

# Actividad de la telomerasa y longitud del telómero en la secuencia pólipo-carcinoma colorrectal

C. Valls Bautista<sup>1</sup>, C. Piñol Felis<sup>1</sup>, J. M. Reñe Espinet<sup>1,3</sup>, J. Buenestado García<sup>1,3</sup> y J. Viñas Salas<sup>2,4</sup>

Departamentos de <sup>1</sup>Medicina y <sup>2</sup>Cirugía. Universitat de Lleida. Servicios de <sup>3</sup>Digestivo y <sup>4</sup>Cirugía. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. IRB Lleida

## RESUMEN

**Objetivo:** el papel de la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero en la secuencia adenoma-carcinoma de la carcinogénesis colónica no ha sido bien establecido. El objetivo fue determinar el comportamiento de la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero en pacientes con pólipos adenomatosos asociados o no a cáncer colorrectal y conocer el papel de la inestabilidad telomérica en la secuencia adenoma-carcinoma.

**Pacientes y métodos:** se estudiaron 14 pacientes intervenidos de cáncer colorrectal y/o pólipos. En 6 de ellos se recogieron muestra colónica tumoral, pólipo y muestra de mucosa colónica normal, mientras que en los 8 restantes se tomaron muestras de pólipos y mucosa normal. Se determinó la actividad de la telomerasa mediante el protocolo de amplificación de repeticiones teloméricas (TRAP-F) y la longitud del telómero por Southern-blot.

**Resultados:** se detectó actividad de la telomerasa en un 86% de los pólipos y en un 50% de sus correspondientes mucosas normales. La actividad de la telomerasa en los pólipos fue de 5,85 y en la mucosa normal 0,58 TPG. La longitud del telómero fue 6,78 kbp y 7,78 respectivamente. Se observó que los pólipos de pacientes que no presentaban cáncer sincrónico mostraban una actividad de telomerasa significativamente superior (9,4) a aquellos con cáncer (1,1) ( $p = 0,02$ ).

**Conclusiones:** existe una actividad de la telomerasa creciente en la secuencia adenoma-carcinoma en la mucosa colónica así como una disminución de la longitud del telómero. La presencia de cáncer sincrónico modifica la actividad de telomerasa del pólipo.

**Palabras clave:** Actividad telomerasa. Longitud telómero. Colorrectal. Carcinoma. Pólipo.

## INTRODUCCIÓN

Actualmente existen evidencias clínicas, epidemiológicas y experimentales que indican que los pólipos o ade-

nomas son las lesiones precursoras de la mayoría de cánceres colorrectales, aunque esto no indica que todos los pólipos desarrollen una neoplasia (1). A partir del modelo de progresión del cáncer colorrectal propuesto por Fearon y Volgestein (2) en 1990 diferentes estudios han establecido los cambios que se producen en la secuencia adenoma-carcinoma. Los principales cambios corresponden a mutaciones, deleciones y pérdida de heterocigosidad (1,3-6).

Los telómeros son estructuras localizadas en los extremos de los cromosomas de las células eucariotas (7). Regulan la expresión génica, participan en la replicación completa de los cromosomas y los protegen de la degradación por nucleasas. En las células somáticas, en cada división celular se produce un acortamiento de los telómeros. Esta pérdida progresiva de longitud telomérica es un importante mecanismo en el envejecimiento de las células humanas. Cuando los telómeros son suficientemente cortos, se detiene de forma irreversible el crecimiento celular, lo que se conoce como fase de senescencia, seguido de apoptosis y muerte. Algunas células escapan de este mecanismo y se reproducen indefinidamente por acción de la telomerasa. Cuando estas células acumulan suficientes mutaciones que afectan al ciclo celular, pueden convertirse en cancerosas. La telomerasa es una ribonucleoproteína que compensa el acortamiento de los telómeros mediante transcripción inversa usando su ARN intrínseco como molde (8). En las células germinales y tejidos con altas tasas de renovación, la telomerasa está activada y mantiene la integridad y la estabilidad del genoma, asegurando la transmisión de la longitud total del telómero en cada división celular (9). Entre un 80-90% de los cánceres humanos presentan actividad de la telomerasa, incluyendo el cáncer colorrectal (10,11), mientras la expresión en la mucosa normal oscila entre el 86% (12).

El papel de la disfunción telomérica en la secuencia adenoma-carcinoma no ha sido bien establecido. Los resultados existentes hasta hoy son divergentes y escasos

Este estudio ha sido financiado en parte por el Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/0620) y FEDER. Cristina Valls: Beca predoctoral de la Generalitat de Catalunya.

los estudios encontrados en la literatura en los cuales se compara la actividad de la telomerasa (AT) o la longitud del telómero (LT) del pólipo con las de la mucosa normal del mismo paciente (13).

El primer objetivo de este estudio es determinar el comportamiento de la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero en pacientes con pólipos adenomatosos asociados o no a cáncer colorrectal y el segundo objetivo es conocer el papel de la inestabilidad telomérica en la secuencia adenoma carcinoma, definida como un aumento de la actividad de la telomerasa en el pólipo superior a la correspondiente mucosa normal, acompañado de cambios o variaciones en la longitud de los telómeros.

## PACIENTES Y MÉTODOS

Este estudio preliminar incluye 14 pacientes intervenidos quirúrgicamente de cáncer colorrectal y/o pólipos no resecables endoscópicamente en el Hospital Universitari Arnau de Vilanova de Lleida. En 6 de estos pacientes se recogieron muestra colónica tumoral, pólipo y muestra de mucosa colónica macroscópicamente normal, alejada 10 cm del tumor, mientras que en los 8 restantes se tomaron muestras de pólipos y mucosa normal.

Todas las muestras fueron congeladas a -80 °C hasta el momento de su análisis. El protocolo de investigación fue aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica del Hospital (CEIC).

La actividad de la telomerasa fue determinada a través de un sistema cuantitativo, *Fluorescent-Telomeric Repeat Amplification Protocol assay* (TRAP-F) (14,15), usando el *TRAPeze Telomerase Detection Kit* (INTERGEN®, Purchase, NY). La metodología se realizó según la técnica TRAP descrita previamente (10).

La determinación de la longitud del telómero se realizó mediante Southern Blot, usando el kit *TeloTAGGG Telomere Length Assay* (Roche Diagnostics GMBH Mannheim). Brevemente, dos microgramos del DNA genómico fueron digeridos por las enzimas Hinf I y Rsa I, y los fragmentos separados mediante una electroforesis en gel agarosa al 0,8%. Los fragmentos de DNA se transfirieron a una membrana de nylon y se hibridaron con

una sonda específica para repeticiones teloméricas (TTAGGG)<sub>4</sub> conjugada con digoxigenina. Seguidamente se incubó con anticuerpo específico para digoxigenina unido covalentemente a fosfatasa alcalina. Finalmente, la sonda telomérica inmovilizada fue visualizada mediante un sustrato quimioluminiscente para fosfatasa alcalina. La quimioluminiscencia fue detectada por el sistema basado en DDC cámara (Lumi-Imager) y analizada con el software Lumi-Analyst (Boehringer Mannheim).

La longitud del telómero fue estimada usando la fórmula  $\Sigma(\text{ODi}) / \Sigma(\text{ODi/Li})$ , donde ODi era la señal quimioluminiscente y Li la longitud del fragmento TRF en la posición i. La unidad de la longitud del telómero fue Kilopares de bases (Kpb).

El estudio estadístico de los resultados fue realizado mediante el programa SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Los resultados de la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero se expresaron como medias. Se utilizaron las pruebas T, U de Mann Whitney y Kruskal-Wallis para la comparación de medias. El grado de significación se estableció para una  $p \leq 0,05$ .

## RESULTADOS

Este estudio incluye por un lado 14 pacientes con pólipos colorrectales, de los cuales 6 presentaban sincrónicamente pólipos y cáncer colorrectal mientras los 8 restantes presentaban únicamente pólipos aislados. De todas las muestras se determinó la actividad de la telomerasa y la longitud del telómero.

— *Estudio de los pacientes (n = 14) con pólipos colorrectales.* La actividad de la telomerasa fue detectada en un 86% (12/14) de los pólipos y en un 50% (7/14) de las correspondientes mucosas normales. La media de la AT en los pólipos fue 5,85 TPG y la media en la mucosa normal 0,58 TPG, la diferencia entre ambos valores no llegó a ser significativa ( $p = 0,077$ ).

Observamos una AT significativamente inferior en los pólipos de pacientes con cáncer colorrectal sincrónico (1.10 TPG) con respecto a los que no lo presentaban (9,42 TPG),  $p = 0,020$  (Tabla I).

La media de la longitud del telómero en los pólipos fue 6,78 Kpb y en la mucosa normal 7,78 Kpb, siendo esta diferencia no significativa ( $p = 0,082$ ) (Tabla I).

**Tabla I. Relación de la actividad de la telomerasa (AT) y la longitud del telómero en los pólipos y la mucosa normal, globalmente y en pacientes con o sin cáncer sincrónico. Valores expresados como media y rango**

	Actividad telomerasa pólipo	Actividad telomerasa normal	Sig. p	Longitud del telómero pólipo	Longitud del telómero normal	Sig. p
n = 14	5,85 (0-33,40)	0,58 (0-2,35)	0,077	6,78 (3,21-6,78)	7,78 (4,83-7,78)	0,082
Neoplasia						
Sí (6/14)	1,10 (0-3,58)	0,33 (0-1,64)	0,242	6,96 (4,94-9,91)	7,51 (4,83-9,05)	0,269
No (8/14)	9,42 (0,91-33,4)	0,77 (0-2,35)	0,097	6,65 (3,21-11,19)	7,98 (5,64-11,33)	0,173
p	0,020	0,345		0,852	0,950	

—*Estudio de los pacientes (n = 6) con cáncer sincrónico.* Resultaron telomerasa positivos un 83% de los tumores (5/6), un 67% de los pólipos (4/6) y un 33% de las mucosas normales (2/6). La media de la AT del tumor fue 5,65 TPG (0-19,02), la del pólipo 1,09 (0-3,57) y la de la mucosa normal 0,33 TPG (0-1,64). Las diferencias entre las medias no fueron significativas pero se observó una mayor AT en el tumor que en el pólipo y mayor AT en este que en la mucosa normal (Fig. 1).

La media de la longitud del telómero en la mucosa tumoral fue 6,28 Kpb (4,20-8,80), la del pólipo 6,95 Kpb (4,94-9,91) y la de la mucosa normal 7,50 Kpb (4,83-9,05) sin que las diferencias llegasen a ser significativas (Fig. 1).

—*Estudio de los pacientes (n = 8) con pólipos colorectales aislados.* La actividad de la telomerasa fue detectada en un 100% (8/8) de los pólipos y en un 62,5% (5/8) de las correspondientes mucosas normales. La media de la actividad de la telomerasa en los pólipos fue 9,41 TPG (0,91-33,41) y en la mucosa normal 0,77 TPG (0-2,35), sin que la diferencia entre ambas mucosas fuera significativa. El valor medio de la longitud del telómero en los pólipos fue 6,65 Kpb (3,21-11,19) y en la mucosa normal 7,98 Kpb (5,64-11-33) sin diferencias.

## DISCUSIÓN

En este trabajo los pólipos expresaron actividad de la telomerasa en un 86% de los casos mientras que en su correspondiente mucosa normal se expresó en un 50%. En uno de los pocos trabajos en la literatura que compara los pólipos con la mucosa normal de los mismos pacientes, los autores obtuvieron una expresión de AT en el 22% de los pólipos colorectales, siendo negativa en todas las muestras de la mucosa normal (16). Otros estudios comparan la AT de los pólipos con la actividad de la mucosa normal sin que ambas mucosas pertenezcan al mismo paciente. Estos estudios muestran una AT en los pólipos que oscila entre el 40 y el 62,5% y en la mucosa normal entre el 0-18,2% (17-21). Hemos observado un porcentaje superior de AT tanto en los pólipos como en la mucosa normal en relación con los estudios anteriormente citados y creemos que podría ser debido a que la técnica que hemos utilizado, análisis de fragmentos por secuenciación, es muy sensible y puede detectar actividad muy baja de la telomerasa, como la que puede presentar la mucosa normal, pudiendo pasar desapercibida por otras metodologías.

La media de la AT en los pólipos fue 5,85 TPG, mientras que en la correspondiente mucosa normal fue 0,58 TPG. Otros autores han publicado cifras de AT en los pólipos que oscilan entre 1,7 y 7,8 TPG (17,20) y en la mucosa normal de 0 a 3,34 TPG respectivamente. Ninguno de los estudios ha mostrado diferencias significativas entre la AT del pólipo y la de la mucosa normal (17,20).

Los pólipos sincrónicos con el tumor presentaron una actividad de la telomerasa significativa menor que aquellos pólipos aislados. Paradójicamente, estos resultados se acompañaban de una longitud del telómero superior en los primeros. Creemos que esto es debido a la activación de mecanismos alternativos de mantenimiento de la longitud del telómero (ALT), que mantendrían la longitud sin el consiguiente aumento de la actividad (22,23).

La media de la longitud del telómero en los pólipos fue 6,78 Kpb y en la mucosa normal 7,78 Kpb sin que la diferencia llegara a ser significativa. En otros estudios en los cuales la mucosa normal con la que comparan los pólipos no era del mismo paciente las medias fueron las siguientes: Engelhardt y cols. (20) 7,1 Kpb en los pólipos y 7,46 Kpb en la mucosa normal, Kim y cols. (24) obtuvieron 9,41 Kpb en los pólipos y 9,25 Kpb en el tejido normal, sin que las diferencias fuesen significativas en ninguno de ambos casos. Las diferencias en las medias de la longitud del telómero que observaron estos autores entre pólipos y mucosa normal eran muy discretas en relación con las que encontramos nosotros, posiblemente esto sea debido a que no trabajaban con muestras apareadas.

Otro aspecto de este trabajo fue el estudio de la secuencia mucosa normal-adenoma-carcinoma con la determinación de la AT y la LT en 6 pacientes que presentaban pólipos y cáncer colorrectal sincrónico, y de los cuales también se analizó la mucosa normal. Esta parte del estudio no pudo ser comparada con otros trabajos similares porque no los hallamos en la literatura.

Un 83% (5/6) de los tumores presentaron AT, un 67% (4/6) de los pólipos y un 33% (2/6) de las muestras de mucosa normal. La media de la AT en las muestras tumorales fue 5,65 TPG, en los pólipos 1,09 TPG y en la mucosa normal 0,53 TPG. Las diferencias no resultaron ser significativas entre ninguna de las muestras. Se observó una AT intermedia de los pólipos inferior a la de la mucosa tumoral pero superior a la de la mucosa normal. Podríamos concluir que existía un aumento de los niveles de AT progresivo en la secuencia mucosa normal-adenoma-carcinoma, acompañado de una disminución de la longitud del telómero. Se observa una tendencia en la secuencia tejido normal-adenoma-carcinoma, donde la AT aumenta con el grado de malignidad de las células y la longitud del telómero disminuye, este comportamiento creemos que es debido a que el ratio de divisiones de las células también aumenta al pasar de un tipo de tejido a otro. No podemos comparar estos resultados porque no existen estudios similares en la literatura.

Creemos que con un mayor número de casos estas diferencias podrían llegar a ser significativas y confirmar la existencia de una secuencia en el comportamiento de los telómeros (AT y LT) desde la mucosa normal hasta la tumoral pasando por los pólipos. Nosotros creemos que para poder estudiar la secuencia adenoma-carcinoma y poder obtener unos resultados coherentes debe hacerse estudiando en un mismo paciente las diferentes mucosas que corresponden a diferentes fases de la evolución carci-

nogénica. Así por un lado, eliminamos las posibles diferencias entre individuos y podemos comparar el mismo número de casos en cada una de las mucosas. Por otro lado, nos permite estudiar la secuencia individualmente en cada paciente.

También merece un comentario los resultados en los 8 pacientes con pólipos aislados, en los que se observó el mismo comportamiento que cuando se analizaron todos los pólipos en general o los pólipos sincrónicos al tumor, es decir, una AT superior en los pólipos que en la mucosa normal y en la longitud del telómero menor en el pólipo que en la mucosa normal.

A pesar de tratarse de un estudio preliminar podemos concluir que existe una actividad de la telomerasa

creciente en la secuencia adenoma-carcinoma en la mucosa colónica, así como una disminución de la longitud del telómero a medida que avanzamos de la mucosa normal hacia la tumoral. La presencia de cáncer sincrónico modifica la actividad de telomerasa del pólipo.

En el CCR existe expresión de la telomerasa como se ha evidenciado en estudios anteriores. En la secuencia adenoma-cáncer hemos demostrado que se produce una disfunción telomérica evidente. Este hallazgo supondría un mecanismo más a tener en cuenta en los cambios ya conocidos que se producen en esta secuencia como deleciones, mutaciones, activación de oncogenes o genes supresores o pérdida de heterocigosidad.