un aumento significativo de la frecuencia de tas en sangre periférica de pacientes con colitis ulcerosa (CU) y pancreatitis crónica, respecto de los controles, sugiriendo su asociación con la predisposición al desarrollo neoplásico característico de ambas patologías^{49, 50}. Estudios realizados en la mucosa intestinal de pacientes con CU en estadios avanzados, detectaron una disminución de la longitud de los telómeros⁵¹, hallazgo que estaría relacionado con el aumento de tas encontrado en nuestro trabajo.

Los estudios realizados en neoplasias hematológicas mostraron un aumento de tas, con la presencia de tas clonales en leucemia linfocítica crónica y leucemia

proliferativa^{25, 27, 28}, detectándose además disminución de la longitud telomérica y aumento de la actividad de telomerasa en estadios avanzados^{11, 47}. En leucemias agudas se observó una importante reducción de la longitud telomérica al momento del diagnóstico, con valores normales en la remisión completa⁵². En leucemia mieloide aguda, se ha demostrado que la actividad de telomerasa es inhibida durante el proceso de diferenciación celular y que los pacientes con actividad de telomerasa aumentada presentan anomalías

TABLA 1.- Asociaciones teloméricas, acortamiento telomérico y actividad de telomerasa en neoplasias humanas

Neoplasia	Aumento de tas	Acortamiento Telomérico	Actividad de Telomerasa
TUMORES SOLIDOS			
Carcinoma hepatocelular		57	57
Carcinoma colorrectal		13	65, 75
Carcinoma gástrico			74
Oseos a células gigantes	59	59	
Próstata		61	61
Melanoma			62
Células germinales			56
Carcinoma renal	63		58
Gliomas			64
Meningioma	66		
Astrocitoma	22, 70		
Ependimoma	35		
Tumores lipomatosos	67		
Ovario	8, 22		
Mama	24		
Utero	24		
Carcinoma de células escamosas de laringe	14		
Carcinoma escamoso de epitelio oral			68
Pulmón			69
NEOPLASIAS HEMATOLOGICAS			
SMD		54	
LMC		12, 52, 71	52
LMA		72	47, 53
LLA	24, 25	12, 52, 60	9, 60
LLC/LPL	24, 27		47
Linfoma de Hodgkin			73
LNH	15		10
MM	15		10

tas: asociaciones teloméricas; SMD: síndrome mielodisplásico; LMC: leucemia mieloide crónica; LMA: leucemia mieloide aguda; LLA: leucemia linfoblástica aguda; LLC: leucemia linfocítica crónica; LPL: leucemia prolinfocítica; LNH: linfoma no-Hodgkin; MM: mieloma múltiple.

citogenéticas de mal pronóstico⁵³. Un comportamiento similar se observó en pacientes con síndromes mielodisplásicos, observándose además que la presencia de telómeros cortos al diagnóstico estaría asociada con enfermedad más agresiva⁵⁴. Por otra parte, en leucemia mieloide crónica se observó un incremento de la actividad de telomerasa durante la fase blástica⁴⁷.

En tumores sólidos se han detectado variaciones de la longitud telomérica con predominio del acortamiento telomérico, así como la presencia de actividad de telomerasa en la mayoría de las neoplasias estudiadas (Tabla 1). Sin embargo, en tumores testiculares de células germinales, se observó un alargamiento de telómeros, sugiriendo un alto potencial proliferativo⁵⁵. Además, se detectó la expresión de actividad de telomerasa en neoplasias de células germinales, en contraste con teratomas maduros, donde se la vio reprimida. Dicha actividad podría contribuir a una capacidad proliferativa limitada de los teratomas maduros, sustentando la existencia de una relación inversa entre la actividad de telomerasa y el estado de diferenciación en los tumores de células germinales⁵⁶. Esto permitiría concluir que no habría una tendencia general a la reducción telomérica en tejidos malignos.

Por otra parte, en carcinoma hepatocelular se observó un acortamiento progresivo de telómeros y actividad de telomerasa, concluyendo que la expresión de telomerasa puede ser un marcador útil para la detección temprana de la progresión de enfermedad maligna de hígado⁵⁷, mientras que en carcinoma renal no presentó valor pronóstico⁵⁸, indicando la importancia de realizar estos estudios en las diferentes patologías.

El hecho de que la mayoría de las neoplasias humanas muestren actividad de telomerasa podría indicar a dicha enzima como un marcador tumoral específico y prevalente, constituyendo un muy buen blanco para realizar terapia anti-cáncer utilizando inhibidores de la misma.

Agradecimientos: El presente trabajo fue realizado con fondos provenientes del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y de la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (ANPCyT).

Bibliografía

- Zakian Va. Telomeres: beginning to understand the end. *Science* 1995; 270: 1601-7.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-73.
- Holt SE, Wright WE, Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cells lines. *EMBO J* 1996; 16: 2932-9.
- Counter CM, Avilion AA, Le Feuvre CL, Stewart NG, Greider CW, Harley CB. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* 1992; 11: 1921-9.
- Slijepcevic P, Bryant PE. Chromosome healing, telomere capture and mechanisms of radiation-induced chromosome breakage. *Int J Radiat Biol* 1998; 73: 1-13.
- Riboni R., Casati A, Nardo T, et al. Telomeric fusions in cultured human fibroblast as a source of genomic instability. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 95: 130-6.
- Schwartz HS, Allen GA, Butler MG. Telomeric associations. *Applied Cytogenet.* 1990; 16: 133-6.
- Mrózek K, Limon J. High frequency of telomeric associations and chromatid exchanges and breaks in human ovarian carcinoma. *Hereditas* 1992; 117: 259-63.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-5.
- Nilsson P, Mehle C, Remes K, Roos G. Telomerase activity in vivo in human malignant hematopoietic cells. *Oncogene* 1994; 9: 3043-8.
- Shay JW, Werbin H, Wright WE. Telomeres and telomerase in human leukemias. *Leukemia* 1996; 10: 1255-61.
- Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JH, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia* 1997; 11: 190-4.
- Hastie ND, Dempster M, Dunlop MG, Thompson DK, Green DK, Allshire RC. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990; 346: 866-8.
- Pathak S, Wang MK, Dhaliwal MK, Sacks PC. Telomeric association: another characteristic of cancer chromosomes? *Cytogenet Cell Genet* 1988; 47: 227-9.
- Cottliar A, Sganazza N, Pedrazzini E, et al. Incremento de asociaciones teloméricas en mieloma múltiple y linfomas no-Hodgkin. *Nuevas Tend Oncol* 2000; IX (Supl): 47.
- Hastie ND, Allshire RC. Human telomeres: Fusion and interstitial sites. *Trends Genet.* 1989; 5: 326-31.
- Pandita TK, Pathak S, Geard CR. Chromosome end associations, telomeres and telomerase activity in ataxia telangiectasia cells. *Cytogenet Cell Genet* 1995; 71:86-93.
- Leteurtre F, Li X, Guardiola P, et al. Accelerated telomere shortening and telomerase activation in Fanconi's anaemia. *Br J Hematol* 1999; 105: 883-93.
- Dutrillaux B, Croueke MF, Viegas-Peguignot E, et al. Human somatic chromosome chains and rings. *Cytogenet Cell Genet* 1978; 20: 70-7.
- Sawyer JR, Swanson CM, Lukacs JL, et al. Telomeric fusion and chromosome instability in multiple tissues of a patient with mosaic Ullrich-Turner syndrome. *Am J Med Genet* 1997; 69:383-7.
- Haber DA. Clinical implications of basic research: telomeres, cancer, and immortality. *N Eng J Med* 1995; 332: 955-6.
- Sawyer JR, Roloson GJ, Bell JM, Thomas JR, Teo C, Chadduck WM. Telomeric associations in the progression of chromosome aberrations in pediatric solid tumors. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1996; 90: 1-13.
- Wan TSK, Chan LC, Ngan HYS, Tao S-W. High frequency of telomeric associations in human ovarian surface epithelial cells transformed by human papilloma viral oncogenes. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 95: 166-72.
- Paz Y Miño C, Sanchez ME, Del Pozo M, et al. Telomeric association in women with breast and uterine cervix cancer. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1997; 98: 115-8.
- Fitzgerald PH, Morris CM. Telomeric association of chromosomes in B-cell lymphoid leukemia. *Human Genet* 1984; 67: 385-90.
- Morgan R, Jarzabek V, Jaffe JP, Hecht BK, Sandberg AA. Telomeric fusion in pre-T-cell acute lymphoblastic

- leukemia. *Hum Genet.* 1986; 73: 260-3.
27. Crossen PE, Tully SM, Benjes SM, et al. Oligoclonal B-cell leukemia characterized by spontaneous cell division and telomere association. *Genes Chrom Cancer* 1993; 8: 49-59.
 28. Howell RT, Kitchen C, Standen GR. Telomeric associations in a patient with B-cell prolymphocytic leukaemia. *Genes Chrom Cancer* 1993; 7: 116-8.
 29. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
 30. Chong L, Van Steensel B, Broccoli D, et al. A human telomeric protein. *Science* 1995; 270: 1663-7.
 31. Van Steensel B, De Lange T. Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1. *Nature* 1997; 385: 740-3.
 32. Kim S, Kaminker P, Campisi J. TIN2, a new regulator of telomere length in human cells. *Nature Genet* 1999; 23: 405-12.
 33. Van Steensel B, Smogorzewska A, De Lange T. TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions. *Cell* 1998; 92:401-13.
 34. Mondello C, Petropoulou C, Monti D, Gonos ES, Franceschi C, Nuzzo F. Telomere length in fibroblasts and blood cells from healthy centenarians. *Exp Cell Res.* 1999; 10: 234-42.
 35. Sawyer JR, Miller JP, Ellison DA. Clonal telomeric fusions and chromosome instability in a subcutaneous sacrococcygeal myxopapillary ependimoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* 1998; 100: 169-75.
 36. Sedivy JM. Can ends justify the means? Telomeres and mechanisms of replicative senescence and immortalization in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95: 9078-81.
 37. Brown JP, Wei W, Sedivy JM. By pass of senescence after disruption of p21^{CIP1/WAF1} gene in normal diploid human fibroblasts. *Science* 1997; 277: 831-4.
 38. Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, et al. Extension of life span by introduction of telomerase into normal cells. *Science* 1998; 279: 349-52.
 39. Hayflick L. The limited in vitro lifetime of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-36.
 40. Therkelsen AJ, Nielsen A, Koch J, Kolvraa S. Staining of human telomeres with primed in situ labeling (PRINS). *Cytogenet Cell Genet* 1995; 68: 115-8.
 41. Rufer N, Dragowska W, Thornbury G, Roosnek E, Lansdorp PM. Telomere length dynamics in human lymphocyte populations measured by flow cytometry. *Nature Biotech* 1998; 16: 743-7.
 42. Blasco MA, Lee HW, Handie MP, et al. Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA. *Cell* 1997; 91: 25-34.
 43. Schwartz HS, Jenkins RB, Dahl RJ, Dewald GW. Cytogenetic analysis on giant cell tumor of bone. *Clin Orthop Rel Res* 1989; 240: 250-60.
 44. Holzmann K, Blin N, Welter C, Zang KD, Seitz G, Henn W. Telomeric association and loss of telomeric DNA repeats in renal tumors. *Genes Chrom Cancer* 1993; 6: 178-81.
 45. Saltman D, Morgan R, Cleary MI, de Lange T. Telomeric structure in cells with chromosome ends associations. *Chromosoma* 1993; 102: 121-8.
 46. Yamada O, Oshimi K, Mizoguchi H. Telomere reduction in hematologic cells. *Int J Hematol* 1993; 57: 181-6.
 47. Counter Cm, Gupta J, Harley Cb, Leber B, Bacchetti S. Telomerase activity in normal leukocytes and in hematologic malignancies. *Blood* 1995; 85, 2315-20.
 48. Richkind KE, Wason D, Vidaillet HJ. Cardiac myxoma characterized by clonal telomeric association. *Genes Chromosomes Cancer* 1994; 9: 68-71.
 49. Cottliar A, Fundia A, Boerr L, et al. High Frequencies of Telomeric Associations, Chromosome Aberrations and Sister Chromatid Exchanges in Ulcerative Colitis. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 2301-7.
 50. Cottliar A, Fundia A, Moran C, et al. Evidence of chromosome instability in Chronic Pancreatitis. *J Exp Clin Cancer Res.* En prensa.
 51. Kinouchi Y, Hiwatashi N, Nagashima F, Chida M, Higashioka S, Toyota T. Lengths of telomeres are reduced in the mucosa of long-standing ulcerative colitis. *Gastroenterology* 1996; 110: A938.
 52. Ohyashiki K, Ohyashiki JH, Iwama H, Hayashi S, Shay JH, Toyama K. Clinical implications of telomerase activity levels in acute leukemia. *Clin Cancer Res* 1997; 3: 619-25.
 53. Zhang W, Piatyszek MA, Kobayashi T, et al. Telomerase activity in human acute myelogenous leukemia: Inhibition of telomerase activity by differentiation-inducing agents. *Clin Cancer Res* 1996; 2: 799-803.
 54. Ohyashiki JH, Ohyashiki K, Fujimura T, et al. Telomere shortening associated with disease evolution in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 1994; 54: 3557-60.
 55. Nowak R. Telomeric length variation in human testicular germ cell tumours: Very long and homogeneous telomeres in spermatocytic seminoma. *Oncology Rep* 1997; 9: 1099-102.
 56. Albanell J, Leonardo F, Rusch V, et al. Telomerase activity and germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91: 1321-6.
 57. Miura N, Horikawa I, Nishimoto A, et al. Progressive telomere shortening and telomerase reactivation during hepatocellular carcinogenesis. *Cancer Genet Cytogenet* 1997; 93: 56-62.
 58. Sugimura K, Yoshida N, Hisatomi H, Nakatani T, Ikemoto S. Telomerase activity in human renal carcinoma. *BJU Int* 1999; 83: 693-7.
 59. Schwartz HS, Dahir GA, Butler MG. Telomere reduction in giant cell tumor of bone and with aging. *Cancer Genet Cytogenet* 1993; 71: 132-8.
 60. Engelhardt M, Ozkaynak MF, Drullinsky P, et al. Telomerase activity and telomere length in pediatric patients with malignancies undergoing chemotherapy. *Leukemia* 1998; 12: 13-24.
 61. Koeneman KS, Pan C-X, Jin J-K, et al. Telomerase activity, Telomere length and DNA ploidy in prostatic interepithelial neoplasia (PIN). *J Urol* 1998; 160: 1533-9.
 62. Bosserhoff AK, Gläßl A, Stolz W, Buettner R. Detection of telomerase activity in skin, melanocytic nevi and melanoma by telomerase PCR ELISA. *Biochem.* 1997; 9: 16-8.
 63. Kovacs G, Muller-Brechlin R, Szucs S. Telomeric association in two renal tumors. *Cancer Genet Cytogenet* 1987; 28: 363-6.
 64. Weil RJ, Wu YY, Vortmeyer AO, et al. Telomerase activity in microdissected human gliomas. *Mol Pathol* 1999; 12: 41-6.
 65. Yoshida R, Kiyozuka Y, Ichiyoshi H, et al. Change in telomerase activity during human colorectal carcinogenesis. *Anticancer Res* 1999; 19: 2167-72.
 66. Sawyer JR, Husain M, Pravdenkova S, Krisht A, Al-Mefty O. A role for telomeric and centromeric instability in the progression of chromosome aberrations in meningioma patients. *Cancer* 2000; 88: 440-53.
 67. Mandhal N, Mertens F, Willen H, Rydholm A, Kreicbergs A, Mitelman F. Nonrandom pattern of telomeric associations in atypical lipomatous tumors with ring and giant marker chromosomes. *Cancer Genet Cytogenet*

- 1998; 103: 25-34.
68. Mutirangura A, Trirekanan S, Sriurapong V, et al. Telomerase activity of human squamous epithelial premalignancy in oral cavity and cervix: a comparative model for in vivo chemical and viral multistep carcinogenesis. *Am J Hum Genet* 1997; 61: A75.
 69. Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, et al. Telomerase activity and germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 1997; 89: 1609-15.
 70. Sawyer JR, Thomas EL, Roloson GJ, Chadduck WM, Boop FA. Telomeric associations evolving to ring chromosomes in a recurrent pleomorphic xanthoastrocytoma. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 60:152-7.
 71. Boulwood J, Fidler C, Shepherd P, et al. Telomere length shortening is associated with disease evolution in chronic myelogenous leukemia. *Am J Hemat* 1999; 61: 5-9.
 72. Yamada O, Oshimi K, Motoji T, Mizoguchi H. Telomeric DNA in normal and leukemic blood cells. *J Clin Invest* 1995; 95: 1117-23.
 73. Brousset P, Saati TA, Chaouche N, et al. Telomerase activity in reactive and neoplastic lymphoid tissues: infrequent deletion of activity in Hodgkin's disease. *Blood* 1997; 89: 26-31.
 74. Okusa Y, Shinomiya N, Ichikura T, Mochizuki H. Correlation between telomerase activity and DNA ploidy in gastric cancer. *Oncology* 1998; 55: 258-64.
 75. Unate H, Ikeguchi M, Kaibara N, Okamura D, Nishihara S, Katoh M, Oshimura M. Telomerase activity and microsatellite instability in colorectal cancer and adenoma. *Int J Oncol* 1998; 13: 1223-8.

Qué aspectos de una asociación debemos tener en cuenta para decidir que la interpretación más aceptable es la existencia de una relación causal?

Intensidad: Ciertamente, ...yo rechazaría el argumento a veces oído de que lo que importa es la diferencia absoluta entre las tasas de mortalidad de los distintos grupos y no la razón entre esas tasas. Eso depende de lo que queremos demostrar. Si lo que queremos saber es el exceso en número de muertes por cáncer pulmonar debido al tabaco (lo cual supone una hipótesis de causación), está claro que debemos usar la diferencia absoluta entre las tasas de mortalidad: 0.07, por 1000 al año en médicos no fumadores; 0.57 en fumadores de 1 a 14 cigarrillos diarios; 1.39 en fumadores de 15 a 24 cigarrillos diarios, y 2.27 en fumadores de 25 o más. Pero de esto no se deduce en este caso o en problemas ocupacionales más específicos que esta medida ideal del efecto sobre la mortalidad sea también la mejor medida en relación a la etiología.

Conviene mencionar aquí el análisis ya clásico de John Snow respecto a la epidemia de cólera de 1854 (Snow 1855). La mortalidad que Snow registró en los clientes abastecidos con el agua extremadamente contaminada de la compañía Southwark & Vauxhall fue bastante baja, sólo 71 muertes por 10 000 viviendas. Lo que destaca claramente es el hecho de que esta pequeña tasa es 14 veces mayor que la de 5 fallecimientos por 10 000 viviendas abastecidas por la compañía competidora Lambeth, cuya red no había sufrido contaminación con aguas fecales del alcantarillado.

.....

Verosimilitud: Es conveniente que la causa que suponemos sea biológicamente verosímil, pero ... lo que es biológicamente verosímil depende de los conocimientos biológicos del momento. ...La asociación que observamos puede ser nueva para la ciencia o la medicina y no debemos descartarla a la ligera sólo porque parezca rara. Como Sherlock Holmes aconsejaba al Dr. Watson, "cuando se ha descartado lo imposible, lo que resta, *aunque sea improbable*, debe ser lo cierto".

Austin Bradford Hill

Ambiente y enfermedad: Asociación o causación? *Bol Of Sanit Panam* 1992; 113: 233-42
(Traducido de: *The environment and disease: association or causation?*. *Proc Roy Soc Med* 1965; 58: 295-300)