

## LOS TELÓMEROS Y EL ORIGEN DE LA ENFERMEDAD (\*)

*María A. Blasco*

*Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas (CNIO)*

### RESUMEN

En el presente texto se recoge la descripción de la trayectoria científica de María A. Blasco, Directora del Centro Nacional de Investigaciones Oncológicas e investigadora española de prestigio internacional, contada por la propia autora, a través de un conjunto de breves apuntes o hitos que han ido jalonando esa carrera científica, enormemente prolífica y cargada de interés científico y social, la cual comenzó después de finalizar su licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Madrid, en cuyo Centro de Biología Molecular inició su andadura científica de la mano de Margarita Salas, prestigiosa científica de reconocimiento mundial y a quien entrevistó *Encuentros Multidisciplinares* en el año 2000, entrevista publicada en el Vol. II n° 1 de esta revista. Aparte de la importancia de su contenido, publicamos este texto como un ejemplo que puede servir como referencia para jóvenes investigadores o universitarios que están planteándose iniciar una carrera investigadora.

La autora describe y resume su carrera científica (en primera persona) en los siguientes veintiocho apuntes:

### TESIS

1) Tras finalizar mi licenciatura en Ciencias Biológicas en la Universidad Autónoma de Madrid (UAM) en 1989, a la hora de realizar una tesis doctoral primé poder estar en un buen laboratorio frente a trabajar en el tema que me gustaba (cáncer y envejecimiento). Con Margarita Salas, en el Centro de Biología Molecular (CBM) (CSIC-UAM) en Madrid, investigué el problema de la replicación de los extremos de un genoma viral. Sin saberlo, estaba trabajando en los «telómeros» procariontas.

### POSDOCTORADO

2) Cuando me planteé mi trabajo posdoctoral no sabía nada acerca de los telómeros, no fue un asunto que me hubiesen impartido durante la carrera, y además era un campo «poco popular». Los temas en boga eran entonces los supresores tumorales (p53 en cáncer), el ciclo celular y la biología del desarrollo.

3) Sin embargo, resultaba que los telómeros eran el mecanismo por el cual los organismos eucariotas resolvían el denominado problema de la replicación terminal (de los extremos), y además se había postulado en 1990 que los telómeros podrían desempeñar una función determinante en el envejecimiento y el cáncer.

---

(\*) Este artículo recoge la presentación que la autora llevó a cabo de su carrera científica en el Foro de Encuentros, en Madrid, en Febrero de 2016.

4) Un colega del CBM, Crisanto Gutiérrez, me habló de Carol Greider, una mujer joven y enérgica que había encontrado, junto con Elizabeth Blackburn, la actividad telomerasa en el organismo modelo *Tetrahymena* y estaba estudiando los telómeros. Me decanté por incorporarme al laboratorio de Carol Greider en vez de al de Elizabeth Blackburn porque el de Carol se encontraba en el Cold Spring Harbor Laboratory (CSHL), en Nueva York (Estados Unidos), y sabía por Margarita Salas, que había hecho un curso en el CSHL, que dicha institución era la meca de la biología molecular. Además, Jim Watson, codescubridor de la estructura en doble hélice del ADN, era el director del CSHL.

5) En la fecha en la que me uní a su grupo, en 1993, Carol era muy joven, treinta y pocos años. Había pasado directamente de realizar su tesis doctoral a dirigir un grupo joven en el CSHL porque Jim Watson creía en la importancia de los telómeros para la enfermedad y porque Barbara McClintock, que había descubierto los telómeros (en el maíz) en los años cuarenta del siglo xx, había realizado una parte de su carrera en el CSHL, donde trabajó hasta su muerte.

6) Solicité la beca posdoctoral de la European Molecular Biology Organization (EMBO) para ir a trabajar con Carol; esta beca era una de las más prestigiosas y de mayor dotación económica. Durante el proceso de selección eran entrevistados por un científico europeo. Mi entrevista la realicé con una investigadora alemana que trabajaba en hongos. Me dijo que había hecho una mala elección, que el campo de la telomerasa era aún muy incipiente, que Carol tenía todavía un grupo de investigación poco desarrollado, que ni tan siquiera se disponía de los genes clonados, y que, por lo tanto, mi proyecto era muy arriesgado y debería haber elegido trabajar en alguna materia que estuviese más avanzada, en algo más parecido a lo que había realizado con Margarita Salas. Sobra decir que encontré tales opiniones muy cortas de miras y enervantes. Así que la beca de la EMBO no me fue concedida, pero este revés no me desanimó lo más mínimo en mi determinación de ir a trabajar en la telomerasa con Carol. Años después fui galardonada con la Medalla de Oro de la EMBO, y tuve ocasión de referir la anterior historia durante la ceremonia de entrega.

7) En una biografía de Elizabeth Blackburn se recogen sus propias quejas por la falta de atención que recibió por parte de la comunidad científica el descubrimiento de la actividad telomerasa. Todos estaban interesados en el ciclo celular como claves del cáncer y en los genes que protegían del cáncer. Hubo que esperar hasta 1997 para que los *big names* del cáncer, David Beach, Robert Winberg y Ronald DePinho, se interesasen por la telomerasa y los telómeros.

8) Solicité la beca posdoctoral del ministerio de turno. Esta solicitud estuvo a punto de ser denegada. Un colega me informó de que fue rechazada en primera instancia por los mismos motivos que la rechazó la EMBO pero, afortunadamente, él tuvo ocasión de aclarar que el grupo de acogida era un grupo muy bueno y que trabajaba en una disciplina muy novedosa y con mucho futuro. Me concedieron, pues, la beca para ir al CSHL.

9) Una vez en el CSHL, mi experiencia previa en biología molecular fue de gran importancia, ya que Carol carecía de ella en técnicas de clonaje y de ADN recombinante. Yo compré la primera enzima de restricción en su laboratorio. Mi proyecto de investigación era sumamente ambicioso. Tenía que clonar el gen de la telomerasa de ratón (solo estaba clonado el de *Tetrahymena*) y generar un ratón deficiente en telomerasa. Como yo ignoraba por completo cómo generar ratones *knock out* (KO), lo primero que hice fue acudir a un curso de embriología de ratón, donde aprendí cómo se generaban los ratones modificados genéticamente.

10) Clonar el gen de la telomerasa de ratón resultó ser muy difícil, ya que carecía de homología alguna con el de *Tetrahymena*. Corría el año 1994, y al final aislamos, en colaboración con la empresa Geron, un ARN que podría ser el gen de la telomerasa. Ese mismo año Geron también describió que la actividad telomerasa se encontraba aumentada en las células cancerosas. Con esta secuencia del putativo ARN de la telomerasa, aislamos el gen del ratón, y analizamos sus niveles de expresión en las células normales y en las cancerosas. Al observar que estaba altamente expresado en las células tumorales pero no en las normales <sup>1</sup>, tuve la corazonada de que habíamos clonado el gen correcto.

Además, detecté que el gen de la telomerasa se inhibía en tejidos adultos, al igual que la actividad. Todo indicaba que mi corazonada era correcta y que por fin teníamos el primer gen de la telomerasa de mamíferos. Denominamos al gen TERC (*telomerasa RNA component*)<sup>2</sup>. Me puse de inmediato a generar el ratón KO. Corría prisa, puesto que, si el grupo de Carol no conseguía pronto el ratón, Geron lo desarrollaría también.

11) Generé el vector para deleccionar el gen en la línea germinal en un tiempo récord, pero necesitábamos el equipamiento adecuado de microinyección de embriones para generar los ratones. El CSHL carecía de la infraestructura necesaria. Sucedió entonces que un investigador posdoctoral que trabajaba en el Albert Einstein School of Medicine con un tal Ronald DePinho, y que era amigo de Manuel Serrano, convenció a Manuel para que generase, en colaboración con Ron, el ratón KO de uno de los genes que Manuel Serrano había aislado en el laboratorio de David Beach en el CSHL, el gen p16. Manuel generó el KO de p16 en colaboración con Han-Woong Lee, un estudiante de tesis coreano que trabajaba en Ron.

12) Convencí entonces a Carol para entablar una colaboración con DePinho, ya que esta era la manera más rápida para obtener nuestro ratón KO y teníamos a Geron pisándonos los talones. Nos desplazamos un día a la Albert Einstein School of Medicine y convencimos a DePinho, que desconocía qué era la telomerasa, para que hiciésemos en colaboración los ratones KO para el gen candidato a ser el de la telomerasa.

13) Entre Han-Woong Lee y yo generamos un ratón que carecía de ese gen. El día más emocionante fue cuando observé por vez primera que los fibroblastos derivados de embriones sin este gen no tenía actividad telomerasa. Lo siguiente que hicimos fue reintroducir el gen que habíamos aislado en esas células sin actividad telomerasa y observamos que recuperaban dicha actividad: disponíamos por fin de un ratón que nos iba a ayudar a entender el papel de la telomerasa en cáncer y envejecimiento. Este trabajo se realizó entre 1995 y 1996.

14) Cuando Carol le contó emocionado los resultados anteriores a Titia de Lange, hicieron una apuesta. Titia de Lange era una colega de la Universidad Rockefeller que acababa de identificar la primera proteína que se unía específicamente a las repeticiones teloméricas, la llamada TRF<sub>1</sub> (*telomere repeat binding factor 1*), el primer componente aislado de un complejo de seis proteínas, hoy en día conocido como shelterina. Titia opinaba que la telomerasa no sería necesaria ni para la vida ni para el sexo -refiriéndose a la fertilidad (“*no for life nor for sex*”)-, mientras que Carol pensaba que podría ser esencial para la vida. La apuesta consistía en una caja de cerveza. Ganó Titia, al menos en parte. Nos encontramos con que los ratones KO para la telomerasa eran viables y que no presentaban grandes patologías. Durante un seminario que impartí en el CSHL para presentar la generación del ratón KO, Jim Watson exclamó: “¡Pero esto es un desastre!”, refiriéndose a que su apuesta por la importancia de los telómeros entonces había resultado errónea. Pero era solo una cuestión de tiempo. En cierto modo, la viabilidad de los ratones era esperable, ya que mientras los telómeros fuesen suficientemente largos quizá no haría falta telomerasa para la vida. Para forzar que fueran cortos creamos generaciones crecientes de los ratones sin telomerasa. Tuvimos que llegar hasta la sexta generación para observar los fenotipos de envejecimiento en ratones muy jóvenes<sup>3</sup>. En mi grupo observamos que si introducíamos la deleción en un fondo genético con telómeros más cortos, entonces tras el transcurso de solo tres generaciones ya se alcanzaba la longitud telomérica crítica y se manifestaban los fenotipos de envejecimiento<sup>4</sup>. Ahora sabemos que incluso en la primera generación de ratones sin telomerasa se produce un envejecimiento acelerado que conduce a unas vidas media y máxima más cortas de lo normal.

## **GRUPO DE INVESTIGACIÓN PROPIO**

15) Regresé a España en 1997 al Centro Nacional de Biotecnología (CNB) del CSIC, en Madrid, donde inicié mi grupo de investigación. Mi primer trabajo una vez establecida allí fue completar lo que quedaba pendiente para poder publicar la descripción del ratón KO para la telomerasa.

Un punto crucial fue poder determinar si los telómeros se acordaban y, en su caso, si dicho acortamiento resultaba en la aparición de aberraciones cromosómicas. Esto era clave para demostrar si la telomerasa era la enzima que mantenía los telómeros en mamíferos (hasta entonces solo se había demostrado en organismos unicelulares), y si el acortamiento de los telómeros producía aberraciones cromosómicas. Comencé una colaboración con Peter Lansdorp, que había desarrollado una técnica para medir telómeros basada en FISH (hibridación de fluorescencia sin situ), el llamado *quantitative telomere* FISH o Q-FISH, para llevar a cabo los análisis anteriores. Los resultados fueron verdaderamente espectaculares y conseguimos por primera vez demostrar que los telómeros se acortaban de manera acelerada en estos ratones sin telomerasa y, por tanto, que la telomerasa era la actividad enzimática responsable del mantenimiento de los telómeros en mamíferos. Carol aceptó incluir los datos en el artículo. Fue mi primera publicación desde España en la revista *Cell*<sup>5</sup>

## **TERT**

16) En 1997 se publicó también por primera vez el aislamiento del gen del componente proteína de la telomerasa de humanos, TERT, por los grupos de Bob Weinberg y Tom Cech. En 1998. Desde Madrid, publicamos el aislamiento del gen del componente proteico de la telomerasa de ratón.

17) En el año 2000 publicamos un trabajo muy esclarecedor acerca de cuál es el papel de los telómeros en cáncer<sup>6</sup>. Demostramos por vez primera que los telómeros cortos actuaban como potentes mecanismos supresores del cáncer, de tal modo que los ratones sin telomerasa y con telómeros cortos tenían una menor tasa de cáncer. Esta fue la primera validación en modelos animales de que la telomerasa podría ser una buena diana contra la cual diseñar fármacos contra el cáncer.

18) En 2001 publicamos la generación del primer ratón transgénico para TERT. Este modelo de ratón nos permitió demostrar que la expresión de telomerasa de manera constitutiva en ratones adultos podría favorecer la aparición del cáncer con el envejecimiento, explicando por qué la telomerasa se reprime en los tejidos adultos tras el nacimiento.

19) También en 2001, y en paralelo con el grupo de Carol, publicamos un trabajo seminal<sup>7</sup> para lo que después ha sido uno de los temas más característicos y distintivos de mi grupo de investigación. Demostramos mediante la activación de manera genética de la telomerasa que el rescate de los telómeros cortos en un ratón sin telomerasa, y que iba a presentar patologías asociadas al envejecimiento, evitaba el desarrollo de dichas patologías de envejecimiento (infertilidad, fallo medular, atrofia intestinal o anemia) y confería, además, una supervivencia normal a los ratones.

## **BIOLOGÍA DE LOS TELÓMEROS**

20) En los años posteriores, mi grupo se diversificó para abarcar el estudio de distintos aspectos de la biología de los telómeros, entre los cuales están la interacción entre la maquinaria de reparación del ADN y los telómeros. Demostramos, por otra parte, que los telómeros cortos interferían con la reparación correcta de las roturas en el ADN, aumentando la radiosensibilidad. Asimismo, demostramos también que ciertas proteínas implicadas en la reparación, Ku o DNAPK, entre otras, desempeñaban una función importante en la protección de los telómeros. Ahora es algo aceptado pensar que los telómeros cortos o desprotegidos son equivalentes a una rotura en el ADN que no se puede reparar, un daño persistente.

21) Mi grupo fue también pionero en caracterizar la naturaleza de la cromatina de los telómeros de mamíferos y, en concreto, su naturaleza heterocromática, así como en la identificación de las actividades de modificación de la cromatina importantes para el establecimiento de la cromatina telomérica. Entre ellas identificamos las HMTasas, las DNMTasas o DICER<sup>8-12</sup>. Todos estos trabajos condujeron a un modelo según el cual los telómeros, cuando perdían su naturaleza heterocromática, eran alargados con mayor facilidad, bien por la acción de la telomerasa o bien por los mecanismos alternativos de recombinación.

22) La comprensión de la naturaleza y regulación de la cromatina de los telómeros nos llevó a uno de los descubrimientos más sorprendentes. Observamos que los telómeros se transcribían, generando unos ARN largos y no codificantes que, además, se unían a los telómeros de prácticamente todos los cromosomas <sup>13</sup>. Más recientemente, hemos identificado las proteínas que se unen a estos ARN, llamados TelRNA o TERRA <sup>14</sup>, lo cual a su vez nos ha permitido su enriquecimiento y lograr la identificación, mediante técnicas de secuenciación masiva, de su sitio de origen <sup>15</sup>. La identificación del locus de TERRA nos permitirá finalmente elucidar su función en el desarrollo normal y en distintas patologías, a través de la generación de ratones modificados genéticamente.

## **LAS PROTEÍNAS DE UNIÓN A LOS TELÓMEROS Y SU IMPORTANCIA EN CÁNCER Y ENVEJECIMIENTO**

23) A los telómeros se une un complejo conocido con el nombre de shelterina formado por seis proteínas, que desempeñan diversos papeles en la protección de los telómeros y en la regulación de la telomerasa. Mi grupo ha generado durante los últimos años una serie de modelos de ratón de ganancia o de pérdida condicional de función para todos los componentes de shelterina con el fin de estudiar su importancia en cáncer y envejecimiento.

Así, mi grupo empezó generando el primer ratón transgénico con niveles elevados de la shelterina TRF<sub>2</sub> <sup>16</sup> y demostró que esta proteína telomérica tenía una función importante en cáncer y envejecimiento, a la vez que desveló la existencia de una interacción genética entre TRF<sub>2</sub> y la ruta NER de reparación de escisión de nucleótidos <sup>17</sup>. Posteriormente, mi grupo ha generado modelos murinos de delección condicional de las shelterinas TRF<sub>1</sub>, TRF<sub>2</sub>, RAP<sub>1</sub>, TPP<sub>1</sub>, y TIN<sub>2</sub>.

Nuestros estudios funcionales de los modelos con expresión alterada de las shelterinas TRF<sub>1</sub> <sup>18</sup> y TPP<sub>1</sub> <sup>19</sup> nos permitieron descubrir que estas dos shelterinas son responsables del envejecimiento prematuro y del riesgo aumentado de cáncer, lo que constituye la demostración por vez primera de que una proteína telomérica puede actuar simultáneamente como un supervisor de tumores y como un agente antienvjecimiento.

Más recientemente, y por completo inesperado, hemos hallado que la shelterina RAP<sub>1</sub>, además de unirse a las repeticiones teloméricas, también se une a sitios extrateloméricos y regula la expresión génica <sup>20</sup>, lo que proporciona una conexión novel entre los telómeros y los programas de expresión génica. Más aún, descubrimos que RAP<sub>1</sub> desempeña una función muy relevante en el metabolismo, ya que regula la expresión del eje PGC<sub>1 $\alpha$</sub> /PPAR $\alpha$  y de esta manera protege frente al síndrome metabólico y la obesidad gracias a su papel extratelomérico en la regulación de la expresión génica <sup>21</sup>.

En un estudio publicado el año pasado comunicamos la identificación de POT<sub>1</sub> como la primera proteína telomérica en estar mutada en el cáncer humano, favoreciendo la adquisición de los rasgos de malignidad en las células de la leucemia linfocítica crónica <sup>22</sup>, como una mayor longitud telomérica y una mayor inestabilidad cromosómica.

Finalmente, la generación de modelos de ratón para la delección condicional de shelterinas nos ha permitido también disponer de modelos para los llamados “síndromes teloméricos”, que son unas enfermedades humanas caracterizadas por la presencia de defectos teloméricos graves debidos a mutaciones en la telomerasa o alguna de las shelterinas, entre los que se encuentran la anemia aplásica <sup>23</sup> y la fibrosis pulmonar idiopática. En particular, hemos generado un modelo murino de anemia aplásica mediante la delección específica de TRF<sub>1</sub> en la médula ósea. Los ratones cuya médula ósea carece de TRF<sub>1</sub> desarrollan anemia aplásica en el transcurso de unas pocas semanas, recapitulando fidedignamente la enfermedad humana, incluyendo el acortamiento telomérico extremo <sup>23</sup>. Este modelo será de gran utilidad en los estudios preclínicos de estrategias de activación de la telomerasa. Por último, los modelos de pérdida de función condicional y específica de tejido de TRF<sub>1</sub> nos han llevado al diseño de fármacos contra TRF<sub>1</sub> que son eficaces para frenar el crecimiento de

los cánceres de pulmón. Se trata de la primera vez que se han desarrollado pequeñas moléculas que tienen como objetivo las proteínas teloméricas, ya que hasta ahora solo se habían desarrollado potenciales fármacos contra la telomerasa.

## **CONSECUENCIAS DE LOS TELÓMEROS CORTOS**

24) Uno de los objetivos principales de mi grupo continuó siendo entender cómo los telómeros cortos provocaban patologías asociadas al envejecimiento para así poder retrasar el envejecimiento y con ello la enfermedad. Fuimos pioneros en explorar si los telómeros cortos afectaban a la función de las llamadas células madre adultas, que son las que regeneran los tejidos para así mantener el buen estado de forma del organismo. Aunque colaboramos con distintos grupos en el estudio de distintos compartimentos de células madre en el contexto de la presencia de telómeros cortos, sin duda el trabajo más esclarecedor fue aquel en el que descubrimos que la presencia de telómeros cortos en los compartimentos de células madre de la piel disminuían la capacidad de las células madre de responder ante estímulos regenerativos<sup>24</sup>. Ese defecto anticipaba el hecho de que los telómeros cortos conllevaban un mayor envejecimiento y una menor tasa de cáncer. Observamos además que p53 era una proteína esencial en la prevención de que las células con telómeros cortos se activaran para regenerar tejidos, algo que sin duda es un mecanismo para garantizar que los tejidos regenerados estén libres de daño y, por lo tanto, puedan ser menos propensos a desarrollar un cáncer. En este momento vivimos claramente lo que ya habíamos intuido en 2001 con el trabajo de la reactivación de telomerasa y la prevención de las patologías asociadas a telómeros cortos en ratones<sup>7</sup>: si fuéramos capaces de alargar los telómeros de estos compartimentos de células madre, entonces deberíamos de ser capaces de alargar el tiempo de vida sin enfermedad y, por ello, también la longevidad.

## **DESARROLLO DE LAS TÉCNICAS PARA MEDIR TELÓMEROS: CUANDO LA TECNOLOGÍA ES NECESARIA PARA AVANZAR EN EL CONOCIMIENTO**

25) Desde 1997, fecha en la que colaboramos con el grupo de Peter Lansdorp para utilizar su tecnología de FISH cuantitativo para poder observar y cuantificar cambios en la longitud de los telómeros del ratón sin telomerasa, mi grupo ha tenido como uno de sus objetivos poder adaptar esta tecnología, que es farragosa y compleja, ya que implica la generación de metafases, y por lo tanto el cultivo in vitro de las células, para poder usarla de una manera rápida, masiva y precisa, tanto en muestras de sangre circulante como en cortes de tejidos, y sin necesidad de tener que cultivar las células. Este tipo de muestras biológicas son las que de hecho suelen estar disponibles en los bancos de sangre o de tejidos. Primero desarrollamos el que denominamos *high throughput QFISH* en muestras de sangre<sup>25</sup> que permite la determinación de la abundancia de telómeros cortos en muchas muestras simultáneas y de manera rápida. Esta tecnología se licenció en 2010 a una nueva compañía, salida del CNIO, y llamada Life Length. La creación de Life Length fue posible gracias al apoyo del Programa de Transferencia de Tecnología de la Fundación Botín, que creyó en mis proyectos y en su posible interés comercial. Desde 2010, la Fundación Botín me acompaña en la tarea de acelerar el proceso desde los descubrimientos científicos básicos a productos con interés comercial y posible uso en el diagnóstico y tratamiento de enfermedades. En 2014, Life Length opera en más de treinta países de todo el mundo comercializando esta tecnología como una técnica de diagnóstico de presencia de telómeros de longitud más corta de lo normal, algo que puede resultar de utilidad en la medicina preventiva y en el diagnóstico precoz de enfermedades como el cáncer o la enfermedad cardiovascular. En mi grupo continuamos estudiando la importancia de la longitud de los telómeros como un biomarcador con valor pronóstico para distintas enfermedades. Por ejemplo, colaboramos con el Centro Nacional de Investigaciones Cardiovasculares (CNIC) en el contexto del estudio PESA.

Posteriormente, adaptamos el mismo concepto, el de detectar telómeros individuales en cada célula, para poder detectar en cada célula de un tejido, generando mapas de longitud telomérica. Esta tecnología la denominamos *telomapping*<sup>26</sup> y está sujeta a una patente concedida en Estados Unidos. Gracias al *telomapping* hemos podido descubrir que los compartimentos de las células madre tienen

telómeros más largos que los compartimentos de células diferenciadas, lo cual nos ha permitido identificar, fundamentalmente en colaboración con otros grupos de investigación, nuevas células madre adultas que hasta ahora eran desconocidas.

La técnica de *telomapping* permite también el análisis en biopsias de tejido normal o patológico (tumores, por ejemplo). Esto puede ser de gran utilidad para determinar el efecto que distintos tratamientos puedan tener en la longitud telomérica.

## LA TELOMERASA Y LA PLURIPOTENCIA

26) Uno de los hitos recientes de la biomedicina fue la reprogramación por Shinya Yamanaka de células diferenciadas a células pluripotentes, que son las células capaces de formar cualquier tipo celular o incluso un organismo entero, y que normalmente solo existen brevemente en los estadios tempranos del desarrollo embrionario, un momento en el que también conviven con niveles de telomerasa muy altos. Esto nos llevó a estudiar qué ocurría con los telómeros y la telomerasa durante el proceso de reprogramación. ¿Se alargaría de manera mágica en un tiempo récord? Si así fuese, ¿nos podrían desvelar nuevas maneras de alargar los telómeros y conseguir así células y tejidos más jóvenes y longevos?, ¿nos podrían desvelar qué genes o actividades son necesarias para este proceso de rejuvenecimiento de los telómeros? Observamos que los telómeros se alargaban espectacularmente cuando la célula adulta diferenciada se convertía en una célula pluripotente<sup>27</sup> y que este alargamiento era necesario para la buena calidad de las células pluripotentes resultantes y era ejecutado por la telomerasa<sup>28</sup>, y requería proteínas que eran necesarias para que la telomerasa accediera a los telómeros, como la proteína TTP<sub>1</sub><sup>19</sup>. Curiosamente, los telómeros más largos de las células pluripotentes continuaban creciendo conforme estas se dividían hasta convertirse en lo que denominamos telómeros “hiperlargos”. Observamos que lo anterior se debía a que la cromatina de los telómeros de las células pluripotentes permitía que la telomerasa fabricara más y más telómeros hasta alcanzar longitudes muy largas. Este fenómeno de telómeros “hiperlargos” ocurría también cuando se cultivan in vitro las células pluripotentes naturales derivadas del blastocito y lo estamos utilizando para intentar generar ratones con telómeros “hiperlargos” que quizá sean capaces de vivir más que los que tienen los telómeros con la longitud normal de la especie.

Hemos observado recientemente que una de las proteínas protectoras de los telómeros, o shelterinas, la llamada TRF<sub>1</sub>, es inducida por el factor de reprogramación Oct<sub>4</sub> a niveles de expresión muy altos en las células pluripotentes, y que es de hecho un excelente marcador para seleccionar aquellas células IPS de mejor calidad<sup>29</sup>.

## LA ACTIVACIÓN DE LA TELOMERASA Y LA LONGEVIDAD

27) Una de las aportaciones que considero sin duda más importante de entre las realizadas por mi grupo, tras la generación y análisis de los ratones carentes de telomerasa, es la demostración de que la telomerasa es suficiente para alargar la juventud, retrasar la aparición de enfermedades y aumentar la longevidad. Por un lado, nuestro grupo generó unos ratones transgénicos que gozaban de una resistencia al cáncer aumentada (portan copias extra de los genes supresores de tumores p53, p16 y p16ARF) y que sobreexpresaban de forma constitutiva TERT, el componente proteico de la telomerasa. Estos ratones triplemente transgénicos presentaban un mejor estado de forma del organismo, un retraso sistémico en el envejecimiento y una longevidad prolongada<sup>30</sup>. Este trabajo demostró por vez primera los efectos antienvjecimiento de la telomerasa. Estudios posteriores de mi grupo han resaltado el potencial de las terapias antienvjecimiento basadas en la telomerasa y han arrojado luz sobre la implicación del acortamiento telomérico en el envejecimiento biológico.

Así, observamos que la administración dietética en ratones de un compuesto natural activador de la telomerasa producía un alargamiento de los telómeros cortos e incrementaba el periodo de vida de los ratones adultos y viejos sin incrementar la incidencia de cáncer. También mostramos que la terapia génica con telomerasa en ratones adultos y en ratones viejos conseguía unos efectos

marcadamente beneficios en su salud y estado de forma, entre los que se incluyen la sensibilidad a la glucosa, la osteoporosis, la coordinación neuromuscular y otros biomarcadores de envejecimiento, sin observarse un aumento en la incidencia de cáncer <sup>31</sup>. Estos ratones sometidos a terapia génica con telomerasa experimentaron un aumento en su longevidad. Los efectos beneficiosos anteriores no se observan cuando la terapia se realiza con TERT catalíticamente inactiva, lo que demuestra que, para que se produzcan, se requiere la telomerasa. Los resultados obtenidos con nuestra terapia génica basada en la telomerasa constituyen una prueba de principio de que el tratamiento de ratones adultos con la telomerasa es suficiente para retrasar las patologías asociadas a la edad y extender la longevidad de los ratones sin incurrir en un aumento de la incidencia de cáncer.

En humanos y ratones con un sistema de mantenimiento telomérico defectuoso, los telómeros aberrantemente cortos tienen una longevidad disminuida. La variación interindividual en la longitud telomérica en humanos y en ratones es elevada, aunque se desconocía si esto se asocia al potencial de vida. Para averiguarlo, nuestro grupo realizó un estudio de la longitud telomérica a lo largo de la vida de ratones silvestres y transgénicos. Observamos que los telómeros murinos se acortan cien veces más rápido que los humanos, y que es la tasa de aumento en el porcentaje de telómeros cortos, más que la tasa mensual de acortamiento telomérico, la que es un factor de predicción significativo del periodo de vida en las dos cohortes de ratones, y que aquellos individuos que exhibían una mayor tasa de aumento en el número de telómeros cortos eran también los que vivían menos. Estos hallazgos demostraron que los telómeros cortos tienen un impacto directo en la longevidad de los mamíferos.

En un intento por mejorar nuestra comprensión de los mecanismos por los cuales se produce el envejecimiento, hemos determinado el perfil metabólico en suero de un número de ratones con diferentes fondos genéticos y edades. Hemos definido así una firma metabólica robusta y un sistema de puntuación metabólica que predice de manera ajustada y de confianza la edad de los ratones silvestres. En el caso de los ratones deficientes de telomerasa, que tienen una vida media acortada, la puntuación metabólica predice una edad mayor que la esperada. En los ratones que sobreexpresan telomerasa, la puntuación metabólica corresponde a edades menores de lo esperado. La reactivación tardía en edad adulta mediante la aplicación de terapia génica basada en telomerasa convertía significativamente el perfil metabólico de los ratones viejos en perfiles característicos de ratones más jóvenes, lo que vuelve a confirmar el papel anti-envejecimiento de la telomerasa. La firma metabólica asociada al envejecimiento natural de los ratones predice el envejecimiento producido por el acortamiento telomérico, lo que sugiere que el envejecimiento natural en los ratones está producido en parte por la presencia de telómeros cortos.

He participado recientemente en la propuesta de definición de cuáles son los sellos de marca que representan los denominadores comunes de envejecimiento en diferentes organismos <sup>32</sup>. En dicho estudio se ha considerado que para que una determinada característica/actividad constituya un sello de marca del envejecimiento ha de cumplir con los tres criterios siguientes: se manifiesta durante el proceso normal de envejecimiento, su empeoramiento experimental debería acelerar el envejecimiento y su mejoría experimental retrasar el proceso de envejecimiento y, por lo tanto, aumentar el periodo de vida sano (libre de enfermedad). El acortamiento progresivo de los telómeros con el aumento de la edad es una de las nueve marcas de sello del envejecimiento. La atrición telomérica con la edad cumple con los tres requisitos requeridos para adquirir tal consideración: es un fenómeno que ocurre durante el envejecimiento fisiológico en los mamíferos, la disfuncionalidad telomérica patológica acelera el envejecimiento en ratones y humanos y la estimulación experimental de la telomerasa retrasa el envejecimiento. Mi grupo ha contribuido decisivamente a la demostración de todos y cada uno de estos tres requisitos, haciendo que el acortamiento telomérico sea una de las rutas moleculares del envejecimiento mejor caracterizadas y con mayor evidencia genética de que modulan el *health span* o tiempo de vida sin enfermedad.



## LA ACTIVACIÓN DE LA TELOMERASA Y LAS ENFERMEDADES

28) El acortamiento telomérico asociado al envejecimiento es uno de los principales factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular (ECV), tanto en humanos como en ratones. Los ratones que portan telómeros excesivamente cortos debido a la deficiencia en telomerasa desarrollan cardiomiopatía caracterizada por un aumento de la muerte de cardiomiocitos e hipertrofia celular, concomitante con una dilatación ventricular, adelgazamiento de la pared cardíaca y disfunción cardíaca. El infarto de miocardio induce unas alteraciones profundas en la arquitectura ventricular con formación de cicatriz, dilatación ventricular e hipertrofia del miocardio no infartado. La ECV asociada al envejecimiento y el infarto de miocardio (IM) conllevan ciertas alteraciones cardíacas compartidas. La capacidad regeneradora en el corazón se pierde con la edad. El corazón de los ratones neonatos puede experimentar una regeneración completa tras la resección quirúrgica parcial o la inducción del IM. Este potencial de regeneración completa se pierde, sin embargo, tras la primera semana de vida. De manera análoga, la pérdida de la capacidad para una regeneración completa, la expresión de los genes esenciales de la telomerasa TERC y TERT, también se pierde durante la primera semana de vida posnatal.

Los hechos anteriores me llevaron a especular si la reexpresión de la telomerasa en el corazón adulto podría ayudar en su generación tras el IM. El empleo de la activación de la telomerasa, mediante su sobreexpresión o el empleo de terapia génica basada en la telomerasa como estrategia para alargar los telómeros y retrasar el envejecimiento y las enfermedades asociadas a este, ya había sido concebida y empleada con éxito por nuestro grupo en el pasado. Puesto que se ha observado que la expresión transgénica de TERT conduce a un aumento en la hipertrofia del corazón coincidente con un incremento en la proliferación de cardiomiocitos *in vivo*, decidimos utilizar nuestra recién desarrollada terapia génica basada en telomerasa para investigar los posibles efectos terapéuticos de la expresión de la telomerasa tras el IM<sup>33</sup>. Empleamos para ello un modelo de ratón de IM en el que se induce este evento mediante la ligación de la arteria coronaria y vectores virales para la expresión específica de TERT en el corazón. Hemos encontrado que la activación de la telomerasa en el corazón de los ratones tras el IM consigue una mejora de los parámetros de funcionalidad y morfología cardíacas, alarga los telómeros, induce la activación de varias rutas asociadas a la protección cardíacas y la regeneración y reduce significativamente la muerte por fallo cardíaco tras el IM. Nuestros hallazgos sirven como prueba de concepto para el desarrollo de estrategias innovadoras basadas en la activación de la telomerasa para tratar el fallo cardíaco crónico y agudo.

Nuestro grupo también tiene interés en el empleo de estrategias de activación de la telomerasa para el tratamiento de otras enfermedades, aparte de la ECV. Así, estamos explorando el uso terapéutico de la activación de la telomerasa en el tratamiento de ciertos síndromes teloméricos como la anemia aplásica y la fibrosis pulmonar idiopática (FPI) familiar. Como he mencionado anteriormente, los denominados síndromes teloméricos son enfermedades genéticas humanas asociadas a mutaciones en la telomerasa y las proteínas shelterina. Estas mutaciones conducen a la aparición de telómeros excesivamente cortos y a una pérdida prematura de la capacidad regenerativa de los tejidos.

La anemia aplásica es una enfermedad que puede resultar fatal y que se caracteriza por una medula ósea hipocelular y una reducción en el número de las células sanguíneas. Disponemos de un modelo de ratón generado por nosotros que recapitula el fenotipo de los pacientes de anemia aplásica<sup>23</sup> en el que ensayaremos nuestra terapia génica basada en la telomerasa. Anticipamos que la reactivación de la telomerasa alargará los telómeros cortos en las células madre y las células precursoras del sistema hematopoyético, y suprimirá o retrasará el fallo de la medula ósea.

La FPI es una enfermedad mortal que resulta del daño crónico en el pulmón cuya etiología todavía no está muy bien conocida. El acortamiento telomérico debido a mutaciones en la telomerasa está vinculado a los casos de FPI familiar. Los ratones deficientes en telomerasa no desarrollan FPI debido a su muerte prematura a causa de otras patologías. La generación de modelos de ratón que recapitulen la FPI permanece pendiente. Puesto que la depleción en la shelterina TRF<sub>1</sub> lleva a una

rápida disfunción telomérica y muerte celular independientemente de la longitud telomérica, mi hipótesis es que la depleción de TRF<sub>1</sub> en los epitelios pulmonares puede llevar a la FPI en los ratones. Estamos generando dicho modelo animal, que de cumplir con las expectativas, utilizaremos como modelo preclínico para el desarrollo de estrategias terapéuticas basadas en la activación de la telomerasa.

## BIBLIOGRAFÍA

1. M.A. Blasco; M. Rizen; C.W. Greider y D. Hanahan (1996): «Differential regulation of telomerase activity and its RNA component during multistage tumorigenesis», en *Nat Genet*, Vol. 12, pp. 200-204.
2. M.A. Blasco; W. Funk; B. Villaponteau y C.W. Greider (1995): «Functional characterization and developmental regulation of mouse telomerase RNA component», en *Science*, Vol. 269, pp. 1267-1270.
3. H.W. Lee; M.A. Blasco; G.J. Gottlieb; C.W. Greider y R.A. DePinho (1998): «Essential role of mouse telomerase in highly proliferative organs», en *Nature*, Vol. 392, pp. 569-574.
4. E. Herrera; E. Samper y M.A. Blasco (1999): «Telomere shortening in mTR<sup>-/-</sup>embryos is associated with a failure to close the neural tube», en *EMBO J*, Vol. 18, pp. 1172-1181.
5. M.A. Blasco; H.W. Lee; P. Hande; E. Samper; P. Lansdorp; R. DePinho y C.W. Greider (1997): «Telomere shortening and tumor formation by mouse cells lacking telomerase RNA», en *Cell*, Vol. 91, pp. 25-34.
6. E. González-Suárez; E. Samper; J.M. Flores y M.A. Blasco (2000): «Telomerase-deficient mice with short telomeres are resistant to skin tumorigenesis», en *Nat Genet*, Vol. 26, pp. 114-117.
7. E. Samper; J.M. Flores y M.A. Blasco (2001): «Restoration of telomerase activity rescues chromosomal instability and premature aging in Terc<sup>-/-</sup>mice with short telomeres», en *EMBO Rep*, Vol. 2, pp. 800-807.
8. R. Benetti; S. Gonzalo; I. Jaco; G. Schotta; P. Klatt; T. Jenuwein y M.A. Blasco (2007): «Suv4-20h deficiency results in telomere elongation and de-repression of telomere recombination», en *J Cell Biol*, Vol. 178, pp. 925-936.
9. R. Benetti; M. García-Cao y M.A. Blasco (2007): «Telomere length regulates the epigenetic status of mammalian telomeres and subtelomeres», en *Nat Genet*, Vol. 39, pp. 243-250.
10. S. Gonzalo; I. Jaco; M.F. Fraga; T. Chen; E. Li; M. Esteller y M.A. Blasco (2006): «DNA methyltransferases control telomere length and telomere recombination in mammalian cells», en *Nat Cell Biol*, Vol. 8, pp. 416-424.
11. M. García-Cao; S. Gonzalo; D. Dean y M.A. Blasco (2002): «Role of the Rb family members in controlling telomere length», en *Nat Genet*, Vol. 32, pp. 415-419.
12. M. García-Cao; R. O'Sullivan; A.H. Peters; T. Jenuwein y M.A. Blasco (2004): «Epigenetic regulation of telomere length in mammalian cells by the Suv39h1 and Suv39h2 histone methyltransferases», en *Nat Genet*, Vol. 36, pp. 94-99.
13. S. Schoeftner y M.A. Blasco (2008): «Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA dependent RNA polymerase II», en *Nat Cell Biol*, Vol. 10, pp. 228-236.
14. I. López de Silanes; M. Stagno d'Alcontres y M.A. Blasco (2010): «TERRA-associated RNA binding proteins», en *Nat Commun*, Vol. 1, pp. 1-9.
15. I. López de Silanes; O. Graña; M.L. de Bonis; O. Domínguez; D.G. Pisano y M.A. Blasco (2014): «Identification of TE-RRA locus unveils a telomere protection role through association to nearly all chromosomes», en *Nat Commun*, Vol. 5, nº 4723, DOI: 10.1038/ncomms5723.
16. P. Muñoz; R. Blanco; J.M. Flores y M.A. Blasco (2005): «XPF nuclease-dependent telomere loss and increased DNA damage in mice overexpressing TRF2 result in premature aging and cancer», en *Nat Genet*, Vol. 10, pp. 1063-1071.
17. R. Blanco; P. Muñoz; P. Klatt; J.M. Flores y M.A. Blasco (2007): «Telomerase abrogation dramatically accelerates TRF2-induced epithelial carcinogenesis», en *Genes Dev*, Vol. 21, pp. 206-220.
18. P. Martínez; M. Thanasoula; P. Muñoz; C. Liao; A. Tejera; C. McNeese; J.M. Flores; O. Fernández-Capetillo; M. Tarsounas y M.A. Blasco (2009): «Increased telomere fragility and fusions resulting from TRF1 deficiency lead to degenerative pathologies and increased cancer in mice», en *Genes Dev*, Vol. 23, pp. 2060-2075.
19. A.M. Tejera; M. Stagno d'Alcontres; M. Thanasoula; R.M. Marión; P. Martínez; C. Liao; J.M. Flores; M. Tarsounas y M.A. Blasco (2010): «TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice», en *Dev Cell*, Vol. 18, pp. 775-789.