



Telomere function and sirtuins 1 and 6 in colorectal cancer from obese and non-obese patients. Clinical correlations

Title in Spanish: *Función telomérica y sirtuinas 1 y 6 en cáncer colorrectal en pacientes obesos y no obesos. Correlaciones clínicas*

Sergio García Martínez^{1,3,*}, Juan Fernández García-Moreno^{1,3}, Ana Barabash Bustelo³, Carmen de Juan Chocano^{1,3}, Antonio-José Torres García^{2,3}, Pilar Iniesta Serrano^{1,3}

¹Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid. 28040-Madrid. ²Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo. Hospital Clínico San Carlos. 28040-Madrid. ³Instituto de Investigación Sanitaria San Carlos. Hospital Clínico San Carlos. 28040-Madrid.

ABSTRACT: Telomere dysfunction is a frequent event in colorectal cancer (CRC). The aim of this study consists of analyzing telomere status and sirtuins 1 and 6, in relation to the prognosis of patients affected by CRC. We have also investigated the possible relationship between obesity and the predisposition to develop CRC. Telomere function parameters, such as telomere length and telomerase activity, as well as the relative expression of *SIRT1* and *SIRT6* in samples of colorectal tumor tissue, non-tumor tissue (control), and subcutaneous and omental adipose tissues have been investigated. The telomere length was determined by TRF (Telomere Restriction Fragment) and quantitative PCR (qRT-PCR). The relative expression of *SIRT1* and *SIRT6* was assessed by qRT-PCR. The critically shortened tumor telomeres were associated with a favorable clinical prognosis in CRC and correlate with the higher expression levels of *SIRT1*. Reduced expression of *SIRT1* ($RQ \leq 0.5$) was detected in tumors that confer a more adverse clinical evolution. The telomeres of the non-tumor cells from obese or overweight patients were significantly longer than those of patients showing normal weight. In omental adipose tissue, telomere length was lower in obese patients with CRC than in obese patients without CRC. Analyses of the telomeric length and *SIRT1* seem of interest in the investigation of the clinical evolution of subjects affected by CRC and in the establishment of the predisposition of obese individuals to the development of this tumor type.

RESUMEN: La disfunción telomérica constituye un evento frecuente en el cáncer colorrectal (CCR). El objetivo de este trabajo consiste en analizar el estatus telomérico y las sirtuinas 1 y 6, en relación con el pronóstico de pacientes afectados de CCR. Asimismo, se investiga la posible relación existente entre la obesidad y la predisposición a desarrollar CCR. Se han investigado parámetros de función telomérica, como la longitud de los telómeros y la actividad telomerasa, así como la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en muestras de tejido tumoral colorrectal, tejido no tumoral (control), y tejidos adiposos subcutáneo y omental. La longitud telomérica se determinó por las técnicas TRF (*Telomere Restriction Fragment*) y por PCR cuantitativa (qRT-PCR). La expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* se evaluó por qRT-PCR. Los telómeros tumorales críticamente acortados se relacionan con un pronóstico clínico favorable en CCR y se correlacionan con los niveles de expresión más elevados de *SIRT1*. La expresión reducida de *SIRT1* ($RQ \leq 0,5$) se detecta en tumores que confieren una evolución clínica más adversa. Los telómeros de las células no tumorales de pacientes obesos o con sobrepeso son significativamente más largos que los de pacientes con normopeso. En tejido adiposo omental, la longitud telomérica relativa es inferior en pacientes obesos con CCR respecto a pacientes obesos sin CCR. El análisis de la longitud telomérica y de *SIRT1* presenta interés en la investigación de la evolución clínica de sujetos afectados de CCR y en el establecimiento de la predisposición de individuos obesos al desarrollo de este tipo tumoral.

*Corresponding Author: sergga05@ucm.es

Received: March 13, 2018 Accepted: March 19, 2018

An Real Acad Farm Vol. 84, N° 1 (2018), pp. 52-71

Language of Manuscript: Spanish

Premio Juan Abelló en el Concurso Científico 2017 de la RANF.

1. INTRODUCCIÓN

Los telómeros son un complejo DNA-proteínas localizados en los extremos de los cromosomas lineales de las células eucariotas. El DNA telomérico es un DNA bicatenario, no codificante, que contiene un número variable de secuencias 5'-(TTAGGG)_n-3' repetidas en tándem, seguido de un extremo monocatenario (facilita la formación de la estructura de “*T-loop*” que impide que los telómeros sean reconocidos por la maquinaria de reparación *DNA Damage Responsive* o DDR). En humanos, las proteínas asociadas a los telómeros se denominan complejo *sheltering* y lo constituyen 3 subunidades llamadas TRF1 y 2 (se unen a las secuencias TTAGGG), y POT1 (se une al extremo monocatenario de los telómeros), además de otras proteínas adicionales tales como TIN2, TPP1 o RAP1 (forman un complejo que permite a la maquinaria DDR discernir entre la región telomérica y regiones dañadas del DNA). Por ello, los telómeros constituyen uno de los principales elementos necesarios para la estabilidad genómica (1, 2).

Además, los telómeros también regulan la expresión génica mediante el silenciamiento de genes localizados cerca de los estos (suceso denominado *Telomere Position Effect* o TPE) y a través de regiones teloméricas que contienen repeticiones de RNA llamadas TERRA (ncRNA que se transcribe a partir de DNA telomérico gracias a la RNA polimerasa II) que participan en la regulación de la telomerasa, organización de la heterocromatina de los telómeros, regulación de la expresión génica y activación del sistema DDR en telómeros disfuncionales (2).

En la población humana normal, la longitud de los telómeros es heterogénea, ya que varía entre 5 y 15 kb, estando influenciada por factores tanto genéticos como ambientales (3). Sin embargo, en cada proceso mitótico, los telómeros se acortan en un promedio de 50-150pb como consecuencia del problema de la replicación terminal: en cada ciclo de división celular, los telómeros se acortan dada la incapacidad de las DNA polimerasas convencionales de poder completar la replicación de los extremos de las nuevas cadenas de DNA. Este acortamiento provoca que los extremos de los telómeros se “desacoplen” y aparezca inestabilidad genómica, aunque la célula cuenta con dos “barreras” de protección, denominadas senescencia replicativa y crisis. La primera se caracteriza por la inhibición de la proliferación celular que, si es superada, la célula pasa a un periodo de división celular extendido y se llega a la segunda “barrera” o estadio de crisis, donde los cromosomas pueden llegar a fusionarse y desencadenar muerte celular por apoptosis (4). Si esto no se consigue, la célula puede sufrir una transformación oncogénica, lo cual está directamente relacionado con la salud y la esperanza de vida de los individuos. La disfunción telomérica ha sido asociada con un incremento en la incidencia de diferentes enfermedades, entre ellas destaca el cáncer, si bien son muchas las patologías humanas que se caracterizan por la presencia de telómeros acortados, tales como enfermedades cardíacas o

la obesidad. Debido a esto, numerosos datos epidemiológicos relacionan la obesidad con un incremento en el riesgo de desarrollar cáncer, entre ellos el cáncer colorrectal (CCR), debido a que la inflamación subclínica derivada de la grasa visceral puede incidir directa o indirectamente en el microambiente tumoral (5, 6).

Las células tumorales, de manera general, cuentan con secuencias teloméricas acortadas. Este acortamiento es propuesto como un mecanismo antitumoral, puesto que evita que células con disfunción telomérica proliferen y sufran importantes aberraciones cromosómicas. Sin embargo, si los mecanismos de control no funcionan correctamente, el acortamiento telomérico genera una elevada inestabilidad cromosómica, lo cual es una característica principal del cáncer. Como consecuencia, en una selección posterior de células tumorales se reactivaría la telomerasa, que garantizaría un potencial replicativo ilimitado (7). La telomerasa es un complejo ribonucleoproteico encargado de sintetizar las repeticiones de DNA telomérico en el extremo 3' de los cromosomas lineales. Para ello presenta acción transcriptasa reversa gracias a una subunidad denominada TERT (codificada por el gen hTERT en el cromosoma 5 en humanos) y a un componente RNA llamado hTERC (codificado en humanos por el gen hTERC en el cromosoma 3) que actúa como molde para la síntesis de dicho DNA. La telomerasa también participa en la regulación de la expresión génica, proliferación celular y apoptosis, adhesión y migración celular (2). Además de la telomerasa, aproximadamente el 15% de los tumores humanos mantienen sus telómeros mediante un mecanismo alternativo a la enzima denominado ALT (*Alternative Lengthening of Telomeres*), basado en procesos de recombinación del DNA donde la región telomérica de un cromosoma puede ser translocada a la región telomérica de otro cromosoma, con intervención de proteínas de reparación del DNA como el complejo MRN, ATRX o BRCA1 (8).

Sin embargo, actualmente la regulación y dinámica del mantenimiento de los telómeros no está completamente establecida, ya que en células que adquieren oncogenicidad, este acortamiento tiene función supresora puesto que limita su capacidad replicativa, pero en ausencia de aquellas moléculas relacionadas con senescencia celular generaría una inestabilidad genómica que contribuiría al avance del proceso tumorigénico (9).

Teniendo en cuenta que la obesidad severa se asocia con un estado de inflamación crónica, resulta importante el papel que puedan desempeñar las sirtuinas. Son una familia de proteínas con actividad desacetilasa NAD⁺ dependiente y mono-[ADP-ribosil] transferasa que tienen como principal función la detección de cambios en el estado redox de las células provocados por estrés (oxidativo, metabólico, genotóxico, etc.). En mamíferos, la familia de sirtuinas está integrada por 7 miembros (SIRT1-7) que difieren en su localización, actividad y funciones: SIRT1, 6 y 7 se localizan principalmente en el núcleo; SIRT2 y 3 en el citoplasma y mitocondria respectivamente (aunque presentan niveles limitados en el núcleo); y SIRT4

y 5 son estrictamente mitocondriales. Todas estas sirtuinas realizan múltiples funciones que pueden ser clasificadas en 4 procesos principales: regulación de la cromatina, supervivencia celular bajo estrés, regulación de la homeostasis metabólica, y desarrollo y diferenciación celular (10). También están relacionadas con varias vías inflamatorias, donde algunos de sus miembros parecen estar implicados en el mantenimiento de los telómeros.

En humanos, se ha propuesto la participación de SIRT1 y SIRT6 en el mantenimiento de la longitud y función telomérica, ya que estudios recientes demuestran que la reducción de los niveles de SIRT6 se relaciona con disfunción telomérica y SIRT1 promueve senescencia replicativa en respuesta a estrés oxidativo crónico (11, 12). Es por ello que en los últimos años hay evidencias claras de la potencialidad que las sirtuinas pueden tener en terapia humana, aunque son necesarios trabajos de investigación que aclaren estas perspectivas. Además, otros trabajos también han establecido variaciones en los niveles de sirtuinas (principalmente SIRT1 y 6) en pacientes obesos antes y después de perder peso, lo que sería indicativo de que la obesidad y la actividad de estas proteínas y, en conclusión, el cáncer están relacionados (13).

Por ello, y considerando los datos anteriores, el presente trabajo plantea la posibilidad de explorar nuevos marcadores moleculares relacionados con función telomérica que permitan obtener un mejor conocimiento de aquellos mecanismos que subyacen en pacientes obesos que desarrollan CCR, además de contribuir a mejorar la capacidad para establecer el pronóstico clínico y a la identificación de nuevas dianas terapéuticas en relación con la obesidad y el cáncer. En el desarrollo del presente trabajo se han considerado pacientes afectados de CCR, obesos y no obesos, así como pacientes obesos sin cáncer.

2. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1. Pacientes y muestras tisulares

El presente trabajo se realizó con muestras de tejidos humanos congelados proporcionadas por el Biobanco del Hospital Clínico San Carlos de Madrid (HCSC) o registradas como colección de muestras (C.0001253) del mismo hospital, todas ellas procedentes de pacientes que han sido sometidos a cirugía de intención curativa en el Servicio de Cirugía General y del Aparato Digestivo del citado hospital. De forma previa al estudio, se asegura a los pacientes la confidencialidad de datos, de acuerdo con la normativa establecida en la Ley de Protección de Datos de Carácter Personal (Ley Orgánica 15/1999, de 13 de Diciembre). Asimismo, se dispone de los consentimientos informados de los pacientes para donación de muestras biológicas.

Los sujetos y muestras considerados en este estudio corresponden a los siguientes grupos:

Casos: pacientes con CCR que presenten un Índice de Masa Corporal (IMC) superior a 30Kg/m^2 en el momento de la cirugía.

Controles:

Sujetos con $\text{IMC} > 30\text{Kg/m}^2$ sin cáncer, que vayan a ser sometidos a cirugía electiva o que vayan a ser sometidos a cirugía bariátrica ($\text{IMC } 30\text{-}45\text{Kg/m}^2$).

Pacientes con CCR con $\text{IMC habitual} < 30\text{Kg/m}^2$.

Los pacientes y muestras tisulares consideradas en el trabajo se indican en la **Tabla 1**. Las muestras de tejido colorrectal, tumorales y no tumorales, una vez resecaadas por cirugía, se envían al Biobanco para realizar los estudios anatomopatológicos pertinentes y ser almacenadas a -80°C en *Tissue Teck*[®] (Sakura) hasta el momento de su utilización; las muestras de tejido adiposo se incluyen en un reactivo que mantiene la integridad del RNA denominado *RNAlater*[®] (Qiagen) y se congelan también a -80°C hasta su procesamiento.

Tabla 1. Clasificación de los grupos de pacientes y muestras tisulares objeto de estudio.

GRUPO	Nº PACIENTES	TIPO DE MUESTRA
Tejido colorrectal		
Pacientes con CCR	60	Tejido colorrectal tumoral y tejido no tumoral (control, a 10 cm del margen del tumor).
Tejido adiposo		
Pacientes con CCR (IMC variable)	80	Tejido adiposo subcutáneo (SC) y tejido adiposo omental (O).
Pacientes obesos sin CCR (IMC > 30)	60	Tejido adiposo subcutáneo (SC) y tejido adiposo omental (O).

En los análisis de tejidos adiposos, para el grupo de pacientes obesos con CCR se utilizó como control el grupo

de pacientes obesos sin CCR cuando se pretende estudiar el efecto del CCR sobre alguna de las variables analizadas,

mientras que para analizar el efecto que tiene la obesidad sobre dichas variables se utilizó como control el grupo de pacientes no obesos con CCR.

Al comienzo del estudio se recogieron datos de peso y talla para determinar el IMC de los pacientes; y en la población de tumores analizada se tuvieron en cuenta las siguientes variables clínico-patológicas: estadio de Dukes

(A, B, C y D), sistema TNM (T1, 2, 3 ó 4; N0, 1 ó 2; M0 ó 1) y recidiva tumoral, con un seguimiento clínico de la población (supervivencia global) de 60 meses.

A continuación, en las **Tablas 2, 3 y 4** se detalla el espacio muestral de cada grupo junto con las distintas variables clínico-patológicas:

Tabla 2. Características clínicas de los tumores y pacientes del grupo 1

GRUPO 1: PACIENTES AFECTADOS DE CCR		
	Variable	N
Sexo		60
	Femenino	33
	Masculino	27
Estadio Dukes		60
	A	12
	B	30
	C	12
	D	6
T, tumor primario		60
	T1	3
	T2	12
	T3	38
	T4	7
N, invasión ganglionar		60
	N0	43
	N1	9
	N2	7
M, metástasis		60
	M0	45
	M1	15
Recidiva		60
	Si	52
	No	8
IMC		60
	18,5-24,9	19
	25-29,9	28
	>30	13

Tabla 3. Características clínicas de los pacientes del grupo 2.

GRUPO 2: PACIENTES AFECTADOS DE CCR		
	Variable	N
Sexo		80
	Femenino	30
	Masculino	50
IMC		80
	18,5-24,9	21
	25-29,9	40

>30

19

Tabla 4. Características clínicas de los pacientes del grupo 3.**GRUPO 3: PACIENTES OBESOS SIN CCR**

Variable	N
Sexo	60
Femenino	44
Masculino	16
IMC	60
18,5-24,9	0
25-29,9	0
>30	60

2.2. Análisis de la función telomérica

La función telomérica fue evaluada en las muestras objeto de estudio mediante la determinación de la longitud de las secuencias teloméricas y de la actividad telomerasa.

2.2.a. Determinación de la longitud telomérica

La extracción de DNA genómico se realizó siguiendo el protocolo de Blin y Stafford (14) adaptado. La cuantificación de la longitud telomérica (LT) para muestras de tejido tumoral se realizó mediante el análisis de los Fragmentos de Restricción (TRF) y mediante PCR cuantitativa (qRT-PCR), mientras que para las muestras de tejido adiposo únicamente se llevó a cabo mediante qRT-PCR.

2.2.a.i. Análisis por Telomere Restriction Fragment (TRF)

En esta técnica se utilizó el kit *Telo TAAGGG Telomere Length Assay* (Roche). El DNA genómico obtenido se digirió con enzimas de restricción HinfI y RsaI (degradan todo el DNA genómico excepto las regiones teloméricas y subteloméricas), los fragmentos se separaron mediante electroforesis y se transfirieron a una membrana de nailon mediante *Southern blotting*. Después, el DNA transferido se hibridó con una sonda marcada con digoxigenina (de unión específica a las regiones teloméricas) y se incubó con el anticuerpo anti-digoxigenina (unido covalentemente a la enzima fosfatasa alcalina), para posteriormente incubarlo con el sustrato CDP-Star, que genera una señal quimioluminiscente que permite visualizar los distintos fragmentos teloméricos en un film de revelado.

Para analizar los resultados se utilizó el software *Image Gauge 3.46*, donde el valor de la longitud telomérica

media en Kb y en referencia a un patrón de peso molecular estándar fue definido como:

$$\text{Longitud telomérica media (Kb)} = \frac{\sum \text{OD}_i}{\sum (\text{OD}_i / \text{Li})}$$

OD_i = señal quimioluminiscente

Li = longitud del TRF de la posición (i)

i = posición a lo largo de la calle de la muestra

El grado de acortamiento telomérico en el tumor respecto al control (ratio T/N) se determinó mediante el cociente TRF tumor/TRF control.

2.2.a.ii. Análisis por qRT-PCR

Esta técnica se basa en la teoría de que la longitud telomérica relativa de una muestra (ratio T/S) viene dada por el número de copias de su secuencia telomérica (T) dividida entre el número de copias de un gen de copia única (S), respecto al de un DNA de referencia. En este caso, el gen de copia única utilizado fue *RPLPO* y como DNA de referencia se empleó el de la línea celular HeLa.

Se realizaron dos reacciones de amplificación por muestra, cada una de ellas por triplicado, donde cada pocillo contenía 10ng DNA/μl y los reactivos indicados en la **Tabla 5**. En el caso de la reacción de amplificación de la secuencia telomérica, se emplearon los *primers* correspondientes a telómeros (*TEL*) y para la amplificación del gen *RPLPO* los *primers* correspondientes a dicho gen (*RPLPO*), todos detallados en la **Tabla 6**:

Tabla 5. Mezcla de reacción para determinación de la longitud telomérica por qRT-PCR.

COMPONENTES	VOLUMEN (µl) POR POCILLO
<i>SYBR Green</i> [®] <i>Master Mix</i> (2X)	5
<i>Primer TEL reverse</i> (10µM)	0,9
<i>Primer TEL forward</i> (10mM)	0,3
<i>Primer RPLPO reverse</i> (10mM)	0,5
<i>Primer RPLPO forward</i> (10mM)	0,3
AUE (Agua Ultrapura Estéril) (<i>TEL/RPLPO</i>)	1,8/2,2
TOTAL	8

Tabla 6. Secuencia de los *primers* de *TEL* y *RPLPO*.

<i>Primer TEL reverse</i>	5'-GGTTTTTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGTGAGGGT-3'
<i>Primer TEL forward</i>	5'-TCCCGACTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTATCCCTA-3'
<i>Primer RPLPO reverse</i>	5'-CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC-3'
<i>Primer RPLPO forward</i>	5'-CCATTCTATCATCAACGGGTACAA-3'

Para cada pareja de *primers* se construyó una curva estándar a través de diluciones seriadas del DNA de HeLa que permitieron calcular la eficiencia (E) de la prueba. Una vez obtenida la E, el cálculo de la longitud telomérica

relativa de cada muestra con respecto al DNA de referencia se realizó siguiendo la fórmula descrita por Pfaffl (15):

$$E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$$

$$\text{Ratio T/S} = \frac{E_{TEL}^{(Ct\ DNA\ referencia - Ct\ DNA\ muestra)}}{E_{RPLPO}^{(Ct\ DNA\ referencia - Ct\ DNA\ muestra)}}$$

2.2.b. Determinación de la actividad telomerasa

La detección de la actividad telomerasa se realizó empleando el kit comercial *TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA*[®] (Roche), que se basan en una ampliación del método descrito por Kim et al. (16). La técnica se realiza en dos pasos, donde en el primero la enzima telomerasa añade repeticiones teloméricas (TTAGGG) al extremo 3' del cebador sintético biotinilado P1-TS, que serán amplificados por PCR usando los cebadores P1-TS y P2, generando así secuencias que difieren de tamaño en 6pb.

En un segundo paso, los fragmentos amplificados por PCR son desnaturalizados e hibridados con una sonda específica marcada con digoxigenina (P3), con una secuencia complementaria a la de las repeticiones teloméricas. El producto obtenido se inmoviliza en los pocillos recubiertos de estreptavidina de una placa de ELISA gracias a que el cebador está marcado con biotina,

y dicho producto es detectado con un anticuerpo anti-digoxigenina conjugado con peroxidasa que, al reaccionar con la tetrametilbenzidina, su sustrato, genera un producto de color azul cuya absorbancia es proporcional a la cantidad de DNA telomérico añadido por la telomerasa. Finalmente se añade ácido sulfúrico para detener la reacción, lo que provoca el viraje a color amarillo.

Utilizando el programa bioinformático Microplate manager[®] (Bio-Rad) se mide la absorbancia de cada pocillo a 450nm empleando una longitud de onda de referencia de 690nm, donde aquellas muestras en las que la diferencia de absorbancias es superior a 0,2 se consideran "telomerasa positivas".

2.3 Ensayos de expresión génica de *SIRT1* y *SIRT6* por qRT-PCR

Previamente se realizó la extracción y purificación de los RNAs procedentes de los cortes de tejido (tumoraes,

no tumorales y adiposo), mediante el método de Chomczynski y Sacchi (17) mejorado, utilizando *TRIzol*[®] (Invitrogen). Seguidamente se sintetizaron los cDNA (DNA complementario) empleando el kit *Hight-Capacity cDNA Reverse Transcriptions*[®] (Applied Biosystem) con

la mezcla indicada en la **Tabla 7** y las condiciones proporcionadas por la casa comercial. Para comprobar que la reacción se había producido correctamente, se realizó una PCR de comprobación utilizando cebadores exón-exón para el gen *GAPDH*.

Tabla 7. Ensayos de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*; mezcla de reacción para la transcripción reversa.

COMPONENTES	VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN
Tampón 10X de transcripción reversa	10
Mezcla dNTPs 25X	4
Mezcla Random Primers 10X	10
Enzima Transcriptasa Reversa (50U/μl)	5
Inhibidor de RNasa	2,5
AUE (Agua Ultrapura Estéril)	18,5
RNA	2μ en 50μl
TOTAL	100

Para realizar la PCR cuantitativa a tiempo real (qRT-PCR) se utilizó la mezcla de reactivos detallada en la **Tabla 8**. El reactivo *TaqMan*[®] *Gene Expression Assay 20X* (Applied Biosystems) incluye dos cebadores para amplificar la secuencia deseada y la sonda *TaqMan* MGB (6-FAM dye-labeled)[®] para detectarla (Hs00966002_m1 para *SIRT1*, Hs01009005_m1 para *SIRT6* y Hs99999905_m1 para *GAPDH*). La mezcla de reacción

previamente detallada se cargó por triplicado, y como control negativo se utilizó AUE (Agua Ultra Estéril) en lugar de cDNA. Para las muestras de tejido tumoral, el control está integrado por un *pool* de tejidos no tumorales, mientras que para el tejido adiposo se cuenta con dos controles: cDNAs de pacientes obesos sin CCR (control de pacientes obesos con CCR) y de pacientes no obesos con CCR (control de pacientes obesos con CCR).

Tabla 8. Ensayos de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*; mezcla de reacción para qRT-PCR.

COMPONENTES	VOLUMEN (μl) POR REACCIÓN
<i>TaqMan</i> [®] <i>Gene Expression Assay 20X</i>	10
<i>TaqMan</i> [®] <i>Universal PCR Master Mix 2X</i>	1
AUE (Agua Ultra Estéril)	8
cDNA (20ng/μl)	1
TOTAL	20

El análisis de la qPCR se basó en el método comparativo de Ct (*Cycle threshold*). Para las muestras de tejido tumoral de colon, una vez obtenidas las medias de los valores de Ct de la muestra tumoral (Ct gen diana tumor) y del control (Ct gen diana control, formado por un *pool* no tumoral), se normalizaron respecto al valor de Ct del gen *GAPDH* (Ct endógeno) para obtener ΔCt. Al valor ΔCt de cada muestra tumoral se le resta el ΔCt del control para obtener el valor de ΔΔCt. Finalmente, se calculó la

expresión relativa (RQ) del gen diana en cada muestra respecto al control mediante la fórmula $RQ = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$.

Para las muestras de tejido adiposo, el valor ΔCt se obtiene de la misma manera pero el valor de ΔΔCt se obtiene al restar al ΔCt de la muestra la media de ΔCt del *pool* de muestras de tejido adiposo subcutáneo (SC) u omental (O) del grupo control correspondiente.

Para tejido tumoral:

$$\Delta Ct \text{ tumor} = Ct \text{ gen diana del tumor} - Ct \text{ gen endógeno del tumor}$$

$$\Delta Ct \text{ control} = Ct \text{ gen diana control} - Ct \text{ gen endógeno control (GAPDH)}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ tumor} - \Delta Ct \text{ control}$$

$$RQ = 2^{(-\Delta\Delta Ct)}$$

Para tejido adiposo:

$$\Delta Ct \text{ adiposo (SC)} = Ct \text{ gen diana adiposo (SC)} - Ct \text{ gen endógeno adiposo (SC)}$$

$$\Delta Ct \text{ adiposo (O)} = Ct \text{ gen diana adiposo (O)} - Ct \text{ gen endógeno adiposo (O)}$$

$$\Delta\Delta Ct \text{ (SC)} = \Delta Ct \text{ adiposo (SC)} - \Delta Ct \text{ del pool adiposo control}$$

Los resultados se interpretan de la siguiente manera:

RQ > 2 → Sobreexpresión.

RQ 0,5-2 → Expresión normal.

RQ < 0,5 → Expresión reducida.

2.4 Análisis estadísticos.

Para los análisis estadísticos se utilizó el programa IBM SPSS Statistics 22[®], con las pruebas detalladas en la **Tabla 9** (en todos los casos se consideran diferencias significativas si P < 0,05).

Tabla 9. Pruebas aplicadas en los análisis estadísticos

OBJETIVO A EVALUAR	ESTADÍSTICA PARAMÉTRICA	ESTADÍSTICA NO PARAMÉTRICA
Asociación entre una variable categórica y una variable cuantitativa	Variable categórica dicotómica T de Student	U de Mann-Whitney
	Variable categórica de 3 o más categorías ANOVA de una vía	Kruskal-Wallis
Asociación entre dos variables cuantitativas	Correlación de Pearson	Correlación de Spearman

Para estimar las curvas de supervivencia (medida como supervivencia global) se empleó el método de Kaplan-Meier, y el test de Log-Rank para compararlas entre sí. En los estudios de supervivencia se excluyó a aquellos pacientes que habían fallecido en el periodo post-operatorio.

3. RESULTADOS

3.1. Análisis de tumores colorrectales.

3.1.a Estatus telomérico y su relación con las variables clínico-patológicas

En el grupo de pacientes con CCR (grupo 1), la longitud telomérica media (LTM, media ± error estándar) fue de 3,80 ± 0,18Kb y de 5,41 ± 0,28 Kb para sus pares no tumorales (controles) (**Figura 1**). La diferencia de LTM entre ambos grupos resultó estadísticamente significativa (P < 0,001; Test de Wilcoxon) con un valor medio para el ratio T/N (relación entre la LTM tumoral y no tumoral) de 0,74 ± 0,03.

Además, se observó una moderada correlación lineal entre las LT del tejido tumoral y no tumoral (correlación de Spearman = 0,460; P valor asociado < 0,001) (**Figura 2**).

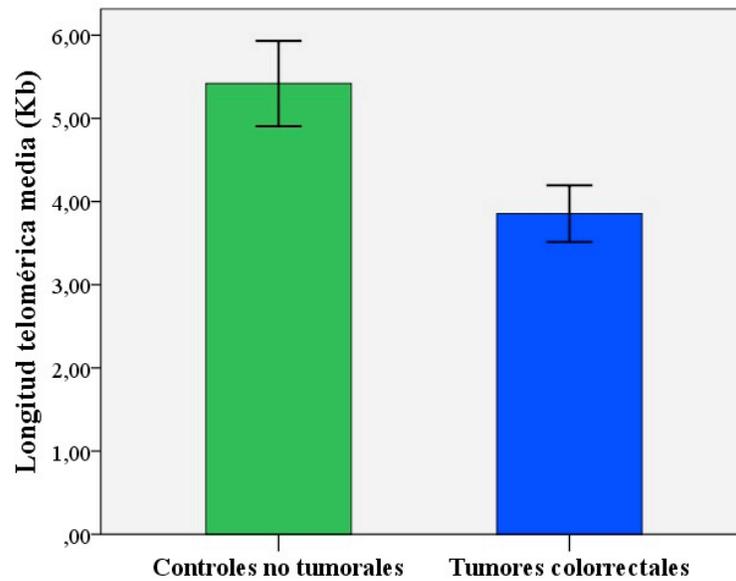


Figura 1. Diagrama de barras referente a la LTM en tumores colorrectales y en los controles no tumorales.

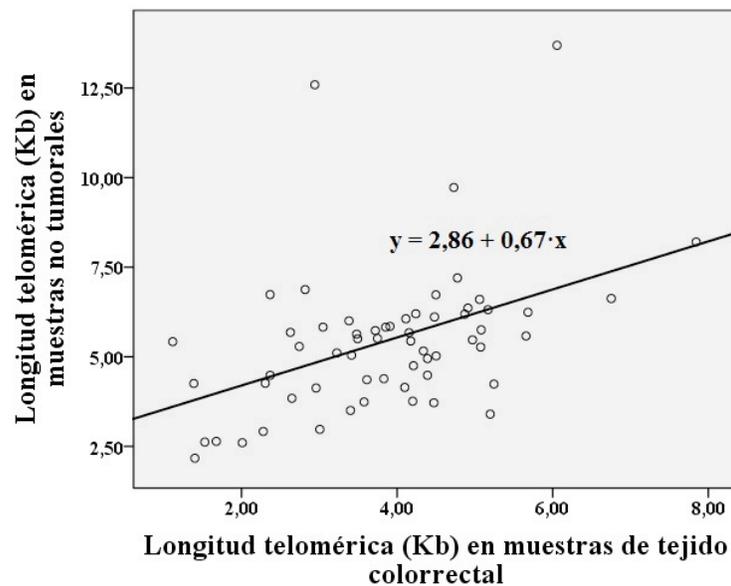


Figura 2. Diagrama de dispersión de las LT (Kb) de las muestras tumorales (eje X) y de las muestras no tumorales (eje Y).

Para las variables clínico-patológicas, se realizó un análisis para evaluar la posible asociación entre estas y el estatus telomérico de los tumores objeto de estudio (**Tabla 10**). De acuerdo con los resultados obtenidos, no se encuentran asociaciones estadísticamente significativas entre la LTM del tejido tumoral o el ratio T/N y las variables clínico-patológicas consideradas.

Seguidamente, la LTMT se dividió en cuartiles poblacionales, de manera que se obtuvo un punto de corte en 3,84Kb, que divide a la población en dos mitades.

Como resultado, se obtuvo una distribución poblacional de las LTMT con diferencias significativas en el estadio A de Dukes frente al resto de estadios (P = 0,048; χ^2 de Pearson. **Tabla 11**). Los tumores colorrectales de estadios más avanzados (Dukes B, C y D), en su mayoría tuvieron longitudes teloméricas superiores a 3,84Kb, mientras que sólo un 20% de los tumores con estadio A de Dukes poseían longitudes superiores a dicho punto de corte.

Tabla 10. Asociación entre el estatus telomérico y variables clínico-patológicas en tumores colorrectales; *Longitud telomérica media tumoral; **Grado de diferenciación; #Error estándar de la media

VARIABLE	N	LTMT* (KB) (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	RATIO (MEDIA ± EE#)	T/N P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes	52	3,82 ± 0,19		0,49 ± 0,06	
A	10	3,45 ± 0,28	P = 0,214 t de Student	0,71 ± 0,05	P = 0,722 t de Student
B, C, D	42	3,9 ± 0,23		0,74 ± 0,04	
T	53	3,86 ± 0,19		0,75 ± 0,03	
T1	2	3,30 ± 0,08	P = 0,561 t de Student	0,60 ± 0,03	P = 0,399 t de Student
T2, T3, T4	51	3,88 ± 0,19		0,75 ± 0,04	
N	52	3,85 ± 0,19		0,74 ± 0,03	
N0		3,96 ± 0,22	P = 0,333 t de Student	0,75 ± 0,04	P = 0,523 t de Student
N1, N2		3,55 ± 0,37		0,70 ± 0,06	
Recidiva	50	3,81 ± 0,2		0,73 ± 0,04	
No	46	3,88 ± 0,21	P = 0,323 t de Student	0,72 ± 0,04	P = 0,394 t de Student
Sí	4	3,15 ± 0,43		0,84 ± 0,06	
G. D**	23	4,01 ± 0,27		0,78 ± 0,05	
Bien	9	4,47 ± 0,51	P = 0,318 ANOVA de un factor	0,75 ± 0,07	P = 0,753 ANOVA de un factor
Moderado	12	3,61 ± 0,32		0,81 ± 0,09	
Pobre	2	4,01 ± 0,27		0,78 ± 0,05	

Tabla 11. Asociación entre LTMT superiores a 3,84 Kb y estadio de Dukes tumoral. *Longitud telomérica media tumoral.

VARIABLE	N (LTMT* > 3,84 KB)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes A	2	P = 0,048
Dukes B, C y D	23	χ^2 de Pearson

En cuanto a la LTM no tumoral, se observaron diferencias significativas respecto a la recidiva (P = 0,024; U de Mann-Whitney); los tumores que recidivaron durante el tiempo de seguimiento mostraron una menor LTM (3,79 ± 0,53 Kb) que los que no lo hicieron (5,63 ± 0,31 Kb). También se encontró una diferencia con tendencia a la significación estadística en la LTM no tumoral en estadios A y B de Dukes frente a los estadios C y D (P = 0,108; U de Mann-Whitney).

3.1.b Estatus telomérico y su relación con el IMC

Para realizar este análisis se consideraron 47 pacientes, los cuales fueron agrupados según su IMC en tres categorías: normopeso (31,9%), sobrepeso (44,7%) y obesidad (23,4%) (**Tabla 12**). Para estos grupos se evaluó la LTM no tumoral, la LTMT (datos recogidos también en la **Tabla 12**) y el ratio T/N (datos no mostrados).

Tabla 12. Asociación entre el estatus telomérico y el IMC de pacientes afectados de CCR.; ¹Longitud telomérica media no tumoral; ²Longitud telomérica media tumoral; [#]Error estándar de la media; 1: Normopeso; 2: Sobrepeso; 3: Obesidad; *Normopeso vs Resto (sobrepeso y obesidad).

VARIABLE	N	LTMNT ¹ (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA	LTMT ² (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA
IMC	47	5,56 ± 0,31		3,80 ± 0,21	
1	15	4,91 ± 0,41	P = 0,049 Kruskal-Wallis	3,55 ± 0,31	P = 0,559 ANOVA de un factor
2	21	6,25 ± 0,56		3,78 ± 0,32	
3	11	5,14 ± 0,49		4,17 ± 0,52	
IMC N vs R*	47	5,56 ± 0,31	P = 0,038	3,80 ± 0,21	
1	15	4,91 ± 0,41	U de Mann-Whitney	3,55 ± 0,31	P = 0,419 T de Student
2, 3	32	5,87 ± 0,41		3,92 ± 0,27	

Estos resultados mostraron una relación significativa entre la LTM no tumoral y el IMC (P = 0,049; Kruskal-Wallis), así como diferencias significativas entre la LTM no tumoral de pacientes con normopeso (4,91 ± 0,41 Kb) respecto al grupo formado por los paciente con sobrepeso u obesidad (5,87 ± 0,41 Kb) (P = 0,038; U de Mann Whitney). Por el contrario, no se encontraron relaciones significativas entre la LTMT o el ratio T/N y el IMC.

3.1.c. Estatus telomérico y su relación con la actividad telomerasa.

En el tejido tumoral, la actividad telomerasa resultó positiva en 48 muestras (85,7%) y negativa en 8 (14,3%), sin hallarse diferencias estadísticamente significativas para la LTMT entre ambos subgrupos (P = 0,493; prueba T de Student) (**Tabla 13**). Sin embargo, cabe destacar que la LTM en los tumores telomerasa positiva fue menor (3,75 ± 0,19 Kb) que en los tumores con actividad telomerasa negativa (4,11 ± 0,54 Kb).

Tabla 13. Actividad telomerasa y su relación con la LTMT en pacientes con CCR. *Longitud telomérica media tumoral; [#]Error estándar de la media.

VARIABLE	N	LTMT* (KB) (MEDIA ± EE [#])	P Y PR. ESTADÍSTICA
Actividad Telomerasa	56	3,80 ± 0,63	
Positiva	48	3,75 ± 0,19	P = 0,493 t de Student
Negativa	8	4,11 ± 0,54	

3.1.d. Estudios de pronóstico basados en el estatus telomérico

Se analizó el papel que tiene el estatus telomérico como posible biomarcador pronóstico para pacientes con CCR que han sido sometidos a cirugía de intención curativa. En este estudio se incluyó a 49 pacientes

considerando el acortamiento de las secuencias teloméricas tumorales

(determinado como ratio T/N). Los resultados obtenidos muestran dos grupos de pacientes con diferente pronóstico clínico (P = 0,058; Log-Rank) (**Figura 3**).

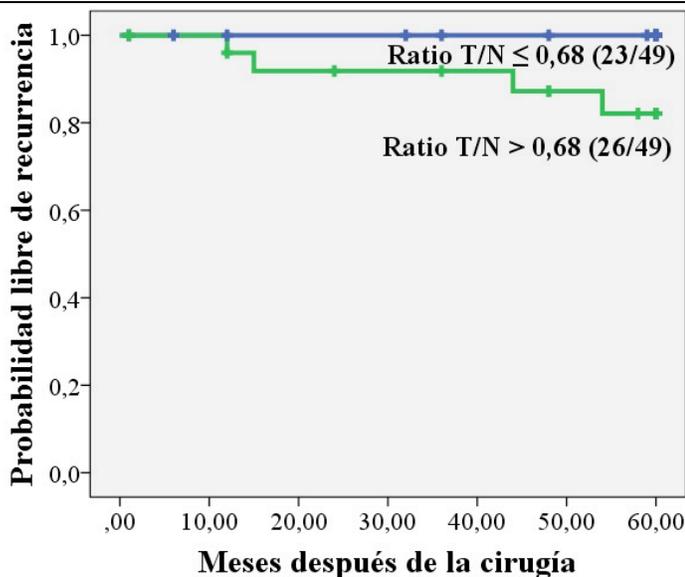


Figura 3. Curvas de supervivencia considerando el ratio T/N para pacientes con CCR.

Según estas curvas de supervivencia, los pacientes con un acortamiento de la LTMT superior al 30%, aproximadamente, presentan un pronóstico clínico más favorable, con diferencias al borde de la significación estadística.

3.1.e. Expresión de SIRT1 y SIRT6 y su relación con las variables clínico-patológicas

La expresión génica relativa media de SIRT1 y SIRT6 (media RQ ± error estándar) en el grupo de pacientes con

CCR fue de $0,54 \pm 0,6$ y de $0,30 \pm 0,4$, respectivamente. Se observó una correlación estadísticamente significativa entre los niveles de expresión relativa (RQ) de SIRT1 y SIRT6 ($P = 0,038$; correlación de Pearson).

Al relacionar la expresión de estas moléculas con las variables clínico-patológicas de los tumores, los resultados obtenidos no mostraron asociaciones estadísticamente significativas (**Tabla 14**):

Tabla 14. Asociación entre la expresión de SIRT1 y SIRT6 y las variables clínico-patológicas en CCR. #Error estándar de la media; * Grado diferenciación; ** No se obtuvo el error estándar por ser N = 1.

VARIABLE	N	RQ SIRT1 (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ SIRT6 (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Dukes	50	0,55 ± 0,06	P = 0,611	51	0,31 ± 0,04	P = 0,647
A	10	0,76 ± 0,23	U de Mann-Whitney	11	0,27 ± 0,09	U de Mann-Whitney
B, C, D	40	0,50 ± 0,05		40	0,32 ± 0,05	
T	51	0,54 ± 0,06	P = 0,207	52	0,29 ± 0,04	P = 0,703
T1	2	1,42 ± 0,94	U de Mann-Whitney	2	0,2 ± 0,14	U de Mann-Whitney
T2, T3, T4	49	0,50 ± 0,05		50	0,29 ± 0,04	
N	50	0,54 ± 0,06	P = 0,857	51	0,29 ± 0,04	P = 0,385
N0	35	0,56 ± 0,08	U de Mann-Whitney	35	0,28 ± 0,05	U de Mann-Whitney
N1, N2	15	0,49 ± 0,07		15	0,31 ± 0,05	Whitney
Recidiva	49	0,52 ± 0,05	P = 0,258	50	0,32 ± 0,04	P = 0,971
No	45	0,54 ± 0,05	U de Mann-Whitney	46	0,32 ± 0,04	U de Mann-Whitney
Sí	4	0,3 ± 0,09		4	0,31 ± 0,14	Whitney
G.D*	21	0,63 ± 0,08		22	0,27 ± 0,05	
Bien	9	0,61 ± 0,1	P = 0,938	9	0,36 ± 0,09	P = 0,351
Moderado	11	0,63 ± 0,13	Kruskal-Wallis	12	0,22 ± 0,05	Kruskal-Wallis
Pobre	1	0,74 ± **		1	0,07 ± **	

3.1.f. Expresión de SIRT1 y SIRT6 en tumores colorrectales y su relación con el IMC

Al igual que en los análisis relativos al estatus telomérico, los pacientes se clasificaron según su IMC en normopeso (37,2%), sobrepeso (44,2) y obesidad (18,6%). Posteriormente, se analizó si existían diferencias

significativas ente dichos subgrupos considerando los valores de RQ obtenidos para *SIRT1* y *SIRT6* (Tabla 15), no encontrándose asociaciones significativas entre la expresión relativa de ambos genes y el IMC.

Tabla 15. Asociación entre la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* y el IMC de pacientes afectados de CCR. #Error estándar de la media; 1: Normopeso; 2: Sobrepeso; 3: Obesidad; *Normopeso vs Resto (sobrepeso y obesidad).

VARIABLE	N	RQ <i>SIRT1</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ <i>SIRT6</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
IMC	46	0,56 ± 0,07		47	0,31 ± 0,04	
1	16	0,55 ± 0,10	P = 0,997	16	0,41 ± 0,09	P = 0,432
2	20	0,61 ± 0,13	Kruskal-Wallis	20	0,26 ± 0,6	Kruskal-Wallis
3	10	0,48 ± 0,06		11	0,26 ± 0,05	
IMC N vs *	46	0,56 ± 0,07	P = 0,982	47	0,31 ± 0,04	P = 0,252
1	16	0,55 ± 0,10	U de Mann-	16	0,41 ± 0,09	U de Mann-
2 y 3	30	0,57 ± 0,09	Whitney	31	0,26 ± 0,04	Whitney

3.1.f Expresión de *SIRT1* y *SIRT6* y su relación con la función telomérica

El acortamiento telomérico tumoral se asoció significativamente con la expresión de *SIRT1*. Concretamente, los tumores con ratio T/N ≤ 0,68 mostraron mayores niveles de expresión de *SIRT1* (P =

0,052; U de Mann-Whitney) (Figura 4). Para *SIRT6* no se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

Tampoco se detectaron diferencias relevantes en la expresión relativa de ambos genes en función de la actividad telomerasa (Tabla 16).

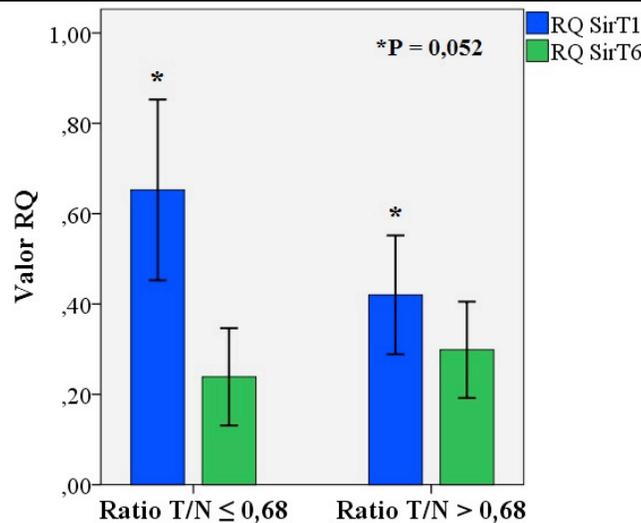


Figura 4. Asociación entre acortamiento telomérico y niveles de expresión de *SIRT1* y *SIRT6*. *Diferencias al borde de la significación estadística.

Tabla 16. Asociación entre la actividad telomerasa y la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tumores colorrectales. #Error estándar de la media; *Actividad telomerasa.

VARIABLE	N	RQ <i>SIRT1</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA	N	RQ <i>SIRT6</i> (MEDIA ± EE#)	P Y PR. ESTADÍSTICA
Act. Tel.*	54	0,54 ± 0,06	P = 0,417	55	0,30 ± 0,04	P = 0,578
Positiva	47	0,53 ± 0,07	U de Mann-	48	0,30 ± 0,04	U de Mann-
Negativa	7	0,59 ± 0,10	Whitney	7	0,28 ± 0,14	Whitney

3.1.g Estudios de pronóstico basados en la expresión de *SIRT1* y *SIRT6*

El análisis de la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tumores de pacientes con CCR y sometidos a cirugía de intención curativa también se realizó para conocer su relevancia como marcador pronóstico. Para *SIRT1*, se detectaron dos grupos de sujetos con diferente pronóstico clínico. Así, los pacientes con niveles de expresión de *SIRT1* inferiores al rango considerado como normal (RQ < 0,5) mostraron un pronóstico clínico significativamente más adverso (P = 0,047; Log-Rank) (Figura 5). Dichas diferencias se mantuvieron independientemente del estadio

tumoral considerado. En las Figuras 6A y 6B se muestran las curvas de supervivencia respecto a la expresión de *SIRT1* para pacientes con CCR en estadios C y D, respectivamente. El punto de corte óptimo dividió la población en dos subgrupos con diferente pronóstico clínico, donde aquellos con una expresión relativa superior a 0,5 tenían un mejor pronóstico que aquellos con RQ < 0,5 (P = 0,065; Log-Rank).

Para *SIRT6*, no se encontró ningún punto de corte que dividiese la población en dos grupos de manera significativa.

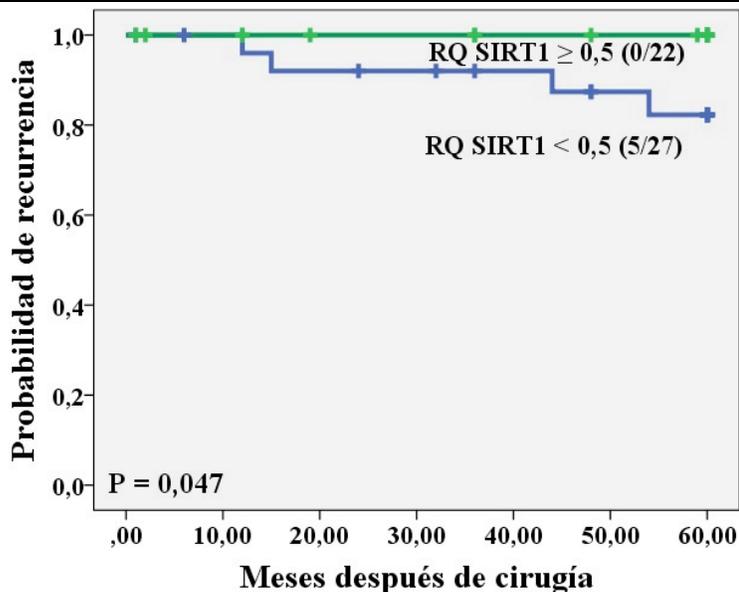


Figura 5. Curvas de supervivencia considerando el nivel de expresión de *SIRT1* en pacientes con CCR.

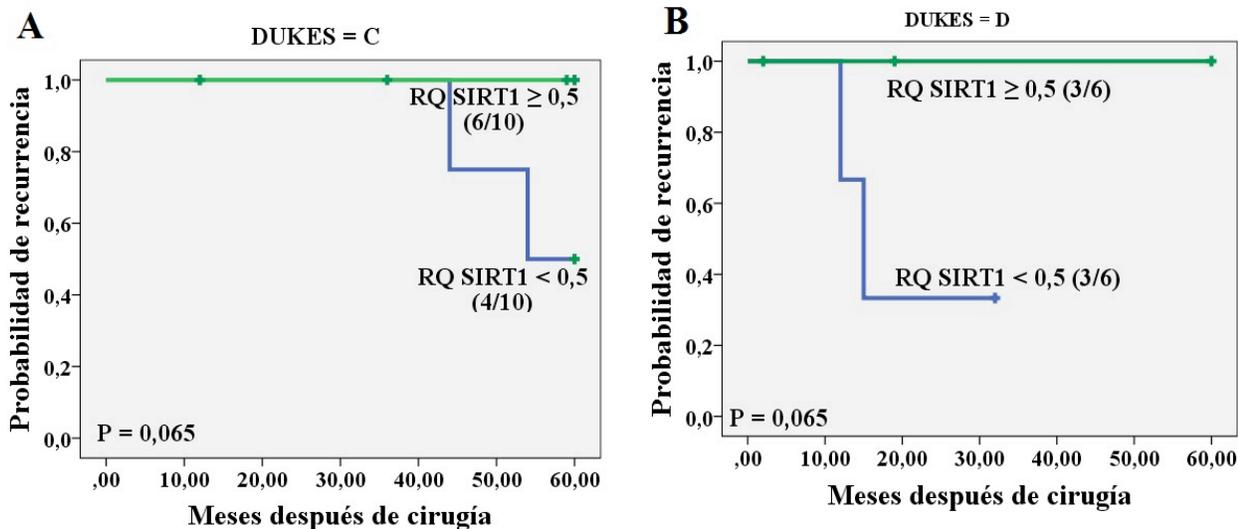


Figura 6. Curvas de supervivencia considerando el nivel de expresión de *SIRT1* en pacientes con CCR en estadio de Dukes C (A) y en pacientes con CCR en estadio de Dukes D (B).

3.2. Análisis en tejidos adiposos omental y subcutáneo

3.2.a. Relación entre la longitud telomérica relativa (LTR) en tejido adiposo y CCR

Para este estudio se analizaron las longitudes teloméricas relativas (LTR) de las muestras de tejidos adiposos omental (O) y subcutáneo (SC) de los pacientes del grupo 2 (obesos y no obesos afectados de CCR) y del grupo 3 (obesos sin CCR).

En pacientes obesos sin CCR, la LTR en tejido adiposo omental tuvo un valor superior que en pacientes obesos

con CCR, las diferencias registradas se aproximaron a la significación estadística ($P = 0,056$; U de Mann-Whitney). En tejido adiposo subcutáneo, los pacientes obesos no afectados de CCR también mostraron una mayor LTR ($P = 0,065$; U de Mann-Whitney) (**Tabla 17**).

Al comparar las LTR entre pacientes obesos con CCR y pacientes no obesos con CCR, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (**Tabla 18**).

Tabla 17. LTR en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y de pacientes obesos sin CCR. #Error estándar de la media.

VARIABLE	PACIENTES OBESOS SIN CCR	PACIENTES OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
Ratio T/S Omental (media \pm EE [#])	1,31 \pm 0,09	1,08 \pm 0,17	P = 0,056 U de Mann-Whitney
Ratio T/S Subcutáneo (media \pm EE [#])	1,26 \pm 0,12	1,21 \pm 0,20	P = 0,065 U de Mann-Whitney

Tabla 18. LTR en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes no obesos con CCR y de pacientes obesos con CCR. #Error estándar de la media.

VARIABLE	PACIENTES NO OBESOS CON CCR	PACIENTES OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
Ratio T/S Omental (media \pm EE [#])	1,17 \pm 0,16	1,08 \pm 0,17	P = 0,293 U de Mann-Whitney
Ratio T/S Subcutáneo (media \pm EE [#])	1,22 \pm 0,10	1,21 \pm 0,20	P = 0,542 U de Mann-Whitney

3.2.b. Actividad telomerasa en tejidos adiposos.

La actividad telomerasa se determinó en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos afectados de CCR, siendo comparada con los pacientes no obesos con CCR (**Tabla 19**) y con pacientes obesos sin CCR (**Tabla 20**). Respecto a los dos grupos control, en pacientes obesos con CCR, el tejido adiposo omental

reflejó un mayor número de casos con actividad telomerasa positiva, siendo estas diferencias estadísticamente significativas. Para el tejido adiposo subcutáneo, solamente se encontraron diferencias significativas en el número de casos con actividad telomerasa positiva entre los grupos de pacientes obesos con CCR y pacientes obesos sin CCR.

Tabla 19. Actividad telomerasa en tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y pacientes no obesos con CCR. *Tejido adiposo.

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA	PACIENTES OBESOS CON CCR	PACIENTES NO OBESOS CON CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
T.A.* omental	Positiva	9	21	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	11	35	
T.A.* subcutáneo	Positiva	9	21	P = 0,136 χ^2 de Pearson
	Negativa	12	34	

Tabla 20. Actividad telomerasa en tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR y pacientes obesos sin CCR. *Tejido adiposo.

VARIABLE	ACTIVIDAD TELOMERASA	PACIENTES OBESOS CON CCR	PACIENTES OBESOS SIN CCR	P Y PR. ESTADÍSTICA
T.A.* omental	Positiva	9	6	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	11	70	
T.A.* subcutáneo	Positiva	9	6	P < 0,001 χ^2 de Pearson
	Negativa	12	70	

3.2.c Expresión de SIRT1 y SIRT6 en tejidos adiposos omental y subcutáneo

Otro de los análisis realizados consistió en evaluar la expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6*, tanto en tejido adiposo omental como subcutáneo, en pacientes obesos con CCR, con objeto de investigar posibles diferencias de expresión ocasionadas por la obesidad y/o por el CCR (como control en el primer caso se consideró el grupo de pacientes no obesos con CCR y, en el segundo caso, el grupo de pacientes obesos sin CCR).

Los resultados indicaron que ambas sirtuinas muestran mayores niveles de expresión génica en los dos tipos de

tejidos analizados en pacientes obesos con CCR, con respecto a los niveles de expresión en pacientes obesos sin CCR (**Tabla 21**). Sin embargo, estas diferencias no alcanzaron valores de $RQ \geq 2$. Así mismo, al comparar la expresión de las dos sirtuinas investigadas en tejidos adiposos de pacientes obesos con CCR, en relación a pacientes no obesos con CCR, ambas sirtuinas mostraron una sobreexpresión en tejido adiposo omental; *SIRT1* mostró una expresión reducida en tejido adiposo subcutáneo, aunque en ambos casos los valores de RQ se encuentran entre 0,5 y 2 (**Tabla 22**).

Tabla 21. Expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposos omental y subcutáneo en pacientes obesos con CCR (control: pacientes obesos sin CCR). *Tejido adiposo.

PACIENTES OBESOS CON CCR		
VARIABLE	RQ <i>SIRT1</i> (media \pm EE)	RQ <i>SIRT6</i> (media \pm EE)
T. A.* omental	1,53 \pm 0,41	1,81 \pm 0,55
T. A.* subcutáneo	1,32 \pm 0,19	1,36 \pm 0,27

Tabla 22. Expresión relativa de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposo omental y subcutáneo en pacientes obesos con CCR (control: pacientes no obesos con CCR). *Tejido adiposo

PACIENTES OBESOS CON CCR		
VARIABLE	RQ <i>SIRT1</i> (media \pm EE)	RQ <i>SIRT6</i> (media \pm EE)
T. A.* omental	1,24 \pm 0,33	1,66 \pm 0,51
T. A.* subcutáneo	0,85 \pm 0,12	1,03 \pm 0,20

4. DISCUSIÓN

Los telómeros tienen un papel crucial en la estabilidad genómica y en el potencial replicativo de las células, estando su disfunción relacionada con procesos oncogénicos (18). Por ello, la caracterización del estatus telomérico en los cánceres humanos, entre ellos en el CCR, ha sido investigada en estudios previos, correlacionándose con los estadios de Dukes o determinando su utilidad como posible factor pronóstico

(19). En este trabajo se ha investigado el estatus telomérico en pacientes obesos con CCR, así como en grupos control, analizándose tejidos tumorales y no tumorales, y tejidos adiposos omental y subcutáneo, y su posible relación con variables clínico-patológicas y con el pronóstico clínico.

En la serie de pacientes con CCR, las muestras tumorales presentaron un acortamiento significativo en su LTM respecto a sus controles no tumorales. Resultados

similares han sido obtenidos por otros grupos previamente (20-22). En las primeras fases de la tumorigénesis, en la mayoría de cánceres, los telómeros acortados provocan inestabilidad cromosómica y alteraciones genéticas relacionadas con la transformación celular. Posteriormente, las células tumorales estabilizan sus telómeros, evitando así que una excesiva inestabilidad genómica les provoque la muerte (23).

En relación con las variables clínico-patológicas de los tumores, se detectó una tendencia hacia una LTMT menor en estadios A de Dukes que en tumores de estadios más avanzados, hecho coincidente con otras investigaciones publicadas que asocian telómeros tumorales más largos con estadios más avanzados y peor pronóstico clínico (19, 24).

Respecto al IMC, no se encontraron asociaciones con la LTMT o el ratio T/N, aunque la LTM no tumoral fue mayor en tumores de pacientes obesos o con sobrepeso. Sin embargo, es conocido que la obesidad está relacionada con inflamación y estrés oxidativo, episodios que, en principio, deberían provocar un acortamiento de los telómeros (25). Este hecho pone de manifiesto la necesidad de ahondar en la posible participación de la disfunción telomérica en la predisposición al desarrollo del tipo tumoral aquí investigado, llevando a cabo para ello el estudio en una población con un mayor número de casos.

La serie de tumores colorrectales considerada en este trabajo mostró una actividad telomerasa positiva en el 85% de las muestras. Este elevado porcentaje de actividad también se ha observado en anteriores trabajos (19, 26), puesto que en la mayoría de los tumores el mantenimiento de los telómeros se lleva a cabo por la reactivación de la telomerasa, evento crucial para la iniciación y supervivencia tumoral (2). Sin embargo, los datos obtenidos no son indicativos de la existencia de correlaciones entre la actividad de la enzima y la longitud de los telómeros, lo cual establece la necesidad de analizar con cierto detalle la función de las proteínas del complejo *sheltering*, especialmente aquellas que intervienen directamente facilitando o restringiendo el acceso de telomerasa a los extremos cromosómicos.

Nuestros resultados han permitido confirmar el valor del estatus telomérico como factor pronóstico en CCR, estableciéndose que aquellos pacientes con tumores con un acortamiento telomérico superior al 30% presentan un mejor pronóstico clínico. El papel pronóstico del estatus telomérico puede ser diferente dependiendo del tipo de tumor: en el CCR, el acortamiento de los telómeros parece tener un papel supresor tumoral ya que la disfunción telomérica activa las vías de senescencia y apoptosis (27); por el contrario, en otros tumores, como el cáncer de pulmón no microcítico, el acortamiento telomérico estaría relacionado con el incremento de la inestabilidad genómica (28).

En base a la importancia del estatus telomérico en el pronóstico de los pacientes con CCR, resulta crucial analizar el efecto que puedan tener moléculas relacionadas con la homeostasis telomérica, como son *SIRT1* y *SIRT6*.

Los datos del presente trabajo parecen indicar que el acortamiento significativo de los telómeros en cánceres colorrectales se asocia con mayores niveles de *SIRT1*. Además, los estudios de pronóstico mostraron que una reducción en la expresión de *SIRT1* disminuye la supervivencia de los pacientes. Estos resultados estarían en consonancia con investigaciones previas, que demuestran la implicación de *SIRT1* en la disminución de la proliferación celular (29). Otros trabajos han demostrado el posible papel oncogénico de *SIRT1* (30), mostrándose así el comportamiento dual que este gen tiene en el desarrollo del cáncer. En cuanto a *SIRT6*, también se ha descrito su papel dual en cáncer, pudiendo actuar como oncogen o como gen supresor tumoral (31, 32).

Otro punto de nuestro estudio es el análisis de la posible relación entre la obesidad y el CCR, para lo que se evaluó el estatus telomérico y la expresión de *SIRT1* y *SIRT6* en tejidos adiposos omental y subcutáneo. Los resultados obtenidos indicaron que, en pacientes obesos con CCR, ambos tipos de tejido adiposo tienen telómeros más acortados que en pacientes sin CCR. Los pacientes obesos con CCR tienen la actividad inmunitaria aumentada en la región tumoral, con respecto a los pacientes obesos sin cáncer, lo que genera mayores niveles de citoquinas y moléculas proinflamatorias que podrían provocar un estrés oxidativo que conduzca al acortamiento de los telómeros en los tejidos investigados (33). Sin embargo, son necesarias futuras investigaciones que ayuden a explicar estas observaciones.

Los resultados del trabajo indicaron asimismo que la actividad telomerasa es superior en tejido adiposo omental de pacientes obesos sin CCR que en el mismo tejido obtenido a partir de pacientes no obesos con CCR. También se detectó una mayor actividad en los tejidos adiposos omental y subcutáneo de pacientes obesos con CCR, respecto a pacientes obesos sin CCR. Esta observación estaría en consonancia con el párrafo anterior, ya que, en pacientes obesos con CCR, la inflamación y el estrés son superiores, incrementando la muerte celular. Como compensación a esta muerte, las células madre derivadas del tejido adiposo (ADSC en inglés) incrementarían su actividad regenerativa, para lo cual la actividad telomerasa resulta crucial (34).

Por último, la expresión de ambas sirtuinas mostró una tendencia a la sobreexpresión en pacientes obesos con CCR en comparación con los dos grupos control. Los niveles de sirtuinas, principalmente *SIRT1* y *SIRT6*, se ven reducidos en tejidos adiposos de pacientes obesos después de la pérdida de peso (35) y, como se ha indicado anteriormente, *SIRT1* y *SIRT6* tienen papeles muy controvertidos en el desarrollo del cáncer (29-32). Por ello, para poder determinar la posible función de estas moléculas en relación con el estatus telomérico, en obesidad y cáncer, sería necesario investigar un mayor número de casos y disponer de un nuevo grupo control integrado por pacientes no obesos y sin CCR.

5. CONCLUSIONES

Los tumores colorrectales acortan significativamente las secuencias teloméricas, con respecto a los tejidos no tumorales.

Los tumores colorrectales de estadio A de Dukes presentan los telómeros significativamente más cortos que los clasificados en estadios más avanzados (B-D de Dukes).

Considerando pacientes afectados de CCR, los telómeros de las células no tumorales de pacientes obesos o con sobrepeso son significativamente más largos que los de pacientes con normopeso.

Existe una clara tendencia hacia un pronóstico clínico más favorable en el grupo de pacientes con CCR, que presentan secuencias teloméricas tumorales acortadas significativamente.

En tumores colorrectales se detecta correlación entre la expresión génica de *SIRT1* y *SIRT6*.

Los tumores colorrectales con acortamiento telomérico significativo registran mayores niveles de expresión de *SIRT1*.

Los niveles de expresión disminuidos de *SIRT1* se asocian con pronóstico clínico desfavorable en CCR.

En tejido adiposo omental de pacientes obesos afectados de CCR, los telómeros presentan tamaños superiores que en el grupo control de individuos obesos sin CCR.

Considerando los dos grupos de sujetos control del presente trabajo, la actividad telomerasa se reactiva principalmente en el tejido adiposo omental de pacientes obesos con CCR.

6. LISTA DE ABREVIATURAS

ADP: Adenosin difosfato
ADSC: *Adipose Derived Stem Cells*
ALT: *Alternative Lengthening of Telomeres*
AUE: Agua Ultra Estéril
CCR: Cáncer Colorrectal
cDNA: *complementary DNA*
Ct: *Cycle threshold*
DDR: *DNA Damage Responsive*
DNA: *Deoxyribonucleic acid*
E: Eficiencia
ELISA: *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
GAPDH: Gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa
HCSC: Hospital Clínico San Carlos
hTERC: *human Telomerase RNA gen*
hTERT: *human Telomerase Reverse Transcriptase*
IMC: Índice de Masa Corporal
Kb: Kilobases
LT: Longitud Telomérica
LTM: Longitud telomérica media
LTMT: Longitud telomérica media tumoral
LTR: Longitud telomérica relativa
NAD: Nicotinamida Adenina Dinucleótido

ncRNA: *non-coding RNA*

NTP: *Nucleoside diphosphates*

O: Omental

OD: *Optical Density*

PCR: *Polymerase Chain Reaction*

POT1: *Protection Of Telomeres 1*

qRT-PCR: *quantitative Real Time Polymerase Chain Reaction*

RAP1: *Ras-related Protein 1*

Ratio T/N: Ratio tumoral/no tumoral

RNA: *Ribonucleic acid*

RPLPO: *gen Large Ribosome Protein*

RQ: *Relative Quantification*

S: Gen de copia única

SC: Subcutáneo

SIRT: Sirtuina

T: Secuencia telomérica

TEL: gen Telómeros

TERRA: *Telomeric Repeat-containing RNA*

TNM: *Primary tumor T, Nodal involvement N, distant Metastasis M*

TPE: *Telomere Position Effect*

TRF: *Telomere Restriction Fragment*

7. CONFLICTO DE INTERESES

No existe conflicto de intereses.

8. REFERENCIAS

1. Chan SRWL, Blackburn EH. Telomeres and telomerase. *R. Soc. Lond.* 2003; 359:109-121.
2. Jafri MA, Ansari SA, Alqahtani MH, Shay JW. Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies. *Genome Med.* 2016; 8(1): 1-18.
3. Samassekou O, Gadji M, Drouin R, Yan J. Sizing the ends: Normal length of human telomeres. *Ann Anat.* 2010; 192(5):284-291.
4. Ligner J, Cooper JP, Cech TR. Telomerase and DNA End Replication: No longer a Lagging Strand Problem? *Science.* 1995; 269(5230):1533-4.
5. Nordfjäll K, Eliasson M, Stegmayr B, Melander O, Nilsson P, Roos G. Telomere Length Is Associated With Obesity Parameters but With a Gender Difference. *Obesity.* 2008; 16 (12): 2582-2689.
6. Ungefroren H, Gieseler F, Flidner S, Lehnert H. Obesity and Cancer. *Horm Mol Biol Clin Investig.* 2015; 21(1):5-15.
7. Blasco MA. Telomeres and human disease: aging, cancer and beyond. *Nat Rev Genet.* 2005; 6:611-22.
8. Martínez AR, Kaul Z, Parvin JD, Groden J. Differential requirements for DNA repair proteins in immortalized cell lines using alternative lengthening of telomere mechanisms. *Genes Chromosomes Cancer,* 2017; 56:617-31.
9. Ogrunc M, d'Adda di Fagagna F. Never-ageing cellular

- senescence. *Eur J Cancer*. 2011; 47(11):1616-22.
10. Bosch-Presegué L, Vaquero A. The Dual role of Sirtuins in Cancer. *Genes Cancer*. 2011; 2(6):648-62.
 11. Yao H, Rahman I. Perspectives on translational and therapeutic aspects of SIRT1 in inflammaging and senescence. *Biochem Pharmacol*. 2012; 84:1332-9.
 12. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Sirtuins and disease: the road ahead. *Front Pharmacol*. 2012; 3(4):1-6.
 13. Lakowa N, Trieu N, Flehmig G, Lohmann T, Schön MR, Dietrich A, Zeplin PH, Langer S, Stumvoll M, Blüher M, Klötting N. Telomere length differences between subcutaneous and visceral adipose tissue in humans. *Biochem Biophys Res Commun*. 2015; 457(3):426-32.
 14. Blin N, Stafford DW. A general method for isolation of high molecular weight DNA from eukaryotes. *Nucleic Acids Res*. 1976; 3(9):2303-8.
 15. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001; 29(9):2002-7.
 16. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science*. 1994; 266(5193):2011-15.
 17. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987; 162(1):156-9.
 18. Bertorelle R, Rampazzo E, Pucciarelli S, Nitti D, De Rossi A. Telomeres, telomerase and colorectal cancer. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(8):1940-50.
 19. Fernández-Marcelo T, Sánchez-Pernaute A, Pascua I, De Juan C, Head J, Torres-García AJ, Iniesta P. Clinical relevance of telomere status and telomerase activity in colorectal cancer. *PLoS One*. 2016; 11(2):1-12.
 20. García-Aranda C1, de Juan C, Díaz-López A, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Díaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M, Iniesta P. Correlations of telomere length, telomerase activity, and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer*. 2006; 106(3).
 21. Haghghi MM, Aghagolzadeh P, Zadeh SM, Molaei M, Zali MR, Radpour R. Telomere shortening: a biological marker of sporadic colorectal cancer with normal expression of p53 and mismatch repair proteins. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2014; 18(4):236-44.
 22. Feng TB, Cai LM, Qian KQ, Qi CJ. Reduced telomere length in colorectal carcinomas. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012; 13(2):443-6.
 23. Zhao Z, Pan X, Liu L, Liu N. Telomere length maintenance, shortening, and lengthening. *J Cell Physiol*. 2014; 229(10):1323-29.
 24. Jia H, Wang Z. Telomere Length as a Prognostic Factor for Overall Survival in Colorectal Cancer Patients. *Cell Physiol Biochem*. 2016; 38(1):122-28.
 25. Wolkowitz OM, Mellon SH, Epel ES, Lin J, Dhabhar FS, Su Y, Reus VI, Rosser R, Burke HM, Kupferman E, Compagnone M, Nelson JC, Blackburn EH. Leukocyte telomere length in major depression: correlations with chronicity, inflammation and oxidative stress--preliminary findings. *PLoS One*. 2011; 6(3):e17837.
 26. Sanz-Casla MT, Vidaurreta M, Sánchez-Rueda D, Maestro ML, Arroyo M, Cerdán FJ. Telomerase activity as a prognostic factor in colorectal cancer. *Onkologie*. 2005; 28(11): 553-7.
 27. Fernández-Marcelo T, Morán A, de Juan C, Pascua I, Head J, Gómez A, Hernando F, López-Asenjo JA, Hernández S, Sánchez-Pernaute A, Torres AJ, Benito M, Iniesta P. Differential expression of senescence and cell death factors in non-small cell lung and colorectal tumors showing telomere attrition. *Oncology*. 2012; 82(3):153-64.
 28. Fernández-Marcelo T, Gómez A, Pascua I, de Juan C, Head J, Hernando F, Jarabo JR, Calatayud J, Torres-García AJ, Iniesta P. Telomere length and telomerase activity in non-small cell lung cancer prognosis: clinical usefulness of a specific telomere status. *J Exp Clin Cancer Res*. 2015; 34(1):1-7.
 29. Kabra N, Li Z, Chen L, Li B, Zhang X, Wang C, Yeatman T, Coppola D, Chen J. SirT1 is an inhibitor of proliferation and tumor formation in colon cancer. *J Biol Chem*. 2009; 284(27):18210-17.
 30. Grbesa I, Pajares MJ, Martínez-Terroba E, Agorreta J, Mikecin AM, Larráyoiz M, Idoate MA, Gall-Troselj K, Pio R, Montuenga LM. Expression of sirtuin 1 and 2 is associated with poor prognosis in non-small cell lung cancer patients. *PLoS One*. 2015; 10(4):e0124670.
 31. Feng XX, Luo J, Liu M, Yan W, Zhou ZZ, Xia YJ, Tu W, Li PY, Feng ZH, Tian DA. Sirtuin 6 promotes transforming growth factor- β 1/H2O2/HOCl-mediated enhancement of hepatocellular carcinoma cell tumorigenicity by suppressing cellular senescence. *Cancer Sci*. 2015; 106(5): 559-66.
 32. Sebastián C, Zwaans BM, Silberman DM, Gymrek M, Goren A, Zhong L, Ram O, Truelove J, Guimaraes AR, Toiber D, Cosentino C, Greenson JK, MacDonald AI, McGlynn L, Maxwell F, Edwards J, Giacosa S, Guccione E, Weissleder R, Bernstein BE, Regev A, Shiels PG, Lombard DB, Mostoslavsky R. The histone deacetylase SIRT6 is a tumor suppressor that controls cancer metabolism. *Cell*. 2012; 151(6):1185-9.
 33. Lippitz BE. Cytokine patterns in patients with cancer: a systematic review. *Lancet Oncol*. 2013; 14(6):218-28.
 34. Blázquez-Martínez A, Chiesa M, Arnalich F, Fernández-Delgado J, Nistal M, De Miguel MP. c-Kit identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells

Telomere function and sirtuins 1 and 6 in colorectal cancer from obese and non-obese patients. Clinical correlations

in adipose tissue with higher telomerase expression and differentiation potential. Differentiation. 2014; 87(3-4): 147-60.

35. Moschen AR, Weiser V, Gerner RR, Bichler A, Enrich B, Moser P, Ebenbichler CF, Kaser S, Tilg H. Adipose tissue and liver expression of SIRT1, 3, and 6 increase after extensive weight loss in morbid obesity. J Hepatol. 2013; 59(6):1315-22.