



**CENTRO DE INVESTIGACION Y DE ESTUDIOS
AVANZADOS DEL
INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL**

UNIDAD ZACATENCO

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

“Estudio de la longitud de telómeros y actividad de la telomerasa en líneas celulares de cáncer de mama. Correlación con su invasividad”

Tesis que presenta

M. en C. Hugo Axel Ceja Rangel

para obtener el Grado de

Doctor en Ciencias

en la Especialidad de

Genética y Biología Molecular

Directores de la Tesis

Dr. Patricio Gariglio Vidal

Dr. Luis Benítez Bribiesca[†]

México, Ciudad de México

Mayo 2016

1. Dedicatorias

Doy gracias a dios por permitirme vivir día con día y por haberme permitido lograr la culminación de este importante proyecto mi vida.

A mis padres, Samuel Ceja y Blanca Rangel, por haberme dado las armas para cumplir con mis metas y así tener una vida digna. Gracias por infinito su apoyo y sus palabras de aliento.

A mi esposa Diana, por ser parte fundamental de mi familia siendo mi fuerza de motivación para seguir superándome y por compartir su invaluable tiempo durante todos estos años.

A mi tutor, el Dr. Luis Benítez Bribiesca que siempre fue un gran maestro, y por permitirme trabajar en su laboratorio, pero que lamentablemente se nos adelantó en el camino QEPD.

A mi cotutor, el Dr. Juan Patricio Gariglio Vidal por su incansable apoyo para la realización del presente trabajo y por haberme permitido trabajar en su equipo de investigación.

A todos mis amigos del UIMEO CMN Siglo XXI (Paty, Rubi, Salvador, Dr. Emilio, Damian, Gabriel, Erica) y de la Unidad de Investigación de Genética Humana (Mauricio, MariJo, Mirna, Dr. Miguel) por esos momentos agradables que pasamos juntos y hacer más grato el tiempo en el laboratorio. Y a todos aquellos que por alguna razón no mencione en esta sección, pero que contribuyeron de alguna forma en la realización del presente trabajo.

2. Agradecimientos al CONACYT

Le agradezco al CONACYT por haberme brindado el apoyo de manutención durante la estancia de estudios en el programa de doctorado (2011-2016).

Le agradezco al Cinvestav-IPN Unidad Zacatenco por haber abierto sus puertas y haber contribuido con mi formación académica.

Agradezco al IMSS CMN Siglo XXI, UMAE Hospital de Oncología por haber permitido culminar en el presente trabajo y espero seguir contribuyendo en futuras publicaciones.

3. Contenido

Resumen.....	5
Introducción.....	7
Antecedentes.....	18
Justificación.....	22
Aportaciones del estudio.....	22
Planteamiento del problema.....	23
Hipótesis.....	23
Objetivos.....	24
Desarrollo.....	25
Materiales y métodos.....	25
Resultados.....	34
Discusión.....	37
Conclusiones.....	41
Perspectivas.....	41
Bibliografía.....	43
Apéndices.....	51
Lista de Abreviaturas.....	52
Lista de Figuras.....	53
Anexos.....	64

Estudio de la longitud de telómeros y actividad de la telomerasa en líneas celulares de cáncer de mama. Correlación con su invasividad.

Resumen

El mantenimiento de la longitud de los telómeros es una función característica de la telomerasa humana. Esta enzima es crucial para la supervivencia de células cancerosas y para su progresión. La longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa se han propuesto como posibles biomarcadores de riesgo de cáncer y se correlacionan con el grado de invasividad de las células cancerosas. Sin embargo, su relevancia clínica continua en discusión. Con el fin de mejorar nuestra comprensión entre la relación de la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa con la invasividad del cáncer, se estudiaron: la longitud del telómero, así como los niveles de telomerasa, su actividad y su localización intracelular en líneas celulares de cáncer de mama con diferentes capacidades invasoras. Se encontró una coincidencia paradójica, telómeros muy cortos y una mayor actividad de la telomerasa en las líneas celulares de cáncer de mama más invasivas. También observamos que la localización intracelular de la proteína hTERT podría estar correlacionada con su nivel de actividad. No encontramos ninguna asociación entre los niveles de expresión de proteínas hTERT con la invasividad.

Proponemos que la evaluación simultánea de estos dos biomarcadores -longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa - podrían ser útiles para la evaluación de la capacidad invasiva y la agresividad de las células neoplásicas de pacientes con cáncer de mama.

**Study of telomere length and telomerase activity in breast cancer cell lines.
Correlation with their invasiveness.**

Abstract

Maintenance of telomere length is one function of human telomerase that is crucial for the survival of cancer cells and cancer progression. Both, telomeres and telomerase have been proposed as possible biomarkers of cancer risk and cancer invasiveness; however, their clinical relevance is still under discussion.

In order to improve our understanding of the relationship between telomere length and telomerase activity with cancer invasiveness, we studied telomere length as well as telomerase levels, activity and intracellular localization in breast cancer cell lines with diverse invasive phenotypes.

We found an apparently paradoxical coincidence of short telomeres and enhanced telomerase activity in the most invasive breast cancer cell lines. We also observed that hTERT intracellular localization could be correlated with its level of activity. There was no association between hTERT protein expression levels and invasiveness.

We propose that simultaneous evaluation of these two biomarkers -telomere length and telomerase activity- could be useful for the assessment of the invasive capacity and aggressiveness of tumor cells from breast cancer patients.

1. Introducción

1.1. El estado actual del cáncer de mama en la población mexicana.

El cáncer de mama es una de las enfermedades que no hacen distinción entre la población de países desarrollados y en desarrollo y es el tipo de cáncer con mayor prevalencia en las mujeres a nivel mundial.

Datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS) señalan que cada año se detectan 1.38 millones de casos nuevos y ocurren 458 mil muertes por esta enfermedad (1).

Según datos de la Organización Panamericana de la Salud (OPS), en el continente americano la tendencia es similar, es decir, el cáncer de mama es el más común entre las mujeres (29% respecto del total de casos de cáncer) y es la segunda causa de muerte por tumores malignos para este grupo de población, superada únicamente por el cáncer de pulmón (15 contra 18 por ciento) (2).

En 2013, el cáncer de mama ocupaba la cuarta causa de mortalidad por tumores malignos (7.7%), en la población mexicana de 20 años y más; el de órganos digestivos (32.8%) es el que genera el mayor porcentaje de muertes por neoplasias, tanto en el total de la población como en hombres y mujeres (33.4 contra 32.2%, respectivamente) (1).

1.1.2. Identificación de subtipos de cáncer de mama. La inmunohistoquímica es una de las herramientas más comúnmente usadas para caracterizar proteínas intracelulares o de membrana de cualquier tejido celular. Se pueden identificar marcadores individuales o en paneles para conocer los diversos subtipos de un tumor, para confirmar el origen del tumor, distinguir entre tumor metastásico de un tumor primario, y puede proveer información adicional que puede ser importante para el pronóstico, predicción de la respuesta a la terapia, o para evaluar la respuesta pos-tratamiento.

Los marcadores más usados para clasificar los subtipos de cáncer de mama son: Receptor de estrógenos (RE), Receptor de progestágenos (RP) y Receptor humano de crecimiento epidermal (HER-2) (del inglés, Human Epidermal Growth

Factor Receptor 2). Es muy importante identificar el subtipo de cáncer, ya que dentro de la sub-clasificación molecular hay cuatro subtipos de cánceres de mama: Luminal A (RE (+), RP (+/-) y HER-2 (-)), Luminal B (RE (+), RP (+/-) y HER-2 (+)), HER-2 (+) (RE (-), RP (-) y HER-2 (+)), basal-like o triple negativo (RE (-), RP (-) y HER-2 (-)).

Estas clasificaciones permiten conocer el tratamiento que seguirá el paciente. Generalmente los tumores positivos a RE y RP, responden adecuadamente a tamoxifen y tienen un buen pronóstico, mientras que los tumores con sobreexpresión de HER-2, no responden a tratamiento con tamoxifen pero si responden a tratamiento con trastuzumab (anticuerpos anti HER-2) y tienen un pronóstico de bueno a malo, pero los tumores basal-like, no tienen un tratamiento específico ya que no poseen receptores distintivos y generalmente son los que presentarán peores pronósticos (3).

1.2. Telómeros, telomerasa y cáncer

Una característica común en la mayoría de los cánceres, es la expresión de la telomerasa, cabe señalar que ésta enzima no se expresa en la gran mayoría de células somáticas, pero se ha descrito que la telomerasa se reactiva en las células cancerosas lo cual permite que ésta tenga divisiones ilimitadas además de jugar un papel importante en la progresión del cáncer (4). En los siguientes párrafos se describirá con mayor detalle la relación entre telómeros, la telomerasa y el cáncer.

1.2.1. Telómeros

Los telómeros fueron descritos por primera vez por Hermann Joseph Muller en los años 30s del siglo XX. Posteriormente, Barbara McClintock propuso que los telómeros eran estructuras que protegían los extremos teloméricos y así evitaban su fusión la cual tendría consecuencias desastrosas para la célula. Algunos años más tarde los investigadores Elizabeth H. Blackburn, Carol W. Greider y Jack W.

Szostak fueron reconocidos con el premio Nobel en 2009 por describir la estructura y mantenimiento de los telómeros, la demostración de su conservación evolutiva y el descubrimiento de la telomerasa, enzima fundamental en el mantenimiento telomérico (5).

Los telómeros son los extremos distales de cada uno de los cromosomas, están constituidos por repetidos en tándem de secuencias ricas en GC en la hebra 5´- 3´ del ADN de las células eucariontes (**Esquema 1B**) (6, 7). Los humanos tienen una secuencia consenso que consiste en secuencias (TTAGGG)_n mientras que en otros mamíferos difieren en la composición de dicha secuencia. Estos repetidos pueden ir de los 15 a los 20 kpb de longitud al nacimiento y de los 8 a los 10 kpb en los adultos humanos. La parte final de la cadena telomérica 5´-3´ está constituido por una cadena de ADN sencilla de 200 nucleótidos (8). Los telómeros protegen los extremos distales de cada cromosoma de proteínas que reconocen daños del ADN, así como de otras proteínas involucradas en los mecanismos de reparación de ADN y fusión, por lo tanto, mientras el telómero se encuentre en condiciones normales brinda estabilidad genómica. Los telómeros que están expuestos activan los mecanismos de reparación del ADN, que en condiciones anormales podrían causar fusiones entre cromosomas generando inestabilidad genómica (8).

Durante la síntesis de ADN, antes de la replicación celular, los extremos de los cromosomas no son replicados completamente, lo que se conoce como el problema de la terminación de la replicación (del inglés, *End-Replication problem*) (9). A principios de la década de 1960 el investigador Leonard Hayflick descubrió un fenómeno en cultivos de fibroblastos humanos; él observó que estas células siempre se dividían un cierto número de veces y después entraban en senescencia y morían, aunque las células se congelaran y se volvieran a cultivar, éstas volvían a dejar de dividirse al alcanzar el mismo número de divisiones que sus progenitoras, a este fenómeno se le denominó límite de Hayflick. Hayflick postuló que la cantidad de veces que las células humanas podían dividirse era limitada, aproximadamente de 50 a 60 divisiones celulares (10). Ahora se sabe

que este fenómeno es ocasionado por el acortamiento telomérico en las células somáticas derivado del problema de la terminación de la replicación conduciendo a la inestabilidad genómica y posteriormente al proceso de senescencia (11).

Es importante el papel que desempeña la enzima telomerasa (hTERT, *del inglés human TElomerase RetroTranscriptase*) en la elongación y mantenimiento de los telómeros. Mientras continúe activa la expresión de telomerasa, la célula puede incrementar su capacidad de replicación y en algunos casos, volverse inmortal debido al mantenimiento telomérico, impidiendo que la célula entre en senescencia (12).

El acortamiento telomérico ocasiona que la célula entre al proceso de senescencia, el que consiste de dos fases denominadas: fase M1 y fase M2 (13). En la fase M1, la célula detiene su ciclo celular a causa de la activación de los mecanismos de reparación del ADN y a la posterior activación de p53 y p21. Raramente algunas células podrían sobrepasar este mecanismo supresor de tumor superando la Fase M1 y continúan dividiéndose con algunos mecanismos comprometidos debido a la presencia de mutaciones oncogénicas (Ras, p53, c-myc, etc.) (14). Por otra parte, cuando los telómeros se han acortado aún más (alrededor de 3 kpb), se detiene el ciclo celular en la fase M2, este fenómeno es conocido como "Crisis". En esta fase la célula tiene telómeros muy cortos y sufre fusiones termino-terminal en los extremos teloméricos y deja de dividirse. El hecho de que la célula sobrepase la fase M2 es muy raro y requiere de reactivación de varios genes (entre ellos el de la telomerasa) (15). Ambas fases son potentes mecanismos de supresión de tumor, pero si son sobrepasados mediante la reactivación de la telomerasa, pueden contribuir en gran parte a la formación de células inmortales y progresar hasta cáncer (16).

1.3. Complejo de shelterina

En los humanos, los telómeros están asociados a un grupo de seis proteínas conocidas como complejo de shelterina (17) (**Esquema 1C**), las cuales se describen a continuación:

a) TRF1 y TRF2.- Estas dos proteínas se unen a la doble cadena de ADN telomérico y son esenciales para el reclutamiento y estabilización de los otros miembros del complejo shelterina. La alta especificidad y afinidad de ambas proteínas por el ADN telomérico está dada por dos mecanismos. Primero, ambas proteínas poseen dominios homólogos carboxilo terminal de unión a ADN que reconocen secuencias consenso con alta especificidad en la doble cadena de ADN (18). Otro aspecto importante es que ambas proteínas forman homodímeros en solución; por un lado, TRF2 puede formar oligómeros de alto orden (19, 20) y, por otro lado, TRF1 puede llevar a cabo una unión simultánea a dos dominios proteicos de la familia de Myb incrementando su afinidad por el ADN unas diez veces (19). Ambos son esenciales y una delección de uno o ambos genes se asocia con un lento crecimiento en ratones, llevándolos a la muerte en corto plazo (21).

b) TIN2.- Esta proteína puede interactuar directamente con TRF1 y TRF2 a través de su región central y la mitad de su amino terminal, respectivamente, ésta a su vez recluta a TTP1 y a la proteína POT1 (22). TIN2 desempeña un papel fundamental en la formación del complejo de shelterina. Por un lado, TIN2 protege a TRF1 del factor tanquirasa el cual tiene la habilidad de fosforilar a TRF1 en células humanas, favoreciendo su disociación de TRF1 en los telómeros y permitiendo la elongación de los mismos (23). También promueve la asociación estable de TRF2 al ADN telomérico y favorece la unión con TRF1 (24). Es esencial en el reclutamiento de POT1, jugando un papel dual en el reclutamiento de TRF1 y TRF2 en cadenas dobles de ADN y reclutando POT1 en cadenas sencillas de ADN telomérico (24).

c) TPP1 y POT1.- La función principal de TPP1 es favorecer la unión de TIN2 y POT1 (25). En ausencia de TPP1, POT1 no es reclutada en el ADN telomérico. POT1 contiene dos dominios de unión a oligonucleótido/oligosacárido (OB) que son altamente específicos a la unión de repetidos teloméricos (26). Por lo tanto, el reclutamiento y la estabilización de POT1 a los telómeros recae en la asociación que enlaza a POT1 a través del complejo de shelterinas a la doble hebra de ADN telomérico (27).

d) RAP1.- Esta proteína reconoce ADN telomérico a través de sus dos dominios, aunque también se ha visto una interacción directa con TRF2 (28). Muchas funciones de esta proteína actualmente siguen siendo investigadas.

La mutación o la ausencia de alguno de los componentes del complejo de shelterina, causa acortamiento acelerado de telómeros favoreciendo las fusiones cromosómicas termino-terminal, aberraciones de longitud de telómeros y repuesta de daño al ADN inducida por telómeros cortos (29).

1.4. Estructura telomérica

El ADN telomérico adopta una estructura de "T loop"; esta forma se adquiere debido a que la doble cadena de repetidos teloméricos (TTAGGG)_n se enrollan en sí mismas (con ayuda de las proteínas del complejo de shelterinas) y la cadena sencilla de ADN localizada en el extremo 3' invade e hibrida a la doble cadena de ADN telomérico, formando una segunda estructura interna conocida como "D loop" (30, 31) (**Esquema 1C**).

Debido al contenido enriquecido de secuencias G, las cadenas sencillas del telómero pueden formar una estructura mucho más compleja llamada cuádruplex G, donde cada base G sirve como un donador y un aceptor de la formación de puentes de hidrógeno. En humanos los G cuádruplex están implicados en protección telomérica, supresión de recombinación e inhibición dependiente de telomerasa (7).

1.5. Telomerasa y su regulación genética

En la mayoría de los mamíferos el mantenimiento telomérico se lleva a cabo por medio de la telomerasa, la cual es una enzima ribonucleoproteína con un componente conocido como catalítico (hTERT) (12) y una parte de ARN conocida como TERC (del inglés, TELOmerase RNA Component) (32). La enzima puede elongar los extremos 3' ricos en bases G de cadena sencilla que contengan repetidos teloméricos mediante el uso de la plantilla de ARN que tiene la parte TERC de la telomerasa. La subunidad catalítica de la telomerasa generalmente se encuentra como homodímero de hTERT, la otra parte está compuesta de TERC y disquerina (32). El núcleo de la enzima telomerasa es mucho más complejo, ya que se unen otras proteínas accesorias, éstas regulan la homodimerización de la telomerasa, su localización sub-celular y su función enzimática (12). Algunas proteínas accesorias que componen a la telomerasa son: disquerina, NHP2, NOP10, Pontin/ Reptin, GAR1, y TCAB1 (**Esquema 1B**).

1.5.1. Regulación de p53 silvestre o mutada sobre el transcrito de hTERT. Se han descrito diversos factores que pueden activar o reprimir tanto la expresión de hTERT como la actividad de la misma, por ejemplo, se ha descrito que p53 juega un papel supresor a nivel de proteína, ya que el Carboxilo terminal de p53 se puede unir al amino-terminal de la proteína hTEP1 (del inglés, *human telomerase association protein 1*), ambas proteínas unidas suprimen la actividad de telomerasa *in vitro* (33). También se ha reportado que p53 interactúa con el factor de transcripción SP1 inhibiendo el promotor de hTERT e impide su expresión (34). El promotor de hTERT contiene sitios de unión c-Myc/Mad (Box-E) que pueden ser activados de forma directa a través de c-Myc (35). Además, se ha reportado que algunas p53 mutadas pueden tener un efecto contrario a la función de p53 silvestre, favoreciendo la sobreexpresión del transcrito de hTERT o provocar una pérdida de su función, esto es, a través del bloqueo del promotor de hTERT impidiendo la unión del factor de transcripción Sp1 (34, 36).

1.5.3. Regulación de otros factores sobre la expresión de hTERT. La sobreexpresión de Mad1, un antagonista de c-Myc, suprime la expresión de hTERT (37). Los estrógenos activan a la telomerasa de manera directa o indirecta mediante el promotor hTERT en las células epiteliales de mama que expresan receptor de estrógeno (38). Algunas variantes del virus del papiloma humano de alto riesgo, mediante la proteína viral E6, pueden aumentar la actividad de la telomerasa en queratinocitos humanos y células epiteliales de mama, mientras que en variantes de bajo riesgo inducen menos actividad (39). Constituyentes oncogénicos de la vía de señalización de RAS inducen mayor actividad de telomerasa (40). Algunos estudios han señalado que la proteína BMP-7 (del inglés, *bone morphogenetic protein 7*) induce la fosforilación de Smad3, translocación nuclear y represión del gen de hTERT, resultando en acortamiento acelerado de telómeros, senescencia y apoptosis (41). Las proteínas pRB y E2F1 reprimen la actividad de la telomerasa, aunque no se ha descrito el mecanismo por el cual éstas ejercen dicha represión (42).

Otro factor estructural que determina la función de la telomerasa es la presencia de ARNs llamados TERRA (43). Estos ARNs se crean a partir de los telómeros a través de la transcripción de las islas CpG con la actividad del promotor presente en las regiones subtelo méricas. Se cree que la transcripción de TERRAs está mediada por TRF1 a partir de una interacción con la ARN polimerasa II. Funcionalmente los TERRAs están involucrados en la formación de heterocromatina telomérica, la protección de los telómeros y la regulación negativa de elongación de los telómeros, por lo tanto, reprime la unión de hTERT con los telómeros (44).

1.6. Disfunción telomérica e inestabilidad genómica

Los telómeros son esenciales para el mantenimiento de la integridad genómica, la longitud telomérica es mantenida en líneas celulares germinales y células madre embrionarias por la telomerasa, pero se acortan durante la división celular en

células somáticas humanas debido a que éstas carecen de actividad de telomerasa. Cuando los telómeros son demasiado cortos son reconocidos por los mecanismos de reparación del daño al ADN de doble cadena y son más susceptibles a las fusiones teloméricas entre dos cromosomas distintos o entre cromátidas hermanas seguido de la replicación del ADN, como resultado se genera inestabilidad genómica que involucra ciclos de break-fusion-bridge (B/F/B) (45). Los ciclos de B/F/B ocurren cuando los cromosomas fusionados forman un puente durante el anafase, posteriormente cuando sus centrómeros son separados en direcciones opuestas cuando la célula intenta dividirse. Los cromosomas fusionados eventualmente se rompen en el sitio de fusión resultando en la adquisición de ADN al final de un cromosoma y pérdida de ADN al final del otro cromosoma. Como consecuencia los cromosomas pierden los telómeros y se fusionan nuevamente en el siguiente ciclo celular continuando los ciclos B/F/B. La consecuencia de las fusiones entre cromosomas dependerá de los sitios afectados durante los rompimientos de los cromosomas (46). Las fusiones entre diferentes cromosomas o fusiones entre cromátidas hermanas resulta en largos repetidos inversos al final del cromosoma en una célula hija y una larga delección al final del cromosoma de la otra célula hija. En divisiones celulares subsecuentes, el cromosoma que contiene la región duplicada puede volver a fusionarse con la cromátida hermana, resultando en una excesiva amplificación de ADN que consiste en largos repetidos invertidos. La amplificación o la delección de los extremos cromosómicos puede variar enormemente dependiendo del número de ciclos B/F/B (46) (**Esquema 2**).

Estos ciclos de B/F/B pueden detenerse si las células estabilizan los extremos teloméricos añadiendo nuevos repetidos teloméricos. La pérdida de un solo telómero puede resultar en inestabilidad genómica de múltiples cromosomas. La inestabilidad genómica que involucra ciclos de B/F/B es importante en cáncer, lo cual ha sido demostrado en experimentos *in vivo* empleando ratones deficientes de telomerasa y p53, y que presentan aberraciones y re-arreglos cromosómicos (47).

La disfunción telomérica (causada por el acortamiento telomérico) es diferente cuando los puntos de restricción al ciclo celular se ven comprometidos. Esto tiene un alto impacto en el desarrollo del cáncer, ya que podría favorecer la expresión de oncogenes y alterar la regulación de supresores de tumor como consecuencia de la ruptura cromosómica. En particular la inactivación de las vías de p53 y p16/Rb conducen a la alteración de las vías de señalización y del ciclo celular, lo que permite que continúe la erosión telomérica. Estudios recientes demuestran que la disfunción telomérica persistente puede inducir tetraploidía, causada por errores durante la mitosis y endo-replicación en células carentes de p53 (48). Se ha demostrado que la disfunción telomérica y la subsecuente reactivación de la telomerasa son suficientes para favorecer la iniciación de tumores y promover su progresión teniendo un papel importante en la biología del cáncer (49).

1.7. Funciones extra-teloméricas de la telomerasa

La telomerasa, además de ser responsable de alargamiento y mantenimiento de los telómeros, también posee actividades que no están relacionadas con dichas funciones. Se ha reportado que hTERT está involucrada en el mantenimiento del fenotipo de las células madre. Además, se ha descrito que hTERT también ayuda a la reparación del daño y a la protección del ADN mitocondrial causado por stress oxidativo; además juega un papel importante en la remodelación de la cromatina (50). También se ha demostrado que participa como factor de transcripción en la vía de señalización de Wnt/ β -Catenina y la vía NF κ B, ambas contribuyen a la sobreexpresión de algunas Metaloproteasas (MMPs, del inglés, Matrix Metalloproteases) y a la expresión de genes de proliferación celular, favoreciendo la progresión de cáncer (51, 52).

1.7.1. hTERT y la expresión de MMPs. La invasión y la metástasis de las células cancerosas son procesos sumamente complejos. Esto incluye la degradación de membranas y de la matriz extracelular, adhesión celular, migración y

angiogénesis. Las metaloproteasas son enzimas que participan en la degradación de la matriz extracelular y su presencia y/o sobreexpresión se han relacionado con fenotipos más agresivos en cánceres de mama (53).

Como se mencionó, la proteína hTERT ha sido correlacionada con la sobreexpresión de algunas MMPs a través de la vía de señalización de Wnt/ β -Catenina y NF κ B. Por un lado, la vía NF κ B activa mecanismos de inflamación, sistema inmune, supervivencia celular y proliferación; está activada en numerosos cánceres y juega un importante papel en la progresión del tumor por medio de la regulación de genes involucrados en proliferación, sobrevivencia, metástasis, angiogénesis y genes ligados a resistencia a drogas (54). Además, se ha reportado que la subunidad proteica hTERT interacciona con las proteínas p65 y p50 formando un complejo de activación de genes blanco, entre ellos la MMP9 (55, 56). Por otra parte, la vía de señalización de Wnt/ β -catenina regula proliferación celular, la polaridad celular, el destino celular en etapas embrionarias, adhesión, crecimiento y diferenciación celular. La proteína hTERT participa en la activación de β catenina, y ambas forman un complejo con las proteínas TCF y BGR1; este complejo activa los genes blanco, uno de ellos es la MMP7 (56, 57).

2. Antecedentes

2.1. La longitud de telómero como biomarcador de agresividad en diversos tipos de cáncer

La disfunción telomérica es un campo de investigación muy activo y cada vez hay más evidencia de que la longitud de los telómeros podría ser de utilidad como marcador biológico para la evaluación de riesgo, pronóstico de supervivencia y respuesta a tratamiento en pacientes con cáncer [58]. Sin embargo, el valor clínico del uso de la longitud de los telómeros no ha sido suficientemente validada y su utilización permanece en discusión. En los siguientes párrafos se describen algunos hallazgos sobre la relación entre la longitud de los telómeros y su significado clínico en diversos cánceres.

a) Telómeros muy cortos.- En estudios de cáncer de mama, los telómeros muy cortos son característicos de células cancerosas más agresivas y de cánceres hereditarios [59]. Marie et al. llevaron a cabo un meta-análisis de varios reportes y encontró que los individuos con telómeros más cortos tenían mucho mayor riesgo de desarrollar cáncer mostrando una alta incidencia en comparación con individuos con telómeros más largos [60]. Este incremento de riesgo ha sido confirmado en diversos cánceres, tales como: cáncer de vejiga, esófago, estómago y riñón [61]. Zhou et al. realizó un estudio en cáncer de mama y reportó que la recurrencia era más común en pacientes con telómeros muy cortos. Adicionalmente encontraron que los pacientes con telómeros más largos tenían mayor índice de supervivencia [62].

Por otra parte, Augustine et al. publicaron que las células cancerosas con los telómeros muy cortos son más susceptibles al tratamiento con el anticuerpo anti HER-2 en comparación con células con telómeros más largos. Además, encontraron que los pacientes con telómeros más largos tenían más posibilidades de supervivencia, sugiriendo que los telómeros podrían ser marcadores predictivos de respuesta al tratamiento en cánceres HER-2 (+) [63]. Otro estudio realizado por Duggan et al., reporta que la longitud de telómeros de linfocitos está relacionada

con mayores tasas de supervivencia en pacientes con cáncer. Ellos evaluaron la longitud de telómero en dos puntos, a los 6 meses y a los 30 meses después del diagnóstico con cáncer y encontraron que el acortamiento telomérico fue asociado con un aumento significativo de riesgo de muerte, sugiriendo que este parámetro podría servir como biomarcador de supervivencia [64].

b) Telómeros largos.- Existen algunas discrepancias en el reporte de telómeros largos en varios tipos de cáncer. Ko et al. reportó que, en cáncer de hígado, las células cancerosas que presentan los telómeros más largos tienen el fenotipo más agresivo, es decir, presentaron sobreexpresión de genes relacionados con invasión y metástasis [65]. En otro estudio realizado con diferentes subtipos histológicos de cáncer de pulmón, Sánchez et al, encontró que los pacientes con adenocarcinoma tienen telómeros más largos en comparación con los controles sanos. La presencia de telómeros más largos se asoció significativamente con un incremento en el riesgo de adenocarcinoma, principalmente en mujeres fumadoras <60 años [66].

En otro estudio, Anic et al. Midió la longitud de telómeros en linfocitos y células cancerosas de pacientes con melanoma maligno. Ellos reportaron que los telómeros más largos están asociados con peores pronósticos [67]. Por otro lado, Xie et al. realizaron estudios en pacientes con sarcomas de tejido blando. Ellos sugieren que la presencia de linfocitos con telómeros muy largos están fuertemente asociados con el desarrollo de este tipo de cáncer [68].

Interesantemente, los telómeros más largos generalmente están asociados con un mecanismo independiente de telomerasa (ALT, del inglés Alternative Lengthening Telomere) [69].

c) No asociación entre la longitud de telómeros y cáncer.- Hay muy pocos reportes en donde se señala que no hay una asociación entre la longitud de los telómeros y el riesgo de cáncer o su asociación con fenotipos más agresivos. Zheng et al. reportaron que después de medir la longitud de telómeros en leucocitos, no encontraron diferencias significativas entre voluntarios sanos y

pacientes con cáncer de mama [70]. Otro estudio realizado en pacientes con cáncer colorectal y de mama, reporta que los telómeros sufren acortamiento después del tratamiento, tampoco encontraron una asociación con el pronóstico [71].

2.2. Actividad de telomerasa en células cancerosas.

El 90% de cánceres presenta actividad de telomerasa (72) mientras que del 5-10% presenta mecanismos alternativos de elongación de telómeros (ALT) que son independientes de la actividad de telomerasa [69]. Hay múltiples reportes en donde se correlaciona una alta actividad de telomerasa con fenotipos más agresivos de células cancerosas en comparación con células sanas [73, 74]. El incremento es mayor en tumores con un alto grado de malignidad y estadio clínico y generalmente representa un mal pronóstico en lesiones cancerosas. Entonces es posible sugerir que existe una correlación entre la actividad de la telomerasa y la progresión del cáncer [75].

Interesantemente, se ha relacionado la presencia de la telomerasa con actividades extra-teloméricas que son independientes de la elongación y mantenimiento telomérico. Se ha propuesto que la sobreexpresión de hTERT en células no invasivas puede favorecer el desarrollo de fenotipos más agresivos y que esta enzima es suficiente para promover un incremento muy significativo en la invasión celular [76]. En otro reporte, se transfectó el gen de la telomerasa a células carentes de la enzima y se encontró que las células presentaron un aumento muy significativo de la actividad de telomerasa acompañado de elongación de telómeros y un fuerte incremento en la expresión de MMP9 y RhoC, ambas involucradas en mecanismos de invasión y metástasis [52].

El objetivo de este estudio fue analizar la posible correlación entre la longitud de telómeros, actividad de la telomerasa y la capacidad invasiva de diferentes líneas

celulares de cáncer de mama. Para cumplir con el objetivo, estudiamos tanto la longitud de telómeros como la expresión de la telomerasa, su actividad y su localización celular, correlacionando estos parámetros con experimentos de invasividad en líneas celulares de cáncer de mama.

3. Justificación

No hay estudios donde se hayan evaluado simultáneamente la longitud de telómeros, expresión proteica y actividad de telomerasa, así como su localización celular, relacionando todos estos parámetros con el grado de invasividad de las neoplasias mamarias.

Es necesario realizar estudios de estos parámetros en líneas celulares de cáncer de mama con invasividad conocida para determinar las características del fenotipo invasor.

4. Aportaciones del estudio

Este trabajo ayudará a una mejor comprensión de la relación entre la longitud de telómeros y la actividad de la telomerasa con respecto a la invasividad, con el fin de ser un posible método que ayude a complementar el diagnóstico y pronóstico en pacientes con cáncer.

5. Planteamiento del problema

¿Existe alguna relación entre la longitud de los telómeros, la actividad y expresión de la telomerasa y su localización celular con el nivel de invasividad de diferentes líneas de cáncer de mama?

6. Hipótesis

El fenotipo más invasivo podría estar relacionado con telómeros muy cortos, alta actividad de telomerasa y alta expresión de hTERT en líneas celulares de cáncer de mama.

7. Objetivos

a) General

Estudiar la longitud del telómero, la expresión y actividad de la telomerasa y su localización celular en líneas celulares de cáncer de mama con diferente grado de invasividad, para determinar la probable relación entre alteraciones del telómero y de la telomerasa con el fenotipo invasor.

b) Particulares

En las cuatro líneas celulares de cáncer de mama, MCF-7, SKBR3, T47D y MDA-MB-231:

- Medir la longitud de los telómeros mediante qPCR en tiempo real.
- Determinar la expresión de hTERT en extractos de proteínas totales mediante Western Blot.
- Cuantificar la actividad de la hTERT mediante la técnica de TRAP assay.
- Determinar la localización y presencia de la proteína hTERT mediante el uso de la técnica de inmunofluorescencia.
- Medir el grado de invasividad de las líneas celulares mediante ensayos transwell.
- Correlacionar los parámetros obtenidos de cada línea celular.
- Determinar la correlación entre la expresión de p53 wt/mut y hTERT mediante Western Blot.
- Determinar la correlación entre la expresión de hTERT y las MMPs

8. Desarrollo

8.1. Materiales y Métodos

8.1.1. Cultivo de líneas celulares

Se emplearon cuatro líneas celulares de cáncer de mama: **MCF-7** (ATCC® HTB-22™) pasaje 13, clasificada como luminal A, perfil inmunológico: Receptor de estrógenos (RE)⁺, Receptor de progestágenos (RP)^{+/-}, Receptor del factor de crecimiento epitelial (Human Epidermal Growth Factor Receptor (HER2)⁻), células tipo epitelial obtenidas de una paciente femenina con adenocarcinoma; **T47D** (ATCC® HTB-133™) pasaje 17, clasificada como luminal A, perfil inmunológico: RE⁺, RP^{+/-}, HER2⁻, células de tipo epitelial obtenida de una paciente femenina con carcinoma ductal; **SKBR3** (ATCC® HTB-30™) pasaje 15, clasificada como HER2 (+), perfil inmunológico: RE⁻, RP⁻, HER2⁺, células de tipo epitelial obtenidas de una paciente femenina con adenocarcinoma y **MDA-MB-231** (ATCC® HTB-26™), pasaje 18, clasificada como “claudin-low”, perfil inmunológico: RE⁻, RP⁻, HER2⁻, células de tipo epitelial obtenidas de una paciente femenina con adenocarcinoma. Todas fueron obtenidas de ATCC (ATCC, VA, USA) y para su crecimiento y/o su mantención se colocaron a 37°C con 5% de CO₂ con una atmósfera humidificada y se empleó el medio de cultivo DMEM F12 (Invitrogen, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) (Biowest, USA) adicionadas con una solución de antibiótico y antimicótico a 1X (Sigma-Aldrich Co, MO, USA) para su crecimiento hasta alcanzar una confluencia del 80%. Adicionalmente, se usó la línea celular **HeLa** (ATCC® CCL-2™; cáncer cervical) pasaje 30, **SW480** (ATCC® CCL-228™; cáncer de colon) y **NIH 3T3** (ATCC® CRL-1658™; fibroblastos de ratón), las cuales fueron usadas como controles; también fueron obtenidas de ATCC, cultivadas y mantenidas como se describió con anterioridad.

Adicionalmente, las cuatro líneas celulares de cáncer de mama fueron caracterizadas mediante inmunocitoquímica mediante el uso de anticuerpos anti RE, anti RP y anti HER-2 (Resultados no mostrados).

a) Procedimiento general para la realización de pases de las líneas celulares.- se usaron 1.5 mL de tripsina al 0.25% (Gibco) y se dejó durante 10 minutos a temperatura ambiente, una vez que se desprendieron las células se les añadió 2 mL de medio completo y se centrifugaron 5 minutos a 1300 rpm, se decantaron y la pastilla* se resuspendió en 2 mL de medio completo para expandirlas a nuevas botellas de cultivo, se les adicionó 5 mL de medio de cultivo por botella.

* Para el almacenamiento indefinido de las células, la pastilla correspondiente se resuspendió en 900 μ L de medio completo, se agregaron 100 μ L de dimetilsulfoxido (DMSO) (Invitrogen) y se depositaron en crio-viales (Sarstedt) e inmediatamente se congelaron a -80 °C en un ultracongelador. De ser necesario, los viales congelados se pueden transferir a nitrógeno líquido para un mejor almacenamiento (hasta 5 años).

8.1.2. Desenmascaramiento de antígeno

Se preparó un cultivo de cuatro líneas celulares MCF-7, T47D, SKBR3 y MDA-MB-231 hasta alcanzar una confluencia del 80% (Ver **Cultivo de líneas celulares**), posteriormente las células se tripsinizaron y se contaron 50,000 células empleando la cámara de Neubauer (<http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf> visitado el 25 de abril de 2016). Después se re-suspendieron en 10 mL de medio DMEM F-12 y se cultivaron sobre una nueva caja de cultivo (Sarstedt) que contenía un portaobjetos estéril cargado positivamente (Nunc) y se agitó cuidadosamente para distribuir las células en toda la caja. Se dejaron en incubación durante 24 h a 37° C y 5% de CO₂. Pasado el tiempo de incubación, se decantó el medio de la caja de cultivo y se sacaron los portaobjetos para que fueran lavados tres veces con 40 mL de PBS al 1X (**Apéndice, solución 1**) en un vaso Koplín, posteriormente se decantaron y se fijaron con 40 mL de PBS 1X-Formaldehído (Invitrogen) al 4% durante 30-40 minutos, por último, se lavaron tres

veces con PBS 1X y se dejaron secar. Las laminillas pueden ser almacenadas hasta 30 días posteriores a la fijación.

Las laminillas que se emplearon se colocaron en un vaso de Koplín y se rehidrataron con 40 mL de una solución de Triton 100X (Invitrogen)-PBS 1X al 5% durante 15 minutos, enseguida se decantaron y se lavaron tres veces con PBS 1X, luego se volvieron a decantar y se les colocaron 40 mL de en una solución precalentada de citratos (DAKO, Target Retrieval Solution, pH 9) para realizar el desenmascaramiento de antígeno, entonces las laminillas se llevaron a una olla de presión de vapor (PRINCESS) y se dejaron durante 15 minutos a 121 °C y 15 psi de presión. Después se sacaron las laminillas y se transfirieron a una nueva solución de citratos pH 9.6 a temperatura ambiente y se llevaron a refrigeración (4 °C) durante 15 minutos. Se procedió con las técnicas de inmunocitoquímica o inmunofluorescencia descritas a continuación.

8.1.3. Inmunocitoquímica. Para bloquear la actividad de peroxidasa endógena de las células fijadas en las laminillas, éstas se sumergen en 40 mL de una solución de peróxido de hidrógeno (Invitrogen) al 3% V/V durante 15 minutos, se recupera la solución y se vuelve a colocar nueva Solución A dos veces más (no se requieren enjuagues durante los bloqueos). Después del último bloqueo, se enjuagan tres veces con 40 mL de PBS 1X, se decantó y cada pocillo de las laminillas se delimitó cuidadosamente con un marcador de silicon (DAKO). Nota: se debe tener cuidado de que las muestras no se deshidraten durante el procedimiento. En cada pocillo se colocaron 200 µL suero bloqueador de proteínas (DAKO) y se dejó incubando a temperatura ambiente en una cámara húmeda de 30 minutos a 2 horas. Posteriormente se desechó el suero bloqueador y se colocaron 100 µL anticuerpo primario (la dilución de cada anticuerpo se indica en el siguiente párrafo) que se va emplear para observar su localización celular en la laminilla. Se dejó en incubación a 4 °C durante 24 horas, después se enjuagó cinco veces con 40 mL de PBS 1X en un vaso Koplín. Para la detección de la proteína problema, se usó el sistema de LSAB-HRP (DAKO), el anticuerpo secundario universal que está unido a biotina se dejó 30 min a temperatura

ambiente y enseguida se lavaron 2 veces con PBS 1X, luego se colocó avidina acoplada a peroxidasa durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavaron 2 veces. Por último, se colocaron 150 μ L de DiAmino Bencidina (DAB) (DAKO), se dejó reaccionar de 30 segundos a 2 minutos dependiendo de la intensidad de la señal deseada y la reacción se detuvo sumergiendo la laminilla en agua destilada contenida en un vaso Koplín. Posteriormente se llevó al microscopio de luz para obtener un registro fotográfico.

Los anticuerpos empleados para inmunocitoquímica fueron: anti hTERT Y182 (ABCam; Genetex), anti p53 DO-1, dilución 1:200 (Santa Cruz Technologies Inc., USA), anticuerpo policlonal de conejo anti-MMP2 dilución 1:100 (Novus Biologicals, USA), anticuerpo policlonal de ratón anti-MMP7 dilución 1:100 (Novus Biologicals), anti-MMP9 dilución 1:100 (Novus Biologicals) y anticuerpo policlonal de ratón anti-MMP14 dilución 1:200 (Novus Biologicals). Para comprobar el fenotipo RE, RP y HER-2 de las líneas celulares de cáncer de mama, se emplearon los anticuerpos de la casa comercial Bio SB y se usaron de acuerdo al instructivo de uso.

Todos los anticuerpos se diluyeron en una solución diluyente de anticuerpos (DAKO) según lo recomendado por la casa comercial, además se comprobó la dilución con la menor señal inespecífica y la óptima señal positiva. Como control negativo se usó suero no-immunizado de ratón o conejo (DAKO) en vez del anticuerpo primario.

8.1.4. Inmunofluorescencia. A las laminillas se les colocaron 200 μ L de suero bloqueador de proteínas y se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas en una cámara húmeda. Se decantaron los pocillos y se les adicionaron 100 μ L del anticuerpo correspondiente (descrito más adelante), se dejaron en incubación durante 24 horas a 4 °C. Después se decantaron y se lavaron en la caja Koplín cinco veces con 40 mL de PBS 1X, posteriormente se colocó el anticuerpo secundario FITC (isotiocianato de fluoresceína)-conjugado de cabra anti-conejo IgG Alexa Fluor® 488 (Invitrogen), se dejaron incubando 24 horas a 4 °C. Enseguida se volvieron a decantar y se lavaron cinco veces con PBS 1X, las

laminillas se montaron en VectaShield® con Dapi (Invitrogen, Vectolabs) y observaron en el microscopio de fluorescencia (Olympus AX70) equipado con un filtro de 515–560 nm y un filtro de barrera de 590 nm, y se tomó un registro fotográfico de cada laminilla.

Los anticuerpos primarios usados para esta técnica fueron: anticuerpo primario anti-hTERT 2C4 dilución 1:100 (ABCam). Como control de localización de nucléolos, se usó un anticuerpo monoclonal anti B23 (nucleofosmina) a una dilución 1:100 (Santa Cruz Biotechnology Inc.).

Ambas técnicas (inmunofluorescencia e inmunohistoquímica) se realizaron por triplicado de tres cultivos independientes y se constató que se repitiera el mismo patrón de localización en las muestras.

8.1.5. Longitud de telómeros. La longitud de telómeros fue determinada usando el método reportado por O'Callaghan (77) que consistió en una qPCR (Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa, por sus siglas en inglés, quantitative Polymerase Chain Reaction). El único cambio que realizamos fue emplear 80 ng de ADN problema. Las amplificaciones y cuantificaciones de PCR se llevaron a cabo en el aparato PCR StepOne plus (Applied Biosystems). Los resultados se reportaron como Longitud de telómeros (kpb)/ número de copias del gen normalizador (gc).

La especificidad de cada reacción se comprobó con el análisis de las curvas “melting” y se verificó que la desviación estándar no fuera mayor a 1 ct (cycle threshold) en las réplicas de cada experimento. Todos los resultados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes realizados por triplicado.

Como control positivo se usó ADN de la línea celular HeLa. Adicionalmente se usaron ADNs obtenidos de linfocitos de personas sanas como controles normales.

8.1.6. Actividad de telomerasa. La actividad de la enzima se midió usando el kit de Roche TeloTAGG telomerase PCR ELISA Plus ®, las instrucciones se

describen detalladamente en el instructivo del fabricante. Se usaron 200000 células para realizar el experimento, el conteo se hizo con la cámara de Neubauer. Las unidades se reportaron como Relative Telomerase Activity (RTA) en cada una de las líneas de cáncer de mama. Como control positivo se usó un extracto de la línea celular HeLa, como control negativo se usaron leucocitos polimorfonucleares. Cada determinación se realizó por duplicado y se hicieron tres repetidos de experimentos independientes.

8.1.7. Extracción de proteínas. El paquete celular se liso en un tubo Eppendorf de plástico de 1.5 mL y se adicionaron de 100-200 μ L de reactivo MPER (Thermo Scientific), se pipeteó varias veces y se dejó reposar 5 minutos a temperatura ambiente, luego se añadió un coctel de inhibidores de proteasas (Roche). Después se centrifugó a 13000 rpm durante 10 minutos a 4 °C y se tomó el sobrenadante, la pastilla se desechó. Los sobrenadantes se almacenaron a -20 °C por tiempo indefinido hasta que se trabajó con ellos.

8.1.8. Cuantificación de proteínas. Para la cuantificación de proteínas se utilizó la técnica de Bradford. Para ello, se usó una solución madre de Albumina Sérica Bovina (ASB), a partir de dicha solución se realizó una serie de diluciones para hacer una curva patrón de 1, 0.5, 0.25 y 0.125 mg/mL de ASB. Para la cuantificación de proteínas, las mezclas se realizaron en una placa de Elisa (Corning) y se usaron 5 μ L de solución o muestra problema + 200 μ L de reactivo de Bradford (Sigma-Aldrich) por duplicado. Como blanco se usó agua en vez de muestra problema. Se incubaron 5 minutos y se leyeron usando el elisómetro (ThermoScientific), se leyeron las muestras con un filtro de 595 nm. Se realizaron los cálculos correspondientes y se obtuvieron las concentraciones de proteínas en mg/mL.

8.1.9. PAGE SDS. Se preparó un gel PAGE SDS (del inglés, *polyacrilamide Gel Electrophoresis Soudium Doudecil Sulfate*) (Ver **Apendice, Soluciones 2**) al 8%, el gel tuvo un grosor de 1.5 mm. Se cargaron 80 μ g de extracto de proteínas

totales + 2X de Loading buffer (BioRad) por carril, se colocaron 7 μ L de marcador de peso molecular (BioRad), se procedió a hacer el corrimiento electroforético a 90V y se dejó 1 hora con 30 minutos. Posteriormente, el gel se sacó, se enjuagó con un poco de buffer de transferencia (**Apéndice, soluciones 2**), el gel se colocó en un nuevo buffer de transferencia y se procedió a hacer el sandwich* para realizar la transferencia a una membrana de nitrocelulosa o PDVF (MilliPore) (si se usa PVDF, la membrana tuvo que ser prehidratada con metanol absoluto por 1 minuto), se llenó la cámara de transferencia (BioRad) y se dejó la corriente eléctrica durante toda la noche a 15-20V en un cuarto frío. Después, se sacó la membrana y se lavó con PBS 1X dos veces (el buffer de transferencia puede ser reusado unas tres veces más), el gel de poliacrilamida se desechó. Se continuó con el método de **Western Blot**.

* El sándwich se formó de la siguiente manera: 1) sobre la rejilla de la cámara de transferencia, se colocó una esponja previamente humedecida con buffer de transferencia 2) se colocaron 2 papeles filtro gruesos (5 x 8 cm) sobre la esponja 3) encima se colocó el gel de poliacrilamida 3) luego se colocó la membrana 4) finalmente se colocaron dos papeles filtro y se puso otra esponja, la rejilla se cerró, se colocó en la cámara de transferencia y se llenó con 1 L de buffer de transferencia.

8.1.10. Western Blot para hTERT y p53. La membrana se puede usar inmediatamente después del lavado previo o se puede dejar que se seque para su posterior uso. La membrana se colocó sobre un recipiente de plástico y se incubó por 2-6 horas con 50 mL de una solución de leche descremada al 5% en PBS 1X (**Apéndice**), pasado el tiempo requerido se desechó la solución y se agregó el anticuerpo 1^{ro}* (5-7 mL de solución de leche al 5%-tween 20 al 0.3% en PBS 1X). Se dejó en incubación durante toda la noche a 4 °C con agitación suave. Posteriormente, se recuperó la solución del anticuerpo primario (se puede usar máximo tres veces si se congela a -20 °C) y la membrana se lavó cinco veces con PBS 1X-tween 20 al 0.3% (el tiempo de los lavados fue dos lavados de 5 minutos, dos de 3 minutos y uno de 1 minuto con agitación moderada). Luego se agregó el

anticuerpo secundario** (5-7 mL de solución de leche al 5%-tween 20 al 0.3% en PBS 1X) y se dejó 1-2 horas de incubación a temperatura ambiente con agitación suave. Por último, se desechó la solución del anticuerpo secundario y se volvió a lavar 5 veces como se describió anteriormente. La membrana se colocó sobre una bolsa de plástico y se llevó al cuarto oscuro usando el sistema de quimioluminiscencia de BioRad. Las placas auto radiográficas (Kodak) se expusieron durante 5 minutos. Los registros se escanearon y se digitalizaron para su posterior análisis densitométrico usando el software Alpha EaseRF 4.0. Las unidades se reportaron como unidades arbitrarias de densidad óptica (D. O.). Cada experimento se realizó por triplicado y se obtuvo de tres experimentos independientes.

Paralelamente, se usó el sistema de LI-COR Odyssey® para la obtención de registros digitales de las membranas de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las imágenes obtenidas se semi-cuantificaron usando el software AlphaEaseRC 4.0 o ImageJ y se midió la intensidad de las bandas en los registros digitales.

*Los anticuerpos primarios usados para Western Blot fueron: anti hTERT Y182 dilución 1:1000 (Genetex) y anti p53 DO1 dilución 1:2000 (Sta Cruz Technologies Inc.).

**Los anticuerpos secundarios fueron: anti mouse HRP dilución 1:10000 (Sta Cruz Technologies), anti rabbit HRP dilución 1:10000 (Sta Cruz Technologies). Todos los anticuerpos se usaron de acuerdo a lo indicado por el fabricante y se obtuvieron las concentraciones óptimas para obtener la mejor señal específica y la más baja señal de fondo.

8.1.11. Invasión. Para medir la capacidad invasora de las líneas celulares se usaron las cámaras de invasión Corning Biocoat Matrigel Invasion Chamber ® (Corning) y las cámaras control que no contienen matrigel (Corning). El método se hizo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Pagina web: <http://corning-ls.jp/faq/pdf/v91svb0000002u3s-att/v91svb0000002u7x.pdf>). Se requirieron de 5×10^4 células por pocillo, previamente éstas habían sido incubadas a 37 °C (se

habían dejado en medio de cultivo DMEM F-12 con 0.3% de SFB durante 16 a 24 horas para posteriormente realizar los experimentos de invasión). Las fotos fueron tomadas en un microscopio inverso AxioVert 40CFL a 400X. Para el cálculo, se obtuvo el promedio de 5 campos al azar en las cámaras de invasión (cámaras con matrigel) (A) y en las cámaras control (cámaras sin matrigel) (B), obtenidos los conteos celulares, ambos valores se dividieron (A)/(B) y se multiplicó por 100 para obtener el resultado (porcentaje (%)) relativo de células invasoras). Cada experimento se realizó por duplicado y se hizo en tres experimentos independientes

8.1.12. Análisis estadístico. Todos los datos cuantitativos se analizaron por *t de Student* con la ayuda del software Graphpad Prism 5.0. Se consideró estadísticamente significativo cuando el valor de *p* fue menor de 0.05. Todos los cálculos fueron realizados usando la línea celular de cáncer de mama MCF-7 como referencia.

9. Resultados

9.1. Las líneas celulares de cáncer de mama con mayor invasión fueron T47D y MDA-MB-231. Para medir la capacidad invasora de las líneas celulares, se empleó un método *in vitro* como se describe en **Materiales y Métodos** (Fig. 1). La línea celular MCF-7 tuvo un porcentaje promedio de células invasoras de 6.83 ± 1.33 , SKBR3 tuvo 4.63 ± 1.2 , T47D presentó 37.9 ± 2.59 y MDA-MB-231 87.55 ± 3.02 . La invasividad (porcentaje de células invasivas) fue significativamente más elevada en T47D ($p < 0.01$) y MDA-MB-231 ($p < 0.001$), en comparación con las líneas celulares MCF-7 y SKBR3.

9.2. Las líneas celulares con mayor invasividad tienen los telómeros más cortos. El promedio de la longitud de telómeros (kpb) de cada línea celular fue medido como es indicado en la sección de **Material y Métodos** (Fig. 2). La línea celular MCF-7 presentó los telómeros más largos (16.48 ± 2.49 kpb/gc), mientras que la MDA-MB-231 tuvo los telómeros más cortos (1.99 ± 1.56 kpb/gc, $p < 0.001$). La longitud de telómeros en SKBR3 y T47D fue de: (7.44 ± 3.12 kpb/ gc, $p < 0.05$) y (5.52 ± 0.74 kpb/gc, $p < 0.01$), respectivamente. Estos resultados demuestran que las líneas celulares con fenotipos muy invasivos tienen los telómeros más cortos en comparación con las de menor invasión.

9.3. Expresión de telomerasa y su actividad. Los niveles proteicos de hTERT de las líneas celulares fueron medidos usando Western Blot. Se encontró que SKBR3 ($p < 0.01$) tenía los niveles más altos de expresión de hTERT. MDA-MB-231 ($p < 0.01$) tuvo los más bajos niveles, mientras que MCF-7 y T47D ($p > 0.05$) tuvieron niveles intermedios. Estos niveles sugieren que no hay relación entre la expresión proteica de hTERT con su invasividad ya que no se observó un patrón definido en los resultados (Figs. 3A y 3B).

Con respecto a la actividad de telomerasa (RTA), esta fue muy baja en MCF-7 (723.9 ± 108.5), mientras que los niveles más elevados de RTA fueron observados

en SKBR3 (4530 ± 1226). T47D, también presentó niveles elevados de RTA (4463 ± 388.6), seguido por MDA-MB-231 (3477 ± 392.3) (Fig. 3C)

Como se mencionó con anterioridad, debido a que los niveles de proteína hTERT fueron muy heterogéneos en las líneas celulares de cáncer de mama, se determinó la actividad específica de telomerasa de cada línea celular, se obtuvo la relación RTA/DO, es decir, la relación entre la actividad relativa de telomerasa y la cantidad relativa de proteína hTERT (DO). MCF-7 y SKBR3 (baja invasividad) tuvieron la más baja actividad específica de telomerasa (813 RTA/DO y 2,960 RTA/DO, respectivamente), T47D (mediana invasividad) presentó niveles intermedios de actividad específica de telomerasa (4,230 RTA/DO) y MDA-MB-231 (alta invasividad) tuvo los niveles más altos (13,852 RTA/DO) (Fig. 3D). Estos resultados sugieren una fuerte asociación entre altos niveles de actividad específica de telomerasa con fenotipos más invasivos.

9.4. Localización celular de la proteína hTERT. La localización intracelular de hTERT fue evidenciada por inmunofluorescencia indirecta (Fig. 4), fue observada en el núcleo celular de las cuatro líneas celulares de cáncer de mama, pero con marcadas diferencias en su distribución intranuclear. En MCF-7, hTERT está principalmente localizada en los nucléolos, mientras que en MDA-MB-231 estaba localizada mayoritariamente en el núcleo, sin embargo, también presentó una ligera señal en nucléolos. En T47D, hTERT estaba homogéneamente distribuida en todo el núcleo y nucléolo mientras que en SKBR3, se encontró mayoritariamente cerca de la membrana nuclear. La localización de la proteína hTERT fue consistente y característica de cada línea celular de cáncer de mama, y su localización sugiere una asociación con sus niveles de actividad de telomerasa.

9.5. Expresión proteica de p53 en líneas celulares de cáncer de mama. Para medir los niveles proteicos de p53, se realizó un análisis de Western Blot (Fig. 5A) de lisados celulares de cada línea celular. Los niveles más bajos de p53 se encontraron en MCF-7, mientras que los más altos fueron encontrados en MDA-MB-231 ($p < 0.01$). T47D ($p < 0.05$) y SKBR3 ($p < 0.05$) presentaron valores intermedios de expresión de p53 (Fig. 5B). Con excepción de MCF-7 que expresa p53 wild-type, las demás líneas celulares expresan p53 mutada. SKBR3 expresa la mutación p53-R175H, T47D tiene p53-L194F y MDA-MB-231, p53-R280K [78]. Los resultados sugieren que la mutante R175H tiene un efecto sobre la expresión de hTERT, por otro lado, el efecto de la expresión de la mutante L194F no es claro; por último, solo R280K parece tener un efecto represor sobre la expresión de hTERT (Fig. 5C).

9.6. La sobreexpresión simultánea de MMP2 y MMP7 está asociada con fenotipos altamente invasivos. Se analizó la expresión de algunas metaloproteasas (MMPs) en las cuatro líneas celulares con el fin de encontrar una posible asociación con su invasividad. Los estudios de inmunocitoquímica de las MMPs (Fig. 6) mostraron que sus niveles de expresión varían en cada línea celular de cáncer de mama. La MMP9 está altamente sobreexpresada en todas las líneas celulares mientras que la MMP14 está altamente expresada solo en MCF-7 y SKBR3. La expresión de MMP2 y MMP7 fue baja en MCF-7, SKBR3 y T47D; en contraste, estas fueron consistentemente sobreexpresadas en la línea celular MDA-MB-231 que posee alta capacidad invasora.

10. Discusión

Aunque la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa han sido estudiados independientemente en líneas celulares de cáncer [79-81], la correlación entre estos dos parámetros y la invasividad no se han estudiado conjuntamente. En el presente trabajo, se estudió la posible asociación de la invasividad con la longitud de telómeros, la actividad de la telomerasa, los niveles proteicos de telomerasa y su localización intracelular, para esto, se emplearon cuatro diferentes líneas de cáncer de mama con diferentes grados de invasión.

Se encontró que los telómeros muy cortos son consistentes y característicos de fenotipos más invasivos en líneas celulares de cáncer de mama. De manera similar, aunque con algunas diferencias en la metodología y el tipo de muestra, Kammori et al, empleó la técnica de Q-FISH (del inglés, quantitative Fluorescence in situ Hybridization) para medir la longitud de los telómeros en pacientes con cáncer de mama [82], ellos encontraron una correlación entre telómeros muy cortos y cánceres más agresivos, además de que estos presentaron una rápida progresión. Los telómeros muy cortos y su asociación con fenotipos más invasivos, podrían ser explicados parcialmente, por la activación de la telomerasa como respuesta al acortamiento telomérico. Un acortamiento crítico de los telómeros induce la disfunción telomérica y genera inestabilidad cromosómica [59], llevando a la delección de genes supresores de tumor y/o a la duplicación de oncogenes, este escenario podría ser una de las causas de la aparición de fenotipos altamente agresivos en células cancerosas [83].

Por otro lado, se encontró que los niveles proteicos de hTERT expresados en las líneas de cáncer de mama no están directamente relacionados con el grado de invasividad ya que se observó un patrón heterogéneo en los niveles proteicos de hTERT. Además, se encontró que los niveles proteicos no siempre tienen asociación con los niveles de actividad de telomerasa, tal es el caso de la línea

celular MDA-MB-231, que presentó poca proteína y sin embargo tiene los niveles más altos de actividad específica de telomerasa. Se ha reportado que la telomerasa no solo está relacionada con elongamiento telomérico, también presenta diversas actividades extra-teloméricas que están involucradas en la sobrevivencia de células cancerosas y/o su grado de agresividad [84]. Nuestros hallazgos no coinciden con lo encontrado por Yu et al. and Che et al. quienes estudiaron la transfección del gen *htert* en líneas celulares cancerosas no-invasivas, ellos sugieren que la proteína hTERT está involucrada en el desarrollo de fenotipos más invasivos a través de funciones extra-teloméricas [52, 76].

Con respecto a la actividad de telomerasa, encontramos que una alta actividad específica de la telomerasa está asociada con fenotipos más invasivos de líneas celulares de cáncer de mama. Nuestros hallazgos coinciden con lo reportado con Kulic et al., quienes estudiaron la actividad de telomerasa en tejidos de pacientes con cáncer de mama [85]. Interesantemente, se encontró que aun cuando MDA-MB-231 tiene la más baja expresión de hTERT, esta mostró los niveles más altos de actividad específica de telomerasa. En contraste, MCF-7 presentó expresión moderada de hTERT, pero su actividad específica de telomerasa fue la más baja. Se sugiere que la actividad específica de la telomerasa no siempre está directamente relacionada con sus niveles proteicos. Una actividad específica de telomerasa más elevada podría explicarse por la presencia de otros factores celulares tales como: modificaciones post transcripcionales y cambios moleculares en la proteína hTERT (por ej., fosforilación, mutaciones) [86], también se ha reportado que concentraciones altas de dGTP en las células cancerosas incrementan la actividad de la telomerasa (aunque el mecanismo molecular no ha sido dilucidado) [87] y/o a alteraciones en los patrones de localización de la proteína hTERT debido a mutaciones en la enzima [88].

Otro hallazgo importante en el presente trabajo fue que, se encontró una fuerte correlación entre la localización de hTERT y la actividad específica de telomerasa.

Encontramos que cuando la enzima está localizada en el nucléolo, ésta presenta una baja actividad específica y cuando es localizada uniformemente en el núcleo (como en T47D y MDA-MB-231), está asociada a los más altos niveles de actividad. Nuestros hallazgos también sugieren que la proximidad de hTERT a la membrana nuclear, como es observado en SKBR3, podría estar asociada a la inactivación de la telomerasa. Las diferencias en la localización intracelular de hTERT podrían ser muy importantes y podrían estar asociadas con los mecanismos de ensamblaje de la enzima, que pudieran tener un impacto directo sobre los niveles de actividad de telomerasa. Sin embargo, no se conocen los mecanismos precisos que influyen en la localización de hTERT involucrados en su activación; se sabe que la subunidad hTERT se almacena en el nucléolo y permanece de forma inactiva, posteriormente se activa hasta que su contraparte TERC se localiza en los nucléolos y se asocia con hTERT formando la enzima completa, entonces son transportadas hacia los telómeros donde ejerce su actividad biológica [89].

Una característica común en células cancerosas, es la expresión de mutantes de p53 [90]. En el presente trabajo se estudió la expresión proteica de p53 en las líneas celulares de cáncer de mama para analizar la correlación con los niveles proteicos de hTERT. Se ha reportado que p53 wild-type ayuda a regular negativamente la expresión del mensajero de ARN de hTERT mediante el bloqueo de su promotor, además tiene un efecto supresor sobre la actividad de la telomerasa. Contrariamente, las proteínas p53 mutadas (que tienen un tiempo de vida media más prolongado con respecto a p53 wild-type [91]) podrían contribuir a la sobreexpresión y activación de hTERT a través de un efecto de “gain-of-function” que favorecería el progreso del cáncer [35, 53]. Se encontró que la mutante de p53 R280K en la línea celular MDA-MB-231 fue la más elevada. Nuestros hallazgos son congruentes con lo reportado en estudios previos donde MCF-7 (p53 wild-type) tuvo los niveles más bajos de hTERT y más baja actividad de telomerasa, mientras que SKBR3, que expresa la mutante p53 R175H mostró sobreexpresión de hTERT [35]. De acuerdo a nuestros resultados, la mutante p53

R280K expresada en MDA-MB-231 podría estar asociada a la reducción de los niveles proteicos hTERT, pero parece no afectar los niveles de actividad de telomerasa (Ver Fig. 5). No está claro, cual podría ser el efecto de la mutante p53 L194F (T47D) sobre la expresión y actividad de la telomerasa. Se requerirán de más estudios que ayuden a confirmar el efecto represor y/o activador de las mutantes L194F y R280K sobre los niveles proteicos de hTERT.

Dentro de las actividades extra-teloméricas que se han reportado de la subunidad hTERT, está incrementa indirectamente la expresión de MMPs en células cancerosas. En el presente trabajo, se encontró que las MMP2 y MPP7 están sobreexpresadas en fenotipos altamente invasivos de líneas de cáncer de mama; interesantemente también éstas líneas celulares poseen altos niveles de actividad específica de telomerasa mientras que, en los fenotipos menos invasivos la MMP7 y MPP9 presentan baja expresión (MCF-7 y SKBR-3). Esto sugiere que la sobreexpresión de algunas MMPs correlaciona con dos características, alta actividad específica de telomerasa y alta capacidad invasora. Cabe señalar que no solo las MMPs son responsables de la degradación de la matriz extracelular, es necesario ampliar el estudio y analizar la expresión y actividad de otras enzimas (catepsinas, serinproteasas) y factores estromales involucrados en la invasividad de las células cancerosas [55]. Los resultados también indican que al menos algunos de los cambios que llevan a fenotipos más invasivos son debido a la sobreexpresión de MMPs específicas [92]. Además, los hallazgos del presente trabajo, coinciden con lo reportado por Ding et al., quienes propone que la sobreexpresión de MMPs es una consecuencia de las actividades extra-teloméricas de hTERT y en consecuencia las células cancerosas adquieren fenotipos más invasivos [93]. Similarmente a lo encontrado con la localización de hTERT, cada línea de cáncer de mama tiene un patrón de MMPs característico de localización, no se conoce el efecto que tiene la presencia de las MMPs en núcleo celular, mientras que su presencia en citoplasma está correlacionada con fenotipos más agresivos de cáncer [94].

11. Conclusiones

En resumen, se encontró que las líneas de cáncer de mama con alto grado de invasividad tienen los telómeros más cortos y tienen muy alta actividad de telomerasa. Con respecto a la localización celular de hTERT, se observó que la localización nuclear, preferentemente en telómeros y/o cromosomas, tiene una fuerte asociación con una alta actividad específica de telomerasa, como se mostró en la línea celular MDA-MB-231. Alternativamente, cuando hTERT es observada en nucléolos, como en MCF-7, su actividad es baja. Además, se encontró que la sobreexpresión de la MMP2 y MMP7 se correlaciona con el fenotipo más invasivo, sin tener relación directa con los niveles de hTERT.

Se sugiere que la longitud de los telómeros junto con la actividad de telomerasa y su localización, son parámetros que podrían ser útiles como biomarcadores para la evaluación de la invasividad de células cancerosas. Serán necesarios más estudios para confirmar la importancia de la localización de hTERT como un indicador de la actividad de la telomerasa.

12. Perspectivas

Corroborar y comparar los resultados obtenidos en el presente trabajo con estudios clínicos en pacientes con cáncer de mama clasificados con diferentes grados de progresión y su correlacionan con el grado de invasión.

Estudiar la asociación entre la localización de la telomerasa con su actividad tanto en muestras de tejido como en otras líneas celulares de cáncer de mama.

Estudiar el efecto de los diferentes tipos de p53 mutado sobre la expresión proteica de hTERT mediante transfección transitoria de los genes mutados.

Agradecimientos

Los autores agradecen a la Dra. Blanca Olivia Murillo Ortiz del IMSS Unidad Médica de Alta Especialidad #1 León, México, por su apoyo en la medición de longitud de telómeros. Al Dr. Enrique Pérez Cárdenas del Instituto Nacional de Cancerología, SSA, México, por su apoyo en la realización de los experimentos en cámaras de invasión y a la Dra. Carmen Mora Villalpando del IMSS Centro Médico Nacional Siglo XXI, México, por sus consejos y análisis en la realización de los experimentos con qPCR Tiempo Real para la medición de telómeros.

Referencias bibliográficas

1. Globocan 2012, <http://globocan.iarc.fr>. Ultimo acceso 16 enero 2016.
2. Organización Panamericana de la Salud [OPS]. 2014. La OPS observa el mes de concientización sobre el cáncer de mama. Recuperado el 2 de septiembre de 2015, de: http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=10087&Itemid=40591&lang=es.
3. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol* 2014; 5(3): 382-392.
4. Ferguson LR, Chen H, Collins AR. Genomic instability in human cancer: Molecular insights and opportunities for therapeutic attack and prevention through diet and nutrition. *Semin Cancer Biol.* 2015 Dec;35 Suppl: S5-24.
5. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350: 569-72.
6. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458–460.
7. Rhodes D. Chapter 11. The structural biology of telomeres, in: de Lange T, Lundblad V, Blackburn E (ed.), *Telomeres (second ed.)*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY, 2006; 317-343.
8. Verdun RE, Karlseder J. Replication and protection of telomeres. *Nature* 2007; 447: 934-31.
9. De Lange T. How Telomeres Solve the End-Protection Problem. *Science.* 2009;326(5955):948.
10. Hayflick L. The limited in vitro time of human diploid cell strains. *Exp Cell Res* 1965; 37: 614-636.
11. Shay JW and Wright WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005; 26: 867-874.
12. Dong K, Masutomi K, Hahn C. Telomerase: regulation, function and transformation. *Crit Rev Oncol Hemat* 2005; 54: 85–93.

13. Wright WE, Pereira-Smith OM, Shay JW. Reversible cellular senescence: implications for immortalization of normal human diploid fibroblasts. *Mol Cell Biol* 1989; 9:3088–92.
14. Harley CB. Telomere loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256:271–82.
15. Wright WE, Shay JW. The two-stage mechanism controlling cellular senescence and immortalization. *Exp. Gerontol* 1992; 27(4):383-9.
16. Jerry WS, Woodring WE. Senescence and immortalization: role of telomeres and telomerase. *Carcinogenesis* 2005; 26: 5 :867-874
17. De Lange T. Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres. *Genes Dev* 2005; 19: 2100–10.
18. Zhong Z, Shiue L, Kaplan S, De Lange T. A mammalian factor that binds telomeric ttaggg repeats in vitro. *Mol Cell Biol* 1992; 12:4834–43.
19. Bianchi A, Stansel RM, Fairall L, Griffith JD, Rhodes D, De Lange T. Trf1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility. *Embo J* 1999; 18:5735–44.
20. Hanaoka S, Nagadoi A, Nishimura Y. Comparison between trf2 and trf1 of their telomeric DNA-bound structures and DNA-binding activities. *Protein Sci* 2005; 14:119–30.
21. Iwano T, Tachibana M, Reth M, Shinkai Y. Importance of trf1 for functional telomere structure. *J Biol Chem* 2004; 279:1442–48.
22. Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN et al. Pot1-interacting protein pip1: A telomere length regulator that recruits pot1 to the tin2/trf1 complex. *Genes Dev* 2004; 18:1649–54.
23. Ye JZ, De Lange T. Tin2 is a tankyrase 1 parp modulator in the trf1 telomere length control complex. *Nat Genet* 2004; 36:618–23.
24. Houghtaling BR, Cuttonaro L, Chang W, Smith S. A dynamic molecular link between the telomere length regulator trf1 and the chromosome end protector trf2. *Curr Biol* 2004; 14:1621–31.

25. Ye JZ, Hockemeyer D, Krutchinsky AN et al. Pot1-interacting protein pip1: A telomere length regulator that recruits pot1 to the tin2/trf1 complex. *Genes Dev* 2004; 18:1649–54.
26. Hockemeyer D, Palm W, Else T, et al. Telomere protection by mammalian pot1 requires interaction with tpp1. *Nat Struct Mol Biol* 2007; 14:754–61.
27. Loayza D, De Lange T. Pot1 as a terminal transducer of trf1 telomere length control. *Nature* 2003; 424:1013–18.
28. Martinez P, Thanasoula M, Carlos AR, et al. Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites. *Nat Cell Biol* 2010; 12: 768-80.
29. Lazzerini Denchi E, De Lange T. Protection of telomeres through independent control of atm and atr by trf2 and pot1. *Nature* 2007; 448:1068–71.
30. De Lange T. T-loops and the origin of telomeres. *Nature Rev Mol Cell Biol* 2004; 5: 323–29.
31. Griffith JD, Comeau L, Rosenfield S, et al. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999; 97: 503–14.
32. Feng J, Funk WD, Wang SS, et al. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995; 269:1236–41.
33. Li H, Cao Y, Berndt MC, et al. Molecular interactions between telomerase and the tumor suppressor protein p53 in vitro. *Oncogene*. 1999;18(48):6785-94.
34. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon GJ. Myc activates telomerase. *Genes Dev* 1998; 12:1769–74.
35. Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild-type p53 in human tumor cells. *Oncogene* 2000; 19(45): 5123-33.
36. Gunes C, Lichtsteiner S, Vasserot AP, Englert C. Expression of the hTERT gene is regulated at the level of transcriptional initiation and repressed by Mad1. *Cancer Res* 2000; 60:2116–21

37. Kyo S, Takakura M, Kanaya T, et al. Estrogen activates telomerase. *Cancer Res* 1999; 59:5917–21.
38. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996; 380:79–82.
39. Cassar L, Nicholls C, Pinto AR, et al. Bone morphogenetic protein-7 induces telomerase inhibition, telomere shortening, breast cancer cell senescence, and death via Smad3, *FASEB J.* 2009; 23: 1880–1892.
40. Goueli BS, Janknecht R. Upregulation of the catalytic telomerase subunit by the transcription factor ER81 and oncogenic HER2/Neu, Ras, or Raf. *Mol Cell Biol* 2004; 24:25–35.
41. Crowe, D. L., and D. C. Nguyen. Rb and E2F-1 regulate telomerase activity in human cancer cells. *Biochim. Biophys. Acta* 2001; 1518:1–6.
42. Cusanelli E, Romero CA, Chartrand P. Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol Cell.* 2013 ;51(6):780-91.
43. Rippe K, Luke B. TERRA and the state of the telomere. *Nat Struct Mol Biol.* 2015; 22(11): 853-8.
44. Murnane P, Telomere dysfunction and chromosome instability. *Mutat Res.* 2012; 730(1-2): 28–36.
45. Bunting SF, Nussenzweig A. End-joining, translocations and cancer. *Nat Rev Cancer* 2013; 13(7):443-54.
46. Sabatier L, Ricoul M, Pottier G, Murnane JP. The loss of a single telomere can result in instability of multiple chromosomes in a human tumor cell line. *Mol Cancer Res* 2005; 3: 139-50.
47. Xu L, Li S, Stohr BA. The role of telomere biology in cancer. *Annu Rev Pathol* 2013; 8: 49-78.
48. Davoli T, Denchi EL, de Lange T. Persistent telomere damage induces bypass of mitosis and tetraploidy. *Cell* 2010; 141:81–93
49. Ding Z, Wu CJ, Jaskelioff M, Ivanova E, et al. Telomerase reactivation following telomere dysfunction yields murine prostate tumors with bone metastases. *Cell* 2012; 148:896–907

50. Saretzki G. Extra-telomeric functions of human telomerase. Cancer, mitochondria and oxidative stress. *Curr Pharm Des* 2014; 20:6386-6403.
51. Maida Y, Masutomi K. Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. *Cancer Sci.* 2015; 106(11): 1486-1492.
52. Chen PC, Peng JR, Huang L, et al. Overexpression of human telomerase reverse transcriptase promotes the motility and invasiveness of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep* 2013; 30: 1157-64.
53. Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N and Ravi Sankar B. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers* 2013; 34(6): 395-405.
54. Karin, M. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature* 2006; 441, 431–436.
55. Ding D, Xi P, Zhou J, et al. Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF-κB-dependent transcription. *FASEB J.* 2013; 27(11): 4375-83.
56. Zhou J, Ding D, Wang M, Cong YS. Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression. *BMB Rep.* 2014; 47(1): 8-14.
57. Zhang Y, Toh L, Lau P, Wang X. Human Telomerase Reverse Transcriptase (*hTERT*) Is a Novel Target of the Wnt/β-Catenin Pathway in Human Cancer. *J Biol Chem* 2012;287(39):32494-32511.
58. Heaphy CM, Meeker AK. The potential utility of telomere-related markers for cancer diagnosis. *J Cell Mol Med* 2011; 15: 1227-38.
59. Martinez-Delgado B, Gallardo M, Tanic M, et al. Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 141: 231-42.
60. Ma H, Zhou Z, Wei S, Liu Z, et al. Shortened telomere length is associated with increased risk of cancer: a meta-analysis. *PLoS ONE* 6 2001; 6.
61. Wentzensen I, Mirabello L, Pfeiffer M, Savagel A. The association of telomere length and cancer: a meta-analysis. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011; 20: 1238–1250.

62. Zhou X, Meeker AK, Makambi KH, et al. Telomere length variation in normal epithelial cells adjacent to tumor: potential biomarker for breast cancer local recurrence. *Carcinogenesis* 2012; 33: 113-118.
63. Augustine TA, Baig M, Sood A, et al. Telomere length is a novel predictive biomarker of sensitivity to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015; 112: 313-8.
64. Duggan C, Risques R, Alfano C, et al. Change in peripheral blood leukocyte telomere length and mortality in breast cancer survivors. *J Natl Cancer Inst* 2014; 106(4).
65. Ko E, Jung G. Positive association of long telomeres with the invasive capacity of hepatocellular carcinoma cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 447: 358-63.
66. Sanchez-Espiridon B, Chen M, Chang JY, et al. Telomere Length in Peripheral Blood Leukocytes and Lung Cancer Risk: A Large Case–Control Study in Caucasians. *Cancer Res* 2014; 74: 2476-86.
67. Anic GM, Sondak VK, Messina JL, et al. Telomere length and risk of melanoma, squamous cell carcinoma, and basal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol* 2014; 37: 434-9.
68. Xie H, Wu X, Wang S, et al. Long telomeres in peripheral blood leukocytes are associated with an increased risk of soft tissue sarcoma. *Cancer* 2013; 119: 1885-91.
69. Cesare AJ, Reddel RR. Alternative lengthening of telomeres: models, mechanisms and implications. *Nat Rev Genet* 2010; 11(5):319-30.
70. Zheng YL, Ambrosone C, Byrne C, et al. Telomere length in blood cells and breast cancer risk: investigations in two case-control studies. *Breast Cancer Res Treat* 2010; 120: 769-75.
71. Pooley KA, Sandhu MS, Tyrer J, et al. Telomere length in prospective and retrospective cancer case-control studies. *Cancer Res* 2010; 70: 3170-6.
72. Kyo S, Inoue M. Complex regulatory mechanisms of telomerase activity in normal and cancer cells: how can we apply them for cancer therapy? *Oncogene*. 2002. 21(4):688-97.

73. Glybochko PV, Zezerov EG, Glukhov AI, et al. Telomerase as a tumor marker in diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Prostate* 2014; 74: 1043-51.
74. Holysz H, Lipinska N, Paszel-Jaworska A, Rubis B Telomerase as a useful target in cancer fighting-the breast cancer case. *Tumour Biol* 2013; 34:1371-80.
75. Gu H, Xin X, Pan Y, et al. Telomerase activity as a marker for differential diagnosis of pancreatic adenocarcinoma: a systematic review and meta-analysis. *Int J Biol Markers* 2015.
76. Yu ST, Chen L, Wang HJ, Tang XD, Fang DC, Yang SM. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells *in vitro*. *Int J Oncol* 2009; 35: 329-36.
77. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Bio Proced Online* 2011; 13: 3.
78. Soussi T, Rubio-Nevedo JM, Hamroun D and Bérout C. The p53 mutation handbook. Available online: <http://p53.free.fr>. Ultimo acceso 17 Julio 2015.
79. Jeon BG, Kumar BM, Kang EJ, Ock SA, Lee SL, Kwack DO, et al. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell Tissue Res* 2011; 345(1): 149-61.
80. Motevalli A, Yasaei H, Virmouni SA, Slijepcevic P, Roberts T. The effect of chemotherapeutic agents on telomere length maintenance in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat* 2014; 145(3): 581-91.
81. Sakin V, Eskiocak U, Kars MD, Iseri OD, Gunduz U. hTERT gene expression levels and telomerase activity in drug resistant MCF-7 cells. *Exp Oncol* 2008; 30(3): 202-05.
82. Kammori M, Sugishita Y, Okamoto T, Kobayashi M, Yamazaki K, Yamada E, et al. Telomere shortening in breast cancer correlates with the pathological features of tumor progression. *Oncol Rep* 2015; 34(2): 627-32.

83. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: Protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010; 11: 171-81.
84. Jaiswal RK, Kumar P and Yadava PK. Telomerase and its extracurricular activities. *Cell Mol Biol Lett* 2013; 18(4): 538-54.
85. Kulić A, Plavetić ND, Gamulin S, et al. Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Med Oncol*. 2016 33(3):23.
86. Jeong SA, Kim K, Lee JH, Cha JS, Khadka P, Cho HS, Chung IK. Akt-mediated phosphorylation increases the binding affinity of hTERT for importin α to promote nuclear translocation. *J Cell Sci* 2015; 128(12): 2287-2301.
87. Gupta A, Sharma S, Reichenbach P, Marjavaara L, Nilsson AK, Lingner J, et al. Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. *Genetics* 2013; 193(4): 1095-1105.
88. Chung J, Khadka P, Chung IK. Nuclear import of hTERT requires a bipartite nuclear localization signal and Akt-mediated phosphorylation. *J Cell Sci*. 2012; 125(Pt 11):2684-97.
89. Podlevsky JD, Chen JJ. It all comes together at the ends: Telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat Res* 2012; 730(1-2): 3-11.
90. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013; 502: 333-39.
91. Lukashchuk N, Vousden KH. Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol* 2007; 27(23): 8284-95.
92. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature* 2015; 525(7568): 206-11.
93. Eiró N, Fernandez-Garcia B, González LO, Vizoso FJ. Clinical Relevance of Matrix Metalloproteases and their Inhibitors in Breast Cancer. *J Carcinogene Mutagene* 2013; S13: 004.

94. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases.
Prog Histochem Cytochem 2012; 47(1): 27-58.

Lista de Abreviaturas

DO	Densidad Óptica
Kpb	Kilopares de base
hTERT	human Telomerase reverse transcriptase
Gc	Gene copy number
hTERC	human Telomerase RNA Component
PBS	Phosphate-buffered Saline
RTA	Relative Telomerase Activity
TBE	Tris-Borate EDTA buffer

Apéndice

Solución 1

PBS 10X

25.6 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$

80 g NaCl

2 g KCl

2 g KH_2PO_4

Aforarlo a un litro con agua destilada. Si se desea, se puede usar autoclave por 40 minutos a 121°C.

Soluciones 2 (PAGE SDS)

1) Acrilamida al 30% (29:1)

Agregar 29.22 g de acrilamida y 0.78 g de bis acrilamida a 100 mL de agua destilada. Disolver completamente y filtrar con papel filtro Whatman No. 4. Guardarlo a 4 °C y preparar nueva solución fresca cada mes.

2) Stacking gel buffer (4X)

0.5 M Tris base-HCl

Disolver 6.05 g de Tris base en 85 mL de H_2O destilada. Ajustar el pH a 6.8 con HCl concentración 6 M. Agregar H_2O destilada para aforar a 100 mL. Guardar el buffer a 4°C.

3) Resolving gel buffer (4X)

1.5 M Tris-Cl at pH 8.8

Disolver 18.15 g de Tris base en 850 mL de H₂O destilada y ajustar el pH a 8.8 con HCl 6 M. Aforar a 1000 mL y guardar a 4°C.

4) 4X SDS-PAGE loading buffer

200 mM Tris-Cl (pH 6.8)

400 mM DTT

8% SDS

0.4% Azul de bromofenol

40% glicerol

5) Geles de poliacrilamida

Para mayores detalles, consultar

<http://www.assay-protocol.com/molecular-biology/electrophoresis/denaturing-page>

Ultimo acceso 25 abril de 2016

6) Running Buffer 10X.

35 mM SDS (10.08 g)

250 mM Tris (30.3 g)

1,92 M glicine (144g)

Volúmenes para hacer 1L. Diluir a 1X antes de usar.

7) Transfer buffer

25 mM Tris (3.03 g)

192 mM glicine (14.4g)

A 800 mL agregar 200 mL de metanol al 100%. Mantener a 4 °C.

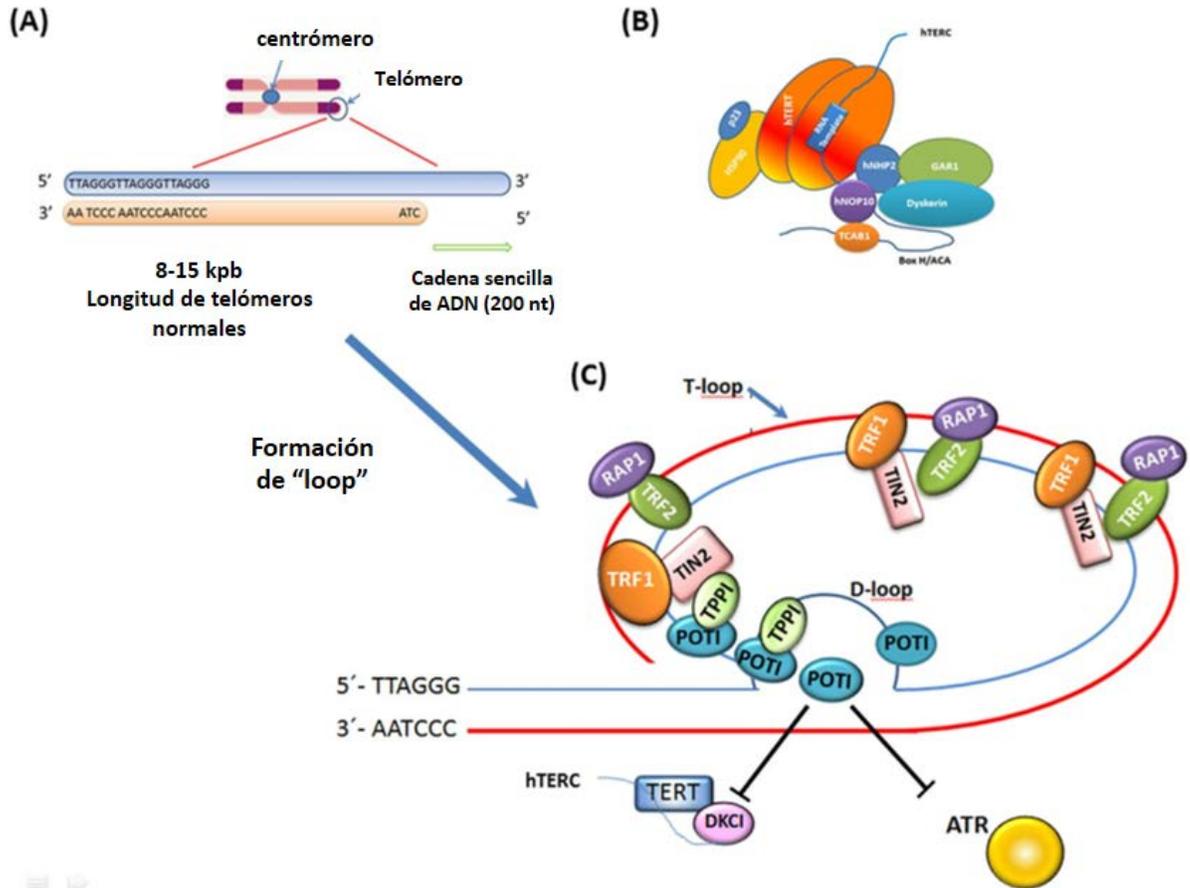
8) Leche 5% Tween 20 (Bloqueador de proteínas y diluyente de anticuerpo primario)

Agregar 5 g de leche en polvo *Svelty*® a 100 mL de PBS 1X/0.3% tween 20

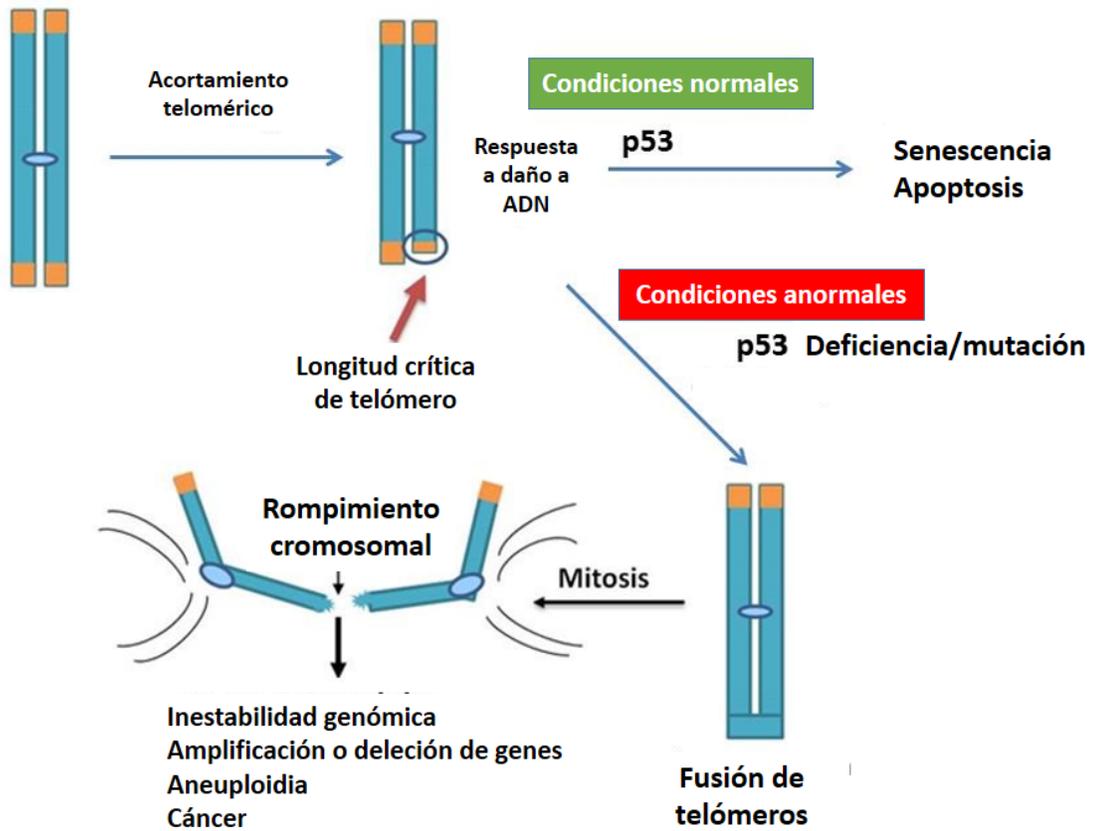
Para el diluyente del anticuerpo secundario se usa una concentración del 1% de leche.

.

Lista de Figuras



Esquema 1. Esquema representativo de los telómeros y la telomerasa. (A) Esquema de la enzima completa de hTERT **(B)** Esquema de la estructura clásica de los telómeros en los cromosomas **(C)** Esquema del complejo de shelterina asociado a los telómeros, además se muestra las estructuras T-loop y D-loop que adquieren los telómeros funcionales.



Esquema 2. Inestabilidad genómica. La disfunción telomérica es consecuencia de telómeros muy cortos aunado con mecanismos de control de ciclo celular dañados o comprometidos, como consecuencia, las células cancerosas adquieren fenotipos más agresivos.

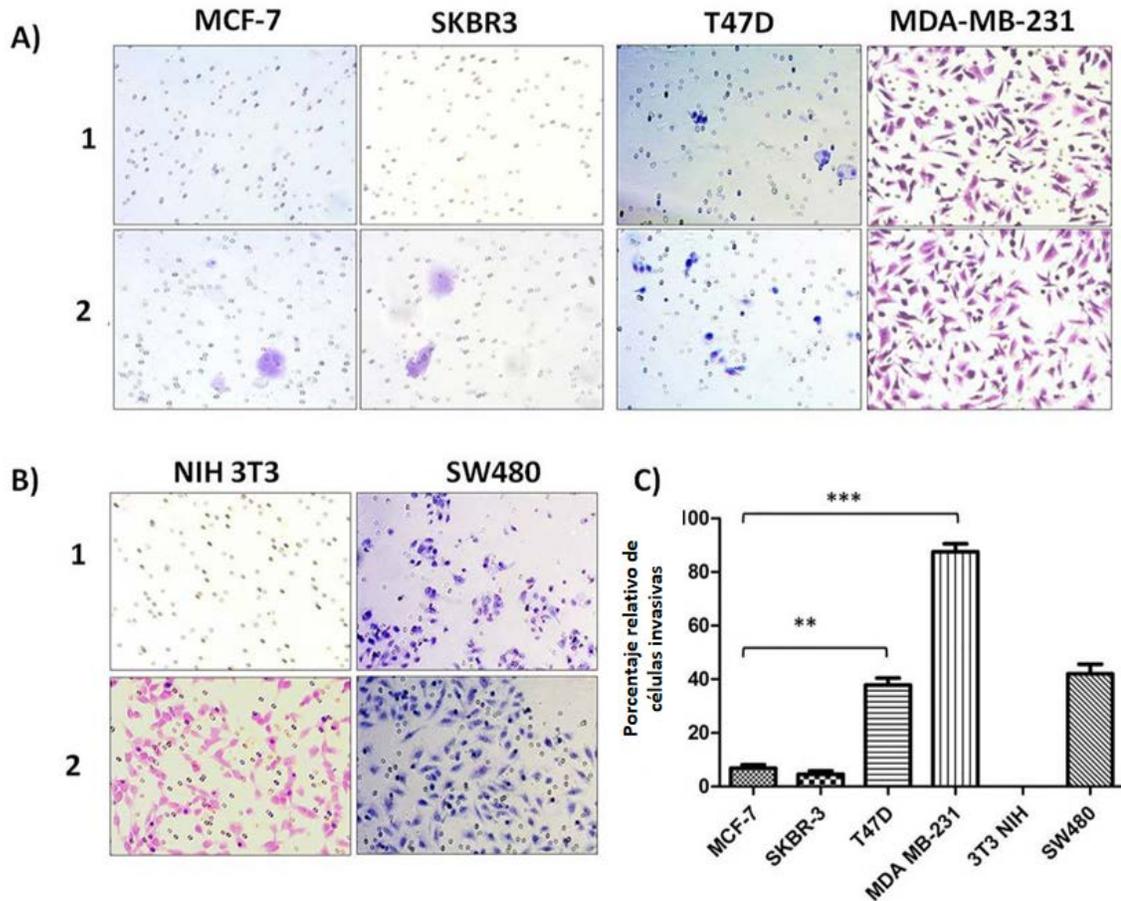


Figura 1. Capacidad de invasión de las líneas celulares de cáncer de mama. (A) Imágenes representativas de la capacidad invasora de MCF-7, SKBR3, T47D y MDA-MB-231 en cámaras de invasión **(1)** y su cámara control respectiva **(2)**. **(B)** La línea celular SW480 fue usada como control positivo; la línea celular NIH 3T3 fue usada como control negativo de invasión. Todas las imágenes fueron obtenidas a una amplificación de 200x. **(C)** Representación gráfica del porcentaje relativo de células invasoras en cinco campos al azar. El promedio del valor se representa como \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado comparando MCF-7 con SKBR3, T47D y MDA-MB231. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

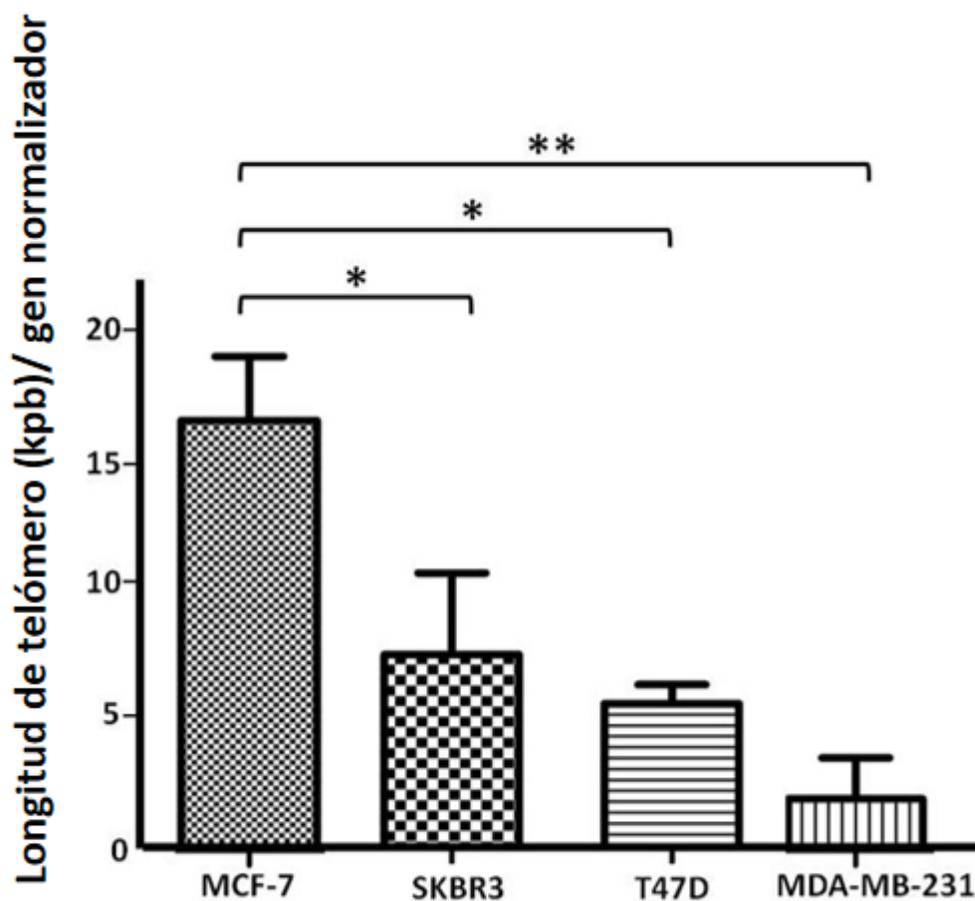


Figura 2. Los telómeros muy cortos correlacionan fuertemente con fenotipos más invasivos en líneas celulares de cáncer de mama. La longitud de los telómeros fue medida por qPCR. El gen 36B4 (gc) fue usado como gen normalizador para las mediciones de la longitud de telómeros (kpb). Las barras representan el promedio de \pm SD de kpb/gc en las líneas celulares MCF-7, SKBR3, T47D y MDA-MB-231. El análisis estadístico fue realizado comparando MCF-7 con SKBR3, T47D y MDA-MB231. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

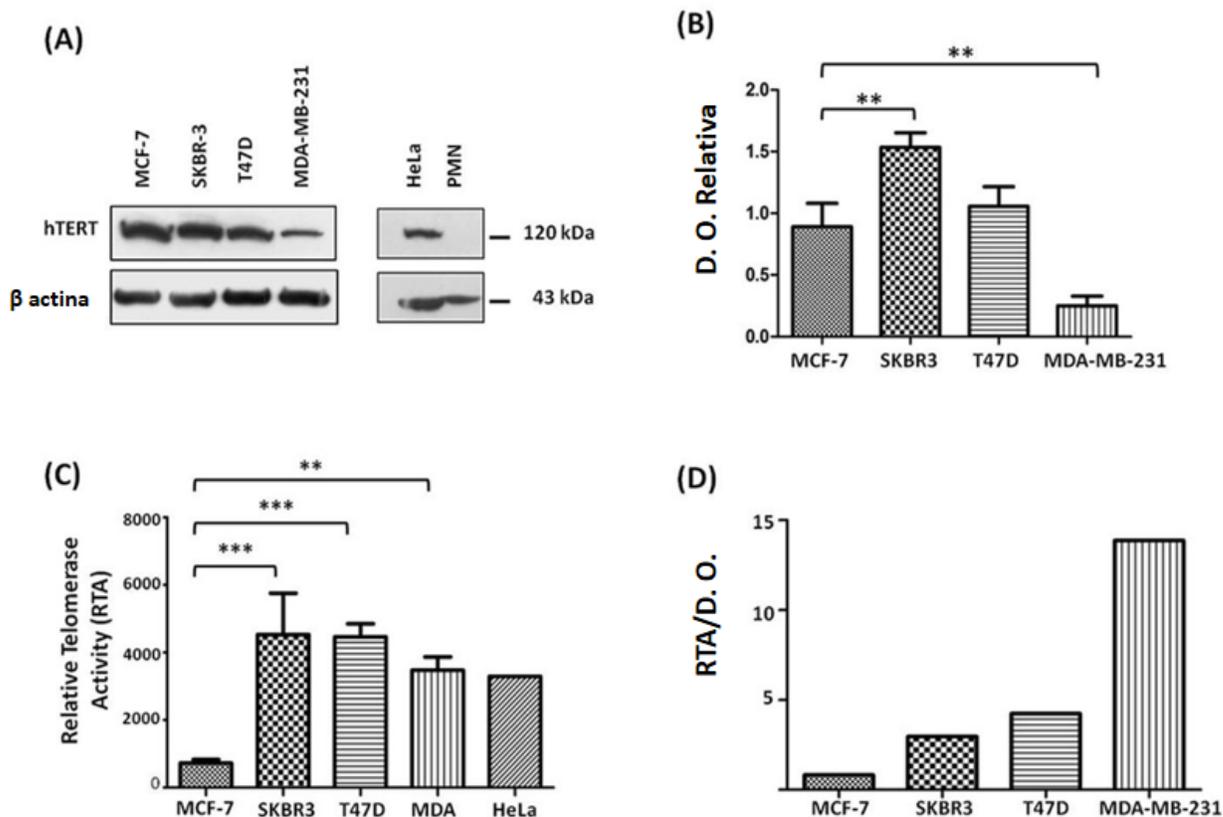


Figura 3. Los niveles proteicos de hTERT no correlacionan con sus niveles de invasividad. Niveles altos de actividad específica de la telomerasa se correlacionan con fenotipos más invasivos en líneas celulares de cáncer de mama. (A) Western blot de hTERT. La proteína β -actina fue usada como control de carga. HeLa y PMN (células polimorfo nucleares) fueron usadas como control positivo y control negativo, respectivamente. **(B)** Análisis densitométrico del Western blot, representado como unidades de densidad óptica relativa (DO). **(C)** Actividad Relativa de Telomerasa (RTA) medida por ensayos de TRAP. **(D)** Relación entre RTA/ D. O. Relativa (actividad específica de la telomerasa), los valores arbitrarios son expresados en 1×10^3 . Las gráficas muestran el valor promedio de \pm SD de tres experimentos independientes. El análisis estadístico fue realizado comparando MCF-7 con SKBR3, T47D y MDA-MB231. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

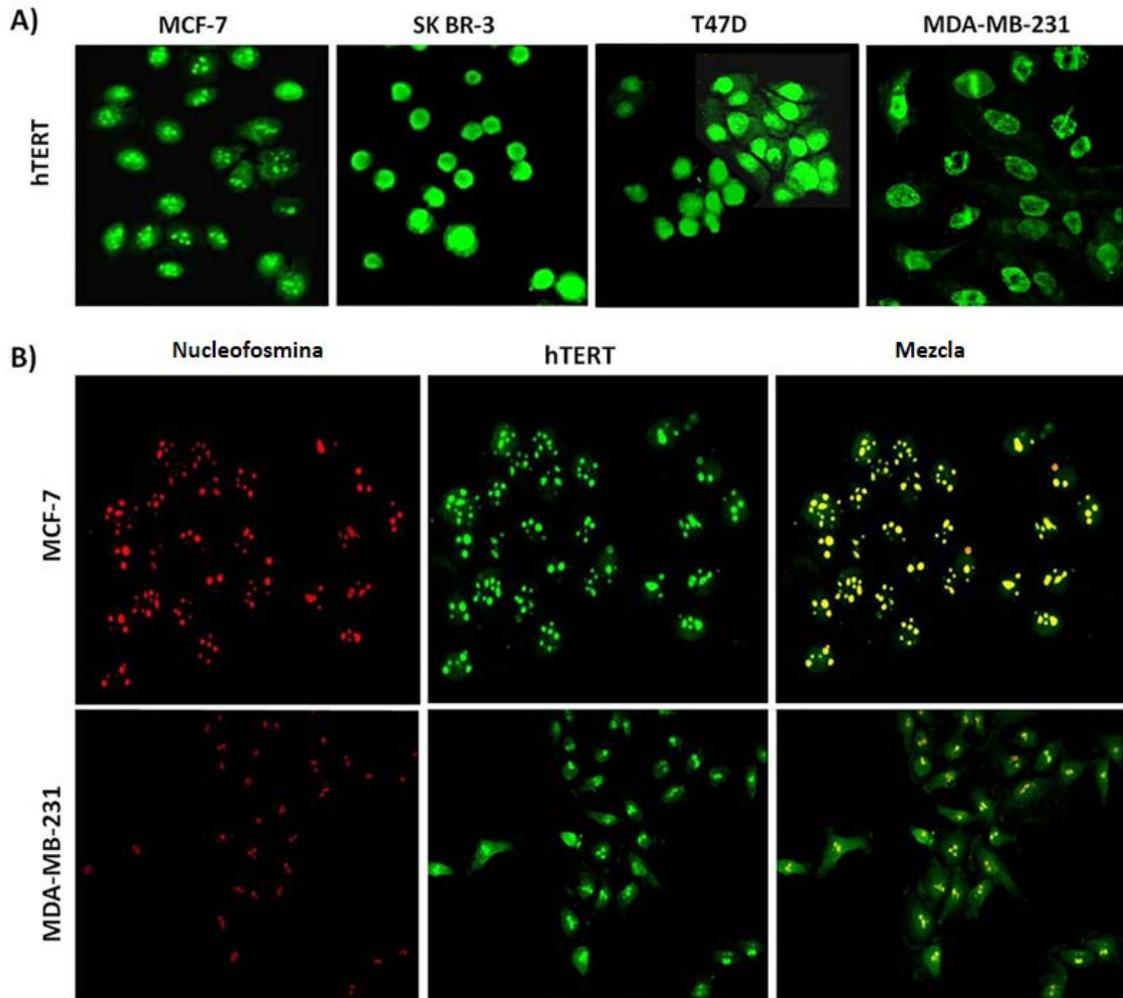


Figura 4. La localización nuclear sugiere una fuerte correlación con sus altos niveles de actividad específica de telomerasa en líneas celulares de cáncer de mama. (A) Inmunofluorescencia indirecta con el anticuerpo anti-hTERT Y182. Todas las líneas celulares mostraron una señal nuclear positiva >95% (señal verde). Las diferencias en la distribución intranuclear son específicas en cada línea celular. Todas las imágenes fueron tomadas con un aumento de 400x. **(B)** Se muestra la inmunofluorescencia de MCF-7 y MDA-MB-231 realizada usando el anticuerpo anti-hTERT Y182 y el anticuerpo B23 (nucleofosmina) con el fin de confirmar la localización nucleolar de hTERT. La línea celular MCF-7 mostró una co-localización de ambos antígenos en nucléolos, mientras que MDAMB-231 mostró una señal significativamente más débil con el anticuerpo B23 en la misma localización.

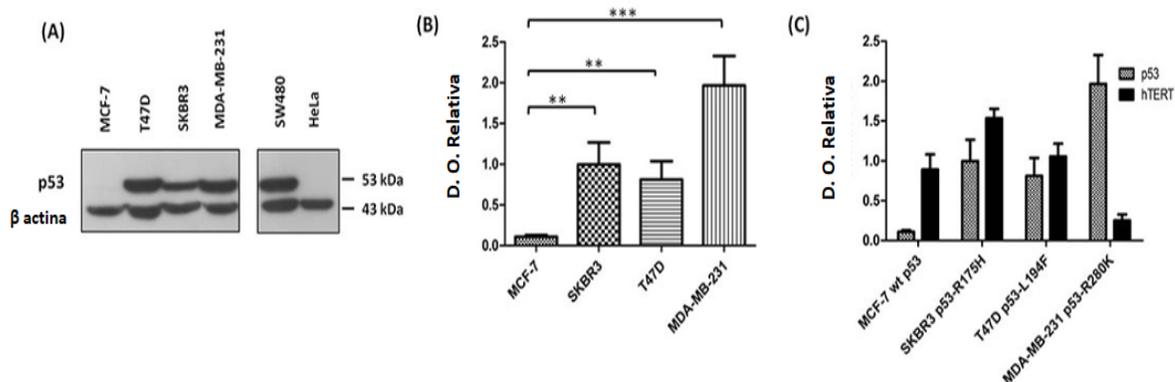


Figura 5. Efecto de las diferentes mutantes de p53 sobre la expresión de hTERT en líneas celulares de cáncer de mama. (A) Western blot para detección de p53 en MCF-7, SKBR3, T47D y MDA-MB-231. SW480 y HeLa fueron usados como control positivo y negativo, respectivamente. La proteína β -actina fue usada como control de carga de proteína total. **(B)** Análisis densitométrico del Western blot. El análisis estadístico fue realizado comparando MCF-7 con SKBR3, T47D and MDA-MB231. **p<0.01, ***p<0.001. **(C)** Comparación entre los niveles proteicos de hTERT y p53 mutado. El valor promedio se representa como \pm SD de tres experimentos independientes.

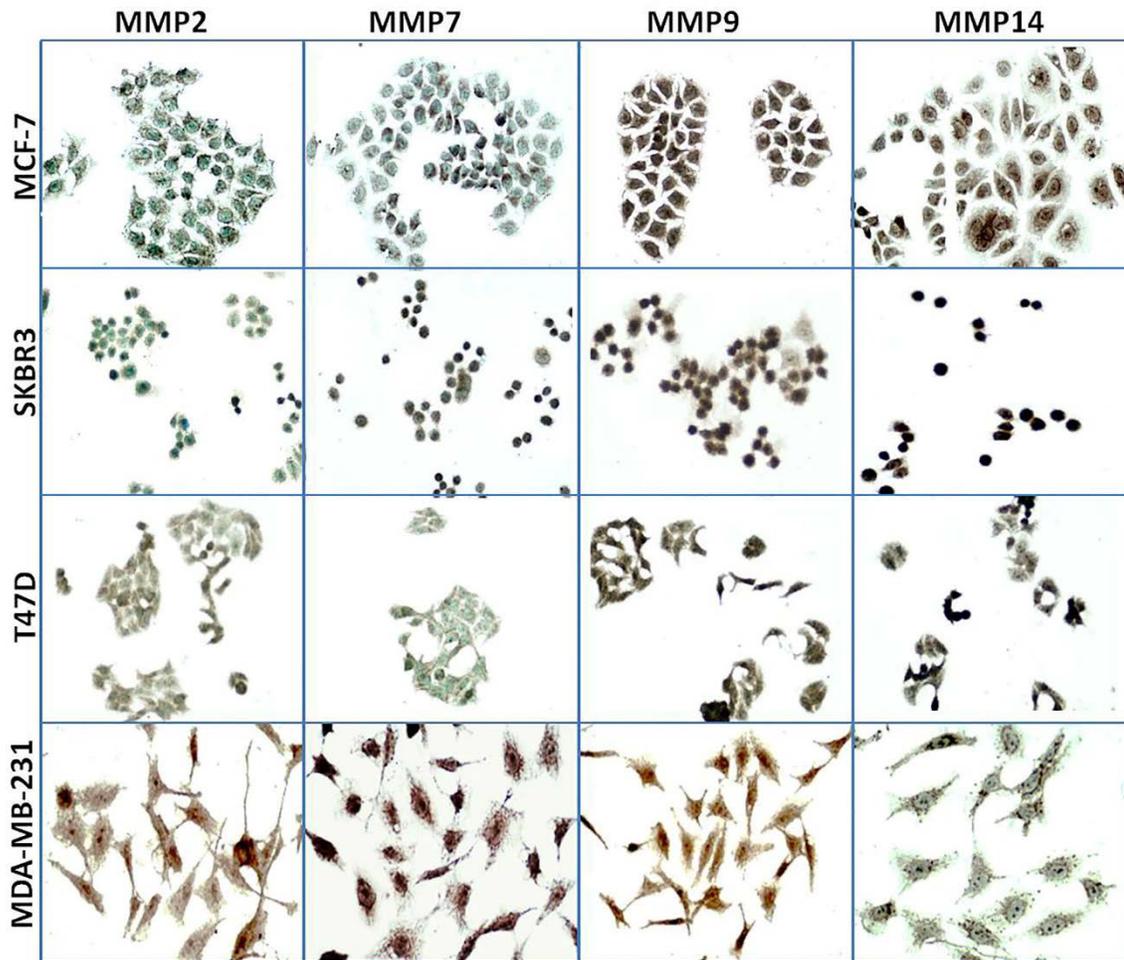


Figura 6. La sobreexpresión de MMP2 y MMP7 se correlacionan fenotipos más agresivos en líneas celulares de cáncer de mama. Imágenes representativas de inmunocitoquímica realizadas para la detección de MMPs de relevancia en la invasividad de células cancerosas. Contra-tinción con Azul de metileno al 3%. Como control negativo, fue usado suero no inmunizado. Todas las imágenes fueron tomadas a un aumento de 200X.

Anexos

Shorter telomeres and high telomerase activity correlate with a highly aggressive phenotype in breast cancer cell lines

Hugo A. Ceja-Rangel^{1,2} · Patricia Sánchez-Suárez² · Emilio Castellanos-Juárez² · Rubicelia Peñaroja-Flores² · Diego J. Arenas-Aranda³ · Patricio Gariglio¹ · Luis Benítez-Bribiesca²

Received: 26 November 2015 / Accepted: 1 April 2016
© International Society of Oncology and BioMarkers (ISOBM) 2016

Abstract Maintenance of telomere length is one function of human telomerase that is crucial for the survival of cancer cells and cancer progression. Both telomeres and telomerase have been proposed as possible biomarkers of cancer risk and cancer invasiveness; however, their clinical relevance is still under discussion. In order to improve our understanding of the relationship between telomere length and telomerase activity with cancer invasiveness, we studied telomere length as well as telomerase levels, activity, and intracellular localization in breast cancer cell lines with diverse invasive phenotypes. We found an apparently paradoxical coincidence of short telomeres and enhanced telomerase activity in the most invasive breast cancer cell lines. We also observed that hTERT intracellular localization could be correlated with its level of activity. There was no association between human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein expression levels and invasiveness. We propose that simultaneous

evaluation of these two biomarkers—telomere length and telomerase activity—could be useful for the assessment of the invasive capacity and aggressiveness of tumor cells from breast cancer patients.

Keywords Breast cancer · Cell lines · hTERT · Telomerase activity · Telomere length

Introduction

Invasiveness and metastatic capacity are two important characteristics that determine the aggressiveness of cancer cells. There is ever increasing evidence that telomere length and telomerase activity play an important role in cancer progression [1, 2]; as a consequence, they have been extensively studied, but findings in tumors have not been consistent.

✉ Patricio Gariglio
vidal@cinvestav.mx

✉ Luis Benítez-Bribiesca
benibribiesca@gmail.com

Hugo A. Ceja-Rangel
hceja@cinvestav.mx

Patricia Sánchez-Suárez
patotota80@hotmail.com

Emilio Castellanos-Juárez
hakatamex@yahoo.com.mx

Rubicelia Peñaroja-Flores
rojaderubi@hotmail.com

Diego J. Arenas-Aranda
arenasdi@gmail.com

- ¹ Departamento de Genética y Biología Molecular, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV), Av. Instituto Politécnico Nacional 2508, 07360 Ciudad de México, Mexico
- ² Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Oncológicas, Hospital de Oncología, Centro Médico Nacional Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social, Av. Cuauhtémoc 330, 06725 Ciudad de México, Mexico
- ³ Unidad de Investigación Médica en Genética Humana, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI Instituto Mexicano del Seguro Social, Ciudad de México, Mexico

Telomeres are crucial for protection of chromosomes and for maintenance of genome stability [3]; they also play an important role in the regulation of cellular senescence and apoptosis [4]. Telomerase is the enzyme responsible for telomere maintenance and its elongation, but it is mostly suppressed in mature somatic cells [5]. As a consequence, the number of telomere DNA repeats diminishes with each cell division and telomere length gradually decreases in most differentiated cells during their lifespan [3]. When telomeres reach a critical length (~5 kbp), telomere dysfunction ensues and DNA damage response mechanisms are activated [5]. Telomere dysfunction is characterized by the altered function of the telomere/telomerase unit, which can generate chromosomal end fusions and genome instability, events that can lead to the development of cancer [6, 7]. In advanced cancers, both clinical and experimental studies consistently report increased telomerase activity [8, 9], coinciding with shorter telomere length [10, 11].

Interestingly, *in vitro* studies have demonstrated that transfection of the hTERT gene in non-invasive cell lines results in increased invasion and metastasis of the transfected cells, suggesting that increased hTERT expression and activity promote invasiveness [12], in part, through extra-telomeric functions, i.e., activities unrelated to telomere elongation [13]. One of these functions is the overexpression of matrix metalloproteases (MMPs), enzymes directly involved in invasiveness of cancer cells [14].

Of great importance for the regulation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) expression is the suppressive effect exerted by wild-type p53 through blockage of the *tert* gene promoter; however, p53 mutants could have a similar or opposed effect, depending on the type of mutation [15]. Thus, it would be convenient to consider the differences in the status of p53 in breast cancer cell lines when assessing the correlation of telomeres and telomerase with invasive capacity.

The aim of this study was to analyze the possible correlation between telomere length, telomerase activity, and invasive capacity of different breast cancer cell lines. To attain this objective, we studied telomere length as well as telomerase expression, activity, and intracellular localization, correlating these parameters with invasion assays in breast cancer cell lines.

Materials and methods

Cell lines

Four breast cancer cell lines were studied: MCF-7 (ATCC® HTB-22™) cell line passage 19, classified as luminal A, immunoprofile: estrogen receptor (ER)⁺, progesterone

receptor (PR)^{+/-}, human epidermal growth factor receptor (HER2)⁻, epithelial cell type obtained of a female patient with adenocarcinoma; T47D (ATCC® HTB-133™) cell line passage 17, classified as luminal A, immunoprofile: ER⁺, PR^{+/-}, HER2⁻, epithelial cell type obtained of a female patient with ductal carcinoma; SKBR3 (ATCC® HTB-30™) passage 15, classified as HER2, immunoprofile: ER⁻, PR⁻, HER2⁺, epithelial cell type obtained of a female patient with adenocarcinoma; and MDA-MB-231 (ATCC® HTB-26™), passage 18, classified as claudin-low, immunoprofile: ER⁻, PR⁻, HER2⁻, epithelial cell type obtained of a female patient with adenocarcinoma [16]. They were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) and were maintained at 37 °C in a 5 % CO₂ humidified atmosphere in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) F12 culture medium (Invitrogen, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS) (Biowest, USA) supplemented with an antibiotic and antimycotic solution 1X (Sigma-Aldrich Co, MO, USA). In addition, we used HeLa (ATCC® CCL-2™; cervical cancer) passage 30, SW480 (ATCC® CCL-228™; colon cancer), NIH 3T3 (ATCC® CRL-1658™; mouse fibroblasts) cell lines as controls; these were also obtained from ATCC, cultured and maintained under similar conditions as above-mentioned.

Quantitative PCR for telomere length

Telomere length (TL) was measured in cells from each breast cancer line by quantitative PCR according to O'Callaghan et al. [17] who use two standard oligomers: Tel STD A formed by (TTAGGG)₁₄, in order to obtain total telomere length (kbp) of the sample and 36B4 standard, CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCCGTTCTCCACAGACAAGGCCAGGACTCGTTTGTACCCGTTGATGATAGAATGGG, in order to obtain the housekeeping gene copy number (gc).

We used four additional oligomers with the following 5' to 3' sequence: TelF, CGGTTTGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTTGGGTT; TelR, GGCTTGCCCTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT; 36B4F, CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC; and 36B4R, CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA [17]. Oligomers were used at 0.1 μM with the exception of standard oligomers. For DNA extraction, we used a phenol/chloroform/isoamyl alcohol mix 25:24:1, diluted with 10 mM Tris, pH 8.0, 1 mM EDTA solution according to manufacturer's instructions (Sigma-Aldrich Co.) and an alcohol precipitation technique. DNA samples obtained from the breast cancer cell lines were used at a concentration of 80 ng/μL and samples were analyzed in triplicate. Results were reported as telomere length (TL), kilobase pair per gene copy (gc) by sample.

TRAP assay for telomerase activity

Telomerase activity of breast cancer cell lines was determined with TeloTAGGG Telomerase PCR ELISA kit (Roche, USA). The procedure was performed according to the manufacturer's instructions. HeLa cells were used as a positive control and polymorphonuclear leucocytes (PMN) were used as a negative control.

Immunocytochemistry

Cell cultures in four-chamber vessels were grown to 80 % confluence, culture medium was decanted, and cells were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) (pH 7.4), then fixed in 10 % formaldehyde in PBS for 30 min and rinsed twice with PBS. Cells were treated with target retrieval solution, pH 9 (DAKO, Denmark) and subjected to 122–125 °C at 15–24 psi in a pressure cooker for 20 min. Endogenous peroxidase activity was blocked by 15-min incubation with a 3 % H₂O₂ aqueous solution. Nonspecific background staining was blocked with protein block serum-free solution (DAKO) for 30 min. Cell samples were incubated overnight at 4 °C with the following primary antibodies: rabbit monoclonal anti-hTERT Y182 at 1:100 dilution (AbCam, UK), mouse monoclonal anti-p53 at 1:100 dilution (DO-1, Santa Cruz Biotechnology Inc., CA, USA), rabbit polyclonal antiMMP2 at 1:100 dilution (Novus Biologicals, USA), mouse anti-MMP7 at 1:100 dilution (Novus Biologicals), mouse anti-MMP9 at 1:100 dilution (Novus Biologicals), and mouse anti-MMP14 at 1:200 dilution (Novus Biologicals). The dilutions of each antibody were determined following manufacturer's indications in order to get an optimal signal and minimal background.

Immunocytochemistry (ICC) reactions were performed using the LSAB-HRP System (DAKO). The chromogen was 3,3'-diaminobenzidine (DAB) solution developed with H₂O₂. Slides were counterstained with 0.2 % methylene blue. Negative controls were included without primary antibody incubation. All experiments were repeated five times/cell line. Microscopic evaluation of all preparations was performed independently by two pathologists (LBB and ECJ). Several parameters were reported after microscopic examination: intracellular location of ICC reaction (nucleus, nucleoli, and/or cytoplasm) and percentage of positive cells (%) in ten ×400 fields. Intensity of ICC reaction was reported as low (1), medium (2), and high (3).

Immunofluorescence

Cancer cells from all lines included in this study were cultured over positively charged slides, washed with PBS, and fixed with 4 % paraformaldehyde in Tris-buffered saline (TBS, 140 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl, pH 7.6) for 30 min at room

temperature. They were washed again with PBS, permeated with 0.2 % Triton X-100 for 20 min at 4 °C, and incubated with 10 % normal blocking serum in PBS for 20 min. Cells were then incubated with the mentioned anti-hTERT primary antibody at 1:100 dilution for 2 h at room temperature. In order to locate nucleolus in the breast cancer cell lines, a mouse monoclonal anti B23 primary antibody at 1:100 dilution was used (Santa Cruz Biotechnology Inc.). After PBS washing, slides were incubated in a dark chamber for 1 h with fluorescein isothiocyanate (FITC)-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Alexa Fluor® 488) at 1:100 dilution (Invitrogen) and washed again with PBS. Dilutions of antibodies were determined according to manufacturer's instructions. The samples were mounted in slides and covered with 90 % glycerol, 2.5 g/l DABCO (diazabicyclo [2.2.2] octane) (Sigma-Aldrich) diluted in PBS. Negative controls were obtained by substitution of the primary antibody with non-immunized rabbit serum. Observation was carried out under an epifluorescence microscope (Olympus AX70) equipped with an excitation filter of 515–560 nm and a barrier filter of 590 nm.

Western blot

For protein extraction, we used M-PER solution (Thermo Scientific, USA), following manufacturer's instructions. hTERT and p53 protein concentration in three samples from three independent cultures of each cell line were measured using the Bradford reagent (Sigma-Aldrich). Eighty micrograms of total proteins from the extracts of each breast cancer cell line were separated by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) through a 12 % polyacrylamide gel and then transferred to a PVDF membrane (Merck Millipore, Germany). Membranes were blocked for 6 h with 5 % non-fat milk in PBS, then incubated with the Y182 antibody at 1:1000 dilution (Abcam) and anti β -actin (control) at 1:10,000 dilution (Abcam) overnight at 4 °C. The membranes were washed and incubated with an alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (Santa Cruz Biotechnology Inc.) for 1 h at room temperature.

For p53 protein levels, we used DO-1 p53 antibody at 1:500 dilution (Santa Cruz Biotechnology Inc.) incubated overnight at 4 °C. A 1:10,000 dilution of HRP-conjugated anti-mouse IgG secondary antibody was added (Santa Cruz Biotechnology Inc.). The dilution of antibodies was determined according to the manufacturer's indications.

β -actin was used as normalizer. Typical Western blot bands were detected using the ECL Western Blot Analysis System (Amersham Biosciences, PA, USA) and analyzed using the Alpha EaseFC v.4.0 software.

Measurements were made in duplicate in three similar independent experiments. MDAMB-231 total protein extract

was used as positive control and HeLa total protein extract as a negative control.

Evaluation of invasiveness

The invasive capacity of cells from the four breast cancer lines (MCF-7, T47D, SKBR3, and MDA-MB-231) was evaluated in invasion chambers (Corning, USA) with 8- μ m pore, matrigel-covered polycarbonate membranes. NIH 3T3 and SW480 cells were used as negative and positive control cells, respectively. The invasion chambers were pre-hydrated by immersion in culture medium for 2 h at 37 °C.

Breast cancer and control cells were maintained under serum starvation conditions for 24 h before seeding. Thereafter, 2×10^5 cells of each cell line, suspended in 500 μ L of culture medium with 0.3 % of FBS were seeded into the invasion and control (without matrigel) chambers that contained 750 μ L of DMEM F-12 culture solution supplemented with 10 % FBS (used as chemoattractant). After 48 h of incubation in a humidified 5 % CO₂ atm. The upper surface of membranes in all chambers was scrubbed in order to eliminate the non-invading cells.

For fixation, 750 μ L of 100 % methanol was added to each chamber, incubated for 5 min, and then washed three times with distilled water. Subsequently, both control and invasion chambers were stained with 750 μ L of 0.25 % crystal violet dye (Sigma-Aldrich) and incubated at room temperature for 2–3 h.

Finally, the chambers were rinsed five times with water to remove excess dye. The membranes were observed with a Zeiss microscope (Axiovert 40CFL) at $\times 200$ and photographs were taken using an AxioCam ERc5s. Cells on the lower surface of the membranes (control and invasive) were counted in five random fields. Percentage of cell invasion was calculated dividing the mean of invading cells/five fields between the mean of control cells/five fields $\times 100$. Measurements were made in duplicate in three similar independent experiments.

Statistical analysis

Results of the experiments are presented as mean \pm SD of all measurements. Statistical analysis was performed using Student's *t* test; $p < 0.05$ was considered statistically significant. All statistical analyses were carried out using GraphPad Prism 5 software and compared against the MCF-7 cell line.

Results

Highly invasive cell lines have the shortest telomeres

Mean telomere length (kbp) from each cell line was measured as indicated in the “Materials and Methods” section (Fig. 1).

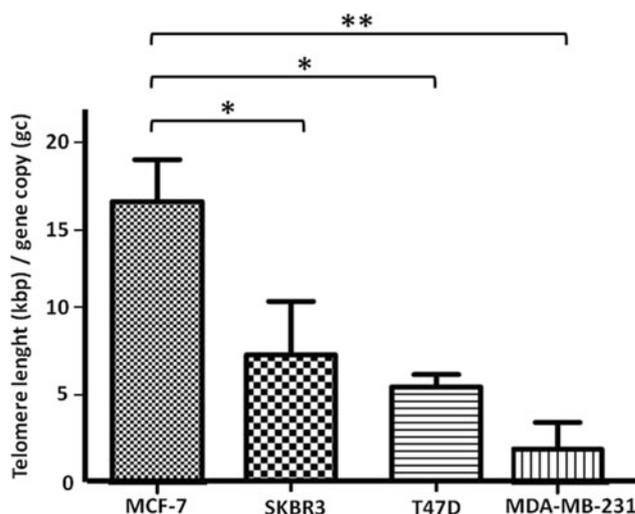


Fig. 1 Telomere length in breast cancer cell lines. Telomere length was measured by qPCR. The 36B4 gene was used as normalizer of telomere length (TL) measures. Bars represent mean \pm SD of kilobase pair per gene copy in MCF-7, SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cell lines. Statistical analysis was performed comparing MCF-7 with SKBR3, T47D, and MDA-MB231 cell lines. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

MCF-7 cells had the longest telomeres (16.48 ± 2.49 kbp/gc), whereas MDA-MB-231 cells had the shortest (1.99 ± 1.56 kbp/gc, $p < 0.001$). Intermediate telomere length was observed in SKBR3 (7.44 ± 3.12 kbp/gc, $p < 0.05$) and T47D (5.52 ± 0.74 kbp/gc, $p < 0.01$). These results demonstrate that highly invasive breast cancer cell lines have shorter telomeres than less invasive cells.

Telomerase levels and activity

hTERT protein levels were measured using Western blot of the four breast cancer cell lines. We found that SKBR3 ($p < 0.01$) had the highest levels of hTERT protein. MDA-MB-231 ($p < 0.01$) had the lowest, whereas MCF-7 and T47D ($p > 0.05$) cell lines had intermediate levels. These results suggest that there is no correlation between hTERT protein levels and invasiveness (Fig. 2).

Concerning relative telomerase activity (RTA), it was very low in MCF-7 cells (723.9 ± 108.5), whereas the highest RTA was observed in SKBR3 cells (4530 ± 1226). High values were also observed in T47D cells (4463 ± 388.6), followed by MDA-MB-231 cells (3477 ± 392.3).

In order to know the specific activity of telomerase in each cell type we determined the RTA/optical density (OD) ratio, that is, the ratio between the relative telomerase activity (RTA) and the amount of hTERT protein expressed as OD.

MCF-7 (low invasiveness) had the lowest specific telomerase activity (813 RTA/OD), SKBR3 and T47D (medium invasiveness) showed an intermediate specific telomerase activity (2960 RTA/OD and 4230 RTA/OD, respectively), and MDA-MB-231 (highest invasiveness) had the highest

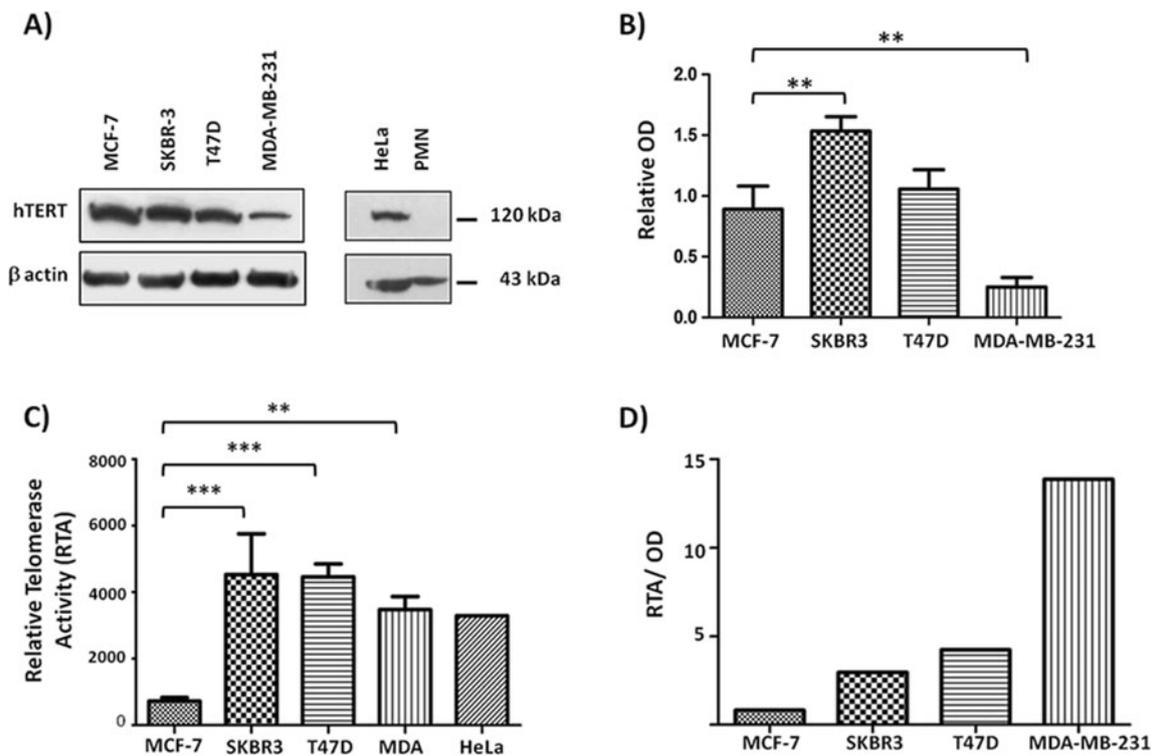


Fig. 2 Detection of hTERT protein and telomerase activity in breast cancer cell lines. **a** Western blot for hTERT. β -actin protein was used as loading control. HeLa cells and PMN were used as positive and negative controls. **b** Densitometry of Western blots represented as relative optical density (OD) units. **c** Relative telomerase activity (RTA) measured by

TRAP assay. **d** Ratio between relative telomerase activity/relative OD, values are expressed in 1×10^3 . Mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed comparing MCF-7 with SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

specific telomerase activity ($13,852$ RTA/OD) (Fig. 2). These results suggest an association between higher specific telomerase activity and higher invasiveness.

Cellular localization of hTERT protein

hTERT intracellular localization was evidenced by indirect immunofluorescence (Fig. 3), it was observed in the nuclei of cells from all breast cancer lines, albeit with differences in intra-nuclear distribution. In MCF-7 cells, hTERT is mainly located in the nucleoli, whereas in MDA-MB-231, it is present in the nucleus, with a significantly weaker signal in nucleolus. In T47D, hTERT was homogeneously distributed in the whole nucleus and nucleolus, whereas in SKBR3 cells, it was observed in close proximity to the nuclear membrane. Localization of hTERT protein was consistent and characteristic of each breast cancer cell line, correlating with their levels of telomerase activity.

Invasiveness is higher in T47D and MDA-MB-231 cells

To measure invasiveness of the breast cancer cells, we performed in vitro invasion assays (Fig. 4). MCF-7 had a mean percentage of invading cells of 6.83 ± 1.33 , SKBR3

had 4.63 ± 1.2 , T47D had 37.9 ± 2.59 , and MDA-MB-231 had 87.55 ± 3.02 . Invasiveness (percentage of invading cells) was significantly higher in T47D ($p < 0.01$) and MDA-MB-231 ($p < 0.001$), as compared with MCF-7 and SKBR3 cells.

p53 in breast cancer cell lines

To measure p53 levels, we performed Western Blot analysis (Fig. 5) of cell homogenates from each cancer line. The lowest p53 levels were noted in MCF-7 cells, whereas the highest levels were found in MDA-MB-231 cells ($p < 0.01$). T47D ($p < 0.05$) and SKBR3 ($p < 0.05$) presented intermediate values. With the exception of MCF-7 that express only wild-type p53, all other cell lines expressed mutated p53 protein. SKBR3 expresses p53-R175H, T47D has p53-L194F, and MDA-MB-231, p53-R280K [18]. All of these mutants overexpressed inducing effect on hTERT; however, only R280K may have a repressive effect on hTERT expression.

Simultaneous overexpression of MMP2 and MMP7 is associated with a highly invasive phenotype

We analyzed the expression of MMPs in the four breast cancer cell lines, looking for a possible relationship with

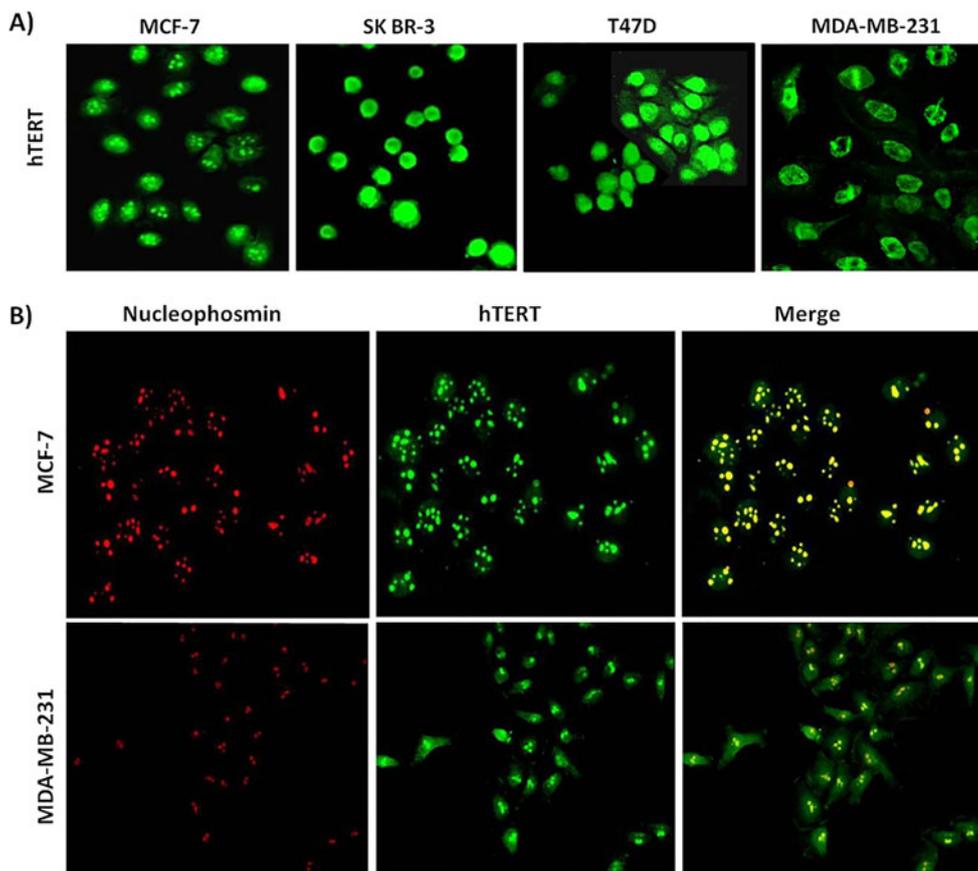


Fig. 3 Nuclear localization of hTERT protein in breast cancer cell lines. **a** Indirect immunofluorescent staining was performed using anti-hTERT Y182 antibody. All breast cancer cells showed nuclear hTERT positivity (>95 %, *green signal*). Differences in hTERT intra-nuclear distribution are noted. All images were taken at $\times 400$. **b** MCF-7 and MDAMB-231 cell lines indirect immunofluorescent

staining was performed using anti-hTERT. Y182 antibody and B23 antibody (nucleophosmin) were used in order to confirm the nucleolar localization. MCF-7 cells show co-localization of both antigens in nucleoli, whereas MDAMB-231 showed a significantly weaker signal with B23 antibody, in the same location

invasiveness. Immunocytochemical (ICC) study of MMPs (Fig. 6) showed that their expression levels vary in each cancer cell line. MMP9 is highly expressed in all cell lines, whereas MMP14 was highly expressed only in MCF-7 and SKBR3 cells. Expression of both, MMP2 and MMP7 was low in MCF-7, SKBR3, and T47D cells, whereas they were consistently overexpressed in the highly invasive MDA-MB-231 cells.

Discussion

Although telomere length and telomerase activity have been separately studied in cancer cell lines [19–21], the correlation between these two parameters and invasiveness has not been thoroughly considered. We studied four different breast cancer cell lines with varying degrees of invasiveness, looking for a possible association of invasiveness with telomere length, as well as with telomerase-specific activity and hTERT protein expression and localization.

We found that very short telomeres are a consistent feature of the more invasive breast cancer cells. Kammori et al., employing a Q-FISH technique to measure telomere length in breast cancer patients [22] found equivalent results, reporting an association between shorter telomeres and cancer aggressiveness and rapid progression. These findings could be explained, at least in part by telomerase activation as a response to telomere attrition. Critical shortening of telomeres induces telomere dysfunction and chromosome instability [23], leading to deletion and/or duplication of genes related to cancer cell survival; this may be one of the causes of highly aggressive phenotypes in cancer cells [24].

We found that levels of hTERT protein expressed in the breast cancer cell lines are not directly related to degree of invasiveness. The reason of this apparent incongruence could be that, as previously reported, there are cell-specific differences in specific telomerase activity and not all hTERT activities are related to telomere lengthening; some extra-telomerase functions influence cancer cell survival and/or invasiveness [13]. In accordance with this notion, Yu et al.

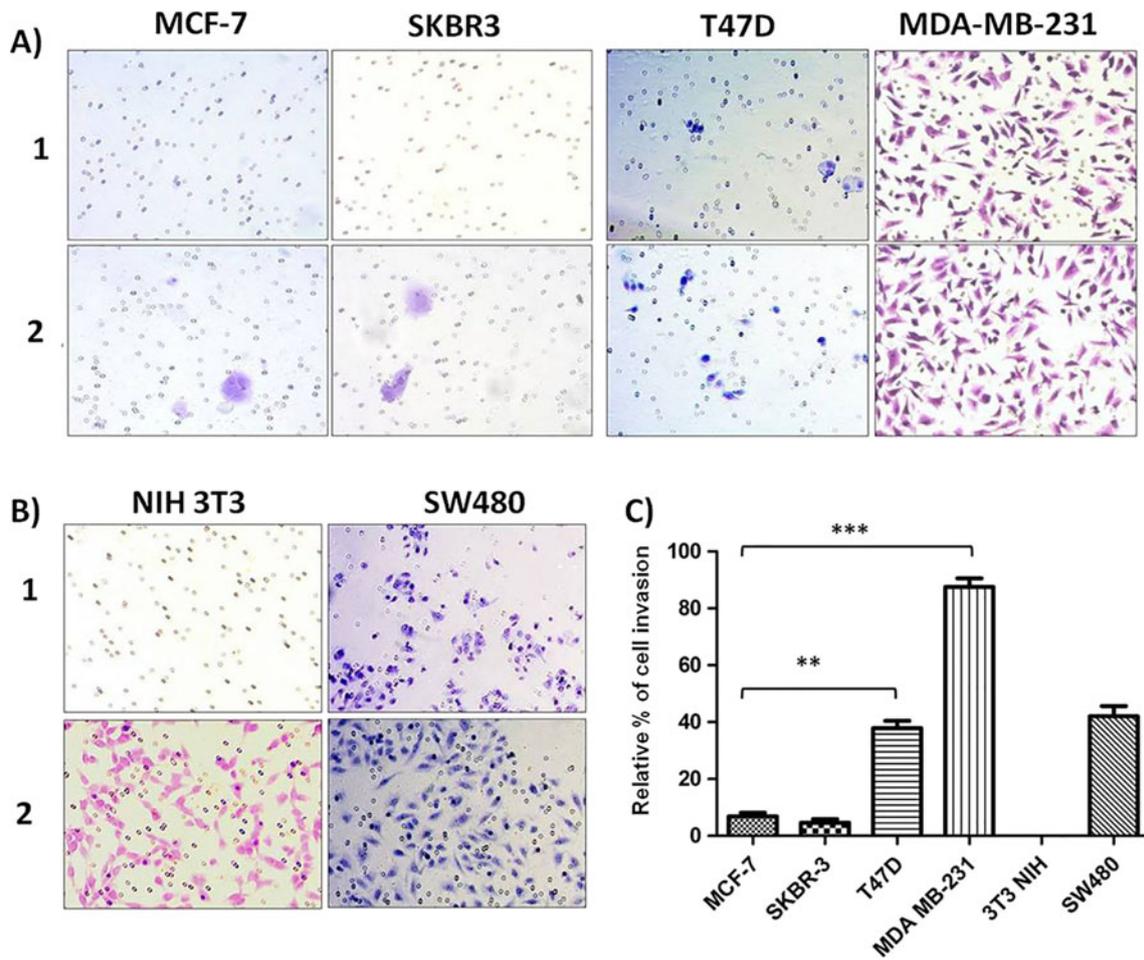


Fig. 4 Invasion of breast cancer cells. **a** Representative images of MCF-7, SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cell lines in invasion (1) and control (2) chambers. **b** SW480 cell line was used as positive control; NIH 3T3 cell line was used as negative control. All images were taken at $\times 200$. **c**

Graphic representation of the percentage (%) of invading cells in five random fields. Mean \pm SD of three independent experiments. Statistical analysis was performed comparing MCF-7 with SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cells. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

and Che et al. have reported that transfection of hTERT gene to non-invasive cancer cell lines is involved in the development of invasive traits [12, 14].

Concerning telomerase activity, we found that increased specific telomerase activity is associated with more aggressive phenotypes of breast cancer cells. Our findings are in

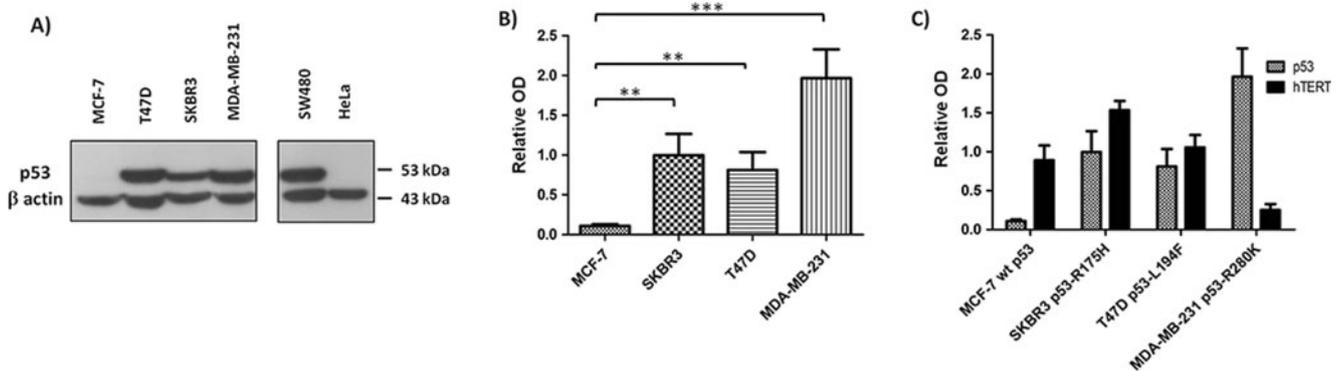
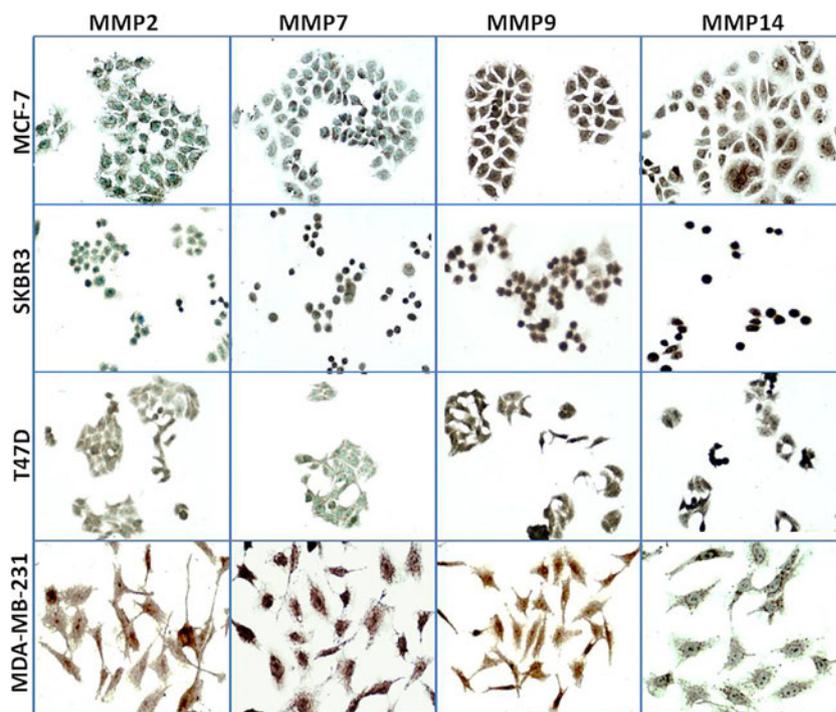


Fig. 5 p53 protein levels in breast cancer cell lines. **a** Western blot for p53 in MCF-7, SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cells. SW480 and HeLa cells were used as positive and negative controls, respectively. β -actin was used as loading control. **b** Densitometry analysis of Western blot.

Statistical analysis comparing MCF-7 cells with SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cells. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **c** Comparison between hTERT and p53 protein levels. Mean \pm SD of three independent experiments

Fig. 6 Matrix metalloproteases (MMPs) expression in breast cancer cell lines. Immunocytochemical images of representative fields of MCF-7, SKBR3, T47D, and MDA-MB-231 cells. Methylene blue counterstaining. Non-immunized serum was used as negative control. All images were taken at $\times 200$



accordance with those of Kulic et al. that studied telomerase activity in tissue of breast cancer patients [25]. Interestingly, we found that even when highly invasive MDA-MB-231 cells have the lowest hTERT expression, they show the higher specific telomerase activity. In contrast, MCF-7 cells (low invasiveness) show moderate expression of hTERT protein but their specific telomerase activity is the lowest. From our results, we can surmise that specific telomerase activity is not directly related to hTERT protein levels.

It is possible that a higher specific telomerase activity of hTERT in some cell types may be dependent on factors such as post-translational modifications and cell changes (e.g., phosphorylation, mutations) [26], higher concentrations of dGTP pools in cancer cells which could increase telomerase activity [27], and/or pattern alterations of nuclear hTERT protein localization [28].

Our findings show that there is a strong correlation between hTERT localization and specific telomerase activity; so, when this enzyme is located in the nucleoli, it has a low specific activity and when it is localized uniformly in the nucleus (as in T47D and MDA-MB-231), it is associated with the highest levels of activity. Our results also suggest that proximity of hTERT to the nuclear membrane observed in SKBR3 cells may be associated to telomerase inactivation. Differences in hTERT intranuclear location could be of paramount importance and be related with steps in telomerase assembling, affecting the levels of telomerase activity. When telomerase

assembling is complete, it is transported to the telomere where it becomes fully active [28]. However, the full details of hTERT assembling and activation have not yet been completely elucidated.

Altered p53 protein expression in cancer cells is a common occurrence [29]; so, we studied the expression of p53 in the employed cancer cell lines to look for any association with hTERT activity. Wild-type p53 downregulates hTERT messenger RNA (mRNA) expression and has a suppressive effect on telomerase activity. Conversely, mutated p53 proteins (having longer half-life than wild-type p53 [30]) could contribute to hTERT overexpression and activation through a “gain-of-function” effect that may favor cancer growth [15, 31]. We found that mutant p53 protein levels were higher in highly invasive MDA-MB-231 cell line.

Previous reports coincide with our findings, where MCF-7 that expresses wild-type p53 had a low hTERT expression and activity, whereas SKBR3, that expresses mutant p53 R175H showed overexpression of hTERT [15]. According to our findings, the mutant p53 R280K, expressed in MDA-MB-231, may reduce hTERT expression without affecting its telomerase activity (Fig. 5). We do not clearly know the effect that L194F p53 mutant (T47D) could have on the expression and activity of hTERT.

Regarding the mentioned extra-telomeric functions of hTERT that could increase MMPs expression in breast cancer cells, we found that MMP2 and MMP7 are overexpressed in the highly invasive breast cancer cell MDA-MB-231, containing high specific telomerase

activity whereas the same MMPs are under-expressed in less invasive cancer cells (MCF-7 and SKBR3). This suggests that expression of some MMPs correlates with both high specific telomerase activity and invasive capacity. Since not only MMPs are responsible for the degradation of extracellular matrix, it should be necessary to study the expression and activity of several other enzymes and stromal factors involved in invasiveness of cancer cells [32]. Our results indicate that at least some of the changes that lead to invasion of breast cancer cells are due to overexpression of specific MMPs [33].

Coinciding with us, Ding et al. propose that hTERT upregulate MMP expression as one of its telomere-independent actions [34]. Similar to hTERT localization, each breast cancer cell line has a characteristic pattern of localization of MMPs, correlating with their functional status [35].

Conclusions

In summary, we found that breast cancer cell lines with a highly invasive phenotype have the shortest telomeres and its telomerase activity is higher. With respect to its nuclear localization, when hTERT was consistently observed on chromosomes and/or telomeres, as in MDA-MB-231, its telomerase activity was higher than less invasive cell lines. Alternatively, when hTERT was concentrated in the nucleoli, its activity was lower. Besides, the expression of relevant MMPs has shorter telomeres, higher specific telomerase activity, mutant p53, and a characteristic hTERT nuclear distribution. We suggest that in breast cancer cells, telomere length together with telomerase activity and localization, are parameters that could be useful as biomarkers for evaluation of invasiveness. Further studies will be required to confirm the importance of hTERT localization as an indicator of telomerase activity.

Acknowledgments The authors thank Blanca Olivia Murillo Ortiz Ph. D. from IMSS Unidad Médica de Alta Especialidad #1 León, México, for her assistance in telomere length measuring assays; Enrique Perez Cárdenas Ph. D. from the Instituto Nacional de Cancerología, SSA, México for his support in invasion assays; and Carmen Mora Villalpando Ph. D. from IMSS Centro Médico Nacional Siglo XXI, México for her advice in qPCR assays. Hugo A. Ceja-Rangel is grateful for CONACYT-México and IMSS scholarships and is grateful for the support, advice, and tutorship of Dr. Luis Benítez Bribiesca and Dr. Patricio Gariglio.

Compliance with ethical standards

Funding This study was supported with grants from the Coordination for Health Research, IMSS (FIS/IMSS/PROT/MD13/1253).

Conflicts of interest None.

References

1. Savage SA, Gadalla SM, Chanock SJ. The long and short of telomeres and cancer association studies. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(7):448–9.
2. Hou L, Zhang X, Gawron AJ, Liu J. Surrogate tissue telomere length and cancer risk: shorter or longer? *Cancer Lett.* 2012;319(2):130–5.
3. Blackburn EH. Structure and function of telomeres. *Nature.* 1991;350(6319):569–73.
4. d'Adda di Fagagna F, Reaper PM, Clay-Farrace L, Fiegler H, Carr P, Von Zglinicki T, et al. A DNA damage checkpoint response in telomere-initiated senescence. *Nature.* 2003;426(6963):194–8.
5. Frias C, Pampalona J, Genesca A, Tusell L. Telomere dysfunction and genome instability. *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012;17:2181–96.
6. Roger L, Jones RE, Heppel NH, Williams GT, Sampson JR, Baird DM. Extensive telomere erosion in the initiation of colorectal adenomas and its association with chromosomal instability. *J Natl Cancer Inst.* 2013;105(16):1202211.
7. Masuda A, Takahashi T. Chromosome instability in human lung cancers: possible underlying mechanisms and potential consequences in the pathogenesis. *Oncogene.* 2002;21(45):6884–97.
8. Glybochko PV, Zezerov EG, Glukhov AI, Alyaev YG, Severin SE, Polyakovskiy KA, et al. Telomerase as a tumor marker in diagnosis of prostatic intraepithelial neoplasia and prostate cancer. *Prostate.* 2014;74(10):1043–51.
9. Chen CH, Chen RJ. Prevalence of telomerase activity in human cancer. *J Formos Med Assoc.* 2011;110(5):275–89.
10. Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK. Telomeres: prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer.* 2006;119(10):2255–60.
11. Svenson U, Roos G. Telomere length as a biological marker in malignancy. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1792(4):317–23.
12. Yu ST, Chen L, Wang HJ, Tang XD, Fang DC, Yang SM. hTERT promotes the invasion of telomerase-negative tumor cells in vitro. *Int J Oncol.* 2009;35(2):329–36.
13. Jaiswal RK, Kumar P, Yadava PK. Telomerase and its extracellular activities. *Cell Mol Biol Lett.* 2013;18(4):538–54.
14. Chen PC, Peng JR, Huang L, Li WX, Wang WZ, Cui ZQ, et al. Overexpression of human telomerase reverse transcriptase promotes the motility and invasiveness of HepG2 cells in vitro. *Oncol Rep.* 2013;30(3):1157–64.
15. Xu D, Wang Q, Gruber A, Björkholm M, Chen Z, Zaid A, et al. Downregulation of telomerase reverse transcriptase mRNA expression by wild-type p53 in human tumor cells. *Oncogene.* 2000;19(45):5123–33.
16. Holliday DL, Speirs V. Choosing the right cell line for breast cancer research. *Breast Cancer Res.* 2011;13(4):215.
17. O'Callaghan NJ, Fenech M. A quantitative PCR method for measuring absolute telomere length. *Biol Proced Online.* 2011;13:3.
18. Soussi T, Rubio-Navado JM, Hamroun D and Bérout C. The p53 mutation handbook. Available online: [www.http://p53.free.fr](http://p53.free.fr). Accessed 17 July 2015.
19. Jeon BG, Kumar BM, Kang EJ, Ock SA, Lee SL, Kwack DO, et al. Characterization and comparison of telomere length, telomerase and reverse transcriptase activity and gene expression in human mesenchymal stem cells and cancer cells of various origins. *Cell Tissue Res.* 2011;345(1):149–61.
20. Motevalli A, Yasaei H, Virmouni SA, Slijepcevic P, Roberts T. The effect of chemotherapeutic agents on telomere length maintenance in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;145(3):581–91.
21. Sakin V, Eskiocak U, Kars MD, Iseri OD, Gunduz U. hTERT gene expression levels and telomerase activity in drug resistant MCF-7 cells. *Exp Oncol.* 2008;30(3):202–5.

22. Kammori M, Sugishita Y, Okamoto T, Kobayashi M, Yamazaki K, Yamada E, et al. Telomere shortening in breast cancer correlates with the pathological features of tumor progression. *Oncol Rep.* 2015;34(2):627–32.
23. O'Sullivan RJ, Karlseder J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2010;11:171–81.
24. Martinez-Delgado B, Gallardo M, Tanic M, Yanowsky K, Inglada-Perez L, Barroso A, et al. Short telomeres are frequent in hereditary breast tumors and are associated with high tumor grade. *Breast Cancer Res Treat.* 2013;141(2):231–42.
25. Kulić A, Plavetić ND, Gamulin S, et al. Telomerase activity in breast cancer patients: association with poor prognosis and more aggressive phenotype. *Med Oncol.* 2016;33(3):23.
26. Jeong SA, Kim K, Lee JH, Cha JS, Khadka P, Cho HS, et al. Akt mediated phosphorylation increases the binding affinity of hTERT for import in α to promote nuclear translocation. *J Cell Sci.* 2015;128(12):2287–301.
27. Gupta A, Sharma S, Reichenbach P, Marjavaara L, Nilsson AK, Lingner J, et al. Telomere length homeostasis responds to changes in intracellular dNTP pools. *Genetics.* 2013;193(4):1095–105.
28. Podlevsky JD, Chen JJ. It all comes together at the ends: telomerase structure, function, and biogenesis. *Mutat Res.* 2012;730(1–2):3–11.
29. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, Ye K, Niu B, Lu C, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature.* 2013;502:333–9.
30. Lukashchuk N, Vousden KH. Ubiquitination and degradation of mutant p53. *Mol Cell Biol.* 2007;27(23):8284–95.
31. Zhu J, Sammons MA, Donahue G, Dou Z, Vedadi M, Getlik M, et al. Gain-of-function p53 mutants co-opt chromatin pathways to drive cancer growth. *Nature.* 2015;525(7568):206–11.
32. Benson CS, Babu SD, Radhakrishna S, Selvamurugan N, Ravi SB. Expression of matrix metalloproteinases in human breast cancer tissues. *Dis Markers.* 2013;34(6):395–405.
33. Eiró N, Fernandez-Garcia B, González LO, Vizoso FJ. Clinical relevance of matrix metalloproteases and their inhibitors in breast cancer. *J Carcinog Mutagen.* 2013;S13:004.
34. Ding D, Xi P, Zhou J, Wang M, Cong YS. Human telomerase reverse transcriptase regulates MMP expression independently of telomerase activity via NF- κ B-dependent transcription. *FASEB J.* 2013;27(11):4375–83.
35. Mannello F, Medda V. Nuclear localization of matrix metalloproteinases. *Prog Histochem Cytochem.* 2012;47(1):27–58.