

Telomerase activity and telomere length in the colorectal polyp-carcinoma sequence

C. Valls Bautista¹, C. Piñol Felis¹, J. M. Reñe Espinet^{1,3}, J. Buenestado García^{1,3} and J. Viñas Salas^{2,4}

Departments of ¹Medicine and ²Surgery. University of Lleida. Departments of ³Gastroenterology and ⁴Surgery. University Hospital Arnau de Vilanova. IRB Lleida, Spain

ABSTRACT

Objective: the role of telomerase activity and telomere length in the adenoma-carcinoma sequence of colon carcinogenesis has not been well established. The objective of this study was to determine telomerase activity and telomere length patterns in patients with adenomatous polyps either associated or not with colorectal cancer, as well as the role of telomeric instability in the adenoma-carcinoma sequence.

Patients and methods: we included in the study 14 patients who underwent surgery for colorectal cancer and/or polyps. In 6 of these patients fresh samples of tumor tissue, polyps, and normal mucosa were obtained; in the 8 remaining cases, we collected only polyps and normal mucosa. We used the fluorescent-telomeric repeat amplification protocol assay (TRAP-F) to determine telomerase activity and telomere length using Southern-blot testing.

Results: telomerase activity was detected in 86% of polyps and 50% of associated normal mucosa. Mean telomerase activity in polyp tissue was 5.85; in the normal mucosa it was 0.58 TPG. Mean telomere length was 6.78 Kbp and 7.78, respectively. Polyps in patients without synchronous cancer had a telomerase activity that was significantly higher (9.4) than in those with cancer (1.1).

Conclusions: telomerase activity increases in the colorectal adenoma-carcinoma sequence, concurrently with a decrease in telomere length. The presence of synchronous cancer modifies telomerase activity in polyps.

Key words: Telomerase activity. Telomere length. Colorectal. Carcinoma. Polyp.

Supported by grants from Fondo de Investigaciones Sanitarias (01/0620) and FEDER. Cristina Valls is supported by a predoctoral grant by Generalitat de Catalunya.

Received: 05-01-09.
Accepted: 15-01-09.

Correspondence: Carme Piñol Felis. Departamento de Medicina. Universitat de Lleida. Hospital Universitario Arnau de Vilanova. C/ Alcalde Rovira Roure, 80. 25198 Lleida, Spain. e-mail: pinyol@medicina.udl.cat

Valls Bautista C, Piñol Felis C, Reñe Espinet JM, Buenestado García J, Viñas Salas J. Telomerase activity and telomere length in the colorectal polyp-carcinoma sequence. *Rev Esp Enferm Dig* 2009; 101: 179-186.

INTRODUCTION

Currently, there is clinical, epidemiological and experimental evidence clearly indicating that polyps or adenomas are precursor lesions for most colorectal malignancies. However, this does not mean that all polyps evolve into cancer (1). From the colorectal cancer progression model proposed by Fearon and Vogelstein (2) in 1990, several studies have established the changes apparent in the adenoma-carcinoma sequence. The main changes are mutations, deletions, and loss of heterozygosity (1,3-6).

Telomeres are structures located at the end of chromosomes in eukaryotic cells (7). They regulate gene expression, participate in the replication of chromosomes, and protect them from degradation by nucleases. In somatic cells, telomeres shorten progressively with each successive cell division. This progressive shortening is an important mechanism in the timing of human cellular aging. When telomeres become sufficiently short undergo a growth arrest called senescence phase, followed by apoptosis and death. Some cells escape from this mechanism and proliferate indefinitely by the action of telomerase. When these cells accumulate sufficient mutations affecting the cell cycle, they can become cancerous. Telomerase is a ribonucleoprotein that compensates the shortening of telomeres by reverse transcription using its intrinsic RNA as a template (8). In germ cells and tissues with high rates of renewal, telomerase is active and main-

tains genome integrity and stability ensuring the transmission of total telomere length in each cell division (9). Telomerase activity was detected in 80-90% of human cancers, including colorectal cancer (10,11), while its expression in the normal mucosa was 86% (12).

The role of telomeric dysfunction in the adenoma-carcinoma sequence has not been well established. The results available so far are divergent, and few studies are found in the literature comparing telomerase activity (TA) and telomere length (TL) in polyps and the normal mucosa of one same patient (13).

The first objective of this study was to determine the behavior of telomerase activity and telomere length in patients with polyps associated or otherwise with colorectal cancer, and the second objective was to explore the role of telomeric instability in the adenoma-carcinoma sequence, as defined by telomerase activity being higher in polyps than in adjacent normal mucosa, accompanied by changes or variations in telomere length.

PATIENTS AND METHODS

This preliminary study included 14 patients undergoing surgery for colorectal cancer and/or for endoscopically non-resectable polyps at Hospital Universitari Arnau de Vilanova, Lleida (Spain). Six of these patients had colonic tumors, polyps, and macroscopically normal mucosa 10 cm away from the tumor, while the remaining 8 samples had polyps and normal mucosa.

All samples were frozen at -80 °C until their analysis. The research protocol was approved by the Hospital's Ethics Committee.

Telomerase activity was measured by a quantitative system using the *fluorescent-telomeric repeat amplification protocol assay* (F-TRAP) (14,15), and the *TRAPeze Telomerase Detection Kit* (INTERGEN® Purchase, NY). The methodology was performed using the TRAP technique previously described (10).

Telomere length determination was performed by Southern blot using the *TeloTAGGG Telomere Length Assay kit* (Roche Diagnostics GMBH Mannheim). Briefly, 2 micrograms of genomic DNA were digested with *Hinf I* and *Rsa I* restriction enzymes, and the fragments separat-

ed on 0.8 agarose gel. The DNA fragments were transferred onto a nylon membrane and hybridized to a specific probe for telomeric repeats (TTAGGG)₄ digoxigenin-conjugated. The hybridized probe was incubated with a digoxigenin specific antibody covalently coupled to alkaline phosphatase. Finally, the immobilized telomere probe was visualized using a highly sensitive chemiluminescent substrate for alkaline phosphatase. Chemiluminescence was detected by the system based on a DDC camera (Lumi-Imager), and analyzed with the Lumi-Analyst software (Boehringer Mannheim).

Telomere length was estimated according to $\Sigma(\text{ODi}) / \Sigma(\text{ODi/Li})$, where ODi is the intensity of the chemiluminescent signal and Li is the length of TRF fragments at point i. The unit of telomere length was Kilo-base pairs (Kbp). TRF lengths were recorded as telomere length.

The statistical analysis was performed using the program SPSS 14.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL). Results of telomerase activity and telomere length are expressed as mean values. A mean comparison was calculated using Student's t-test, Mann-Whitney U test, and Kruskal-Wallis test. $p \leq 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

The present pilot study includes 14 patients with colorectal polyps, of which 6 showed synchronous colorectal polyps and cancer, while the remaining 8 were isolated polyps. All samples had telomerase activity and telomere length measured.

—*Patients with colorectal polyps (n = 14)*. Telomerase activity expression was detected in 86% (12/14) of polyps and 50% (7/14) of their corresponding normal mucosa. Mean TA in polyps was 5.85 TPG and average normal mucosal 0.58 TPG, the difference did not reach significance ($p = 0.077$).

We observed a significantly lower TA in polyps in patients with synchronous colorectal cancer (1.10 TPG) versus those who had no cancer (9.42 TPG), $p = 0.020$ (Table I).

Average telomere length in polyps was 6.78 Kbp, and 7.78 Kbp in the normal mucosa; this difference did not reach significance ($p = 0.082$) (Table I).

Table I. Relationship of telomerase activity (TA) and telomere length in polyps and normal mucosa, both overall and in patients with or without synchronous cancer. Values expressed as mean and range

	Telomerase activity polyp	Telomerase activity normal	Sig. p	Telomere length polyp	Telomere length normal	Sig. p
n = 14	5.85 (0-33.40)	0.58 (0-2.35)	0.077	6.78 (3.21-6.78)	7.78 (4.83-7.78)	0.082
Cancer						
Yes (6/14)	1.10 (0-3.58)	0.33 (0-1.64)	0.242	6.96 (4.94-9.91)	7.51 (4.83-9.05)	0.269
No (8/14)	9.42 (0.91-33.4)	0.77 (0-2.35)	0.097	6.65 (3.21-11.19)	7.98 (5.64-11.33)	0.173
p	0.020	0.345		0.852	0.950	

—*Patients with synchronous colorectal cancer* ($n = 6$). In all, 83% of tumors (5/6), 67% of polyps (4/6), and 33% of normal mucosa (2/6) samples were telomerase-positive. Telomerase activity in tumors was 5.65 TPG (0-19.02), in polyps 1.09 (0-3.57), and in the normal mucosa 0.33 TPG (0-1.64). Differences between means were not significant but showed a higher TA in tumors than in polyps, and in polyps vs. normal mucosa (Fig. 1).

Average telomere length in tumors was 6.28 Kbp (4.20-8.80), in polyps 6.95 Kbp (4.94-9.91), and in the normal mucosa 7.50 Kbp (4.83-9.05), without any significant differences (Fig. 1).

—*Patients with isolated polyps* ($n = 8$). Telomerase activity was detected in 100% (8/8) of polyps and 62.5% (5/8) of their corresponding normal mucosa. Mean telomerase activity in polyps was 9.41 TPG (0.91-33.41), and 0.77 in the normal mucosa TPG (0-2.35), but the difference was not significant between them. Mean telomere length in polyps was 6.65 Kbp (3.21-11.19), and 7.98 in the adjacent normal mucosa Kbp (5.64-11.33), without significant differences.

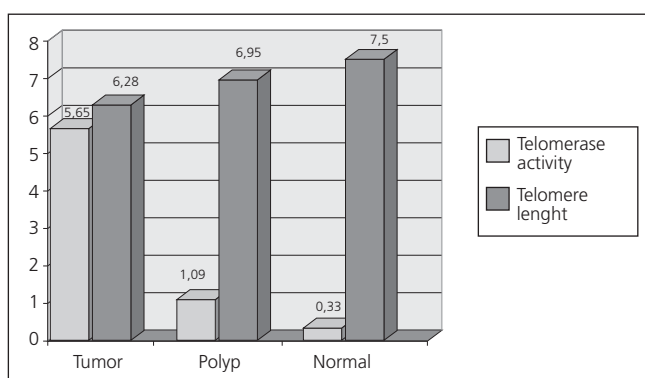


Fig. 1. Telomerase activity (unit: TPG) and telomere length (TRF) (unit: Kbp) in the tumor, polyp and adjacent normal mucosa of patients with synchronous polyps and cancer.

Actividad de la telomerasa (unidad: TPG) y longitud del telómero (TRF) (unidad: Kbp) en el tumor, pólipo y mucosa adyacente normal de los pacientes con pólipos y cáncer sincrónico.

DISCUSSION

In our study 86% of polyps expressed telomerase activity, as well as 50% of cases in their adjacent normal mucosa. In one of the few published studies that compared polyps with normal mucosa in the same patients, the authors obtained TA expression in 22% of colorectal polyps, and none of all normal mucosa specimens (16). Other studies that compare TA in polyps with the normal mucosa of different patients found that polyp TA oscillates between 40 and 62.5%, these values being 0 and 18.5% in the normal mucosa (17-21). Related

to those studies we observed a higher TA percentage in polyps and normal mucosa, which we believe likely due to the technique we used, fragment analysis by sequencing, which is very sensitive and can detect very low telomerase activities possibly common in the normal mucosa, and that can be missed by other methodologies.

Mean telomerase activity in polyps was 5.85 TPG, while it was 0.58 TPG in the adjacent normal mucosa. Other authors published polyp TA figures that oscillate between 1.7 and 7.8 TPG (17,20) in the normal mucosa, from 0 to 3.34 TPG. None of these studies showed significant differences between polyp TA and normal mucosa TA (17-20).

Polyps synchronic with tumors have a significantly lower telomerase activity when compared to isolated polyps. Paradoxically, those results are accompanied by greater telomere length in the former. We think that this is due to the activation of alternative mechanisms for the maintenance of telomere length (ATL), which act with no increase in activity (22,23).

Mean polyp telomere length was 6.78 Kbp and 7.78 Kbp in the normal mucosa (difference did not reach significance). Mean values obtained in other studies in which the normal mucosa was compared with polyps of different patients, were as follows: Engelhardt et al. (20) 7.1 Kbp in polyps and 7.46 Kbp in normal mucosa, Kim et al. (24) obtained 9.41 Kbp in polyps and 9.25 Kbp in normal mucosa, with no significant differences in both cases. Differences in mean telomere length found by those authors between polyps and normal mucosa were very small when compared to those in our study, possibly due to the fact that they did not work with paired samples.

We also studied the normal – adenoma – carcinoma sequence by measuring TA and TL in samples from 6 patients who had synchronous polyps and colorectal cancer, in which we also analyzed the normal mucosa. This part of the study could not be compared with other similar studies as we found none the literature.

TA was found in 83% (5/6) of tumors, in 67% (4/6) of polyps, and in 33% (2/6) of normal mucosa samples. Mean TA in tumor samples was 5.65 TPG, 1.09 TPG in polyps, and 0.33 TPG in normal mucosa. Those differences did not reach significance. We observed intermediate TA in polyps lower than in cancer but higher than in normal mucosa. We can conclude that there exists a progressive increase in TA levels in the sequence normal mucosa – adenoma – carcinoma, accompanied by a diminution of telomere length. We observed a tendency in the sequence normal tissue–adenoma–carcinoma where TA increases with cell malignancy grade, and telomere length diminishes. This behavior we think it due to the fact that the cell division ratio also increases with the passage from one tissue type to the next. We cannot compare those results because we found no similar studies in the literature.

We think that with more cases those differences could be significant and confirm the existence of a sequence in telomere behavior (TA and TL) from normal towards tumoral mucosa through polyps. We believe that for a study of the sequence adenoma-carcinoma able to obtain coherent results it is necessary that mucosa samples showing the various stages of carcinogenic progression be studied in the same patients. With this approach we eliminate possible differences between individual patients and can compare the same number of cases for each type of mucosa. On the other hand, it allows to study the sequence in each patient individually.

In all 8 patients with isolated polyps we observed the same behavior as in all polyps taken together or in polyps synchronic with tumors: a higher TA in polyps than in the normal mucosa and lower telomere length in polyps *versus* the normal mucosa.

Although this is a preliminary study we can conclude that there is a growing telomerase activity in the adenoma-carcinoma sequence in the colonic mucosa, as well as a decrease in telomere length as we move toward the normal mucosa from the tumor. The presence of synchronous cancer modifies polyp telomerase activity.

In colorectal cancer there is an expression of telomerase that has been shown in previous studies. In the adenoma-cancer sequence we have demonstrated that there is obvious telomeric dysfunction. This finding would be a mechanism taking into account the changes already known to occur in this sequence, including deletions, mutations, oncogene activation, suppressor genes, or loss of heterozygosity.

REFERENCES

- Ponz de Leon M, Di Gregorio C. Pathology of colorectal cancer. *Dig Liver Dis* 2001; 33(4): 372-88.
- Fearon ER, Vogelstein B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell* 1990; 61(5): 759-67.
- Cruz-Bustillo Clarens D. Genética molecular del cáncer colorectal. *Rev Esp Enferm Dig* 2004; 96(1): 48-59.
- Cheng L, Lai MD. Aberrant crypt foci as microscopic precursors of colorectal cancer. *World J Gastroenterol* 2003; 9(12): 2642-9.
- Benito M, Díaz-Rubio E. Molecular biology in colorectal cancer. *Clin Trans Oncol* 2006; 8(6): 391-8.
- Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger A. Aberrant crypt foci: A review. *Toxicol Pathol* 1999; 27(6): 632-42.
- Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350(6319): 569-73.
- Shay JW, Zou Y, Hiyama E, Wright WE. Telomerase and cancer. *Hum Mol Genet* 2001; 310(7): 677-85.
- Hiyama E, Hiyama K. Telomerase as tumor marker. *Cancer Lett* 2003; 194(2): 221-33.
- Bautista CV, Felis CP, Espinet JM, Salas J. Telomerase activity is a prognostic factor for recurrence and survival in rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 2007; 50(5): 611-20.
- Saleh S, Lam AK, Ho YH. Real-time PCR quantification of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in colorectal cancer. *Pathology* 2008; 40: 25-30.
- Kammori M, Kanauchi H, Nakamura K, Kawahara M, Weber TK, Mafune KI, et al. Demonstration of human telomerase reverse transcriptase in human colorectal carcinoma by in situ hybridization. *Int J Oncol* 2002; 20(1): 15-21.
- Boldrini L, Faviana P, Gisfredi S, Zucconi Y, Di Quirico D, Donati V, et al. Evaluation of telomerase in the development and progression of colon cancer. *Int J Mol Med* 2002; 10(5): 589-92.
- Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266(5193): 2011-5.
- Piatyszek MA, Kim NW, Weinrich SL, Hiyama K, Wright WE, Shay JW. Detection of telomerase activity in human cells and tumors by a telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Methods Cell Sci* 1995; 17: 1-15.
- Katayama S, Shiota G, Oshimura M, Kawasaki H. Clinical usefulness of telomerase activity and telomere length in the preoperative diagnosis of gastric and colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125(7): 405-10.
- Abe N, Watanabe T, Nakashima M, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, et al. Quantitative analysis of telomerase activity: a potential diagnostic tool for colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 2001; 48(39): 692-5.
- Yan P, Saraga EP, Bouzourene H, Bosman FT, Benhattar J. Telomerase activation in colorectal carcinogenesis. *J Pathol* 1999; 189(2): 207-12.
- Tang R, Cheng AJ, Wang JY, Wang TC. Close correlation between telomerase expression and adenomatous polyp progression in multistep colorectal carcinogenesis. *Cancer Res* 1998; 58(18): 4052-4.
- Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1997; 122(11): 1141-5.
- Mizumoto I, Ogawa Y, Niiyama H, Nagai E, Sato I, Urashima T, et al. Possible role of telomerase activation in the multistep tumor progression of periampullary lesions in patients with familial adenomatous polyposis. *Am J Gastroenterol* 2001; 96(4): 1261-5.
- Bechter OE, Zou Y, Walter W, Wright WE, Shay JW. Telomeric recombination in mismatch repair deficient human colon cancer cells after telomerase inhibition. *Cancer Res* 2004; 64(10): 3444-51.
- Nittis T, Guittat L, Stewart SA. Alternative lengthening of telomeres (ALT) and chromatin: is there a connection? *Biochimie* 2008; 90(1): 5-12.
- Kim HR, Kim YJ, Kim HJ, Kim SK, Lee JH. Telomere length changes in colorectal cancers and polyps. *J Korean Med Sci* 2002; 17(3): 360-5.

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

C. Valls Bautista¹, C. Piñol Felis¹, J. M. Reñe Espinet^{1,3}, J. Buenestado García^{1,3} y J. Viñas Salas^{2,4}

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

RESUMEN

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

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN

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

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

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

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

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

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

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

PACIENTES Y MÉTODOS

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

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

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

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

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

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

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

RESULTADOS

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

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

Observamos una AT significativamente inferior en los pólipos de pacientes con cáncer colorrectal sincrónico (1,10 TPG) con respecto a los que no lo presentaban (9,42 TPG), $p = 0,020$ (Tabla I).

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

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

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

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

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

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

DISCUSIÓN

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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