



Armando, Romina Gabriela

Evaluación del efecto del AZT y de nuevos inhibidores de la unión DKC1-hTR sobre las actividades del complejo telomerasa en modelos tumorales



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Armando, R. G. (2022). *Evaluación del efecto del AZT y de nuevos inhibidores de la unión DKC1-hTR sobre las actividades del complejo telomerasa en modelos tumorales. (Tesis de doctorado). Bernal, Argentina: Universidad Nacional de Quilmes. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/3886>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Evaluación del efecto del AZT y de nuevos inhibidores de la unión DKC1-hTR sobre las actividades del complejo telomerasa en modelos tumorales

TESIS DOCTORAL

Romina Gabriela Armando

romaarmando.88@gmail.com

Resumen

La inmortalidad celular es uno de las principales características del cáncer. Las células tumorales tienen un potencial replicativo ilimitado debido, en la mayoría de los casos, a la actividad de la telomerasa. Esta holoenzima mantiene la longitud de los telómeros a partir del agregado de repeticiones TTAGGG al extremo cromosómico. Dado que esta enzima se encuentra presente en más del 80% de los tumores sólidos, la misma se ha convertido en un blanco interesante para el desarrollo de terapias dirigidas contra el cáncer.

El cáncer de mama es una de las patologías oncológicas más comunes, con más de 1.300.000 casos y 450.000 muertes anuales a nivel mundial. El tratamiento para el cáncer mamario incluye cirugía, radioterapia y terapia sistémica. Si bien se desarrollaron en las últimas décadas estrategias terapéuticas muy eficaces para el cáncer mamario, aquellos tumores que se clasifican como triple negativos siguen siendo difíciles de tratar ya que se trata de una enfermedad biológicamente agresiva con pocas opciones terapéuticas. Por otra parte, más del 90% de los tumores mamarios presentan actividad de la holoenzima telomerasa, siendo este porcentaje aún mayor en tumores de mayor agresividad y casi nulo en tejidos adyacentes o tumores benignos. Este escenario propicia el estudio de esta enzima como un potencial blanco para el desarrollo de nuevas drogas para el tratamiento del cáncer mamario triple negativo.

La presente tesis presenta dos ejes principales: a) analizar cómo la Azidotimidina (AZT), la cual presenta una comprobada eficacia en la inhibición de la telomerasa, ejerce su acción sobre las actividades extrateloméricas de TERT; b) el desarrollo y evaluación de nuevos inhibidores de la telomerasa a partir de la interrupción de la unión hTR-disquerina (DKC1) en el ensamblado de la holoenzima.

El primer capítulo se enfoca en las actividades extrateloméricas que presenta la telomerasa en el desarrollo tumoral. En este área, se ha determinado que TERT, principal componente de la telomerasa, actúa como modulador transcripcional en diversas vías de señalización. Durante muchos años se consideró que el AZT solo ejercía su acción antitumoral como terminador de cadena. Sin embargo, no existen evidencias contundentes acerca de su efecto sobre las actividades extrateloméricas de TERT. En función de lo antes mencionado, y dada la experiencia del grupo en el estudio del AZT como inhibidor de la actividad telomerasa, se analizó su efecto sobre las funciones no canónicas de TERT. Para esto se evaluaron genes modulados por la vía Wnt-βCatenina y NF-KB, y procesos tales como migración, adhesión y ciclo celular en células de carcinoma mamario murino F3I1. Los resultados obtenidos luego de 15 pasajes con AZT (600 μM) corroboran el efecto sobre la actividad telomerasa. En torno a las actividades extrateloméricas o no canónicas, se determinó un descenso del 64% ($p < 0.05$) en la transcripción de *c-myc*; un efecto similar sobre la transcripción de *cyc-d1* (38% $p < 0.05$); una caída del 80% en la expresión de *tnf-α* y en menor medida una baja sobre la expresión de *tert* e *i/6* (25% $p < 0,05$ y 30% $p < 0,05$, respectivamente). Paralelamente se evaluó el efecto sobre la migración, alcanzando una inhibición del 48% ($p < 0.05$). Además, se determinó el tiempo de duplicación de las células a distintos pasajes del tratamiento, obteniéndose un aumento de más de 3 veces en las células tratadas durante 15 pasajes en comparación con el control ($p < 0,001$). Por último, se estudió el efecto sobre ciclo celular, donde se pudieron observar cambios sutiles en las poblaciones de las distintas fases del ciclo celular en las células tratadas con AZT. Estos resultados nos permiten postular a dicha molécula no sólo como un inhibidor de la actividad telomerasa, sino también, como un posible modulador de los procesos extrateloméricos en los cuales se encuentra involucrada.

La segunda parte aborda la búsqueda y validación de nuevos inhibidores contra la holoenzima telomerasa. Para ello se ideó una estrategia dirigida a desestabilizar el complejo telomerasa a partir de la interrupción de la unión hTR-DKCI. Para llevar a cabo este trabajo se modeló la estructura tridimensional de DKCI humana. Esta estructura se utilizó para realizar un ensayo de *screening* virtual basado en *docking* sobre el dominio PUA de esta proteína a partir de una biblioteca de 300.000 compuestos de tipo "*drug like*". A partir de este ensayo se seleccionaron los primeros 20 compuestos que mostraron mayores valores de afinidad para proceder a la evaluación *in vitro* en la línea de adenocarcinoma mamario MOA MB 231. Luego de 48 h de tratamiento con los compuestos denominados 10 y 15 a una dosis 2 μM, se encontró una disminución de la actividad telomerasa del 57,3% y 54,6% ($p < 0,001$), respectivamente. A partir de esta información, se continuó el tratamiento con estos compuestos durante 55 pasajes, resultando en un acortamiento telomérico del 66% y 47% para los compuestos 10 y 15 respectivamente ($p < 0,001$). Luego se procedió a evaluar el efecto del tratamiento sobre la senescencia celular, obteniéndose para el compuesto 10

un incremento de 4 veces en la expresión de *p16ink4 α* ($p < 0,001$) y tinción positiva para la actividad SA β -galactosidasa, no encontrándose diferencias significativas con el compuesto 15. Respecto a los marcadores de apoptosis, para el compuesto 10 se obtuvo un aumento de 2,3 veces en la relación *bax/bc/2* ($p < 0,001$) y un incremento del 55% en la actividad caspasa 3 respecto a las células control ($p < 0,01$). Estos resultados nos permiten postular al compuesto 10 como un inhibidor novedoso de la actividad telomerasa, validando la estrategia utilizada durante este trabajo para el desarrollo de una terapia dirigida.

En conclusión, el presente trabajo ha permitido establecer las bases para el estudio del AZT como modulador de las actividades extra teloméricas de TERT involucradas en el desarrollo tumoral, más allá de su efecto como inhibidor de la actividad telomerasa. Por otra parte, hemos obtenido un compuesto novedoso con capacidad inhibitoria de la actividad telomerasa, el cual presentó sus efectos sobre una línea celular de cáncer de mama tipo triple negativo. Teniendo en cuenta la información existente y los resultados obtenidos, disponemos de una molécula novedosa con características aptas para su utilización, como terapia blanco específica, en el tratamiento de cáncer de mama triple negativo, con potencial aplicación clínica.



Tesis Doctoral

**“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL AZT Y DE
NUEVOS INHIBIDORES DE LA UNIÓN
DKC1-hTR SOBRE LAS ACTIVIDADES DEL
COMPLEJO TELOMERASA EN MODELOS
TUMORALES”**

Lic. Romina G. Armando

Director: Daniel E. Gomez

Co-Director: Diego L. Mengual Gómez

Laboratorio de Oncología Molecular
Departamento de Ciencia y Tecnología
Universidad Nacional de Quilmes

-2018-

AGENCIA
NACIONAL DE PROMOCION
CIENTIFICA Y TECNOLOGICA



CONICET



Consejo Nacional de Investigaciones
Científicas y Técnicas



Laboratorio de
Oncología Molecular



Universidad
Nacional de Quilmes



“Tu trabajo va a ocupar gran parte de tu vida, y la única forma de estar realmente satisfecho con lo que haces es haciendo un gran trabajo. Y la única forma de hacer un gran trabajo es amando lo que haces. Si aún no lo encuentras, sigue buscando. No te conformes. Como todos los asuntos del corazón, sabrás cuando lo hayas encontrado. Y al igual que cualquier relación importante, mejora con el paso de los años. Así que sigan buscando hasta que lo encuentren. No se detengan.” Steve Jobs, 2005.

A mi Familia, por el apoyo, el amor y la confianza incondicional.

Los estudios realizados durante esta tesis dieron lugar a las siguientes publicaciones y presentaciones a congresos:

Artículos y publicaciones en revistas científicas con referato

- **2016:** Armando RG, Mengual Gomez DL, Gomez DE. AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model. *Oncology Reports*. Septiembre 2016
- **2016:** Mengual Gomez DL, Armando RG, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Gomez DE. Telomerase as a cancer target. Development of new molecules. *Current Topics in Medicine*. Febrero 2016.
- **2014:** Mengual Gomez DL, Armando RG, Farina HG, Gomez DE. Telomerasa y Telómero: Su estructura y dinámica en salud y enfermedad. *Revista Medicina Buenos Aires*, Enviado.
- **2012:** Gomez DE, Armando RG, Alonso DF. AZT as a telomerase inhibitor. *Front Oncol*. 2012;2:113.
- **2012:** Gomez DE, Armando RG, Farina HG, Menna PL, Cerrudo CS, Ghiringhelli PD, Alonso DF. Telomere structure and telomerase in health and disease (review). *Int J Oncol*. 2012 Nov;41(5):1561-9

Capítulos de Libro

- **2017:** Gomez DE, Mengual Gómez DL, Maloukh L, Armando RG. Chapter2: Telomerase Activity. In: *Telomeres, Diet and Human Disease: Advances and Therapeutic Opportunities*. CRC Press. ISBN 9781498750912.

Congresos y reuniones Nacionales

- **2015:** Armando RG, Mengual Gomez DL, Lorenzano Menna P, Juritz El, Gomez DE. INHIBIDORES DE TELOMERASA: YENDO DE LA COMPUTADORA A LA MESADA. Jornadas de Doctorando y Estudiantes Avanzados de CyT. Universidad Nacional de Quilmes. 13-15 de Octubre de 2015.
- **2014:** Armando, R.; Mengual Gómez, DL; Alonso, DF; Gómez, DE. REGULACIÓN NEGATIVA DE C-MYC Y CYC-D1 MEDIADA POR LA INHIBICIÓN DE LA TELOMERASA POR AZT: IMPLICANCIA A NIVEL CELULAR EN EL MODELO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO F3II. *Revista Medicina Buenos Aires (74 Supl III)* 2014, p281.
- **2013:** Armando R.; Alonso D.; Mengual Gómez DL; Gomez DE. IMPACTO DEL TRATAMIENTO CON AZT SOBRE LAS ACTIVIDADES EXTRA-TELOMÉRICAS DE LA TELOMERASA EN EL MODELO DE CARCINOMA MAMARIO MURINO F3II. *Revista Medicina Buenos Aires (73 Supl III)* 2013, p193.

Congresos y reuniones Internacionales

- **2016:** Armando RG, Mengual Gomez DL, Gomez DE. Telomeropathies: a constellation of related genetic diseases caused by defects in the telomere maintenance machinery. 21th World Congress on Advances in Oncology and 19th International Symposium on Molecular Medicine. Atenas. Grecia. Octubre 2016
- **2016:** Armando R, Mengual Gomez DL, Gomez DE. AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model". EMBO Telomere, telomerase and disease meeting. Liège. Belgica. Abril 2016.
- **2015:** Armando RG, Mengual Gomez DL, Gomez DE. New inhibitors of telomerase. 20th World Congress on Advances in Oncology and 18th International Symposium on Molecular Medicine. Atenas. Grecia. Octubre 2015.

Índice

Abreviaturas.....	12
Introducción General	15
Generalidades del Cáncer	17
Cáncer de mama	18
Terapéutica actual del cáncer mamario	20
Telómero y Telomerasa	21
Arquitectura funcional de los telómeros	22
Complejo proteico relacionado al telómero	23
Arquitectura funcional de la telomerasa	27
Mantenimiento celular de los telómeros	28
Mecanismos involucrados en la regulación telomérica: Senescencia y Apoptosis	29
Telómeros, Telomerasa y Cáncer	32
Objetivo General	35
Objetivos Específicos	35
Capítulo 1: “AZT como modulador de las actividades telomérica y extrateloméricas del complejo telomerasa”	37
Introducción.....	39
Historia del AZT	41
AZT, Telómero y Cáncer	42
Actividades Extrateloméricas de TERT.....	43
Objetivo.....	48
Materiales y Métodos	49
Resultados.....	55
Efecto del AZT sobre la viabilidad celular	57
Determinación de la actividad telomerasa	57
Análisis de Transcritos	58
Efecto del AZT en el proceso de migración celular	60
Evaluación de la remodelación del citoesqueleto de actina.....	60
Efecto del tratamiento con AZT en el crecimiento y ciclo celular	61
Discusión	63
Conclusión.....	69

Capítulo 2: “Desarrollo de nuevos inhibidores de la unión disquerina-hTR en ensamblado de la holoenzima telomerasa, mediante <i>screening</i> virtual basado en <i>docking</i> ”	73
Introducción.....	75
Inicio del desarrollo y utilización de drogas en cáncer	77
Desarrollo de drogas en cáncer utilizando estrategias dirigidas a un blanco específico.....	77
disquerina como blanco molecular en Cáncer.....	91
Objetivo.....	97
Materiales y Métodos.....	99
Resultados.....	103
Análisis de la secuencia proteica de disquerina humana.	105
Reclutamiento de estructuras de disquerinas emparentadas.....	105
Modelado y estudio de la disquerina humana.	106
Búsqueda de ligandos por <i>docking</i>	108
Discusión	111
Conclusión.....	117
Capítulo 3: “Evaluación <i>in vitro</i> de los compuestos candidatos sobre las actividades del complejo telomerasa”	121
Introducción.....	123
Telomerasa como blanco en oncología: Desarrollo de nuevas moléculas	125
Objetivo.....	130
Materiales y Métodos.....	131
Resultados.....	135
Ensayo de sobrevivencia celular.....	137
Efecto de los compuestos sobre de la Actividad Telomerasa.....	138
Efecto del tratamiento crónico de los compuestos sobre la longitud telomérica.....	139
Evaluación de la capacidad de los compuestos de inducir senescencia.....	140
Evaluación de la capacidad de los compuestos de inducir apoptosis.....	142
Discusión	145
Conclusión.....	153
Conclusión General	157
Agradecimientos.....	163
Anexo	171
Bibliografía	177

Abreviaturas

aa: aminoácido.

ADME: Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción.

ADN: Ácido desoxirribonucleico.

ADNc: ADN copia.

ALT: Elongación alternativa de telómeros (*Alternative Lengthening of Telomere*).

ANOVA: Análisis de la varianza.

ARN: ácido ribonucleico.

ARNi: ARN de interferencia.

ARNm: ARN mensajero.

ARNr: ARN ribosomales.

AZT: Azidotimidina.

CDK: Quinasa dependiente de ciclina.

Cyc: Ciclina.

DAPI: 4',6-diamino-2-fenilindol.

DBVS: *Screening* virtual basado en *docking*.

DC: Disqueriatosis congénita.

DKC1: disquerina.

DMEM: *Dulbecco's Modified Eagle Medium*.

DMSO: Dimetilsulfóxido.

EMT: Transición epitelio mesenquimal.

ER: Estrógeno.

FDA: *Food and Drug Administration* (USA).

HER2: Receptor 2 de factor de crecimiento epidérmico humano.

hTERT: subunidad catalítica de la telomerasa humana.

hTR: ARN molde de la telomerasa humana.

IC₅₀: Concentración inhibitoria 50.

IL: Interleuquina.

Kcal: Kilocaloría.

MMP: Metaloproteasa de Matriz.

MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol.

NCBI: *National Center for Biotechnology Information (USA)*.

NIH: *National Institutes of Health (USA)*.

NLS: Señal de localización nuclear.

NRTI: Nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa.

NSCLC: Carcinoma pulmonar de células no pequeñas.

PBS: Buffer fosfato salino.

PDB: Banco de datos de proteínas.

PIN1X: *PIN2/TRF1-interacting telomerase inhibitor 1*

PR: Progesterona.

qPCR: PCR cuantitativa.

RNP: Ribonucleoproteína.

SA β gal: β galactosidasa asociada a senescencia.

SEM: Error estándar de la media.

SFB: Suero fetal bovino.

SnoRNA: ARNs pequeños nucleolares.

SnoRNP: Ribonucleoproteínas pequeñas nucleolares.

TANK: Tanquirasa

TERRAs: ARNs contenedores de repeticiones teloméricas.

TERT: Subunidad catalítica de la telomerasa.

TNF: Factor de necrosis tumoral.

TR: ARN molde de la telomerasa.

TRF: Factor de unión a repeticiones teloméricas.

VEGF: Factor de crecimiento endotelial vascular.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana.

Introducción General

Generalidades del Cáncer

El término genérico “cáncer” representa a un a un extenso grupo de más de 100 enfermedades que pueden afectar casi a cualquier estructura del organismo. La característica principal de las células transformadas es el crecimiento anormal y aumentado, el cual da lugar a la formación de un tumor. Sin embargo, no todos los tumores son malignos. Las neoplasias benignas son aquellas que se circunscriben a la localización original presentando un límite definido en la arquitectura tisular que las rodea, mientras que las neoplasias malignas están originadas por células agresivas con capacidad de invadir los tejidos circundantes, diseminarse y formar focos metastásicos en sitios distantes (Bal De Kier Joffe E, 2008).

En 2012 el cáncer fue responsable de 8.2 millones de muertes estimadas a nivel mundial. Argentina se encuentra dentro del rango de países con incidencia de cáncer media-alta, de acuerdo a las estimaciones realizadas por la Agencia Internacional de Investigación sobre Cáncer (IARC) para 2012 (Ferlay J, 2013). Según los datos publicados por el Instituto Nacional del Cáncer, el volumen más importante de casos estimados en Argentina corresponde al cáncer de mama con más de 18.700 casos nuevos por año (18% del total y 36% del total de casos en mujeres). En incidencia, el cáncer de mama es seguido por el de próstata (13% del total), el de colon y recto (10.5%) y pulmón (10%) (<http://www.msal.gov.ar/inc/acerca-del-cancer/incidencia/>).

El cáncer se caracteriza por ser una enfermedad compleja en donde intervienen diferentes factores. Los tumores comparten ciertas capacidades biológicas que se manifiestan o son adquiridas a lo largo de su desarrollo. Entre estas capacidades se encuentran: capacidad proliferativa sostenida; insensibilidad a señales inhibitorias de crecimiento; resistencia a la muerte celular; capacidad de inducir angiogénesis; activación de los procesos de invasión y metástasis; e inmortalidad replicativa ilimitada. A estas características esenciales se agrega la inestabilidad genómica que presentan éstas células y la capacidad de reprogramar el metabolismo celular y de evadir la respuesta inmune del organismo. Además, los tumores exhiben otro grado de complejidad al contener un repertorio de células aparentemente normales, las cuales contribuyen a la adquisición de estas características mediante la creación del “microambiente tumoral”, contribuyendo al desarrollo del fenotipo transformado. La aplicación de todos estos conceptos constituyó la base para el desarrollo de nuevas drogas y estrategias para el tratamiento del cáncer humano (Imagen 1, Hanahan D y Weinberg RA, 2011).

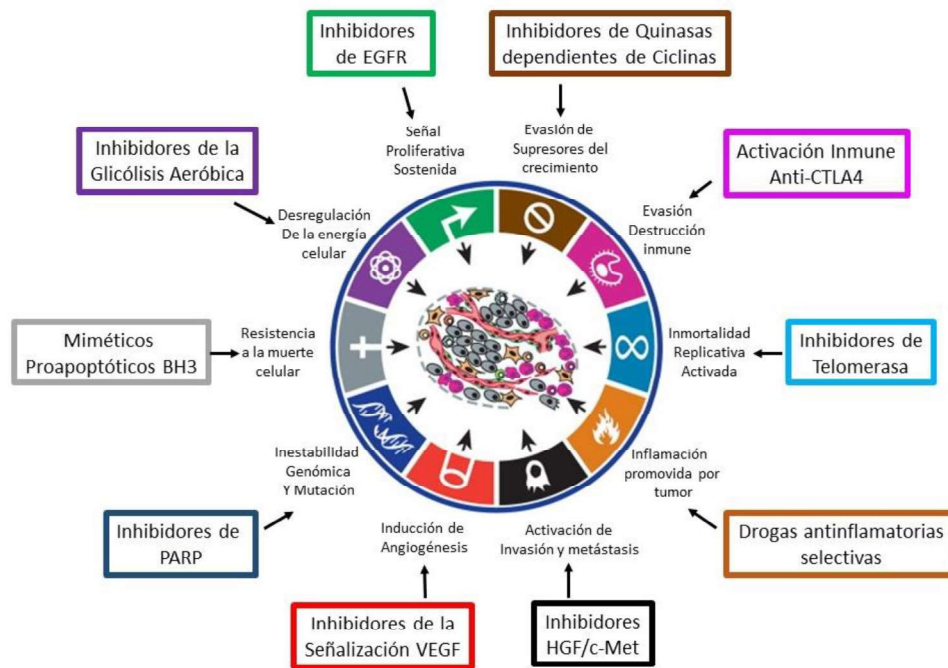


Imagen 1. Terapias Dirigidas contra las principales características del Cáncer. Distintas estrategias que fueron utilizadas para el desarrollo de drogas que ataquen a cada una de las características adquiridas por las células, que promueven el desarrollo tumoral (Adapatado de Hanahan D y Weinberg RA, 2011)

Cáncer de mama

El cáncer de mama es uno de los tipos de cáncer más comunes con más de 1.300.000 casos y 450.000 muertes anuales a nivel mundial (Banin Hirata BK, 2014). Las neoplasias mamarias constituyen una enfermedad heterogénea que difiere de manera significativa entre pacientes (heterogeneidad intertumoral) como así también dentro del mismo tumor en cada individuo (heterogeneidad intratumoral) (Turashvili G, 2017).

Existen varias clasificaciones propuestas para el cáncer de mama. Las mismas se basan en sus características invasivas, su histología, ocurrencia y perfil molecular. Basado en el sitio de ocurrencia, los tumores pueden ser clasificados como lobulares (sitiados en los lóbulos mamarios) o ductales (sitiados en los ductos mamarios). Los carcinomas también pueden surgir a partir de células epiteliales invasivas (carcinoma medular), células productoras de mucosa (carcinoma mucinoso), o como un subtipo de carcinoma ductal invasivo (carcinoma tubular). Tradicionalmente, el cáncer de mama ha sido clasificado mediante la detección inmunohistoquímica de receptores asociados a distintas funciones celulares. Los tumores derivados de células luminales son el grupo más común dentro de

los distintos tipos de cáncer de mama, representando aproximadamente el 70% de los casos de cáncer mamario. Los mismos expresan los receptores hormonales para estrógeno (ER), progesterona (PR) o tienen amplificado el receptor HER2/ErbB2 (del inglés, *Human epidermal receptor growth factor 2*). Los tumores que sobreexpresan HER2 son considerados de mayor malignidad, sobreexpresando otros genes como *grb7* y *pgap3* y pudiendo presentar mutaciones en el gen *p53* (Velloso F, 2017)

Los tumores que carecen de la expresión de los receptores ER, PR y HER2 son referidos como cáncer mamario triple negativo, los cuales derivan en su mayoría de células basales. El perfil molecular de expresión génica también ha redefinido a los distintos subtipos como luminal A, luminal B, enriquecimiento en HER2 y simil basales. Esta clasificación presenta cierto grado de paralelismo con las categorías inmunohistoquímicas (Velloso F, 2017).

Por último, recientemente se ha sumado una clasificación basada en claudinas para cáncer mamario. Las mismas constituyen una familia de proteínas presentes exclusivamente en las uniones estrechas de las células epiteliales. Los tumores con baja expresión de claudinas, que además carecen o presentan baja expresión de E-cadherina, son más heterogéneos que los subtipos basales y luminal A, además de presentar mayor infiltración linfocítica, tumores de mayor tamaño y alta expresión de marcadores mesenquimales, entre sus principales características (Velloso F, 2017). En la Tabla 1 se observa un resumen de las clasificaciones moleculares e histológicas para los distintos subtipos de cáncer de mama.

Clasificación basada en sitio de ocurrencia	Clasificación basada en biomarcadores			
	Subtipo	Estado del biomarcador	Pronóstico	Prevalencia
Carcinoma in situ				
Lobular	Luminal A	ER+/PR+/HER2-/Ki67-	Bueno	~30%
Ductal	Luminal B	ER+/PR+/HER2-/Ki67+	Intermedio	~20%
Carcinoma Invasivo (Infiltrante)				
Medular	Luminal B	ER+/PR+/HER2+/Ki67+	Pobre	~10%
Mucinoso	HER2 enriquecido	ER-/PR-/HER2+	Pobre	~15%
Ductal	TN/ Basal	ER-/PR-/HER2-	Pobre	~10%
Lobular	Claudina baja	ER-/PR-/HER2-/Claudina-	Pobre	~10%
Tubular	Normal	ER+/PR+/HER2-/Ki67-	Intermedio	~5%

Tabla 1. Clasificación de los subtipos de cáncer de mama, basados en el sitio de ocurrencia y/o en biomarcadores.

Si bien estas características histopatológicas y/o genómicas permiten realizar un diagnóstico y diseñar una estrategia terapéutica, la causa de muerte en más del 90% de estas pacientes no es el tumor primario, sino las metástasis en sitios distantes. Los sitios metastásicos más frecuentes para tumores primarios mamaros son hueso, pulmón, hígado y cerebro (Melzer C, 2017).

Aproximadamente 10-15% de los pacientes con cáncer de mama desarrollan metástasis dentro de los primeros 3 años de la detección inicial de tumor primario, aunque existen abundantes casos en los que la manifestación de metástasis se da a tiempos mayores a 10 o 15 años posteriores al primer diagnóstico (Sun YS, 2017).

Terapéutica actual del cáncer mamario

En la actualidad, el tratamiento primario para el cáncer mamario es la cirugía. Luego se incluyen la radioterapia y terapia sistémica, en sus diversas formas. La terapia elegida está basada en la determinación de la expresión de los receptores mencionados por inmunohistoquímica (IHQ) (Schnitt SJ, 2010). Existen diferentes tipos de terapias sistémicas para el cáncer mamario: quimioterapia, terapia hormonal y terapia dirigida.

La quimioterapia adyuvante basada en antraciclinas se convirtió en la más utilizada desde los años 1990s. Dentro de este grupo se pueden encontrar a la Doxorubicina y la Epirubicina. Estos agentes se los combina con taxanos, tales como el Docetaxel o el Paclitaxel, la Ciclofosfamida, y también con 5-fluorouracilo (Perez E, 2005). Actualmente se utiliza quimioterapia como neoadyuvante, adyuvante y en escenarios metastásicos (Patel SA y DeMichele A, 2017).

La terapia hormonal se basa en la presencia de los receptores de estrógeno y/o progesterona en los tumores, permitiendo la utilización del antagonista estrogénico Tamoxifeno y de los inhibidores de aromatasas que bloquean la síntesis de estrógeno, como el Anastrozole y el Letrozole. Los agentes antihormonales concomitantes con quimioterapia son la estrategia terapéutica más utilizada para tumores mamaros ER+ y PR+. También se utiliza como tratamiento de segunda línea el Fulvestrant, un antagonista puro del receptor de estrógeno (Lukong KE, 2017).

Con respecto a las terapias dirigidas, se destaca la utilización del anticuerpo monoclonal anti HER2 Trastuzumab, para aquellos tumores mamaros que presentan la amplificación en este gen. También se aprobó como tratamiento de primera línea la combinación del anticuerpo monoclonal anti VEGF (factor de crecimiento del endotelio vascular) Bevacizumab con paclitaxel en pacientes con cáncer mamario metastásico HER2 negativos. También se probaron inhibidores de tirosina quinasa para el tratamiento de cáncer mamario. Un ejemplo de ellos es el inhibidor Lapatinib, que es inhibidor de HER1 y HER2 (Rubovszky G y Horváth Z, 2017).

Respecto a los tumores con características triple negativo, la quimioterapia continúa siendo el tratamiento pilar, dando como resultado pacientes con remisión completa de la enfermedad luego de la quimioterapia neoadyuvante, incluyendo un pronóstico favorable a pesar de la agresividad

inherente a este subtipo tumoral. Sin embargo, los pacientes que son menos respondedores a la quimioterapia, tienen un pronóstico desfavorable evidente, con altas tasas de recurrencia y mortalidad. Este escenario es el reflejo clínico de la falta de potenciales blancos en los tumores mamarios triple negativo, lo cual refuerza la búsqueda y desarrollo de nuevos blancos y drogas para el tratamiento de este tipo tumoral (Marhold M, 2016).

Durante los últimos años se han desarrollado varias terapias contra blancos específicos para distintos tipos tumorales. Los desarrollos recientes han contribuido al estudio de protocolos de tratamientos más específicos para los pacientes con cáncer de mama. Sin embargo, uno de los principales desafíos que se presentan en la actualidad es el de resolver los mecanismos de resistencia de la célula, los cuales se desarrollan poco tiempo después del comienzo del tratamiento. Entre estos mecanismos se encuentra la resistencia a la terapia endócrina, a inhibidores de tirosin quinasa, a factores antiangiogénicos, etc. Una de las estrategias más prometedoras para el tratamiento de estos mecanismos es la combinación de drogas que ataquen diferentes vías de señalización, generando una acción sinérgica sobre el bloqueo de las rutas de escape para la célula y minimizando la aparición de mecanismos de supervivencia. Actualmente se están realizando distintos ensayos clínicos para el tratamiento de estos tumores resistentes, en los cuales se combinan distintos agentes quimioterápicos con terapias dirigidas (Masoud V, 2017).

Telómero y Telomerasa

Hace más de 70 años Müller y McClintock establecieron que los extremos de los cromosomas eucariotas poseían una estructura especial necesaria para mantener la integridad de los cromosomas, a los que llamaron 'telómeros' (Palm W, 2008; Martinez P 2011). Pocos años después, McClintock demostró que los telómeros poseen una función esencial para proteger la fusión de los extremos de los cromosomas. Décadas más tarde, diferentes técnicas moleculares revelaron que los extremos de los cromosomas consistían en repeticiones ricas en guanina (Chong L, 1995).

Cuando la célula se divide, se copian todos sus cromosomas de modo que cada célula hija recibe una copia idéntica de todos los cromosomas. En cada ronda de replicación el ADN telomérico pierde un determinado número de bases debido a la imposibilidad de la ADN polimerasa de concluir por completo el proceso de copia. De este modo, los telómeros terminan limitando la cantidad de veces que una célula se puede dividir, ya que la proliferación celular se frena cuando la longitud de los telómeros alcanza un valor crítico que conlleva a la muerte de las células y, consecuentemente, a la degeneración tisular relacionada con el envejecimiento. Sin embargo, una alternativa es que ese mismo proceso induzca la transformación tumoral, activando los mecanismos moleculares de

mantenimiento de la longitud de los telómeros. Este mecanismo está mediado principalmente por la holoenzima telomerasa, un complejo ribonucleoproteico que es capaz de unirse al telómero y alargarlo, añadiéndole secuencias teloméricas, con lo que se logra evitar el desgaste de las estructuras protectoras en esos tipos celulares y alcanzar una capacidad de proliferación ilimitada (Bianchi A, 1999).

Arquitectura funcional de los telómeros

El término telómero hace referencia a un gran complejo nucleoprotéico que se encuentra en los extremos de los cromosomas, donde su estructura es diferente del resto de la cromatina (Smogorsewska A, 2000). Los telómeros funcionales son estructuras estables que no están sujetas a degradación, recombinación o fusión con extremos de otros cromosomas, por lo que no son censados por los sistemas de reconocimiento de daño de ADN, aunque técnicamente, un extremo cromosómico constituya un corte en la doble cadena de ADN (Karlseder J, 1999). El ADN telomérico de prácticamente todos los organismos eucariotas consiste en secuencias cortas y repetitivas. La secuencia primaria y la organización de estas repeticiones, es muy conservada en la mayoría de las especies, ya que tales repeticiones suelen contener grupos de tres o más G, siendo la cadena que los contiene la que constituye el extremo 3' de los cromosomas (Van Steensel B, 1997).

El número de repeticiones en los telómeros varía ampliamente entre los diferentes organismos y también entre los correspondientes a un mismo organismo. Para todos los vertebrados, incluyendo los seres humanos, la secuencia repetitiva es d(TTAGGG) (Van Steensel B, 1998). La extensión de los telómeros individuales puede variar desde pocos kb, como en algunas líneas celulares transformadas, o superar los 100 kb, por ejemplo en algunas células de ratón. La mayor parte de ese ADN está organizado en nucleosomas y sólo la parte más distal se puede encontrar en una conformación diferencial como cromatina no nucleosómica, siendo análoga a la estructura que se encuentra en los telómeros de levadura o *Tetrahymena* (Gong Y, 2010).

La cadena de ADN telomérica rica en G está siempre orientada en sentido 5'-3' hacia la parte terminal del cromosoma, con el extremo 3' extendido en aproximadamente 200 nucleótidos como consecuencia de la replicación terminal (Lee CC, 2001). El extremo 3' extendido rico en G puede formar estructuras complejas de los telómeros, denominados G-quadruplex, los cuales cumplen como funciones principales la protección telomérica y la localización de la telomerasa (Moye AL, 2015). Estas estructuras pueden adoptar diferentes conformaciones, y se mantienen unidos por planos cuadrados de cuatro guaninas que interactúan mediante el apareamiento alternativo de enlaces de tipo Hoogsteen (Martinez P, 2010; Takai KK, 2011). En este tipo de interacción, dos nucleobases

pertenecientes a cadenas distintas, interactúan a través del surco mayor mediante el establecimiento de puentes de hidrógeno (Rhodes D, 2015).

La formación de tales estructuras en los telómeros puede ser un problema para la replicación del ADN y el mantenimiento de los telómeros. Los telómeros forman grandes estructuras llamadas bucles de los telómeros, o T-bucles que sirven para secuestrar el extremo terminal de los cromosomas. Aquí, el ADN de una sola hebra se enrolla alrededor de un largo círculo estabilizado por proteínas de unión al telómero. Al final del T-bucle, el ADN telomérico de una sola hebra se entrelaza con una región de ADN doble cadena dando lugar a una estructura de triple hebra denominada bucle de desplazamiento o D-bucle (Imagen 2) (Takai KK, 2011).

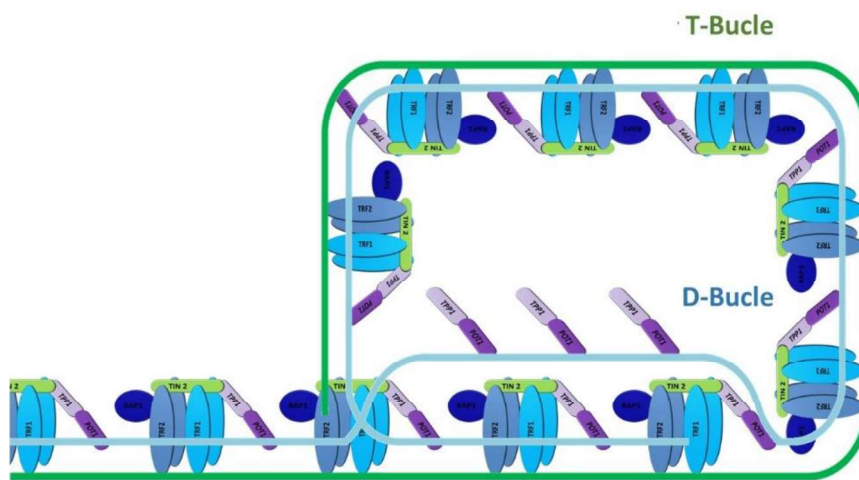


Imagen 2. Estructura de T-bucle y D-bucle del extremo telomérico, unido a la shelterina.

Complejo proteico relacionado al telómero

A pesar que la función de los telómeros se conserva en diferentes organismos, la arquitectura y la composición de las proteínas con las que interactúan son muy variadas y supone haber cambiado rápidamente a lo largo de la evolución (Tejera AM, 2010). En los seres humanos, los telómeros se articulan con un complejo de seis proteínas llamado shelterina o complejo protector, compuesto por TRF1 y TRF2 que a su vez interactúan con RAP1, TIN2, TPP1 y POT1 para asociarse al ADN telomérico de doble y simple cadena (Baumann P, 2010). La shelterina impide la activación de un Mecanismo de Reparación de ADN (MRA) en los extremos de los cromosomas y actúa en la regulación de la actividad de la telomerasa (Tejera AM, 2010).

En las células humanas, las proteínas de interacción con los telómeros más conocidas son TRF1 y TRF2 (del inglés, *Telomeric Repeat Binding Factor 1 y 2*). El primero en ser identificado fue TRF1

(Schoeftner S, 2008). La secuencia C-terminal de esta proteína reconoce específicamente un fragmento de ADN telomérico y actúa como regulador negativo de la longitud telomérica. TRF2 es otro regulador negativo de la longitud telomérica (Nergadze SG, 2009) y tiene funciones como estabilizador de la secuencia G repetitiva que sobresale y es capaz de prevenir fusiones teloméricas (De Lange T, 2005; Hsiao SJ, 2008). Las proteínas TRF1 y TRF2 restringen la actividad de la telomerasa, inhibiendo la elongación de los telómeros. Además, están involucradas en las vías de las ATM (del inglés, *ataxia-telangiectasia mutated*) y ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*) quinasas, las cuales son las encargadas de orquestar la vía de señalización de respuesta al daño de ADN (Chen Y, 2008).

En los telómeros humanos TRF2 recluta a la proteína RAP1 (del inglés, *Human Repressor Activator Protein*), la cual protege los extremos teloméricos del ataque propiciado por los mecanismos de reparación del ADN. Se ha reportado que su sobreexpresión causa alargamiento telomérico (Zhou XZ, 2001). RAP1 es un componente del complejo shelterina en los telómeros de mamíferos, pero su papel *in vivo* en el mantenimiento de la longitud telomérica aún requiere de mayor investigación (Janoušková E, 2015, Cai Y, 2017).

Otro de los componentes de la shelterina es la proteína POT1 (del inglés, *protection of Telomeres Protein-1*). POT1 actúa como un regulador de la longitud telomérica dependiente de telomerasa y colabora en la formación de la estructura D-bucle en la estabilización telomérica. El silenciamiento de POT1 mediante ARNi induce el alargamiento telomérico y la inestabilidad genómica. POT 1 protege el ADN telomérico simple cadena mediante la heterodimerización con TPP1, contribuyendo a la formación del T-bucle en asociación con TRF2 (Patel TN, 2015).

TPP1 (del inglés, *Tripeptidyl-peptidase 1*) es una proteína necesaria para el reclutamiento de la telomerasa *in vivo*. Además posee una función dual en la protección y la elongación de los telómeros, dando lugar a la preservación de la función del telómero y a la prevención de la aparición temprana de enfermedades degenerativas (37). Esta proteína presenta un papel importante en la regulación de la longitud telomérica ya que actúa como un activador o inhibidor de la telomerasa dependiendo de la posición de POT1 en el extremo 3' extendido (Latrack CM, 2010).

TIN2 (del inglés, *TRF1/ TRF2 Interacting Nuclear Protein-2*) es un componente central de la shelterina. Esta proteína es la encargada de conectar a las proteínas TPP1 y POT1 con los otros componentes y estabilizar a TRF1 y TRF2 en los telómeros. TIN2 presenta dos isoformas derivadas de *splicing* alternativo, de las cuales aún se desconoce sus diferencias a nivel funcional. La actividad de TIN2 está regulada indirectamente por TRF1, contribuyendo a la regulación de longitud de los telómeros (Patel TN, 2015).

En la Imagen 3 se puede observar un esquema representativo de la estructura de la shelterina interactuando con el extremo telomérico.

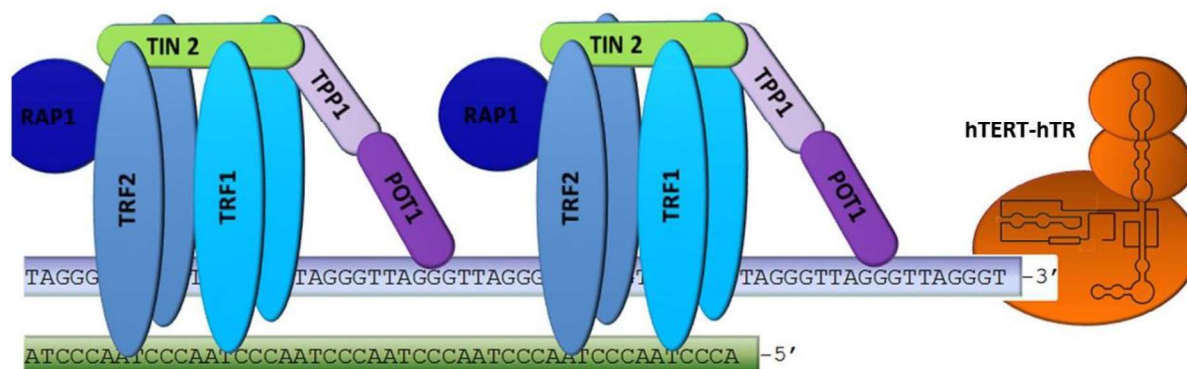


Imagen 3. Estructura de la shelterina y sus componentes en el extremo telomérico.

Otro factor estructural que determina la función del telómero es la presencia de ARNs denominados TERRAs (del inglés, *telomere repeat containing RNAs*). Estos ARNs se crean a partir de 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 implicados en la formación de heterocromatina telomérica, la protección de los telómeros y la regulación negativa de la telomerasa, ya que pueden hibridar con el ARN de la telomerasa con alta afinidad e interactuar con la subunidad catalítica hTERT (Deng Z, 2009).

Los componentes de shelterina se asocian cuantitativamente con los telómeros, requieren las repeticiones 5'-TTAGGG-3' para el montaje y están presentes en los telómeros durante todo el ciclo celular. Sin embargo, la shelterina ejerce sus funciones en los telómeros a través del acople transitorio de factores accesorios (Patel TN, 2015). Entre estos factores asociados se destaca principalmente la tankirasa (TANK), asociada a TRF1 y TRF2. La tankirasa se une a TRF1 y añade cadenas de poli-ADP-ribosa a los residuos de glutamato (42). Esta modificación post-traducciona l conduce a una disminución en la afinidad de TRF1 para el ADN, y en la degradación proteosoma l de la proteína. Por lo tanto, TANK es un regulador positivo de la longitud de los telómeros a través de su acción de eliminar eficazmente TRF1 de los telómeros. Existen dos tipos de TANK, las cuales presentan grados de homología y funciones similares. (Seimiya H, 2006).

PINX1 (del inglés, *PIN2/TRF1-interacting telomerase inhibitor 1*) es un inhibidor indirecto de la telomerasa, ya que esta función se desarrolla por interacción con TRF1 cuando se encuentra asociado a la telomerasa. La unión con TRF1 es muy específica, mientras que con TRF2 no se ha encontrado asociación detectable. PINX1 es capaz de interactuar simultáneamente con la subunidad catalítica de la telomerasa proporcionando a la enzima un enlace físico con TRF1. Se ha demostrado

que PINX1 es capaz de mediar en el control de longitud de los telómeros a través de la inhibición de la telomerasa, con el consecuente acortamiento telomérico (Cheung DH, 2012).

También hay factores asociados a TRF2, entre los que se destacan Apollo, el complejo MRN, WRN/FEN1 y ORC complejo TERRA. La interacción de Apollo con los telómeros es completamente dependiente de TRF2, y presumiblemente contribuye a la formación del extremo 3' extendido en la cadena líder de los telómeros, y la replicación eficaz a través del tracto telomérico (Sarthy JF, 2010). Otro factor asociado a TRF2 es el complejo MRN (Mre11-Rad50-Nbs1) con una acción similar a Apollo. El complejo MRN también podría promover la elongación de los telómeros por la regulación negativa de TRF1 (Lamarche BJ, 2010).

WRN (Proteína Werner) y FEN1 (Flap Endonucleasa 1) actúan como una pareja uniéndose ambos a TRF2. Las mutaciones en el locus WRN se asocian con el síndrome de Werner, un cuadro caracterizado por el envejecimiento prematuro, alta incidencia de diabetes y enfermedades cardiovasculares, así como un fenotipo celular de senescencia prematura, alta inestabilidad cromosómica y disfunción de los telómeros (Saharia A, 2008).

La interacción del ORC (del inglés, *origin recognition complex*) con el ARN TERRA genera un complejo capaz de evitar defectos replicativos a nivel telomérico. Además la presencia de TERRAs le brinda estabilidad a una interacción entre TRFs y ORC formando un complejo ternario. El agotamiento de TERRA conduce a un cambio en la estructura de la cromatina detectable por modificaciones de las histonas. Actualmente, se considera que los TERRA son importante para el mantenimiento de la heterocromatización de los telómeros (Deng Z, 2007; 2009).

Además de los sitios de anclaje situados dentro de la propia telomerasa, se ha sugerido que las proteínas asociadas con la telomerasa poseen un vínculo físico con componentes del complejo shelterina, lo que proporciona nueva información sobre el mecanismo de síntesis de los telómeros.

Arquitectura funcional de la telomerasa

En la mayoría de los mamíferos, el mantenimiento de la longitud telomérica se lleva a cabo principalmente por una retrotranscriptasa específica, llamada telomerasa, que inicialmente se identificó en ciliados. La holoenzima telomerasa humana catalíticamente activa es una ribonucleoproteína (RNP) que se encuentra compuesta por la subunidad catalítica hTERT y por el ARN molde, denominado hTR. hTERT es una proteína con 4 dominios altamente conservados: dominio telomerasa N-Terminal (TEN); dominio de unión a TR (TRBD); dominio retrotranscriptasa y extensión C-terminal (CTE). El dominio retrotranscriptasa contiene el sitio activo de la enzima telomerasa, el cual muestra una clara homología con los dominios de transcriptasas reversas de retrotransposones o retrovirus. Por otra parte, hTR es el molde que permite la transcripción reversa mediada por la telomerasa. El mismo se presenta de distintas formas entre los organismos, pero en todos los casos conserva 4 regiones: el sitio molde; una región “*pseudoknot*”; una secuencia tipo *loop* de interacción con hTERT y un elemento 3' requerido para la estabilidad del ARN. (Schmidt JC, 2015). Además de estas subunidades, varias otras proteínas son necesarias para el ensamblaje *in vivo*, el tráfico subcelular y la asociación al telómero de la holoenzima telomerasa funcional. Una característica a destacar en la formación del complejo es el rol de la disquerina pseudouridina sintasa (DKC1), la cual a través de su dominio PUA, interactúa y permite la correcta disposición espacial del hTR maduro. Luego se asocia con las proteínas nucleolares denominadas NOP10, NHP2 y la chaperona NAF1, la cual es reemplazada por GAR1 en el complejo maduro. Estas proteínas son indispensables para la actividad telomerasa, ya que de las mismas depende el correcto ensamblaje de la holoenzima. Luego de la biogénesis de este complejo, una fracción del mismo forma un complejo con hTERT mediante múltiples interacciones ARN-proteína (Vogan J, 2015). Varios reportes indican que hTERT se asocia con las chaperonas HSP90 y P23 como así también con las ATPasas Pontina y Reptina. HSP90 y P23 interactúan con la telomerasa madura, favoreciendo la actividad de la misma. En contraste con estas proteínas, Reptina y Pontina se asocian a un conjunto de hTERT que todavía no se ha incorporado dentro de la RNP enzimáticamente activa, sugiriendo un potencial rol en el ensamblaje de la telomerasa. Otra de las proteínas del complejo es TCAB1 (del inglés, *Telomerase Cajal Body protein 1*), la cual no es requerida para la actividad enzimática, pero es esencial en el tráfico intracelular de la telomerasa hacia los cuerpos de Cajal, en donde es ensamblada. (Schmidt JC, 2015). En la Imagen 4 se encuentra representada la holoenzima telomerasa.

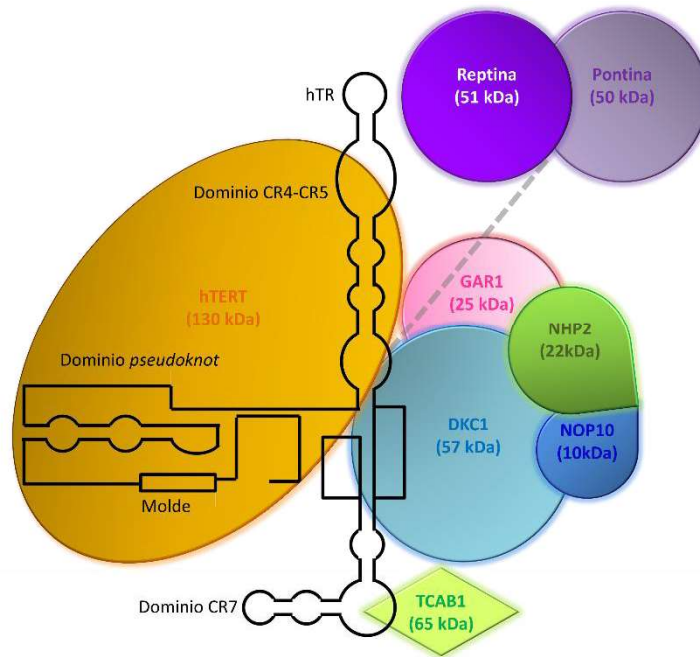


Imagen 4. Estructura de la holoenzima telomerasa y proteínas asociadas.

Mantenimiento celular de los telómeros

Una función fundamental de los telómeros es la de actuar como amortiguador en la erosión de los extremos de ADN cromosómico debido al problema de la replicación terminal. Las ADN polimerasas convencionales son unidireccionales y no pueden copiar todas las bases en el extremo 3' después de la eliminación del cebador. Como resultado, en cada ciclo de replicación el cromosoma no puede ser sintetizado por completo y se pierde el extremo 3'. De no resolverse el problema replicativo, el contenido genético completo no podría transferirse de generación en generación. Como consecuencia, todas las especies deben tener, al menos a nivel de las células germinales, un mecanismo que permita la replicación completa de sus genomas (Mengual Gómez, 2014).

Diferentes organismos han adquirido evolutivamente distintos métodos para prevenir la pérdida del ADN en los extremos de sus cromosomas, sin embargo, la mayoría de los mamíferos usan una retrotranscriptasa específica recién descrita, denominada telomerasa.

Existen células que carecen de actividad telomerasa, pero son capaces de mantener o alargar sus telómeros por medios alternativos, a los que se denominaron ALT (del inglés, *Alternative Lengthening of Telomeres*). Aproximadamente entre el 5% y 15% de los tumores humanos utilizan esta

estrategia para la mantención de la longitud telomérica (Heaphy CM, 2011). El mecanismo de este proceso sugiere estar basado en la replicación por recombinación homóloga dependiente de ADN. Las principales características de las células que presentan ALT son: ausencia de actividad telomerasa; heterogeneidad en la longitud telomérica; formación de promielocitos asociados a ALT; cuerpos nucleares y una gran frecuencia en el intercambio de cromátidas hermanas teloméricas (Jeitany M, 2017).

El alargamiento de los telómeros por la telomerasa es un proceso que ocurre en diferentes etapas (Imagen 5). En primer lugar, los nucleótidos del extremo 3' del ADN telomérico se hibridan con el extremo de ARN molde en el interior del componente hTR del complejo telomerasa. La secuencia molde de 11 nucleótidos es complementaria a casi dos repeticiones teloméricas. En segundo lugar, la brecha en el extremo del molde se completa por síntesis, utilizando nucleótidos trifosfato en el sitio catalítico de la enzima (hTERT). Por último, la cadena sintetizada se transloca en dirección 5' con el fin de permitir la formación de una nueva brecha y la repetición del ciclo (Mengual Gómez, 2014).

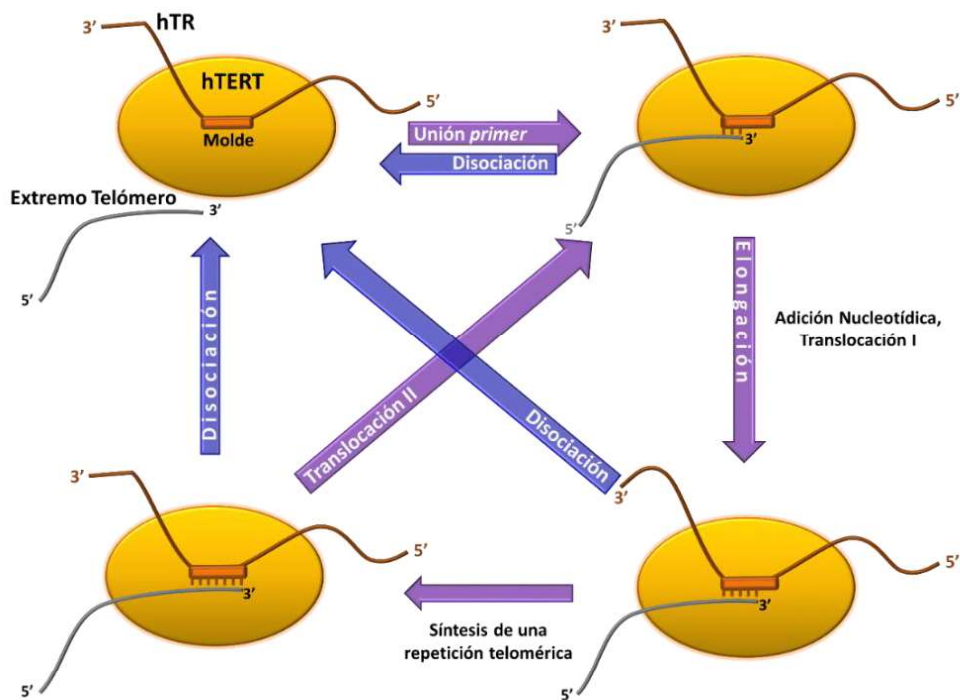


Imagen 5. Mecanismo de elongación telomérica mediado por la holoenzima telomerasa.

Mecanismos involucrados en la regulación telomérica: Senescencia y Apoptosis

La senescencia celular fue descrita por primera vez por Hayflick y Moorhead como la pérdida progresiva e irreversible del potencial proliferativo de células somáticas humanas. Este fenómeno es caracterizado no sólo por la pérdida de capacidad replicativa, sino también por una serie de cambios

dramáticos en la morfología celular, expresión génica, metabolismo, epigenética y otros procesos (van Deursen JM, 2014). Se trata de un fenotipo estable, con células senescentes capaces de mantenerse en cultivo por una gran cantidad de tiempo luego del arresto inicial (Vitorelli S, 2017).

Hasta ahora, la mejor explicación para la senescencia replicativa es el acortamiento telomérico. Estas zonas, como se ha mencionado anteriormente, son zonas que se encuentran en los extremos de los cromosomas, compuestas por repeticiones de ADN asociadas a proteínas. En la década del 90, se demostró que las regiones teloméricas se acortaban gradualmente con cada división celular, y que esto se correlacionaba con la inducción de senescencia celular (Harley CB, 1990). De manera determinante, se evidenció que la expresión ectópica de la holoenzima telomerasa, contraataca el acortamiento telomérico dirigido por la división celular, evitando la entrada en senescencia (Bodnar AG, 1998). De esta manera, se demostraba que la longitud telomérica es un factor limitante en el arresto senescente, jugando un papel principal en este proceso y dando origen al concepto de senescencia replicativa.

Si bien la senescencia replicativa es una de las explicaciones más relevantes, el proceso de senescencia celular se puede disparar por otros factores. Entre ellos se encuentra el stress oncogénico, generado por la sobreexpresión de oncogenes tales como RAS, RAF, PI3K, etc; como así también por el silenciamiento de genes supresores de tumor, como PTEN o pRB. Otros factores son agentes externos que dañen al ADN, como la radioterapia o la quimioterapia, especies reactivas de oxígeno (ROS), daño al ADN no resuelto, etc. (Yaswen P, 2015)

Más allá del arresto del ciclo celular, las células senescentes presentan cambios dramáticos en lo que respecta a expresión génica, metabolismo, epigenoma, y de manera muy relevante, el perfil de secreción, conocido como Fenotipo Secretorio Asociado a Senescencia (SASP, del inglés *Senescence-Associated Secretory Phenotype*), el cual media las interacciones entre las células senescentes y las aledañas (Coppé JP, 2008). Este fenotipo incluye la secreción de citoquinas proinflamatorias, factores de crecimiento, proteínas degradadoras de matriz y reclutamiento de células del sistema inmune, mecanismo por el cual la célula senescente señala la limpieza de sus propios detritos, y estimula las células progenitoras para la regeneración tisular.

En cuanto al fenotipo de las células senescentes, las células adherentes que crecen en cultivo experimentan varias alteraciones morfológicas, tales como el aplanamiento, vacuolización y acumulación de gránulos de stress. El aumento en el tamaño celular relativo a las células en proliferación se asocia a una continuación de procesos anabólicos, como lo son la síntesis de membrana y proteínas en las células senescentes que abandonaron el ciclo celular. Las células senescentes expresan de manera rutinaria la β -galactosidasa asociada a senescencia (SA- β gal) y

p16ink4a, un inhibidor selectivo de las quinasas dependientes de ciclinas CDK4 y CDK6. Además, también secretan varias citoquinas y otras moléculas de señalización como Interlequinas 1, 6, 8, el factor de crecimiento del endotelio vascular A (VEGFA) y metaloproteasas de matriz (MMPs). Adicionalmente, una característica prominente de muchas células senescentes es la activación persistente de respuesta por daño al ADN (Sharpless N, 2015)

El otro proceso involucrado en la regulación telomérica es la apoptosis. La misma es un tipo de muerte celular programada que se caracteriza por protuberancias en la membrana plasmática (*blebbing*), contracción celular, fragmentación nuclear, condensación de la cromatina y fragmentación del ADN cromosómico. Existen dos vías de señalización apoptóticas básicas: Las vías extrínseca e intrínseca. La vía intrínseca se activa por varios estímulos intracelulares, los cuales incluyen el daño al ADN, la privación de factores de crecimiento y el *stress* oxidativo. Esta vía se basa en la formación de un complejo denominado apoptosoma, compuesto por la procaspasa 9, Apaf-1 (del inglés, *apoptotic protease-activating factor*) y el citocromo C. Una serie de miembros de la familia Bcl-2, tales como Bax, Bak, Bcl-2 y Bcl-XL, controlan la liberación de citocromo c mediante la regulación sobre la permeabilización de la membrana mitocondrial (Green DR y Llambi F, 2015). Por otra parte, la vía extrínseca de la apoptosis es iniciada por la unión de ligandos, como ligando Fas (FasL), TRAIL (del inglés, *TNF-related apoptosis inducing ligand*) y el factor de necrosis tumoral α (TNF- α), a receptores de muerte pertenecientes a la superfamilia de receptores TNF. Estas interacciones derivan en el ensamblaje del complejo DISC (del inglés, *death-inducing signaling complex*), el cual consiste en proteínas con dominios de muerte asociados a FAS (FADD) y procaspasa-8/10 (Verbrugge I, 2010). DISC puede actuar activando las caspasas efectoras río abajo (caspasa 3, 6 y 7) para inducir directamente la muerte celular o, por otra parte, clivando a BID (del inglés, *BH3 interacting-domain death agonist*, miembro de la familia Bcl-2) para convertirlo en tBID, el cual activa la vía intrínseca de la apoptosis mediada por mitocondria. Distintos factores, tales como p53, las proteínas inhibitorias de la apoptosis (IAPs) y NF- κ B, se encuentran reportadas como reguladores de las vías de apoptosis (Su Z, 2015).

La forma en que estos procesos se relacionan con el mantenimiento telomérico se encuentra representado en la Imagen 6. Cuando la disfunción telomérica ocurre, ya sea por acortamiento telomérico como por desprotección de los extremos ("*uncapping*"), activa los moduladores río arriba de las PI3 kinasas, tales como ATM o ATR. Una vez activadas, estas quinasas fosforilan factores río abajo, como CHK1 y CHK2 que a su vez fosforilan P53. LA fosforilación de P53 resulta en el desplazamiento de la proteína MDM2 (del inglés, *murine double minute 2*), lo cual exime a P53 de la degradación y promueve la expresión del inhibidor de quinasas dependiente de ciclinas P21. P21 inhibe la progresión del ciclo celular, mediante la inhibición de quinasas dependientes de ciclinas que

fosforilan e inactivan a RB. De esta manera, tanto P53 como pRB pueden inducir la expresión de los reguladores como p16ink4a para iniciar el proceso de senescencia replicativa. Además, para promover el arresto del ciclo celular, la disfunción telomérica puede también activar la apoptosis mediada por p53, la cual es capaz de regular puntos de control sobre muerte celular programada tanto por la vía intrínseca como por la extrínseca. En un escenario donde la vía P53 se encuentre activa, la disfuncionalidad telomérica aparece como una actividad supresora de tumor potente, mediante la acción sobre vías celulares que activan la senescencia replicativa y o la apoptosis para evitar el desarrollo tumoral (Deng Y, 2008).

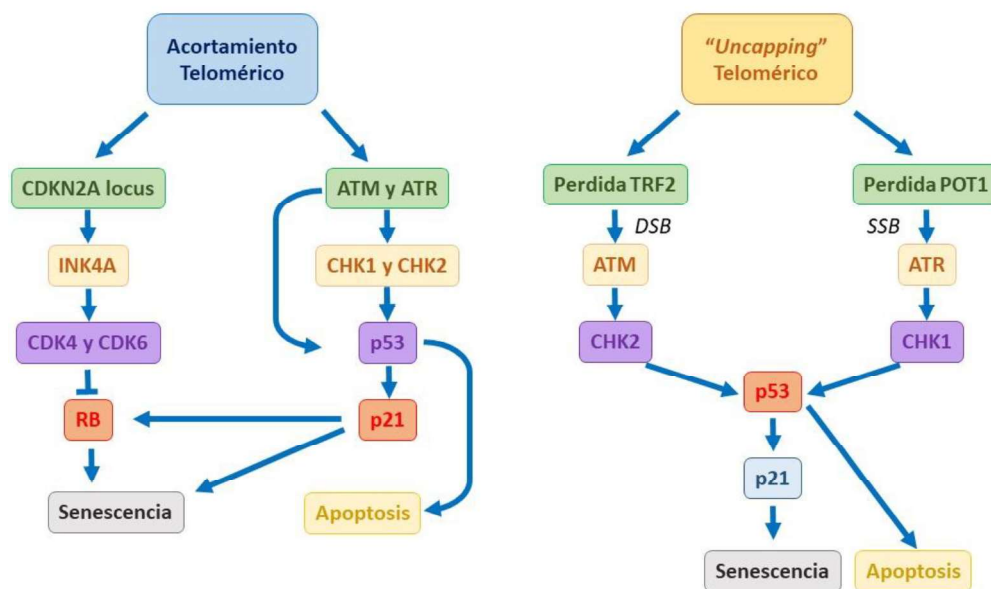


Imagen 6. La disfunción telomérica inicia la respuesta de daño al ADN, disparando los mecanismos de apoptosis y senescencia. (DSB: *double strand break*; SSB: *single strand break*). Adaptado de Deng Y, 2008.

Telómeros, Telomerasa y Cáncer

Los primeros estudios demostraron que las células sin telomerasa presentaban un acortamiento de los telómeros en relación directa con el aumento de divisiones celulares. Esto sugirió que la pérdida de los telómeros podría explicar la senescencia celular después de un determinado número de duplicaciones *in vitro* (Harley CB, 1990).

Estudios en cultivos celulares indicaron que la longitud telomérica sería la mejor forma de predecir la capacidad replicativa de las células. Se ha propuesto que la pérdida de repeticiones

teloméricas, al alcanzar una longitud telomérica crítica, induce una señal de daño en el ADN que resulta en la salida del ciclo celular y la senescencia replicativa (Allsopp RC, 1995). De acuerdo con este modelo, los telómeros actúan como un reloj mitótico que determina la vida replicativa de una célula. Bodnar y colaboradores dieron la prueba más definitiva demostrando que la reintroducción del compuesto catalítico de la telomerasa, en células que carecían de actividad telomerasa, alarga las repeticiones teloméricas dando como resultado un aumento significativo en su capacidad replicativa (Bodnar AG, 1998).

La "hipótesis telomérica" de la senescencia y la inmortalización celular describe la posible relación entre dinámica telomérica e inmortalización. La telomerasa se expresa en las células de la línea germinal que tienen telómeros largos (~ 10 kb), mientras que en las células somáticas normales la telomerasa es reprimida y los telómeros se acortan hasta una longitud crítica en donde las células dejan de dividirse (Campisi J, 1997).

La detención del ciclo celular que se impone en estas células se mantiene por medio de señales que activan las vías de los genes supresores de tumores p53 y Rb. Este límite en la etapa de mortalidad (M1) podría ser alterado por la transformación con agentes virales tales como SV40 o el antígeno T que inactivan los genes p53 o Rb y permiten a las células sufrir otras divisiones celulares adicionales. Estas células, sin embargo, no pueden dividirse indefinidamente y no se consideran inmortales, ya que seguido por la erosión telomérica ulterior, las células alcanzan una segunda etapa de mortalidad (M2), con los telómeros críticamente cortos (~ 3 kb). En esta etapa de crisis, las células podrían continuar proliferando, pero con altas tasas de apoptosis, desencadenadas por importantes aberraciones cromosómicas, donde no hay aumento neto en el número de células. La progresión más allá de este punto es un evento muy raro que requiere la alteración por la mutación de oncogenes adicionales y genes supresores de tumores. Sin embargo, las células que tienen éxito en la superación de M2 se correlacionan fuertemente con la reactivación de la actividad de la telomerasa, la estabilización de los telómeros y la adquisición de un fenotipo inmortal (Dhaene K, 2000). La telomerasa es activa en la línea germinal, así como en células madre, pero es inactiva en la mayoría de las células somáticas. Por otro lado, la telomerasa está activa en la mayoría de líneas celulares inmortalizadas y en 85-90% de los tumores humanos. En un estudio en células en cultivo (representando 18 tipos de tejidos humanos), se encontró que el 98% de células inmortales presentaban actividad telomerasa positiva, mientras que fue negativa en el 100% de las poblaciones de células mortales. De la misma manera, se encontró actividad telomerasa positiva en 90 de 101 biopsias (12 tipos de tumores humanos), pero ninguno de los 50 tejidos somáticos normales fue positivo (Kim NW, 1994).

Pocos estudios se han centrado en el papel de la telomerasa en la latencia del cáncer. Gauthier y colaboradores encontraron actividad telomerasa en el 73% de los pacientes en etapa IIIB y IV de cáncer de pulmón de células no pequeñas, con células tumorales diseminadas, y en el 72% de los pacientes con cáncer de colon en etapas Dukes C y D (Gauthier LR, 2001). Por otro lado, se encontró actividad telomerasa en sangre periférica en 21 de 25 pacientes con cáncer de mama en estadio IV (Soria JC, 1999). En ambos estudios, la actividad de la telomerasa no se detectó en las células de voluntarios sanos. Por lo tanto, la detección de actividad de la telomerasa en sangre o médula ósea parece ser altamente sugerente de células cancerosas diseminadas.

Pfitzenmaier y colaboradores se centraron en buscar actividad telomerasa positiva en células tumorales diseminadas en sangre periférica o médula ósea. El objetivo de ese estudio fue aislar grupos homogéneos de células epiteliales diseminadas a partir de médula ósea de pacientes con cáncer de próstata clínicamente localizado, obtenido antes de la prostatectomía radical (PR). Sobre esas células se realizaron ensayos de actividad telomerasa, y asociaciones con variables clínicas (Pfitzenmaier J, 2006). Este estudio muestra la factibilidad de aislar células cancerosas diseminadas y poder desarrollar una comparación entre células individuales y agrupadas. La tinción de tejidos permitió detectar actividad telomerasa en aproximadamente el 85% de las muestras, mientras que en las células tumorales diseminadas los índices de actividad telomerasa fueron más bajos (49%). Las células telomerasa-negativas pueden proporcionar información sobre la latencia celular, dado que la telomerasa es un marcador de la proliferación celular en células cancerosas e inmortales. Por su parte las células telomerasa-positivas podrían utilizarse para predecir la recurrencia temprana de la enfermedad (Chen CH, 2011)

En general, se ha aceptado que el acortamiento telomérico es responsable de limitar la vida media de la mayoría de las células somáticas normales, así como la expresión de la telomerasa en las células es suficiente para superar la senescencia replicativa para otorgarles la inmortalidad. Aunque los mecanismos implicados en la regulación de la telomerasa no se han resuelto por completo, su comprensión progresiva es la base necesaria para la manipulación de la actividad de la telomerasa como un potencial blanco terapéutico contra el cáncer.

Objetivo General

Obtener compuestos con actividad inhibitoria de la telomerasa, que presenten un efecto antitumoral y puedan ser utilizados en protocolos terapeuticos para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo.

Objetivos Específicos

- Evaluar el efecto del AZT sobre las actividades extrateloméricas de TERT en la línea de carcinoma mamario murino F3II.
- Obtener una lista de nuevos compuestos de tipo “*small molecule*” que presenten afinidad por el dominio PUA de DKC1 e interfieran en la interacción hTR-DKC1.
- Evaluar el efecto *in vitro* de los compuestos candidatos que presenten mayor afinidad *in silico* sobre los procesos de actividad telomerasa, longitud telomérica, senescencia y apoptosis en la línea de adenocarcinoma mamario MDA MB 231.

Capítulo 1: “AZT como modulador de las actividades teloméricas y extrateloméricas del complejo telomerasa”

Introducción

Historia del AZT

La Zidovudina, Azidotimidina o AZT fue sintetizada por primera vez en 1964 por Jerome Horwitz (Barbara Ann Karmanos Cancer Institute y de Wayne State University School of Medicine) bajo una subvención del US National Institutes of Health (NIH). El AZT fue originalmente ideado para el tratamiento del cáncer, pero fue archivado después de haber demostrado ser altamente tóxico y mortal en ratones. En 1985, Samuel Broder y colaboradores, en el National Cancer Institute (NCI), comenzaron a trabajar con el AZT como un fármaco contra el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Luego de demostrar que éste era un agente efectivo contra el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) in vitro, se llevaron a cabo ensayos clínicos iniciales. Un ensayo aleatorio controlado de AZT con placebo fue posteriormente llevado a cabo por Burroughs Wellcome, en el que se demuestra que la AZT podría prolongar la vida de los pacientes con SIDA. Burroughs Wellcome Co. presentó una nueva patente sobre el AZT en 1985. La *Food and Drug Administration* (FDA) aprobó el fármaco para su uso contra el VIH en 1987 y luego como tratamiento preventivo en 1990 (De Clercq E, 2009).

Desde entonces, estos agentes llamados comúnmente como nucleósidos inhibidores de transcriptasa reversa (NRTIs), se han vuelto componentes esenciales en la terapia antiretroviral. EL AZT (Imagen 1) fue el primer nucleósido aprobado para el tratamiento del VIH-1 por la FDA, siendo ampliamente utilizado desde entonces y, desde 1994, indicado para evitar la transmisión vertical del virus desde la madre al feto (Olivero OA, 2007). En años posteriores, nuevos antiretrovirales (didanosina, saquinavir, rinovavir, indinavir, nevirapina) fueron incorporándose al tratamiento principalmente en esquemas combinatorios.

El mecanismo por el cual AZT resultó útil para el tratamiento del VIH se debe a que el mismo es convertido intracelularmente a AZT-trifosfato (AZT-TP) mediante la fosforilación de la timidina quinasa para luego ser incorporado en el ADN viral de manera selectiva, bloqueando la elongación de la cadena por la transcriptasa reversa del VIH-1. Si bien el AZT-TP podría ser incorporado en el ADN eucariota en lugar de la timidina, el mismo presenta menor afinidad por las ADN polimerasas (α , β , γ) y una gran afinidad por las transcriptasas reversas (Gomez DE, 2012).

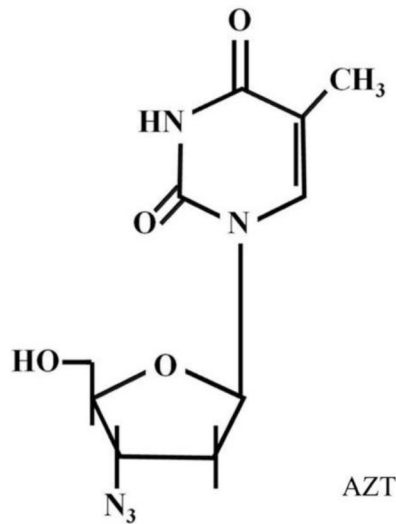


Imagen 1. Estructura química del AZT.

AZT, Telómero y Cáncer

Como se ha mencionado anteriormente, la telomerasa está compuesta principalmente por dos componentes: TR y TERT, siendo esta última una proteína con actividad transcriptasa reversa. Dado la similitud y conservación de los motivos estructurales relacionados con la actividad de TERT con la transcriptasa reversa del VIH, durante la década de los 90 se empezó a estudiar el efecto del AZT sobre la telomerasa. En 1994 se demostró en *Tetrahymena thermophila* que el AZT provocaba acortamiento telomérico mediante el descenso en la polimerización del telómero de *nov* (Strahl C and Blackburn E, 1994). Asimismo, fue demostrado que el AZT se incorporaba de manera diferencial al ADN telomérico en células CHO (Olivero OA y Poirier M, 1993). En 1995, se desarrolló una metodología para cuantificar la incorporación diferencial del AZT, comparando entre la cantidad incorporada en el ADN telomérico y el no telomérico en células CHO (Gomez DE, 1995). Años más tarde, se demostró que el AZT inhibía y/o reducía la telomerasa y los telómeros en cultivos de células B y T, sin cambiar la tasa de crecimiento celular (Strahl C, 1996). Al mismo tiempo, otros estudios mostraban que el tratamiento crónico con AZT durante 3 meses en fibroblastos embrionarios de ratón provocaba la formación de clones libres de actividad telomerasa, los cuales derivaban en cultivos cuya tasa de crecimiento bajaba hasta entrar en un estado similar al senescente. Sin embargo, este proceso era reversible, ya que al quitar la inhibición por AZT, las células recuperaban su capacidad proliferativa, indicando que el AZT era el causante a partir de la inhibición en la elongación telomérica (Yegorov YE, 1996).

El auge en el estudio del AZT como inhibido de la telomerasa condujeron inevitablemente a evaluar su efecto sobre el desarrollo tumoral, debido principalmente a la elevada presencia de actividad telomerasa en tumores sólidos como no así en células somáticas normales (Dhaene K, 2000). En 1998 se evaluó la toxicidad celular provocada por diferentes dosis de AZT sobre distintas líneas celulares, normales y tumorales, mostrando que el crecimiento de estas últimas era afectado por el AZT en un amplio rango de concentraciones (Melana SM, 1998). Al mismo tiempo, se demostró por primera vez que el acortamiento telomérico producido por AZT era un proceso irreversible en células tumorales humanas (Gomez DE, 1998). Años más tarde se demostró que el tratamiento crónico con AZT sobre la línea tumoral murina F3II provocó senescencia y posterior apoptosis, rompiéndose así el dogma de la inmortalidad tumoral. (Tejera AM, 2001). Este último hallazgo fue corroborado por varios autores tiempo después en distintas líneas celulares tumorales positivas para la actividad telomerasa (Beltz L, 1999; Ji HJ, 2005; Falchetti A, 2005; Jeng K, 2011), demostrando la potencialidad del AZT como terapia antitumoral.

En lo que respecta a su mecanismo de acción, durante varios años los efectos observados en el tratamiento con AZT se vincularon únicamente a su capacidad de impedir la elongación en la síntesis de ADN telomérico, debido a su analogía con el sustrato natural timidina, actuando como un terminador de cadena que si bien preferentemente ejercen esa acción sobre el ADN viral no son específicos del mismo. En el último tiempo diversas publicaciones comprobaron que TERT cumple diversas funciones en mecanismos de señalización y regulación génica (Li Y Tergaonkar V, 2014), motivo por el cual surgió el interrogante sobre si el efecto observado luego del tratamiento con AZT podría tener un componente adicional a su actividad como inhibidor de la elongación telomérica.

Actividades Extrateloméricas de TERT

Como se ha mencionado anteriormente, el rol principal de la telomerasa es mantener la homeostasis telomérica y evadir la senescencia celular, permitiendo el sostenimiento y progresión del cáncer.

Trabajos recientes han demostrado que existen funciones de la telomerasa y proteínas relacionadas al telómero, que son independientes de sus roles en la extensión del telómero. En estas actividades, denominadas no canónicas o extrateloméricas, uno de los actores principales es TERT, el componente catalítico de la telomerasa, el cual se encuentra involucrado en la interacción con al menos dos grandes vías de señalización celular: NF- κ B y Wnt/ β -Catenina. La manera en que TERT se relaciona con estas vías se basa en la característica que presenta como modulador transcripcional,

activando vías de señalización oncogénicas que mantienen su propia expresión como así también la de genes *target* que son críticos para la proliferación y mantenimiento de las células tumorales (Li Y Tergaonkar V, 2014). La descripción de estos mecanismos genera una nueva perspectiva en lo que respecta a terapias oncológicas dirigidas hacia la telomerasa, sugiriendo que se pueden plantear también contra los roles no teloméricos de TERT.

TERT y la vía de señalización NF- κ B

La vía de NF κ B (del inglés, *Nuclear factor- κ B*) consiste en una familia de factores transcripcionales que presentan un rol crítico en la inflamación, inmunidad, proliferación celular, diferenciación y supervivencia, procesos en los cuales su desregulación ha sido relacionada con distintas patologías humanas, entre las que se incluye el cáncer. En la tumorigenesis, esta vía puede ser activada tanto por vía intrínseca, en donde componentes genéticos (ej. oncogenes) inducen la transformación neoplásica disparando la cascada inflamatoria, como por vía extrínseca, en la cual la inflamación crónica (ej. infecciones) aumenta de manera significativa el riesgo en el desarrollo de distintos tipos de cáncer (Oeckinghaus A y Ghosh S, 2009).

A nivel molecular, NF κ B induce la expresión de citoquinas inflamatorias (IL6, TNF- α), moléculas de adhesión (I-CAM), enzimas claves en la síntesis de prostaglandinas (COX2), óxido nítrico sintasa (iNOS), metaloproteasas de matriz y factores angiogénicos (VEGF). A nivel tumoral, NF κ B también promueve la supervivencia celular y la proliferación mediante la activación de genes que codifican proteínas reguladoras de la progresión del ciclo celular (ciclina D1, cmyc) y la apoptosis (Bcl2, c-Flip, etc.) (Del Prete A, 2011).

Existe abundante evidencia que demuestra el rol crucial que presenta NF κ B en la progresión tumoral en distintos tejidos (Colorrectal, Glioma, Próstata). La principal relación se da debido a que los productos río abajo de esta vía son factores que reclutan y activan leucocitos, principalmente del linaje mieloide, produciendo y amplificando la respuesta inflamatoria. El ambiente inflamatorio instaurado contribuye a la proliferación y supervivencia de células malignas, angiogénesis, metástasis, evasión a la inmunidad innata y la reducción en la respuesta a agentes quimioterápicos, promoviendo de esta forma el desarrollo tumoral (Oeckinghaus A y Ghosh S, 2009).

El mecanismo por el cual se genera la activación de esta vía depende de la degradación proteosomal mediada por fosforilación de las proteínas inhibidores de NF κ B (I κ Bs), las cuales mantienen inactivos los dímeros de la familia de proteínas Rel (p65, p50, RelB, c-Rel y NF- κ B2) en el citosol. La mayoría de las diversas vías de señalización dirigidas por NF κ B convergen en el complejo I κ B quinasa (IKK), el cual es responsable de la fosforilación de las I κ Bs, permitiendo la transducción de

señales que activa NFκB. Durante la última década se han realizado numerosos estudios a través de ensayos de sobreexpresión, ARNi y *knock out* génico, los cuales han permitido establecer que existe un vínculo entre TERT y la vía de señalización NFκB. Se ha determinado en ensayos *in vitro* que la sobreexpresión de TERT resulta en una mayor expresión de los genes target de NFκB, mientras que se ha observado en modelos *in vivo* de ratones que no expresan TERT una respuesta refractaria en la activación de la vía NFκB. Adicionalmente, se encontró que TERT se une a p65 y se colocaliza en las regiones promotoras de un *subset* de genes de la vía de NFκB, el cual incluye interleuquina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral α (TNF-α) y varias citoquinas, todos factores conocidos y relacionados con la inflamación y la progresión tumoral. TNF-α presenta un rol clave en la persistencia de la inflamación, como así también se ha demostrado que el TNF-α derivado del tumor mantiene el crecimiento y progresión de tumores de piel, páncreas e intestino en modelos singénicos y xenogénicos. Por otra parte, se ha descrito en el microambiente tumoral células productoras de TNF-α (macrófagos, Células T CD4+) que mantienen y promueven el estado inflamatorio, favoreciendo el crecimiento tumoral en cáncer de hígado. En cáncer de ovario se ha descrito una compleja relación entre el epitelio tumoral y los tejidos aledaños, lo cual promueve la colonización del peritoneo. Sumado a esto, se ha estudiado que la producción constitutiva de TNF-α está asociada con una liberación de quemoquinas (CCL2, CXCL8, CXCL12), IL-6, VEGF y el factor inhibitorio de la migración de macrófagos (MIF-1). El mecanismo de acción de TNF-α incluye efectos directos en la expansión tumoral, la supervivencia y en la estimulación en la creación de nuevos vasos. Respecto a IL6, es una citoquina inflamatoria y factor de crecimiento anti apoptótico, siendo además uno de los efectores río abajo de NFκB en la promoción de neoplasias. El rol pro tumoral de IL6 se ha demostrado en mieloma múltiple, carcinoma hepatocelular, cáncer pulmonar y mamario. La importancia de la IL6 autócrina fue confirmada en distintos tipos tumorales, en donde se demostró que IL6 es un importante activador de la proteína oncogénica STAT3. IL6 protege a las células normales y premalignas de la apoptosis y promueve la proliferación de las células tumorales iniciales. Estas acciones están mediadas por STAT3, indicando que la cascada NFκB/IL-6/STAT3 presenta un rol clave en la carcinogénesis y en el balance de interleuquinas reguladoras de la inmunidad innata en el microambiente tumoral (Del Prete A, 2011).

La información hasta aquí expuesta avala la función de TERT como factor transcripcional de la cascada de señalización en la vía de NFκB independientemente de su actividad en la elongación telomérica. Adicionalmente, existe evidencia de que NFκB actúa como factor transcripcional en la expresión de TERT y viceversa, hecho que demuestra la interrelación y, posiblemente la regulación positiva entre NFκB y TERT (Ramlee MK, 2015). Esta retroalimentación positiva podría ser uno de los mecanismos subyacentes a la inflamación crónica y la actividad telomerasa sostenida que presentan varios tipos de cáncer humano. (Imagen 2)

TERT y la vía de señalización Wnt/ β -catenina

La vía de señalización Wnt/ β -catenina juega un rol central en la embriogénesis y las propiedades auto-renovadoras de las células madre adultas en tejidos proliferativamente activos, como por ejemplo; intestino, folículo piloso, y sistema hematopoyético. Del mismo modo es uno de los mecanismos claves que gobierna la proliferación celular, polarización y determinación celular. La desregulación de la vía Wnt/ β -catenina está asociada a una gran variedad de patologías, entre las que se incluye preponderantemente el cáncer (MacDonald BT, 2009).

La señalización mediada por la familia Wnt es uno de los mecanismos fundamentales que conllevan a la proliferación, polarización y determinación celular durante el desarrollo embrionario y la homeostasis tisular. La vía crítica y más estudiada es la vía canónica, que funciona mediante la regulación de la cantidad del co-activador transcripcional β -catenina, principal efector en el control de expresión de genes vinculados al desarrollo.

Cuando la vía Wnt no se encuentra activada la β -catenina citoplasmática es constantemente degradada por la acción del complejo Axin (Axin, APC, CK1 y GSK3), el cual genera la ubiquitinación de la β -catenina con su subsecuente degradación proteosomal. Esta continua eliminación de β -catenina previene que la misma alcance niveles de expresión suficientes para su translocación a núcleo y por lo tanto, impidiendo su interacción con los factores de unión a ADN TCF/LEF (del inglés, *T cell factor/lymphoid enhancer factor*) reprimiendo la expresión de los genes blanco. La activación de la vía Wnt/ β -catenina se da cuando el ligando Wnt se une al receptor transmembrana Frizzled (Fz) y a su co-receptor LRP6. La formación de este complejo junto con el reclutamiento de la proteína Dishevelled (Dvl) resulta en la fosforilación de LRP6 y la activación y reclutamiento del complejo Axin hacia los receptores. Estos eventos provocan la inhibición de la fosforilación sobre β -catenina por el complejo Axin y por lo tanto, la estabilización de la misma, la cual se acumula y trasloca al núcleo para formar el complejo transcripcional activo (MacDonald BT, 2009).

La primer relación que se estableció entre la vía Wnt/ β -catenina y TERT fue descubierta en células madre de folículo piloso, en donde se demostró la habilidad de TERT de activar a estas células y fomentar el crecimiento del pelo de manera independiente a su actividad transcriptasa reversa. Años más tarde, a través del análisis transcriptómicos por microarreglos en células murinas de piel, se observó que cuando se alteraban de manera aguda los niveles de TERT, se encontraba expresión diferencial en genes relacionados con el desarrollo, morfogénesis, transducción de señales y señalización de los procesos que rigen al citoesqueleto y la adhesión celular. Utilizando distintos algoritmos, se observó que la gran mayoría de los genes que se encontraban regulados

transcripcionalmente por TERT están altamente superpuestos con los controlados por Wnt y Myc (Li Y Tergaonkar V, 2014).

Los resultados que relacionan la presencia de TERT con la transcripción de genes regulados por Wnt y Myc sugiere una potencial intersección de TERT en estas vías, las cuales son conocidas como promotoras del desarrollo tumoral, ya que las mismas controlan la proliferación, diferenciación y recambio de células madres. La primer evidencia de la regulación directa de TERT sobre la vía de señalización Wnt/ β -catenina se obtuvo en un estudio realizado por Park y colaboradores en células embrionarias de ratón y *Xenopus laevis*. En este estudio se observó que la sobreexpresión de TERT resultaba en la activación de genes reporteros dependientes de Wnt, mientras que se encontró que TERT se hallaba relacionado a las zonas promotoras de genes target de Wnt, tales como *cyc-d1* y *c-myc*. En estudios más recientes, se ha reportado que TERT forma un complejo con Brg1 (proteína de remodelación de la cromatina) junto a nucleostemina (NS), una proteína nucleolar de unión a GTP. Se encontró que el complejo TERT-Brg1-NS es esencial para el mantenimiento del fenotipo celular en el inicio tumoral en células humanas, aportando más evidencia al rol regulador que presenta TERT en la vía Wnt/ β -catenina a través de la interacción con Brg1 (Li Y Tergaonkar V, 2014).

Por otra parte, se encontró que la vía de señalización Wnt/ β -catenina puede regular la transcripción de TERT en células madre embrionarias y células tumorales, demostrando que existe una retroalimentación positiva que sostiene la actividad telomerasa y promueve la transcripción de oncogenes al mismo tiempo. Por ejemplo, se observó que *c-myc*, el cual es un conocido factor transcripcional de la vía Wnt/ β -catenina, regula la expresión de TERT, mientras que al mismo tiempo NF κ B modula la señalización mediada por Wnt durante la tumorigenesis, agregando mayor complejidad a las interacciones y cooperación funcional entre TERT y múltiples redes de señalización asociadas con la progresión tumoral (Imagen 2) (Ramlee MK, 2015).

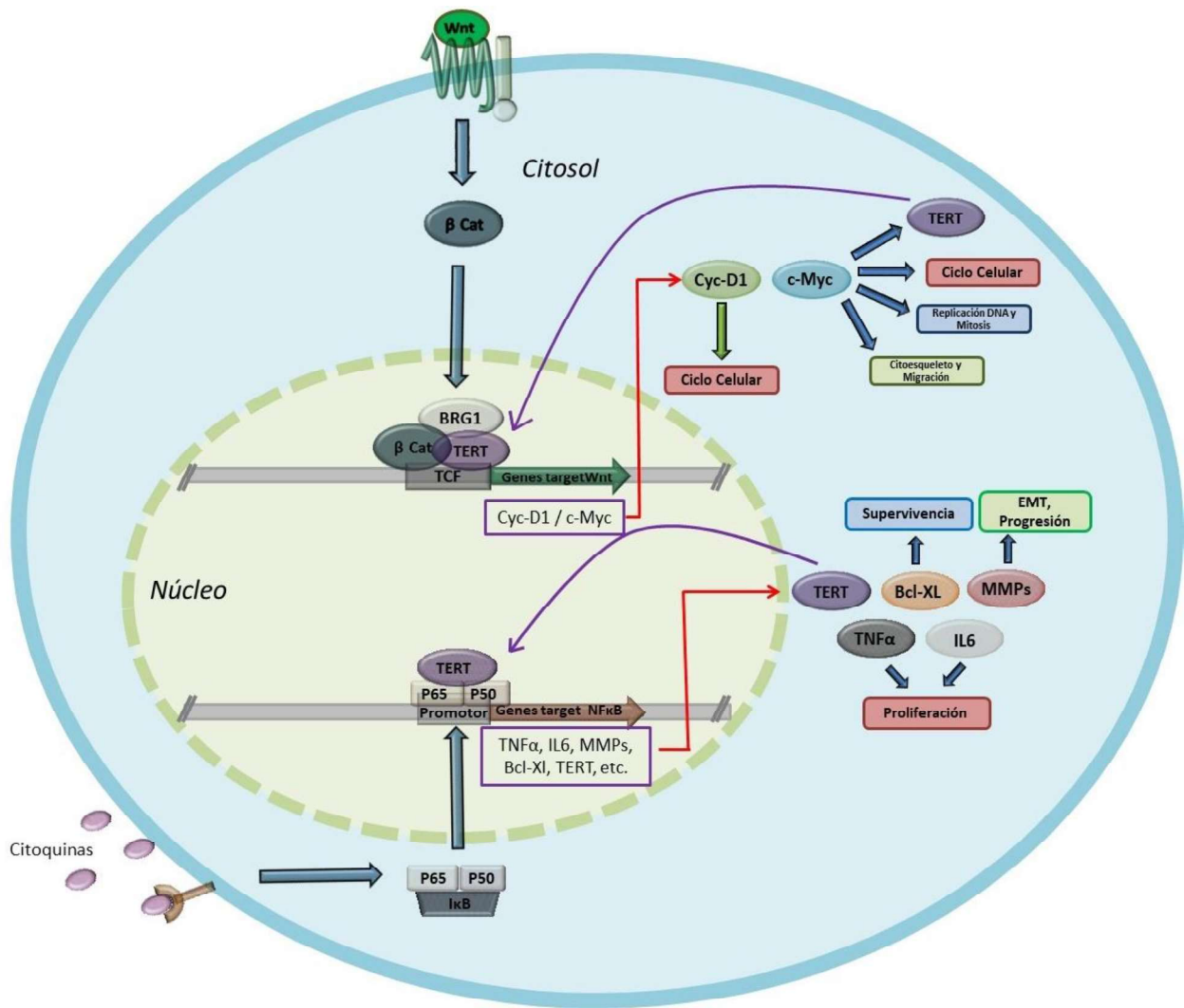


Imagen 2. Rol de TERT como factor transcripcional sobre las vías Wnt-β Catenina y NFκB y los principales procesos celulares regulados por las mismas.

Objetivo

Con el objetivo de profundizar en el estudio de los mecanismos involucrados en la acción del AZT como una droga inhibidora de la telomerasa, y por lo tanto antitumoral, en este capítulo se analizaron los posibles efectos del tratamiento del AZT en la transcripción de genes implicados en la vía de señalización Wnt/β-catenina (*tert*, *c-myc* y *cyc-d1*) y en la vía NF-κB (*il-6* y *tnf-α*), su efecto sobre la actividad telomerasa, estructura del citoesqueleto, proceso de migración celular y ciclo celular en el modelo murino de carcinoma mamario F3II.

Materiales y Métodos

Líneas celulares y condiciones de cultivo. La línea celular de carcinoma mamario F3II es una variante altamente agresiva y metastásica que fue establecida a partir de una subpoblación clonal de un tumor mamario hormono independiente, surgido de manera espontánea en un ratón BALB/c. La línea fue mantenida en medio Dulbecco modificado (DMEM) [Life Technologies] suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB) [Gibco], 2mM de glutamina [Gibco] y 80µg/ml de gentamicina [Northia]. Las células se mantuvieron a 37°C, en una atmósfera húmeda con CO₂ al 5% y fueron rutinariamente subcultivadas mediante tripsinización, utilizando procedimientos estándar. Los tratamientos con AZT se realizaron durante 5, 10 y 15 pasajes, considerando cada repique como un pasaje. A la condición denominada Control, se le agregó el volumen equivalente al tratamiento con AZT, pero de H₂O estéril, ya que el stock de AZT fue preparado en el mismo solvente.

Ensayo de proliferación celular. 1x10⁴ células /well fueron sembradas en placas de 96 wells. 24 horas post siembra, las células fueron tratadas con concentraciones diferenciales de AZT (50-2000 µM) durante 72 hs. El crecimiento celular fue evaluado por el ensayo colorimétrico basado en MTT [Sigma]. Se determinó la concentración inhibitoria 50% (IC₅₀) mediante una función de ajuste no lineal en el programa GraphPad Prism 6[®]. Los resultados mostrados corresponden al promedio de las determinaciones obtenidas a partir de 3 experimentos independientes.

Extracción de ARN y Síntesis de ADN copia (ADNc). Para cada tratamiento, se aisló el ARN total de las células mediante el reactivo QuickZol [Kalium], siguiendo instrucciones del proveedor. El ARN extraído fue cuantificado mediante absorbancia a 260; 230 y 280 nm, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 [Thermo Fisher Scientific]. La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1µg de ARN total, utilizando oligodT 18 [PB-L] y Superscript III [Invitrogen], siguiendo las instrucciones del proveedor.

Análisis de la transcripción de *cyc-d1*, *c-myc*, *tert*, *il-6*, *tnf-α* y *β-actina* mediante Real Time PCR (qPCR). Se diseñaron *primers* específicos para cada gen (Anexo, Tabla 1) utilizando el software Primer Express[®] Software Versión 3.0 [Applied Biosystem]. Todos los *primers* utilizados presentaron eficiencias de amplificación mayores al 90%, rangos dinámicos aceptables y curvas de *melting* con picos específicos, permitiendo así el correcto análisis de los experimentos (Anexo 1, Figura 3). Los ensayos fueron llevados a cabo utilizando el termociclador StepOne[®]. La mezcla de reacción se realizó en un volumen final de 10µl, conteniendo 1µl de molde, *Power Sybr Green Master Mix 1X* [Applied Biosystem] y agua bidestilada. Las condiciones y secuencia de cada *primer* se encuentran especificadas en la Tabla 1 del Anexo. El gen de β Actina fue utilizado como control de carga. El perfil de ciclado se puede observar en la Figura 1.A del Anexo. Una vez definidos todos los parámetros de la reacción, los resultados fueron analizados mediante el método de ΔΔCT con el StepOne[®] Software versión v2.3.

Determinación de actividad telomerasa mediante qPCR. Se realizaron las mediciones correspondientes a la actividad telomerasa de las muestras utilizando el método de TRAP basado en SYBR Green. Para esto se diseñaron primers específicos (Anexo, Tabla 1) denominados ACX y TS, los cuales fueron evaluados en distintas condiciones hasta que presentaron una eficiencia de amplificación mayor de 90%, curvas de *melting* con picos únicos y un rango dinámico adecuado (Anexo). Las reacciones se llevaron a cabo en el mismo termociclador mencionado anteriormente. La mezcla de reacción contuvo 2µl de lisado proteico, *Power Sybr Green Master Mix 1X* [Applied Biosystem] y agua bidestilada. Las condiciones de cada *primer* se encuentran especificadas en la Tabla 1 del Anexo. El perfil de ciclado se puede observar en la Figura 1.C del Anexo. Para obtener el lisado proteico, se cuantificaron 2×10^6 células por condición, mediante hemocitómetro. Las células fueron lavadas con PBS y transferidas a un tubo cónico de 1,5 ml para luego ser centrifugadas durante 10' a 450 x g. El *pellet* obtenido fue lisado en 200 µl de *buffer* de lisis CHAPS (10mM Tris pH 7,5; 1mM MgCl₂; 1mM EGTA; 5mM βmercaptoetanol; 0,5% CHAPS; 10% Glicerol), el cuál contenía RNase OUT [Invitrogen] y Cocktail Inhibidor de Proteasas [Sigma]. El lisado se incubó durante 30' en hielo; luego se centrifugó durante 20' a 13400 x g. Se trasvasó el sobrenadante a otro tubo y se conservó a -20°C, hasta su uso.

Tinción de Citoesqueleto de Actina. Las células control y las tratadas con AZT fueron sembradas en vidrios cubreobjetos y cultivadas en DMEM libre de SFB. Una vez obtenida una confluencia cercana al 50%, se retiró el medio de cultivo y las células fueron lavadas y fijadas con Formaldehído al 4% en PBS. Luego fueron teñidas con Faloidina conjugada a Alexa Fluor 555 [Invitrogen], según recomendaciones del proveedor. Las fotografías de las monocapas se tomaron mediante el microscopio invertido de fluorescencia Nikon Eclipse T2000.

Migración Celular. La migración fue evaluada mediante el ensayo de herida en monocapa. El mismo constó en sembrar $2,5 \times 10^5$ células/*well* (control, 5, 10 y 15 pasajes de AZT) en una placa de 6 *wells*. A las 24 hs post siembra se realizó una herida con un *tip* de p200 estéril en la monocapa confluyente de F3II. Luego de 16 hs de incubación en medio completo con la presencia o ausencia de AZT, las monocapas fueron lavadas, para luego ser fijadas y teñidas (Cristal Violeta 0,5% + Metanol 20%). Se realizaron fotografías al azar sobre cada *well* para poder cuantificar el área invadida, utilizando el microscopio invertido Nikon Eclipse T2000 y el *software* NIS-Element 3.0 [Nikon].

Ciclo Celular por citometría de flujo. Para el análisis de ciclo celular, las células correspondientes a cada condición fueron lavadas e incubadas en DMEM libre de SFB por 24 hs, con el objetivo de obtener una población sincronizada. Una vez transcurrido este tiempo, las células fueron tripsinizadas y centrifugadas 5' a 450 x g. Luego, se procedió a la fijación de las mismas

mediante la incubación con metanol al 70% en PBS, para luego ser teñidas con Ioduro de Propidio (1mg/ml) [Life Technologies]. La determinación de los distintos estadios del ciclo celular fue evaluada en el citómetro de flujo BD FACSCalibur™ [BD Biosciences]. Los parámetros para discriminar los distintos estadios del ciclo celular fueron determinados mediante el uso del kit *DNA QC Particles* [BD Biosciences]. Una vez establecidos dichos parámetros, se procedió a evaluar las células provenientes de los distintos tratamientos, adquiriéndose 10.000 eventos por condición.

Tiempo de Duplicación. $1,5 \times 10^4$ células/*well* (control, 5, 10 y 15 pasajes de AZT) fueron sembradas en placas de 12 *wells*. Las mismas fueron cultivadas en medio completo durante 24, 48, 72 y 96 hs. Una vez transcurridos estos tiempos, las células fueron fijadas y teñidas (Cristal Violeta 0,5% + Metanol 20%), para luego ser solubilizadas en 500 μ l de etanol:acético (3:1). Se determinaron los valores de absorbancia a 570nm, mediante el lector Synergy HT [Biotek]. Se construyó una curva de crecimiento vs tiempo, donde el valor del 100% se estableció como el valor obtenido a las 24 hs para cada tratamiento.

Análisis Estadísticos. Todos los datos fueron representados como el promedio \pm el error estándar de la media (SEM). La significancia de las diferencias fue determinada utilizando ANOVA de simple vía contrastado con Dunnett y con ANOVA de doble vía con el test de comparaciones múltiples de Tukey. Los análisis fueron llevados a cabo mediante el software GraphPad Prism 6® [GraphPad software, La Jolla, CA, USA]. El criterio para la significancia estadística fue $p < 0.05$.

Resultados

Efecto del AZT sobre la viabilidad celular

Con el objetivo de conocer el efecto del AZT sobre la viabilidad de F3II, se determinó que la IC_{50} de esta molécula para esta línea presenta un valor de $1195 \pm 37 \mu M$ (Figura 1). Teniendo en cuenta este resultado, se determinó como condición de tratamiento una dosis de $600 \mu M$ de AZT, lo cual equivale aproximadamente a un valor de IC_{25} .

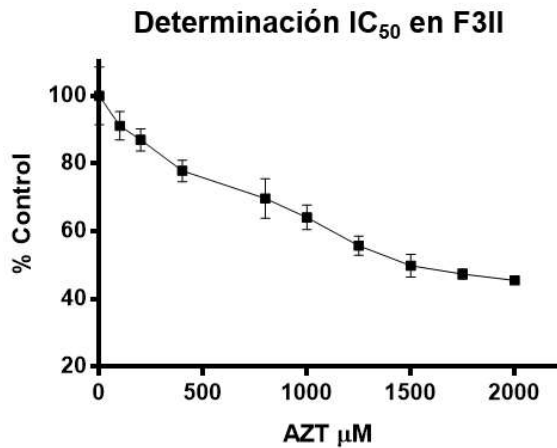


Figura 1. Efecto del AZT sobre la proliferación celular de células de carcinoma mamario murino F3II. La proliferación se midió por medio del ensayo de MTT descrito previamente. Los valores representan media \pm SEM y son representativas de tres experimentos independientes. A partir del valor de este ensayo se determinó $600 \mu M$ como la concentración de AZT para los tratamientos.

Determinación de la actividad telomerasa

Como se puede observar en la Figura 2, la actividad telomerasa disminuyó significativamente conforme avanzan los pasajes, cayendo un 26,22% ($p < 0.05$), un 36,27% ($p < 0.01$) y un 45,08% ($p < 0.01$) después de 5, 10 y 15 pasajes de tratamiento con AZT, respectivamente. De esta manera, se corroboró la función inhibitoria que presenta el AZT sobre la actividad telomerasa.

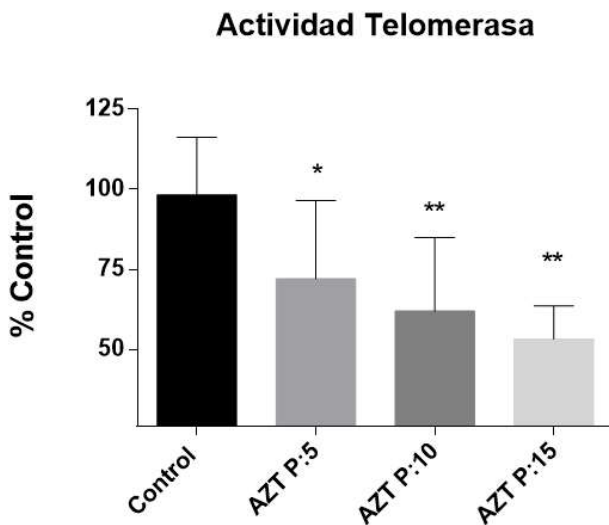


Figura 2. Determinación de actividad telomerasa mediante qPCR. Se realizó una cuantificación mediante Real Time PCR con primers específicos utilizando como molde a los lisados proteicos obtenidos a partir de las células tratadas. Los valores representan media \pm SEM ($n=6$, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs control (ANOVA contrastado con Dunnett).

Análisis de Transcritos

Respecto al análisis de los genes involucrados en la vía de señalización Wnt/ β -Catenina, se cuantificó la expresión relativa de los genes *c-myc*, *cyc-d1* y *tert* durante los distintos tratamientos, mediante el método de $\Delta\Delta Ct$, siendo *β -actina* el control de carga. Se determinó que la expresión relativa de *tert* se ve afectada por el tratamiento de una manera pasaje dependiente (Figura 3.a). Después de 5 pasajes, la expresión de este gen decayó en un 17,1% ($p < 0.05$); luego de 10 pasajes, la misma se vio reducida en un 20,28% ($p < 0.05$) y, finalmente, se afectó un 30,91% ($p < 0.05$) alcanzados los 15 pasajes de tratamiento.

De manera similar a lo antes expuesto, se pudo observar que la expresión de *cyc-d1* también mostró un descenso conforme avanzan los pasajes. Como se observa en la Figura 3.b, después de 5, 10 y 15 pasajes se evidenció un descenso en la expresión de este gen del 24,25% ($p < 0.05$), 30,87% ($p < 0.05$) y 38,24% ($p < 0.01$) respectivamente.

Por último, en lo que respecta a la expresión de *c-myc*, se encontró una reducción en la expresión más evidente, alcanzando un 34,14% ($p < 0.01$), 43,85% ($p < 0.001$) y un 64,2% ($p < 0.001$) de inhibición de la expresión de este gen con 5, 10 y 15 pasajes de tratamiento, respectivamente (Figura 3.c).

En la Figura 3.d y 3.e, se muestran las determinaciones realizadas sobre los genes *tnf- α* y *il-6* respectivamente, ambos involucrados en la vía de señalización de NF- κ B. Como se puede observar, la expresión relativa de *tnf- α* se vio altamente afectada durante el tratamiento, observándose un descenso del 62% ($p < 0.001$) luego de 5 pasajes y del 77% ($p < 0.001$) y 83% ($p < 0.001$) conforme avanzaron los pasajes 10 y 15, respectivamente. En cuanto a la expresión de *il-6*, la misma no se encontró afectada de manera tan inmediata como la de *tnf- α* , aunque sí se observó un descenso significativo de un 30% y 70% ($p < 0.05$; $p < 0.001$) alcanzados los 5 y 10 pasajes. Respecto al pasaje 15, se observó un descenso similar al obtenido en el pasaje 5, mostrando además un llamativo aumento del 30% respecto al pasaje 10 ($p < 0.05$).

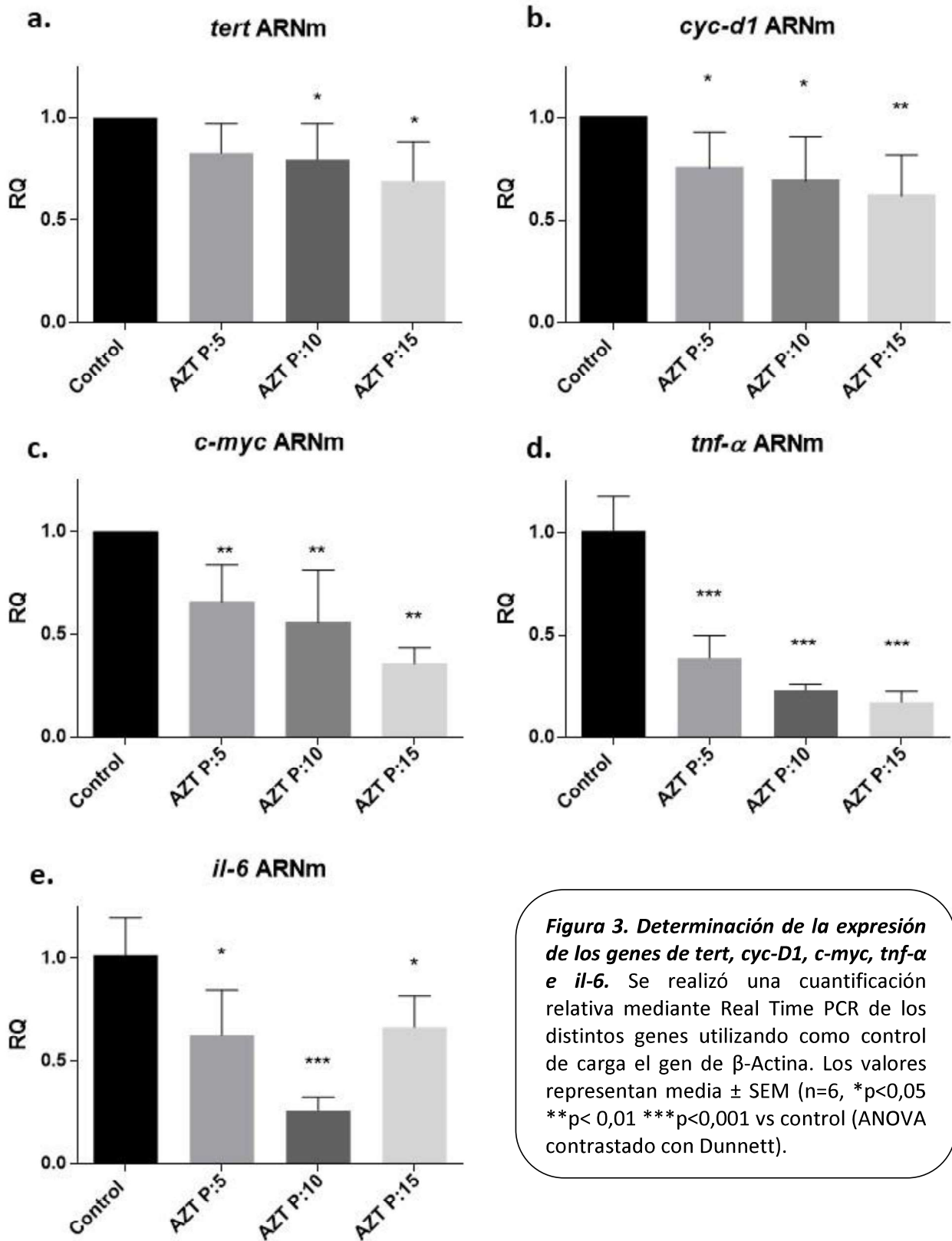


Figura 3. Determinación de la expresión de los genes de *tert*, *cyc-D1*, *c-myc*, *tnf-α* e *il-6*. Se realizó una cuantificación relativa mediante Real Time PCR de los distintos genes utilizando como control de carga el gen de β -Actina. Los valores representan media \pm SEM (n=6, *p<0,05 **p< 0,01 ***p<0,001 vs control (ANOVA contrastado con Dunnett).

Efecto del AZT en el proceso de migración celular

Utilizando el ensayo de herida, se analizó el efecto del tratamiento del AZT sobre la migración celular. Como se puede observar en la Figura 4, el tratamiento con AZT después de 5 pasajes no demostró cambios significativos en la migración celular. Sin embargo, después de 10 y 15 pasajes con AZT, el área invadida disminuyó un 31% ($p < 0.01$) y un 47,7% ($p < 0.01$) respectivamente, indicando que el tratamiento en cuestión impactó de manera negativa sobre el proceso de migración celular.

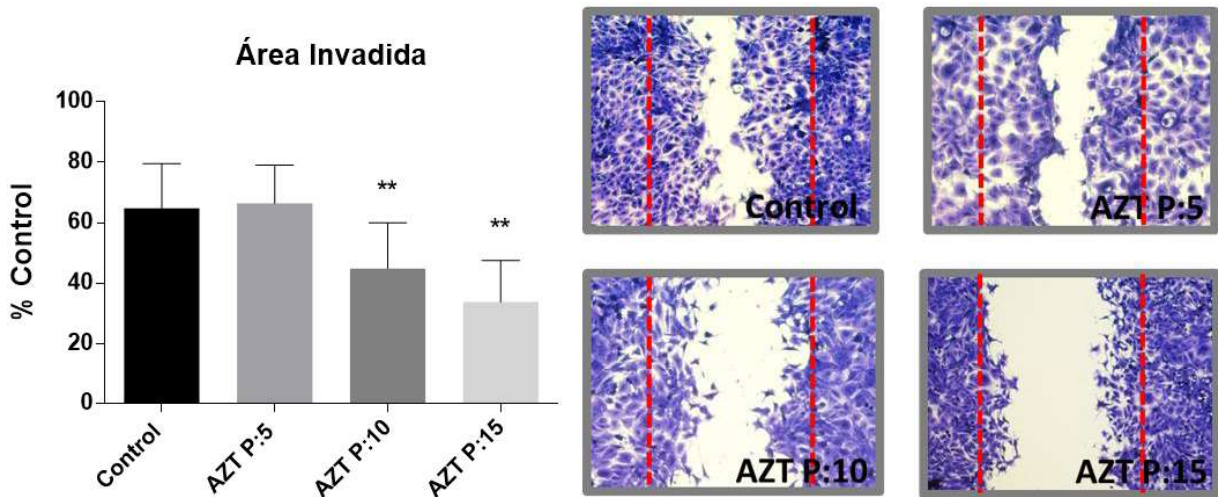


Figura 4. Evaluación del efecto del AZT sobre la migración celular. A partir de una monocapa de células F3II confluentes se realizó el ensayo de herida. El revelado se llevó a cabo mediante tinción con Cristal Violeta, Magnificación x200. Las líneas rojas punteadas marcan la referencia de la herida control del ensayo. La cuantificación se realizó utilizando el Software NIS-Elements 3.0. Los valores representan media \pm SEM ($n=6$, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ vs control (ANOVA contrastado con Dunnett).

Como se observa en la Figura 5.a, las células control mostraron fibras de actina regulares en la mayoría de las células, las cuales se observaron con una intensidad de fluorescencia destacable en todo el área celular. Cuando se observaron las células correspondientes a 5 pasajes de tratamiento con AZT (Figura 5.b), también se pudieron observar algunas fibras de actina, aunque también se vio una pequeña acumulación de actina monomérica en la zona periférica de las células. Sin embargo, cuando se observaron las células correspondientes a 10 y 15 pasajes de tratamiento con AZT, los cambios en el citoesqueleto de actina fueron claros y evidentes. Como se puede apreciar en la Figura 5.c las células presentaron muy pocas fibras de actina, mientras que la misma se encontraban principalmente en la zona cortical de la célula. Finalmente, en las células correspondientes al tratamiento durante 15 pasajes (Figura 5.d) ya no se observaron fibras de actina, la fluorescencia fue

mucho más difusa, de menor intensidad y se encontró distribuida uniformemente en el citoplasma de la célula.

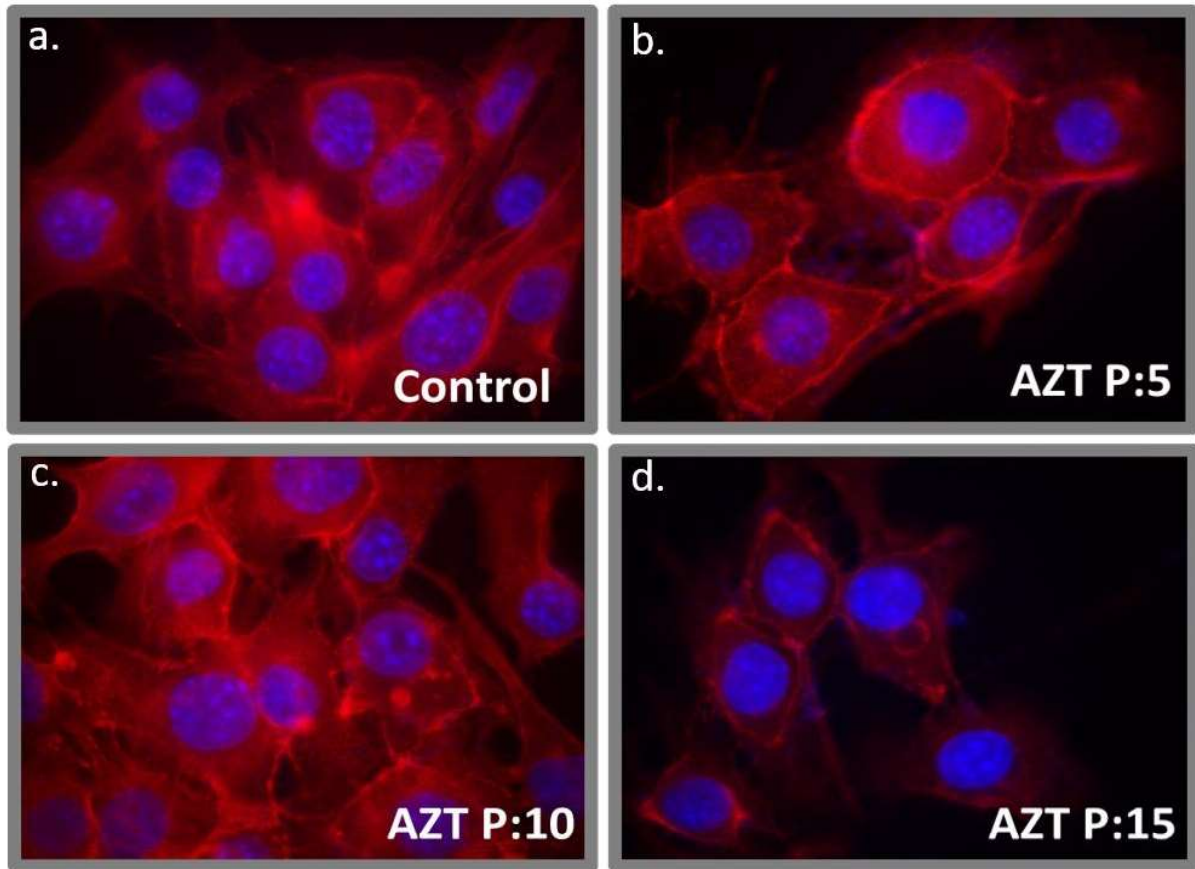
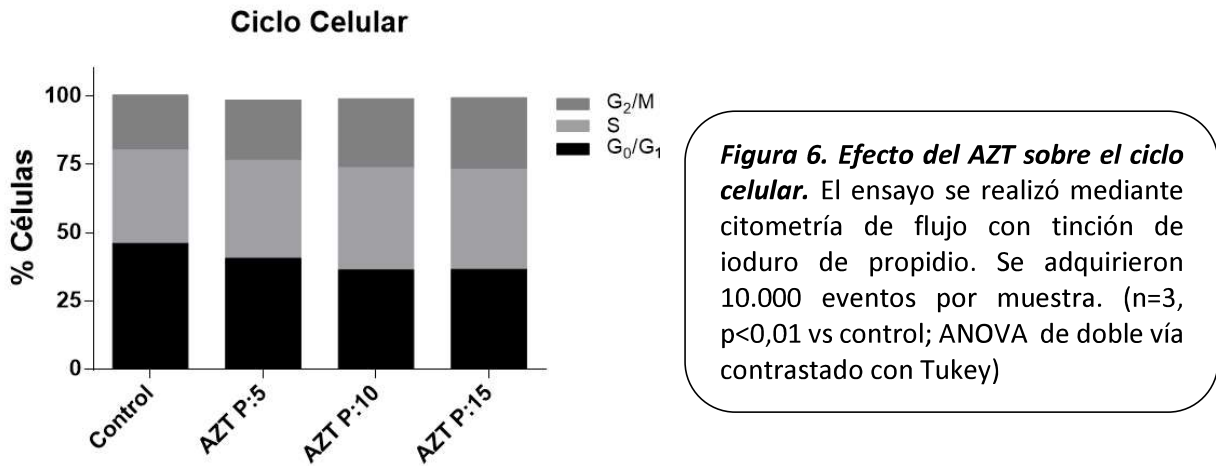


Figura 5. Evaluación del efecto del AZT sobre el citoesqueleto de actina. Se evaluaron mediante microscopía de fluorescencia los cambios en el citoesqueleto de actina (tinción con Faloidina Alexa Fluor® 555, contratinción con DAPI). Magnificación x1000.

Efecto del tratamiento con AZT en el crecimiento y ciclo celular

Como se puede observar en la Figura 6, la distribución de las poblaciones celulares entre las diferentes fases del ciclo celular presentó algunos cambios significativos entre los distintos tratamientos. En lo que respecta a la fase G0/G1 se observó un descenso del 46% de células en esta fase, un 40% luego de 5 pasajes y un 36% luego de 10 y 15 pasajes ($p < 0,01$). De manera complementaria, se evidenció un aumento del porcentaje de células en fase G2/M que va desde el 20% hasta el 25% y 26% luego del tratamiento durante 10 y 15 pasajes respectivamente ($p < 0,05$). Si bien las diferencias detectadas a partir de estos resultados son muy sutiles, a lo largo del tratamiento se pudo apreciar que el crecimiento celular no fue parejo entre células control y células tratadas, presentando estas últimas un aparente crecimiento más lento. Dado que los resultados de ciclo celular

no fueron congruentes con este fenómeno, se procedió a evaluar el tiempo de duplicación de las células F3II durante el tratamiento con AZT.



Mediante la cuantificación celular después de 24, 48, 72 y 96 hs de crecimiento se construyeron curvas para cada condición, a partir de la cual se determinaron los tiempos de duplicación. De esta manera, se obtuvo que para las células control el tiempo de duplicación fue de 22.8 horas. En lo que respecta a las células tratadas con AZT se encontró que para el pasaje 5, 10 y 15 los tiempos de duplicación fueron 43,1, 56,2 y 67,2 horas, respectivamente (Figura 7). Estos datos demuestran una clara influencia del AZT sobre el tiempo de duplicación, corroborando lo observado durante el tratamiento.

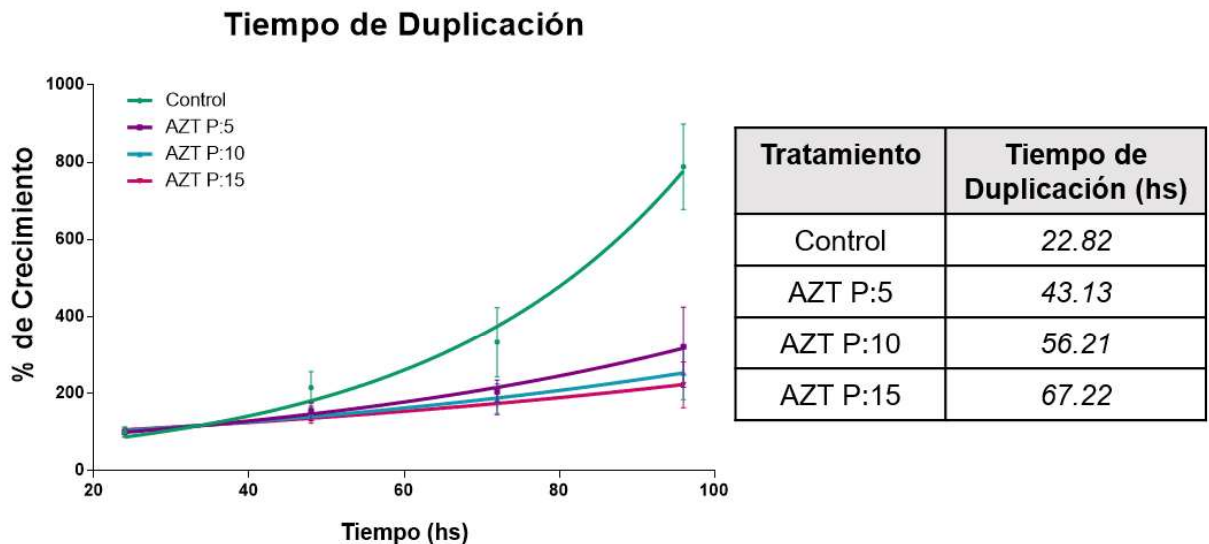


Figura 7. Análisis del tratamiento con AZT sobre el tiempo de duplicación celular. Se sembraron 15.000 células por well en placas de 12 wells. Se revelaron las placas con cristal violeta y lectura a 570 nm cada 24 horas, durante 96 horas. Se construyó una curva de crecimiento teniendo en cuenta como 100% la medida a 24 hs para cada tratamiento. El análisis estadístico se realizó mediante la comparación de ajuste de las curvas no lineales a través de sus parámetros con el software Graph Prism 6.

Discusión

AZT fue el primer inhibidor reportado de la telomerasa, siendo aún desconocido su mecanismo completo de acción antitumoral. El AZT es capaz de revertir la inmortalidad celular de una célula tumoral, lo cual se fundamentaba principalmente por su característica de terminador de cadena en la síntesis de ADN telomérico. Si bien esta postura está validada por varias investigaciones que así lo demuestran, AZT por sí mismo puede producir y modular procesos antitumorales por otros medios, es decir, de manera independiente de su actividad como inhibidor de la telomerasa. Años más tarde, numerosas funciones no teloméricas de la telomerasa fueron descriptas, por ejemplo la capacidad de TERT de funcionar como factor transcripcional de genes target en la vía de señalización Wnt/ β -catenina y NF κ B, resaltando dentro de las mismas a *cyc-d1*, *c-myc*, *Il-6* y *tnf- α* (Park JI, 2009; Ghosh A, 2012). En este trabajo, se propuso demostrar el efecto del tratamiento con AZT sobre las funciones canónicas y no canónicas de la telomerasa, en la misma línea celular donde ya fue demostrada su capacidad de inducir senescencia y apoptosis, con el objetivo de integrar los diferentes mecanismos de acción que el AZT presenta en la biología tumoral (Gomez DE, 2012).

El tratamiento crónico con AZT a una dosis de 600 μ M provoca un descenso progresivo en la actividad telomerasa durante los 15 pasajes en la línea celular F3II, sin provocar efectos sobre la viabilidad celular. Nuestro grupo fue el primero en encontrar este efecto utilizando una dosis de 800 μ M (Gomez DE, 1998). Si bien en nuestros estudios utilizamos una dosis de 600 μ M, en los numerosos trabajos que utilizan AZT como inhibidor de la telomerasa la IC₅₀ varió de 0.25 a 1.35 mM en las distintas líneas de células tumorales sin que la IC₅₀ correlacione con la tasa de crecimiento celular. Las variaciones de la IC₅₀ pueden reflejar diferencias en la absorción, excreción, y/o fosforilación del AZT entre las diferentes líneas celulares, habiendo sido confirmado por otros autores tiempo después (Gomez DE, 2012).

En este estudio se encontró que, a una dosis de 600 μ M, los niveles de expresión de *tert* se vieron significativamente reducidos a medida que el tratamiento avanzaba. Se ha reportado que TERT actúa como factor asociado al complejo transcripcional β -catenina/BRG1, el cual actúa sobre genes target específicos de la vía Wnt/ β -catenina. Dado esto, es lógico esperar que un descenso en la expresión de *tert* impacte de manera negativa en la expresión de los genes *c-myc* y *cyc-d1*. Nuestros resultados revelan un descenso continuo, conforme avanzan los pasajes de tratamiento, en la expresión de estos dos genes, alcanzando niveles de expresión de hasta dos veces menos en *c-myc* y una vez en *cyc-d1*. Este resultado nos permite inferir que el descenso en la expresión de *TERT*, debido al tratamiento con AZT, podría estar afectando su rol como posible factor transcripcional de estos genes, de manera coincidente con lo expuesto en bibliografía donde distintos autores demostraron que el tratamiento intermitente con AZT suprime inicialmente la expresión de *tert* para luego hacerlo sobre *c-myc* (Ji HJ, 2005; JinRR, 2012). Por otro lado, siendo C-MYC factor transcripcional de la

expresión de TERT, la suma de los resultados de expresión génica nos permite inferir la existencia de un *loop* de retroalimentación negativa entre la expresión de TERT mediada por C-MYC y viceversa. De esta manera, se puede asumir que al tratamiento con AZT podría estar afectando el rol de ambas proteínas como factores transcripcionales, coincidiendo este hecho con lo reportado en la bibliografía respecto a la regulación de estos genes (Cerni C, 2000; Listerman I, 2013; Zhou J, 2014). Por otra parte, también se observaron descensos en los niveles transcripcionales de los genes *tnf- α* e *Il-6*, ambos relacionados con la vía NF κ B. Estos resultados coinciden con los encontrados en otros tejidos, en donde el tratamiento con AZT provoca el bloqueo de esta vía de señalización, acompañada por el descenso de estos genes *target* (Pornprasert S, 2006; Ghosh SK, 2003). Sumado a esto, se encuentra reportado que la sobreexpresión de TERT en distintos modelos celulares está acompañada de un aumento de IL6 y TNF- α entre otros marcadores (Ding D, 2013, Wu X, 2015). Una posible explicación a los resultados observados en este trabajo sobre la regulación en la expresión de los genes río abajo de estas vías se puede plantear teniendo en cuenta que el AZT es un inhibidor de la actividad telomerasa que interacciona con TERT. De esta manera, dicha interacción podría provocar cambios conformacionales que inhiban también su actividad como factor transcripcional.

Respecto a las variaciones encontradas en la expresión de *cyc-d1* luego del tratamiento con AZT, se encontró un descenso pasaje dependiente que alcanzó el 38,24% en el pasaje 15. La regulación negativa en la expresión de *CYC-D1* es un indicador directo de cambios en la modulación del ciclo celular, ya que la misma es una proteína requerida para el progreso de la fase G1/S y su descenso puede indicar un arresto del ciclo celular en G0/G1. Basado en la bibliografía existente respecto a la expresión de este factor, se llevaron a cabo análisis sobre el ciclo celular mediante citometría de flujo. Estos análisis arrojaron resultados en donde no se vieron grandes diferencias entre las distintas poblaciones para los tratamientos y el control. De manera similar, Datta y colaboradores demostraron que el tratamiento prolongado con AZT sobre células MT2 provoca arrestos en todas las fases del ciclo celular (Datta A, 2006). Fang y colaboradores demostraron que la proteína ciclina A aumentaba su expresión de manera temprana en ratones sometidos al tratamiento con AZT mientras que la expresión de la quinasa 1 dependiente de ciclina (CDK1) decaía de manera más tardía, al igual que la expresión de Ciclina D2 (Fang JL, 2009). Sin embargo, otros autores encontraron diferentes resultados en otros modelos, como es el caso del trabajo de Olivero y colaboradores, en el cual se encontró que el AZT induce una regulación positiva en la expresión de *cyc-d1*, acompañado por un descenso en la expresión de P18 y P27, los cuales son inhibidores asociados a *CYC-D1* (Olivero OA, 2005). Dado el resultado hallado en este trabajo respecto a la expresión de *CYC-D1*, es importante resaltar el rol fundamental que juega esta proteína en el progreso del ciclo celular. La primera aproximación de este efecto está basada en el impacto que podría tener este proceso, esperando un incremento en la

proporción de células presentes en la fase G₀/G₁. El resultado al que se ha arribado respecto a ciclo celular no permite observar el fenómeno recién expuesto, ya que se observa un descenso en el estadio celular G₁; una distribución constante en la fase S y un incremento en la fase G₂/M en las células tratadas con AZT. Una de las posibles interpretaciones que se le puede atribuir al fenómeno observado, podría estar basada en el hecho que el tratamiento con AZT aumente los niveles en la expresión de p21 (Hassani S, 2013), la cual es una proteína conocida por su rol como regulador del ciclo celular a través de la inhibición de los complejos E/ck2 y A/ck2, siendo capaz de inhibir el progreso del ciclo celular. Adicionalmente, durante la fase S, también es capaz de inhibir cdk1-cycA y cdk2-cycA, las cuales son requeridas para el pasaje a la fase S y a la fase G₂, respectivamente (Abbas T y Dutta A, 2009). Por otra parte, existe una relación directa entre p21 y C-MYC, siendo este último conocido como represor en la expresión de p21. Por lo tanto, cuando la expresión de C-MYC baja, aumentaría la expresión de p21, permitiendo la regulación de las diferentes ciclinas presentes en el proceso de ciclo celular. Estos factores podrían explicar las diferencias entre la cantidad de células encontradas en los distintos estadios del ciclo celular luego del tratamiento con AZT (Wang H, 2008).

Los resultados de este trabajo muestran una diferencia significativa en el tiempo de duplicación de la línea F3II tratada a distintos pasajes con AZT. Por otra parte, se ha reportado que C-MYC tiene un importante rol en lo que refiere al proceso de mitosis y replicación del ADN, ya que el mismo es regulador de genes target tales como *cdc6*, *cdt1*, *mcm3*, *mcm4* y *mcm5*, entre otros genes asociados a estos procesos (Bretones G, 2015). Si bien los genes implicados no fueron abordados en este trabajo, la vía NFκB también presenta alta relevancia en los procesos de proliferación y supervivencia a través de la regulación de genes como *cdk2*, *bcl2*, *bclxl*, *cyc-E*, etc (Del Prete A, 2011). Dado que el tratamiento con AZT estaría generando un efecto bloqueante sobre esta vía, esto podría estar afectando a los genes implicados en este proceso, provocando un descenso significativo en la capacidad proliferativa y anti apoptótica de las células tratadas. A partir de esta información, y dado que el tratamiento con AZT provoca un descenso en la expresión de los genes target de las vías estudiadas, se puede relacionar que el proceso de mitosis y replicación del ADN se encuentra alterado en las células tratadas con AZT, lo cual se ve reflejado en el tiempo de duplicación de las mismas.

Demostramos que el tratamiento crónico con AZT provoca descensos en la capacidad migratoria de la célula y modifica de manera significativa la organización del citoesqueleto de actina, evidenciando una respuesta tratamiento dependiente en el modelo altamente agresivo F3II. La bibliografía sugiere que existe una relación entre la expresión de *c-myc* y el fenotipo invasivo, siendo que las células que expresan mayores cantidades relativas de este gen, presentan mayor habilidad migratoria (Chen D, 2014). Nuestros resultados coinciden con esta evidencia, mostrando que a lo largo de los pasajes de tratamiento con AZT, la expresión de *c-myc* se ve disminuida, como así también la

migración y la formación de filamentos de actina, lo cual indica que las células tratadas tienen un fenotipo más epitelial asociado a un perfil de menor agresividad. Esta relación entre *c-myc*, citoesqueleto de actina y migración se corresponden debido al efecto que presenta C-MYC en la señalización de la vía RhoA/ROCK, la cual se encuentra altamente relacionada con la transición epitelio mesenquimal (EMT), la motilidad celular y la señalización que regula la organización del citoesqueleto de actina (Shi JW, 2013). Sumado a esta evidencia, si bien no fue evaluado en este trabajo, se ha reportado que el aumento en la sobreexpresión de TERT provoca un aumento en la expresión de MMPs del tipo 1, 3, 9 y 10 a través de la vía NFκB, las cuales se encuentran altamente relacionadas con la EMT. Del mismo modo, la inhibición de esta vía a través de agentes bloqueantes de TERT provocan el descenso de MMPs (Ding D, 2013; Wu X, 2015). De esta manera, el tratamiento con AZT también podría estar afectando este aspecto de la EMT.

Basándonos en los resultados aquí obtenidos, postulamos que el tratamiento con AZT tiene un efecto sobre el proceso de migración a través de la regulación de *c-myc* y *tert*, direccionando a las células tumorales hacia la adquisición de un fenotipo menos agresivo, sugiriendo además que este efecto también podría estar dado por la regulación de la vía NFκB a través de la inhibición de TERT. Esta información aporta evidencia novedosa sobre el estudio y aplicación del AZT relacionado al campo de las actividades extrateloméricas.

Conclusión

Los resultados e información presentados en este capítulo se encuentran dirigidos a completar nuestros estudios previos sobre cómo el AZT ejerce su actividad inhibitoria de la telomerasa y consecuentemente su actividad antitumoral. La telomerasa se encuentra relacionada con múltiples vías de señalización, principalmente mediada por TERT, y su regulación positiva o reactivación conducen a la modulación de procesos celulares críticos para la progresión tumoral, tales como la expresión de genes *target* en los procesos de proliferación, metabolismo celular, etc.

El entendimiento de la acción antitumoral del AZT presenta una gran importancia, más aún luego del reporte de Bhushan y Kush donde se estudian los efectos farmacofóricos de las drogas inhibitoras de la telomerasa (Bhushan B y Kush L, 2014). Ellos describen que el AZT y unos pocos nucleósidos del tipo VIH-RTIS presentan una exclusividad muy selectiva, sin necesidad de realizar su bioactivación mediante quinasas para fosforilarse ni incorporarse a la cadena de ADN creciente. De esta manera, se unen a sitios alostéricos de TERT, provocando cambios conformacionales en la proteína de manera no competitiva con sus sustratos.

A partir de los efectos extrateloméricos descubiertos recientemente, en este trabajo se aborda por primera vez los distintos procesos evaluados luego del tratamiento con AZT, sugiriendo que la acción inhibitoria del mismo puede deberse a una mezcla de efectos canónicos y no canónicos.

Dado que nuestro grupo demostró que el AZT permite la recomposición del reloj biológico de la célula tumoral y habiendo encontrado el mecanismo de acción, es necesario reflexionar sobre su utilidad clínica. Si bien el uso de AZT permitió generar muchos conocimientos sobre el complejo telómero/telomerasa, su relevancia clínica en pacientes con cáncer es por el momento acotada (limitada al tratamiento de tumores de origen viral). En cuanto al resto de la patología oncológica, de acuerdo con nuestras demostraciones junto con los resultados encontrados por otros grupos, podemos predecir que el AZT no afectará de manera suficiente al tumor hasta que los telómeros alcancen un tamaño crítico para la inducción de senescencia. Esto significa que, durante el tratamiento, las células tumorales continuaran dividiéndose hasta el momento de entrada en senescencia. De este hecho se desprende una clara preocupación con respecto al tratamiento con AZT en pacientes con tumores avanzados. Varios ensayos clínicos buscan una ventana de utilidad, por ejemplo luego de la cirugía como tratamiento adyuvante, cuando la carga tumoral es baja (Gomez DE, 2012). El AZT fue pensado como una molécula inhibitoria de la telomerasa tan solo por la semejanza estructural entre esta retrotranscriptasa y la propia del VIH. Actualmente, con las nuevas metodologías existentes podemos generar drogas que no solo inhiban la telomerasa sino también que apunten a la desestructuración de la holoenzima. Teniendo en cuenta este enfoque es que se construye la segunda parte de esta tesis.

Capítulo 2: “Desarrollo de nuevos inhibidores de la unión disquerina-hTR en ensamblado de la holoenzima telomerasa, mediante *screening* virtual basado en *docking*”

Introducción

Inicio del desarrollo y utilización de drogas en cáncer

El término “quimioterapia” fue definido por el químico alemán Paul Ehrlich como el uso de drogas para el tratamiento de enfermedades. El inicio en el desarrollo y descubrimiento de la quimioterapia convencional, se focalizó principalmente en los agentes citotóxicos. El paradigma en el descubrimiento de nuevas drogas se basaba en la selección de agentes que tenían un efecto citostático o citotóxico evidente sobre líneas celulares tumorales, causando regresión tumoral en modelos murinos. Los agentes antitumorales fueron descubiertos principalmente en forma azarosa o por inhibición de vías metabólicas cruciales implicadas en la división celular, en donde su mecanismo de acción exacto estaba generalmente sujeto a una investigación posterior. Por ejemplo, Farber y colaboradores, reportaron el uso de análogos de folato para el tratamiento de Leucemia Linfoblástica Aguda (ALL) en 1948, mientras que su mecanismo de acción (inhibición de la dihidrofolato reductasa) fue reportado por Osborn y colaboradores en 1958. De manera similar, la mostaza de nitrógeno, denominada Mustina, fue utilizada como un agente quimioterápico mucho tiempo antes de que su mecanismo de acción fuera dilucidado. (De Vita VT, 2008). A pesar de que estas estrategias han alcanzado un importante éxito, los desarrollos más recientes en biología molecular y el avance en el entendimiento de la farmacología del cáncer a niveles moleculares, han desafiado a los investigadores a iniciar el camino en estrategias de diseño de drogas blanco-dirigidas.

Desarrollo de drogas en cáncer utilizando estrategias dirigidas a un blanco específico.

Actualmente, y de manera global, se invierten gran cantidad de recursos en la prevención, diagnóstico y tratamiento del cáncer. El descubrimiento y desarrollo de agentes antitumorales son el foco clave en el que se centran las compañías farmacéuticas, como así también, organizaciones gubernamentales y no gubernamentales sin fines de lucro. La identificación de compuestos citotóxicos permitió el desarrollo de terapias antitumorales novedosas durante varias décadas. Sin embargo, los avances en el tratamiento del cáncer continuaron siendo limitados por la identificación de un único aspecto bioquímico que podría ser explotado de manera selectiva para atacar a las células tumorales. Schwartzmann y colaboradores observaron en 1988 que de los 600,000 compuestos evaluados hasta ese momento, menos de 40 eran utilizados rutinariamente en la clínica (Schwartzmann G, 1988). Los avances en la biología molecular, genómica y proteómica, obtenidos durante los últimos años han generado una gran cantidad de nuevos blancos terapéuticos, permitiendo cambiar el paradigma del descubrimiento de nuevas drogas antitumorales, a través de la terapia molecular dirigida. Este cambio

de paradigma, no solo resultó en una clara evolución de los procesos involucrados en el descubrimiento de nuevas drogas, sino también requirió un ajuste en la búsqueda y evaluación clínica de las drogas candidatas. Estas drogas son agentes pre diseñados para inhibir o modificar un blanco molecular definido, implicado en pronóstico tumoral, crecimiento y/o metástasis. Una gran cantidad de compuestos de este estilo han emergido durante los últimos años, encontrándose muy pocos de ellos aprobados por las agencias regulatorias correspondientes, otros en las distintas fases clínicas y la gran mayoría en estado de evaluación preclínico (Narang AJ, 2009). Por ejemplo, el Imatinib Mesylato es un compuesto de tipo “*small molecule*” que inhibe una tirosin quinasa específica denominada proteína de fusión Bcr-Abl. Este compuesto se encuentra indicado para el tratamiento de Leucemia Mieloide Crónica y tumor Estromal Gastrointestinal. Otro ejemplo es el Rituximab, el cual es un anticuerpo monoclonal utilizado en el tratamiento de Linfoma de células B tipo non-Hodgkin’s y Leucemia de células B. Este anticuerpo se une al antígeno CD20 sobre la superficie de las células B CD20 positivas, provocando la entrada en apoptosis de las misma (Seow H, 2016). Estos compuestos antitumorales, junto a otros, se encuentran listados en la Tabla 1.

“Small Molecules”	Proteína Blanco (o clase de droga)
Imatinib	BCR-ABL, PDGFR, C-KIT
Gefitinib	EGFR
Erlotinib	EGFR
Sorafeniv	VEGFR, PDGFR, C-KIT, raf, Scf
Nilotinib	BCR-ABL, PDGFR, C-KIT
Dastinib	BCR-ABL
Lapatinib	EGFR, erbB2
Sunitinib	VEGFR, PDGFR, C-KIT,Ret, Fit-3
Bortezimib	(Inhibidor del proteosoma)
Octreotide	Receptor de Somatostatina
Anticuerpos Monoclonales	
Rituximab	CD20
Trastuzumab	erbB2 (HER2)
Cetuximab	EGFR
Bevacizumab	VEGF
Alemtuzumab	CD52

Terapias aprobadas para el tratamiento del cáncer por la FDA. Esta lista excluye los tratamientos hormonales para cáncer de mama y próstata. (Adaptado de Seow H, 2016)

Tabla 1. Ejemplos de terapias dirigidas aprobadas por la FDA (Food and Drug Administration).

Las terapias dirigidas tienen como primer objetivo optimizar la eficacia y la selectividad de la terapia contra la célula tumoral, de manera tal que se bloqueen o regulen específicamente los procesos celulares que lideran a la patología y derivan en la transformación celular maligna. En general, en comparación con el efecto provocado por las drogas citotóxicas, estas drogas tendrían un efecto crónico en vez de agudo, mostrando un resultado citostático en la célula tumoral. Dada esta

situación, se considera que este tipo de drogas dirigidas sugieren ser más selectivas y menos tóxicas para las células con fenotipo normal (Hoelder S, 2012).

El desarrollo de una nueva droga es un proceso costoso y complejo. El tiempo promedio que involucra ingresar un nuevo fármaco en el mercado es de más de 13 años desde el inicio del proyecto. Dentro de este tiempo se considera que se destinan 4 años en la investigación preclínica y 9 años para que la droga candidata atraviese y apruebe las distintas fases clínicas. La inversión total en este tipo de proyectos es de alrededor de mil millones de dólares, dependiendo del área terapéutica. Sin embargo, a pesar del costo en dinero y tiempo que conlleva el desarrollo de una droga exitosa, sólo el 25% de las drogas que comienzan este largo proceso logran alcanzar la fase 3 en la investigación clínica, de las cuales el 76% la superan (Bunnage M, 2011). En este contexto, cada paso del proyecto es fundamental, y su éxito o fracaso determina el resultado de la siguiente fase. Es por esto, que es de suma importancia conocer y entender cuáles son y cómo afrontar cada una de las etapas requeridas en el desarrollo de una nueva droga (Imagen 1).

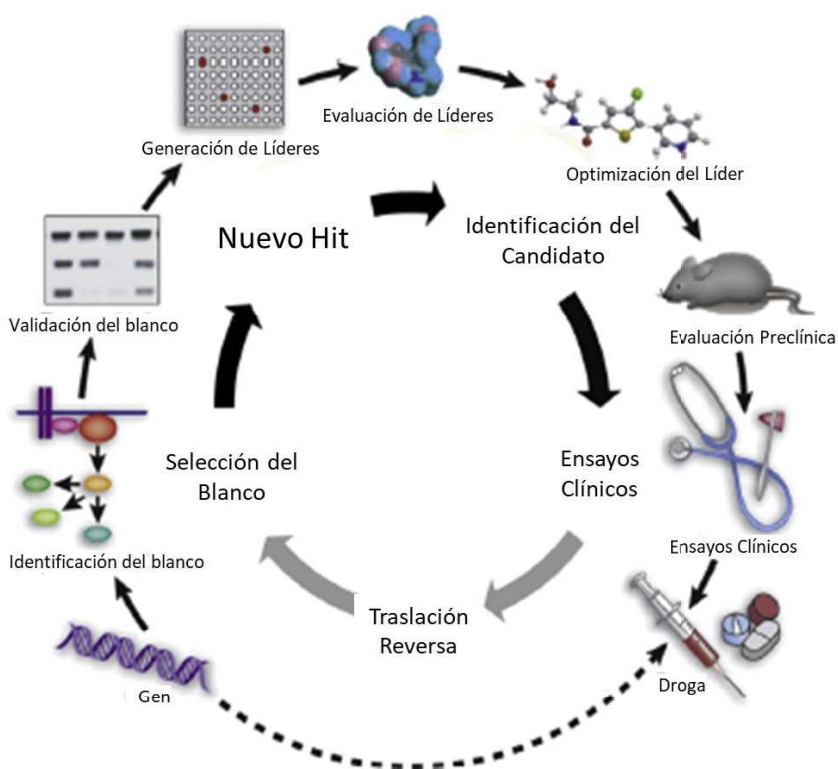


Imagen 1. Hallazgo y Desarrollo de nuevas drogas. Los cuatro pasos claves en el hallazgo de drogas antitumorales se encuentran representados en el centro. La traslación reversa desde la clínica al laboratorio se encuentra dentro de la validación del blanco y la selección. (Adaptado de Hoelder S, 2012).

Selección y Validación del Target

Definir el blanco con el que se va a trabajar es una de las decisiones más importantes involucradas en el descubrimiento y desarrollo de nuevas drogas. Principalmente se debe a que la elección de un blanco equivocado conlleva a que todos los recursos destinados para los pasos posteriores a la selección, incluyendo potencialmente ensayos clínicos, serán desperdiciados. Además, al no ser un buen blanco, surgirán gastos extra relacionados con los problemas que provoca el trabajar con un blanco de poco potencial. La selección de un nuevo blanco en el desarrollo de drogas antitumorales está ampliamente basado en la fuerte evidencia que demuestra la dependencia o vulnerabilidad del blanco elegido para un determinado grupo de pacientes, generalmente definido por su estado genético. Este tipo de evidencia no solo resulta útil para generar confianza sobre el efecto antitumoral que se puede lograr si se modula el blanco farmacológicamente, sino también para que durante el desarrollo del proyecto se pueda alcanzar una máxima selectividad de la droga por las células tumorales y no por el tejido sano (Hoelder S, 2012).

La selección del blanco correcto está completamente ligada a un balance entre oportunidades y riesgos. La oportunidad está asociada a que la nueva droga pueda satisfacer necesidades médicas que aún no han sido abordadas de manera exitosa. El riesgo se puede presentar de dos maneras: Como riesgo biológico, el cual se asocia a si el efecto terapéutico esperado se evidenciará en pacientes, o como riesgo en la viabilidad, lo cual refiere a la posibilidad de descubrir y desarrollar una droga con el efecto deseado sobre el blanco. El riesgo “total” con el que se enfrenta un nuevo proyecto es un balance entre estos dos, siendo la situación ideal la que permita que ningún otro tipo de riesgos existan. Por ejemplo, sería lógico proceder con un blanco que presenta alto riesgo en cuanto a lo técnico para su obtención, siempre y cuando la validación biológica sea robusta y la necesidad en el desarrollo de la droga sea valiosa para alguna necesidad médica insatisfecha (Hoelder S, 2012).

Dada la enorme complejidad de la biología tumoral, la elección del blanco correcto se hace aún más complicada. Si bien no se pueden definir atributos que determinen la calidad del blanco, la acumulación de evidencia puede ayudar a sugerir que cierto blanco tiene mucha más potencialidad que otras opciones. Entre estas evidencias, se encuentra la disponibilidad de información humana, representándose, por ejemplo, con la obtención de estudios que brinden información genética humana asociada a la patología y/o datos clínicos de muestras de pacientes. La disponibilidad de esta información fue determinante en el desarrollo de Maraviroc19, un antagonista de CCR5 utilizado contra el VIH, el cual fue inspirado a partir de la observación de que una delección en el genoma humano de este receptor, confería resistencia a la infección por VIH. Este tipo de evidencia, junto a otras, se encuentra explicadas en la Tabla 2 (Bunnage M, 2011).

Por otra parte, si bien es esencial considerar las distintas evidencias relacionadas con la racionalidad de la enfermedad, también es importante evaluar la factibilidad asociada al desarrollo de ese blanco. Para abordar este objetivo se deberían tener en cuenta los parámetros incluidos en la Tabla 2. La mayoría de los parámetros de calidad y factibilidad aquí expuestos están incluidos en cualquier nuevo proyecto de desarrollo de drogas, lo cual demuestra la importancia que estos implican en el éxito en la selección de un nuevo blanco.

Información sobre la patología	Factibilidad en el desarrollo de la nueva droga
Genética: Información genética humana disponible que soporte la relevancia que presenta el blanco en la enfermedad (por ejemplo, mutaciones ligadas al fenotipo de la patología)	Búsqueda de la cascada: Búsqueda viable de la cascada asociada al blanco, incluyendo ensayos celulares funcionales e idealmente en tejidos sanos y enfermos.
Validación Preclínica: Herramientas biológicas o sondas selectivas que modulan el fenotipo de la enfermedad en modelos preclínicos (por ejemplo, RNA de interferencia)	Drogabilidad Química: Evidencia de que el blanco es "drogable" de una manera terapéutica (compuestos tipo "small molecule" o biológicos)
Perfil de Expresión: Evidencia de una regulación positiva o negativa del blanco en células o tejidos humanos relacionados con la enfermedad (por ejemplo, ensayos de perfil de transcripción y proteómica)	Predicción de la Dosis: Claro entendimiento de la concentración efectiva y la recepción en modelos farmacológicos preclínicos para poder predecir la dosis en humanos con alta certeza.
Diferenciación: Evidencia de cómo la modulación del blanco elegido para una determinada enfermedad tiene potencialidad en modificar el estado actual del tratamiento de la enfermedad.	Desarrollo Clínico: Parámetros robustos y eficaces que puedan ser monitoreados en estudios de pacientes. Biomarcadores que se traduzcan, para definir determinar valores de dosis. Biomarcadores tempranos que demuestren la interacción y farmacología en el sitio de acción del blanco. Poblaciones bien definidas de pacientes para estudios de pruebas de concepto clínicas.
Modelos Animales: Información en modelos animales que aporten datos sobre el rol que posee el blanco en la enfermedad (por ejemplo, <i>knockout</i> génicos, o modelos de la enfermedad validados clínicamente).	
Conocimiento de las Vías: Vías relevantes con la biología de la enfermedad; validación de cómo interacciona el blanco con otras proteínas.	
Seguridad del Blanco: Evidencia de que la modulación del blanco no provoca un efecto no seguro o tóxico.	

Tabla 2. Parámetros asociados a la calidad del blanco elegido. (Adaptado de Bunnage M, 2011)

Obtención de la secuencia y estructura de la proteína blanco

Uno de los problemas más comunes que se presentan luego de la selección de una proteína blanco y de un método de *screening* de nuevas drogas, es el hecho de disponer la estructura tridimensional (3D) de la proteína de interés. Los principales obstáculos en la obtención de estructuras cristalográficas de proteínas se encuentran en las dificultades del proceso de cristalización y la incapacidad de generar suficiente material de partida, lo que en general está asociado a un nivel de expresión bajo de la proteína (Tuccinardi, 2009). Este impedimento se vio reflejado hace algunos años,

debido al descenso en el porcentaje de secuencias proteicas en UniProtKB que poseen una estructura asociada en la biblioteca del banco de datos de proteínas (PDB). Este valor fue del 2% en el año 2004, del 1,2% en el año 2007, alcanzando un 0,6% en 2009. Los recientes avances en algoritmos computacionales para la predicción de estructura 3D y función, han aliviado este problema proveyendo a los investigadores de información valiosa sobre las proteínas de interés (Roy A, 2011).

Los métodos computacionales para predecir la estructura 3D de proteínas se dividen, de manera histórica, dentro de 3 categorías, las cuales se basan en la disponibilidad de estructuras 3D en la base de datos PDB. En el modelado comparativo (CM), proteínas homólogas molde relacionadas evolutivamente son identificadas por secuencia o comparación del perfil de la secuencia, pudiendo ser generados modelados de alta resolución mediante la copia del armazón de la estructura del molde o satisfaciendo los requerimientos espaciales determinados a partir de la estructura molde. En el caso de proteínas con distinto origen evolutivo, pero que pueden presentar estructura similar, se han desarrollado métodos de ensamblaje para hacer coincidir la secuencia en estudio directamente con la estructura 3D de otras proteínas que se encuentran resueltas, con el objetivo de reconocer plegamientos similares en la proteína estudiada, aunque no tenga una relación evolutiva con la proteína molde. Por último, para proteínas que no tienen estructura relacionada con proteínas presentes en la biblioteca PDB, la estructura de la misma deberá ser construida desde cero mediante modelado *ab initio* (Roy A, 2011).

Habitualmente, las categorías convencionales de métodos de predicción de estructura proteica se basan en más de una técnica para realizar este proceso. A su vez, distintos métodos pueden utilizar la misma técnica, aun perteneciendo a categorías diferentes. Esto genera que la clasificación de estos métodos sea difícil de delimitar. Si bien tanto los métodos de modelado comparativo y ensamblaje utilizan perfiles de secuencia y perfiles de alineamientos para identificar los moldes, la mayoría de los algoritmos de modelado *ab initio* utilizan información basada en conocimiento previo o en la evolución para coleccionar las restricciones espaciales o para identificar bloques estructurales locales. Ensayos recientes de cálculos en la predicción de estructura proteica (CASP), han demostrado ventajas significativas en las metodologías de predicción de estructura proteica que combinan varias técnicas, tales como ensamblaje, modelado *ab initio* y métodos refinados de estructura a nivel atómico (Roy A, 2011).

La relevancia biológica de los modelos de predicción de proteínas subyace en la especificidad en la predicción de la estructura. Por ejemplo, modelos de alta resolución con valores de desviación cuadrática en el rango de 1-2 Å, se generan de manera habitual utilizando métodos de modelado comparativo a partir de proteínas molde homólogas. Usualmente muestran requerimientos

estructurales altos y son adecuados para la utilización en estudios computacionales de unión a ligando y *screening* virtual de compuestos. Modelos de resolución media, aproximadamente en el rango de 2 a 5 Å y generados por ensamblaje o modelado comparativo a partir de moldes homólogos distanciados evolutivamente, pueden ser usados para identificar la locación espacial de residuos funcionalmente importantes, tales como los que se encuentran en sitios activos o en mutaciones asociadas a enfermedades. Sin embargo, muchos de los sitios de importancia en la funcionalidad están localizados en regiones bucle que muestran amplia variabilidad estructural, aun cuando la estructura proteica está conservada. Dado esto, el modelado preciso de las regiones bucle sigue siendo un problema importante, aunque todavía no se encuentra resuelto en los modelados basados en molde. Finalmente, si bien son los modelos con menor resolución, los modelos predichos utilizando métodos *ab initio* tienen una gran aplicación, incluyendo identificación del límite de dominios proteicos, reconocimiento de la topología y funciones de la familia o superfamilia (Zangh Y, 2009; Roy A, 2011).

Para llevar a cabo las tareas de predicción de la estructura existen distintas herramientas bioinformáticas (Tabla 3). Entre ellas se encuentra, el programa MODELLER, el cual se utiliza para realizar modelados por homología o comparación de estructuras proteicas en 3 dimensiones. Para realizar esta tarea, el programa necesita un alineamiento de la secuencia a modelar con estructuras relacionadas conocidas. Basado en esta información el programa calcula automáticamente un modelo que contiene todos los átomos distintos de hidrógeno, e implementa modelados de estructura proteica comparativa mediante la satisfacción de los requerimientos espaciales (Webb B y Sali A, 2016). Por otro lado, se encuentra el servidor I-TASSER (del inglés, *iterative threading assembly refinement*) el cual funciona como una plataforma para la predicción de estructura y función de una proteína, basada en el paradigma “estructura-función”. Tomando como base la secuencia aminoacídica, el programa genera primariamente un modelo atómico en 3 dimensiones mediante el ensamblaje de alineamientos múltiple y simulaciones iterativas de la estructura. La función de la proteína se infiere a partir de la coincidencia estructural que presenta el modelado obtenido con otras proteínas conocidas. La estimación de la exactitud de la predicción es obtenida a partir de la determinación de puntajes sumamente confiables del modelado (Yang J y Zhang Y, 2015).

Generación de Hits y Compuestos Líderes

Herramienta	Método	Disponibilidad
Homología		
3D-JIGSAW	Ensamblaje basado en fragmento	Server
MODELLER	Satisfacción de restricciones espaciales	Server/Descarga
HHpred	Comparación de perfiles HMMs (del inglés, <i>Hidden Markov Models</i>)	Server/Descarga
RaptorX	Predicción de calidad de alineamiento	Server
Swiss Model	Ensamblaje basado en fragmento y similaridad local	Server
Phyre2	Detección de homología remota avanzada	Server
Reconocimiento de plegado		
MUSTER	Alineamiento con información estructural múltiple	Server
GenTHREADER	Alineamiento de secuencia	Server/Descarga
I-TASSER	Ensamblaje iterativo de fragmentos	Server/Descarga
Ab Initio		
QUARK	Replica- Intercambio Monte Carlo	Server
Rosetta/Robetta	Ensamblaje de fragmentos, hibridación simulada.	Server/Descarga
I-TASSER	Ensamblaje de fragmentos.	Server/Descarga
CABS-FOLD	Restricciones de distancia provistas por el usuario	Server
EVfold	Cálculo de variación evolucionaria con residuos co-evolucionados pares	Server

Tabla 3. Algunas de las herramientas bioinformáticas más populares, utilizadas para los ensayos de predicción. (Adaptado de Leelananda S y Lindert S, 2016)

Una vez definido el blanco, es necesario definir la estrategia por la cual se generará el *hit*. Este es el nombre que se utiliza para describir al compuesto químico que aparece para ser el prototipo inicial que actúa en el blanco a drogar. Distintas aproximaciones en la generación de *hits* han sido empleados con éxito. Estas aproximaciones pueden ser utilizadas de manera individual o en combinación, dependiendo de la naturaleza o la necesidad del proyecto. La decisión sobre qué tipo de estrategia se utilizará para la identificación es uno de los pasos claves para el proyecto, ya que en general este proceso consume una gran cantidad de tiempo, y en caso de ser de ser una búsqueda de tipo *High Throughput*, también consumirá una gran cantidad de recursos. La estrategia elegida impactará directamente sobre las propiedades del *hit*, principalmente condicionando el tiempo que se tardará en optimizarlo, en un primer paso como compuesto líder para luego producir un candidato preclínico (Hoelder S, 2012).

Conceptualmente, existen dos tipos de aproximaciones para la búsqueda de *hits*: Diseño basados en conocimiento previo o búsqueda al azar (*Random Screening*). El diseño de los *hits* requiere la organización previa del conocimiento. Esto se obtiene, por ejemplo, obteniendo la estructura cristalizada del blanco o la estructura química de inhibidores conocidos de ligandos naturales, lo cual involucra la búsqueda de una colección amplia de compuestos. De hecho, la mayoría de las búsquedas

de *hits* utilizan una mezcla de las dos aproximaciones y representan un intercambio entre el conocimiento del blanco requerido y, por otro lado, el número de compuesto desafiados. Actualmente, mientras grandes colecciones de compuestos son cuidadosamente diseñadas para contener los llamados compuestos de tipo “*drug-like*”, científicos de todo el mundo están diseñando de manera racional un gran número de compuestos a ser probados, utilizando la aproximación basada en el conocimiento previo (Hoelder S, 2012).

Dentro de las aproximaciones disponibles para la generación de compuestos líderes se encuentran distintas variantes de *screening*: los de tipo *High Throughput*, en los cuales se evalúan varios compuestos mediante ensayos bioquímicos o sobre células, con el objetivo de descubrir modos de acción innovadores; los basados en fragmentos, en donde sólo se utilizan un número limitado de compuestos (alrededor de 1000), con bajo peso molecular (<300); y por último el denominado *Screening Virtual*, el cual se desarrollará a continuación.

Screening Virtual

El método de selección de compuestos a partir de una gran base de datos, utilizando herramientas computacionales se denomina *screening* virtual. Conceptualmente existen dos abordajes que pueden ser seguidos: Basados en ligandos, donde compuestos seleccionados de una base de datos que son de alguna manera similares a otros inhibidores ya existentes del blanco en cuestión; y los basados en estructura, los cuales buscan evaluar computacionalmente cómo se adecuan estéricamente los compuestos a bolsillos de unión, explorando la estructura cristalizada o modelada del blanco. Los compuestos son luego ordenados en base a la afinidad obtenida y solo los compuestos de menores energías de *docking* son evaluados posteriormente (Hoelder S, 2012).

El *screening* virtual presenta ventajas obvias sobre los otros tipos de *screening*, siendo de por sí más rápido y necesitando menor cantidad de recursos. Además, los compuestos evaluados por *screening* virtual no necesariamente deben estar disponibles comercialmente, solo aquellos obtenidos como candidatos deben ser comprados o, en su defecto, sintetizados. Esto indica que millones de compuestos pueden ser analizados por este método. Sin embargo, es importante tener en cuenta que todavía se encuentra en etapas de desarrollo, principalmente para el abordaje basado en estructura, ya que la predicción de afinidad de unión certera continúa siendo una de las principales metas perseguidas por la química computacional. Varios proyectos exitosos han sido reportados y aprobados por la FDA para su ingreso al mercado. La proteasa del VIH-1 es una de los principales blancos terapéuticos para el tratamiento del SIDA. A principio de la década del 90 varios inhibidores de proteasas del VIH fueron desarrollados para controlar la infección, utilizando *docking* basados en estructura molecular. Esto fue un gran éxito para la época e hizo posible que los pacientes infectados

con HIV puedan tener mayor expectativa de vida. *Saquinavir* fue una de las primeras drogas que tienen como blanco la proteasa del VIH-1 que alcanzó el mercado. Otro ejemplo es la Dorzolamida, un inhibidor de la anhidrasa carbónica II aprobado por la FDA para el tratamiento de glaucoma y fue desarrollada utilizando esta estrategia (Leelananda S y Lindert S, 2016).

Dentro de los ensayos de *screening* virtual basados en estructura, el basado en *docking* es sin duda el más ampliamente aplicado en la práctica. El flujo de trabajo básico para realizar un *screening* virtual basado en *docking* (DBVS) parte de la estructura del blanco elegido, tanto resuelta experimentalmente o modelada computacionalmente, y una biblioteca de compuestos de compuestos del tipo “*small molecules*”, los cuales estén disponibles para ser comprados o sintetizados. Regularmente, tanto el blanco como la biblioteca de compuestos requieren preparación, tales como asignación de propiedades tautoméricas, estereoisoméricas y estados de protonación. Cada compuesto en la biblioteca es virtualmente “presentado” al sitio de unión definido en el blanco mediante un programa de *docking*, el cual modela computacionalmente las interacciones ligando-blanco hasta alcanzar una complementariedad óptima de propiedades estéricas y fisicoquímicas. Luego, un algoritmo matemático (generalmente denominado como la “función de puntaje o *score*”) es utilizada para evaluar cuán afín es el compuesto al blanco. Esto generalmente es continuado por un paso de post procesamiento, en el cual los compuestos son ordenados en un *ranking* que se basa en el cálculo de los puntajes de unión y/u otros criterios. Regularmente, solo un pequeño grupo de los compuestos que quedaron en las primeras posiciones son elegidos como candidatos para experimentos posteriores (Leelananda S y Lindert S, 2016). Durante las últimas décadas, un gran número de programas de *docking* han sido desarrollados, entre los cuales se encuentra al AutoDock Vina, Dock, FlexX, Glide, Gold, Surflex, ICM, LigandFit, and eHiTS, entre otros (Tabla 4) (Cheng T, 2012).

Programa	Estrategia de Búsqueda	Libre para la Investigación	Sitio Web
AutoDock Vina	GA/MC	Si	http://vina.scripps.edu
Dock	IC	Si	http://dock.compbio.ucsf.edu
FlexX	IC	No	http://www.biosolveit.de/flexx
Glide	Híbrido	No	http://www.schrodinger.com
Gold	GA	No	http://www.ccdc.cam.ac.uk/products/life_sciences/g
Surflex	IC	No	http://www.tripos.com/index.php
ICM	MC	No	http://www.molsoft.com/docking.html
LigandFit	MC	No	http://accelrys.com/products/discovery-studio
eHiTs	IC	No	http://www.simbiosys.ca/ehits/index.html

GA: Algoritmo Genético; MC: Monte Carlo; IC: Construcción Incremental

Tabla 4. Ejemplos de los programas de *Docking* más utilizados (Adaptado de Cheng T, 2012).

Respecto al contenido y la calidad de la biblioteca de compuestos a utilizar, existe un rol esencial de la misma asociado al éxito o fracaso de los proyectos DBVS. En la Tabla 5 se resume una lista parcial de las bases de datos públicas y comerciales utilizadas comúnmente en la práctica. Estas bases de datos contienen, por lo general, una enorme cantidad de compuestos tipo “*small molecule*” que varían entre los 10,000 hasta varios millones de compuestos (Cheng T, 2012).

Base de Datos	Tipo	Nº de Compuestos	Sitio Web
PubChem	Pública	30 millones	http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov
ChEMBL	Pública	1 millón	https://www.ebi.ac.uk/chembl/db/index.php
NCI Set	Pública	140,000	http://dtp.nci.nih.gov/index.html
ChemSpider	Pública	26 millones	http://www.chemspider.com
CoCoCo	Pública	7 millones	http://cococo.unimore.it/tiki-index.php
TCM	Pública	32,000	http://tcm.cmu.edu.tw
ZINC	Pública	13 millones	http://zinc.docking.org
ChemBridge	Comercial	700,000	http://www.chembridge.com
Spees	Comercial	240,000	http://www.specs.net
Asinex	Comercial	550,000	http://www.asinex.com
Enamine	Comercial	1,7 millones	http://www.enamine.net
MayBridge	Comercial	56,000	http://www.maybridge.com
Wombat	Comercial	263,000	http://www.sunsetmolecular.com
ChemDiv	Comercial	1,5 millones	http://www.chemdiv.com
ChemNavigator	Comercial	55,3 millones	http://www.chemnavigator.com
ACD	Comercial	3,87 millones	http://accelrys.com/products/databases/sourcing/available-chemicals-directory.html
MDDR	Comercial	150,000	http://accelrys.com/products/databases/bioactivity/mddr.html

Tabla 5. Bases de datos comúnmente utilizadas para realizar *Screening* (Adaptado de Cheng T, 2012).

A pesar de la enorme capacidad de procesamiento de las computadoras actuales, el realizar el ensayo de *docking* con la biblioteca “a ciegas” a menudo genera pérdidas de tiempo y capacidad de cálculo computacional. Más aún, impondrá una gran carga en la selección del compuesto posteriormente. Dada esta situación, una manera sabia y útil de evitar estos problemas, es remover los compuestos no deseados de la biblioteca de manera previa a la realización del proceso de *docking*, solo dejando aquellos compuestos que son relevantes. Una estrategia común que se puede utilizar para llevar a cabo esta tarea es aplicar filtros fisicoquímicos adecuados a las reglas de Lipinski (Imagen 2) o buscar similitudes basadas en ligandos activos conocidos (Lipinski C, 2001).

Como se describió hasta aquí, existen varios abordajes disponibles para la generación y encuentro de un *hit*, pudiéndolos usar de manera individual o en combinación. Particularmente, cuando se exploran blancos que presentan un desafío ya que se predicen con baja drogabilidad, es recomendable el seguir más de una estrategia para así aumentar las posibilidades de encontrar *hits* que puedan ser incorporados en el camino de la química medicinal (Hoelder S, 2012). Diseñar una

estrategia para obtener *hits* es un trabajo que implica una revisión cuidadosa sobre lo que se conoce sobre el blanco para poder determinar con cuál abordaje será evaluado, y así obtener *hits* tan confiables como sea posible.

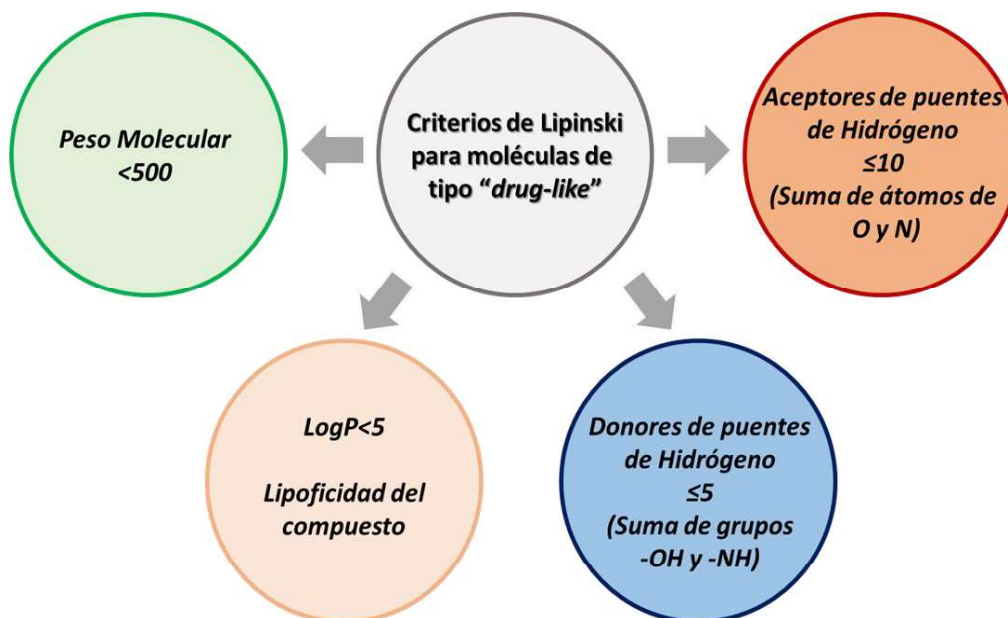


Imagen 2. Reglas de Lipinski para moléculas del tipo "drug like". Las reglas se encuentran basadas en valores de distribución de drogas, aplicadas sólo en la absorción mediante difusión pasiva de los compuestos a través de membranas celulares. Los compuestos que son transportados de manera activa a través de las membranas celulares por proteínas transportadoras son excepciones a esta regla. Debido a su simplicidad, las reglas de Lipinski son ampliamente utilizados en la química médica para predecir, no sólo la absorción de los compuestos, sino también la similitud de los mismos a una droga.

Evaluación del nuevo compuesto en ensayos preclínicos.

En el desarrollo de un nuevo fármaco uno de los principales obstáculos es trasladar la eficacia demostrada durante la fase preclínica a la clínica, donde probablemente se encuentren discrepancias entre la capacidad demostrada en los modelos experimentales frente a la eficacia real en los pacientes (Hoelder, 2012). Los modelos preclínicos necesitan tener en cuenta tanto la naturaleza molecular del blanco como así también el comportamiento y la especificidad del compuesto a evaluar. Se requieren diferentes modelos para evaluar blancos genético-dependientes comparados con aquellos que apuntan a la interacción tumoral con el estroma o la señalización hormonal.

Durante la optimización del compuesto líder, se utilizan de manera frecuente líneas celulares tumorales que crecen en cultivo *in vitro* como la primera línea de estudio en ensayos de proliferación

celular, apoptosis y otros procesos celulares que pueden ser medidos de manera simple utilizando distintas tecnologías. Es de gran valor el uso de estas técnicas en combinación con ensayos mecánicos para comprometer al blanco y vías de inhibición del mismo. Utilizando los dos tipos de ensayos juntos, se asegura que el blanco se encuentra modulado a concentraciones similares o inclusive menores que las requeridas para inhibir el crecimiento celular, y dada esta situación, asumir que el efecto inhibitor del crecimiento está mediado por el mecanismo propuesto. La seguridad aumenta si se observa una correlación entre la inhibición de crecimiento celular tumoral y la modulación del blanco o de la vía en una relación estructura/actividad a través de un rango de análogos. Sin embargo existen algunas advertencias con respecto al uso de líneas celulares. El mantenimiento de la línea tumoral *in vitro* puede resultar en alteraciones fenotípicas, genéticas y epigenéticas sustanciales, inducidas principalmente por el ambiente artificial creado por las condiciones del cultivo celular, el cual podría enmascarar efectos o procesos de la biología original del tumor *in situ* (Wilding JL, 2014).

Otro abordaje utilizado para la evaluación de la nueva droga utilizando líneas celulares tumorales es el crecimiento en cultivo 3D, donde el modelo es más representativo de la biología tumoral en el organismo hospedador. Las células pueden ser cultivadas tanto como esferoides en suspensión como en matrices que representan el ambiente extracelular del tumor. Si bien el uso de este modelo presenta un gran desafío, principalmente para la evaluación de tipo *High Throughput*, actualmente se están desarrollando nuevas metodologías para solucionar estos obstáculos (Wilding JL, 2014).

Los compuestos que presentan una actividad prometedora en los ensayos *in vitro* en líneas celulares pasarán a ser evaluados en estudios *in vivo* en animales, siempre y cuando las propiedades del tipo ADME (Administración, Distribución, Metabolismo y Excreción) sean apropiadas para este tipo de estudios (Leelananda S y Lindert S, 2016). Estudios en modelos tanto singénicos como xenogénicos, en donde células tumorales son implantadas en ratones, se han utilizado de manera extensiva, pudiendo mimetizar muchas de las características y respuestas a distintas drogas del cáncer humano correspondiente. Sin embargo, existen limitaciones para la realización de estos ensayos: No se reproduce la interacción celular estroma-célula tumoral, los tumores crecen mucho más rápido que en los pacientes y, debido a esto, son más sensibles a las drogas. Este abordaje generalmente deriva en el uso de una línea celular tumoral establecida, con todas las limitaciones que ya se discutieron antes, donde las células no son implantadas en el sitio nativo al que pertenecen (modelo heterotópico) sino se implantan en el órgano del cual provienen (modelo ortotópico). Otro modelo que se comenzó a utilizarse hace algunos años es el denominado PDX (del inglés *Patient-Derived Xenografts*), en el cual se establecen tumores provenientes de biopsias frescas de pacientes en animales inmunodeprimidos.

El objetivo principal de este modelo es el de mantener la mayor cantidad de características del tumor original, aunque también presenta limitaciones, ya que al igual que los modelos antes descritos, no es posible evaluar la interacción con el sistema inmune (Pompili L, 2016).

Recientemente ha surgido un nuevo modelo *in vivo* para complementar el uso de modelos xenogénicos, el cual se denomina GEMMs (del inglés, *genetically engineered mouse models*). Los mismos se basan en inducir lesiones genéticas específicas que provoquen la activación o sobreexpresión de oncogenes o la depleción de genes supresores de tumor. La ventaja principal que presenta es que el tumor surge de una manera espontánea, rodeado del ambiente natural del organismo, como por ejemplo, el sistema inmune. Sin embargo, también presenta sus limitaciones: requiere del mantenimiento de *stocks* suficientes de ratones portadores de tumor; pueden surgir diferencias en la secuencia proteica entre el blanco humano y el murino; usualmente se observan pocas aberraciones genéticas, mientras que en los tumores humanos se pueden encontrar una gran cantidad de mutaciones (Holen I, 2017).

Dado el caso que se hayan obtenido la cantidad de datos preclínicos suficientes, la droga candidata continuará el camino hacia los ensayos clínicos, pasando por varias etapas de evaluación y validación de los datos obtenidos por distintos entes que conllevan un porcentaje considerable en el tiempo de desarrollo de nuevas drogas.

Disquerina como blanco molecular en Cáncer.

Estudios sobre el rol de la disquerina en patologías humanas

La disquerina humana (DKC1) es una proteína evolutivamente conservada que participa en diversos complejos nucleares. DKC1 es una proteína nucleolar de 58 kDa, cuya secuencia presenta un alto grado de conservación filogenética, lo cual evidencia su relevancia biológica. De hecho, el gen de levadura *Cbf5*, originalmente descrito para codificar una proteína de unión a centrómero y microtúbulos, fue el primer miembro de esta familia de genes en ser identificado. Inmediatamente después, un ortólogo en mamíferos llamado Nap57 fue reconocido en rata, y propuesta su actividad como transportador de estructuras pre ribosómicas. Años más tarde se observó que la inactivación de *Cbf5* en levaduras era letal, atribuyéndole esta letalidad al proceso defectivo de pseudouridinilación de precursores de ARNs ribosomales (ARNr) (Angrisani A, 2014)

El vínculo que existe entre la disquerina y su rol patológico está basado en la presencia de irregularidades genéticas o de expresión de esta proteína en distintas enfermedades. Una de ellas es la Disqueratosis Congénita (DC), donde su presentación clínica expone una variedad de síntomas caracterizados por la clásica tríada de características mucocutáneas, como pigmentación de la piel, distrofia ungueal y leucoplasia mucosa, seguido de una gran cantidad de síntomas adicionales como falla de la médula ósea, células madre defectuosas, retraso mental, envejecimiento prematuro y susceptibilidad tumoral aumentada. En 1998, *dkc1* fue identificado como el gen causante de la enfermedad, a partir de un *screening* de ADNc candidatos en pacientes no relacionados, mostrando la existencia de mutaciones en la zona codificante. Un año más tarde, estas mutaciones fueron relacionadas a la causa del síndrome de Hoyeraal-Hreidarsson caracterizado por retraso en el desarrollo, inmunodeficiencia, anemia aplásica y mortalidad precoz, actualmente considerada como una variante severa de la DC (Dokal I, 2011).

La identificación de *dkc1* como causa central de la DC dirigió la atención sobre los miembros de esta familia de genes, describiéndose rápidamente a sus ortólogos en genomas de plantas, hongos, protistas e inclusive *archaeobacterias*. Si bien dentro de cada organismo, se denominaron con distintos nombres a los miembros de la familia DKC1, en general para referirse a sus ortólogos, se utiliza la denominación “disquerinas”. Todas las disquerinas descritas en organismos eucariotas tienen una localización nuclear preferencial. Dentro del núcleo, la disquerina participa en la formación de 3 complejos esenciales: H/ACA snoRNPs (del inglés *small nucleolar RiboNucleoProteins*), el cual controla la biogénesis de los ribosomas, la pseudo uridinilación del ARN y la estabilidad de los snoARNs (del

inglés *small* nucleolar ARNs); el scaRNPs (del inglés, *Small Cajal body (CB)-specific RNPs*), el cual controla la pseudouridinilación de los snoARNs (del inglés *small nuclear ARNs*); y la holoenzima telomerasa activa, la cual mantiene la integridad y longitud telomérica (Imagen 3). Los H/ACA snoRNPs son hetero complejos pentaméricos en los cuales la disquerina se asocia con una molécula de un ARN nucleolar del tipo H/ACA y 3 proteínas altamente conservadas: NOP10, NHP2 y GAR1. La conservación funcional de este complejo es tal que inclusive la proteína Cbf5 de *archeobacterias*, es capaz de unirse con la proteína NOP10 proveniente de levadura (Angrisani A, 2014).

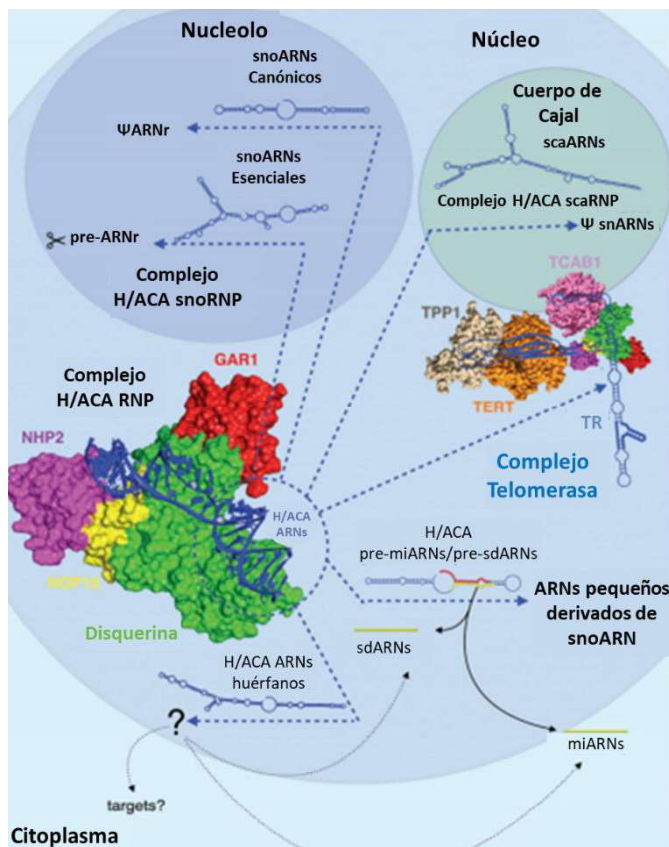


Imagen 3. Diversos complejos que conforma

disquerina. Los H/ACA snoRNPs maduras están compuestas por un tetrámero de disquerina/NOP10/GAR1/NHP2 ensamblado con una molécula de un H/ACA ARN. Mientras las RNPs que se ensamblan con snoARNs esenciales, dirigen el procesamiento del pre-ARNr, los que se ensamblan con snoARN canónicos, dirigen la pseudouridinilación del ARN. Los H/ACA ARNs ya han sido identificados como precursores de miARNs/sdARNs y se refieren como H/ACA pre-miARN o pre-sdARN. Si se ensamblan con scaARN, el tetrámero se une a los scaRNPs que se localizan en los cuerpos de Cajal y promueve la pseudouridinilación de snRNAs. El tetrámero completo también participa en la formación del complejo activo telomerasa, junto con la retrotranscriptasa TERT, la proteína TCAB1 y TPP1. Dentro del complejo telomerasa, la disquerina se une al TR por su dominio 3'H/ACA. (Adaptado de Angrisani A, 2014).

Información de secuencia y mutaciones reportadas de la disquerina.

El alineamiento de secuencias de disquerinas provenientes de varios organismos revela la presencia de regiones altamente conservadas, indicando la conservación funcional de las mismas. Este aspecto se encuentra evidenciado en experimentos de intercambio, en donde se observa que tanto la disquerina proveniente de rata como con la proveniente de *Drosophila*, pueden rescatar mutaciones de Cbf5 de levadura. A partir de análisis de secuencia realizados en el banco de datos Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/> Acceso O60832) se identificaron al menos 3 dominios funcionales preservados: el dominio simil disquerina (DKCLD; 48-106 aminoácidos (aa)), el cual hasta el momento no se le conoce

función, pero es típico de la familia de esta proteína; el dominio catalítico TruB_N pseudouridina sintasa (110-226 aa), el cual se encuentra implicado en el proceso de pseudouridinalación; y por último el dominio PUA de unión a ARN (297-370 aa), el cual se relaciona con el reconocimiento de la familia de ARN tipo H/ACA. Además, en la mayoría de las proteínas homólogas de metazoos se pueden encontrar dos señales de localización nuclear (NLS), ubicadas respectivamente en el N- y C- terminal (Imagen 5) (Angrisani A, 2014).

Observando las secuencias proteicas, los principales puntos de divergencia que se encuentran entre las disquerinas de eucariotas y *archeas* subyacen en el N- y C- terminal, en los cuales las eucariotas exhiben extensiones típicas. Llamativamente se ha observado que la longitud de la extensión N-terminal se encuentra aumentada significativamente en metazoos, en los cuales se puede reconocer un bloque de 30 aa, mientras que en humanos varía entre 2 y 34 aa y en levaduras se encuentra ausente. La posibilidad, aún no definida, de que esta sección pueda jugar una función reguladora está reforzada por la observación de que esta zona está sujeta a dos modificaciones postraduccionales, como lo son la fosforilación de S21 y la SUMOilación de K16. La desigualdad en la distribución de las mutaciones asociadas a la DC también sostiene la relevancia funcional que presenta el extremo N- terminal de la disquerina. De hecho, la mayoría de las mutaciones encontradas en pacientes no se ubican en el dominio catalítico, sino que se concentran en el dominio PUA y la extensión N- terminal, ausente en *archeas* (Angrisani A, 2014).



Imagen 5. Organización general de los dominios funcionales de la disquerina. Los recuadros rojos en los N- y C- terminales representan las zonas NLS, ricas en lisina y arginina. El pequeño cuadro rosa dentro del dominio TruB_N indica el aminoácido aspártico catalítico. Las posiciones de las mutaciones asociadas a la DC y el síndrome Hoyeraal-Hreidarsson (HHS) se encuentran indicadas de la siguiente manera: Líneas verticales corresponden a mutaciones missense, el triángulo indica la delección de la Leucina 37 mientras que (Γ) indica la delección p.Asp493ValfsX12. (Adaptada de Angrisani AI, 2014)

Inclusive, las secuencias N-terminales de *archeas* y eucariotas no pueden ser alineadas y cuando las estructuras cristalizadas de *Pyrococcus furiosus* (1–19 aa) y *Saccharomyces cerevisiae* (1–32 aa) son sobreimpuestas, revelan diferentes plegamientos, indicando que tienen roles diferenciales. A pesar de esta evidencia, existe poca información disponible sobre la función de esta región, la cual

está generalmente relacionada con un único rol como actor sinérgico con la señal de localización nuclear del C-terminal (Angrisani A, 2014).

El dominio PUA (297-370 aa), consiste en seis láminas beta y dos alfa hélices cortas. En el año 2014 Cerrudo y colaboradores, realizaron un estudio comparativo entre la estructura de proteínas con dominios PUA de distintos organismos (*Homo sapiens*, *Mus musculus*, *Drosophila melanogaster*, *Aedes aegypti*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Escherichia coli*, entre otros) encontrando una gran similitud y conservación de esta estructura a través de las distintas especies. Si bien, como se ha mencionado anteriormente, existen diferencias estructurales entre las disquerinas provenientes de los distintos organismos estudiados, encontraron que la mayoría de las mutaciones que dan lugar a patologías relacionadas con la disquerina, se encuentran en el dominio PUA. Entre ellas, se encuentra la mutación posicionada en el aminoácido A353 la cual es la más comúnmente encontrada en pacientes con DC y la mutación en el aminoácido K314. Esta última genera una isoforma de la disquerina que se asocia con las variantes de DC de mayor severidad. (Zeng XL, 2012). Esta evidencia sugiere que las mutaciones podrían estar afectando la unión de los ARNs sustrato o de algún componente aún no descrito del complejo. (Cerrudo C, 2014)

Respecto a la extensión C- terminal (390–514 en humanos), la cual se encuentra ausente en *archeas*, la misma es extremadamente variable en tamaño y secuencia en eucariotas. La relevancia biológica de esta región se basa en la presencia de una NLS dividida y en varios residuos potencialmente modificables. Uno de los primeros trabajos realizado en levadura reportó que la delección de la extensión C- terminal conlleva un retraso en la fase G2/M, sugiriendo que esta región podría estar relacionada con el control del ciclo celular. Tiempo después, se reportó que la delección del segmento terminal del último exón causa DC en algunos pacientes. Luego, isoformas de disquerina truncadas alternativamente que carecían de las regiones C- terminales fueron identificadas en *Drosophila* y en varios tejidos humanos y líneas celulares. Una de estas isoformas (isoforma 3) incluía el dominio catalítico y el dominio PUA, pero no contenía la señal de localización nuclear en el C-terminal, mostrando preferentemente localización citoplasmática. Estudios basados en la estructura y localización, sugieren que la isoforma 3 de disquerina podría favorecer el transporte de estructuras pre-ribosomales desde el núcleo al citoplasma y/o influenciar la traducción mediante la interacción con ribosomas o ARNm citoplasmáticos. En relación con estas observaciones, el rol de la disquerina en estos procesos y otros tales como morfología celular y adhesión han sido reportados en células humanas y en *Drosophila*. Otras isoformas cortas, desprovistas no solo de la región C- terminal, sino también del dominio PUA han sido descritos hace algunos años, promoviendo futuras investigaciones que describan las funciones en las que pueden estar involucrados los distintos dominios (Angrisani A, 2014).

Disquerina en el complejo telomérico

Como se ha mencionado anteriormente, a través de la habilidad de unión que presenta al componente ARN de la telomerasa (hTR), el cual contiene en el 3' un dominio H/ACA, la disquerina forma parte de la holoenzima telomerasa, la cual es ensamblada en los Cuerpos de Cajal (CBs, del inglés *Cajal Bodies*) y así lleva a cabo un rol bien establecido en el mantenimiento de la integridad de los telómeros. Esta función adicional fue revelada por primera vez por Mitchell y colaboradores en el año 1999, quienes encontraron que cultivos primarios de fibroblastos y linfoblastos de pacientes afectados por DC presentaban menos valores de hTR, de actividad telomerasa y telómeros más cortos que las células normales, generando la duda sobre la mirada inicial de que la DC era un desorden asociado a deficiencia ribosomal. Años más tarde, la deficiencia en hTR también fue reportada en linfocitos de pacientes de DC, indicando que este defecto no estaba causado por las condiciones de cultivo celular. El rol de disquerina en el mantenimiento de los telómeros fue establecido definitivamente en el año 2007 por Cohen y colaboradores, quienes identificaron a la disquerina como un componente de la holoenzima telomerasa activa (Cohen SB, 2007). De manera exitosa, mutaciones en NOP10 y NHP2, las cuales participan de manera similar en el complejos snoRNPs y la telomerasa activa, lograron reproducir la forma autosomal de la DC. Mutaciones en otros genes envueltos en la actividad telomerasa, tales como TR, TERT y TIN2 también produjeron efectos similares (Angrisani A, 2014).

Varios trabajos indicaron que cada molécula de hTR se asocia a dos complejos completos de los cuatro componentes H/ACA RNP (DKC1, NOP10, NHP2 y GAR1). Dado esta situación, varios investigadores concluyeron que la principal causa de la DC es provocada porque la actividad telomerasa se ve comprometida, indicando la relevancia de esta actividad para el correcto funcionamiento y desarrollo del organismo (Angrisani A, 2014).

Disquerina y Cáncer

En 1992, Dokal y colaboradores observaron que, en cultivos de fibroblastos derivados de pacientes con DC, existían anormalidades tanto en la morfología como en la tasa de crecimiento comparada con células normales. Desde ese momento, varios trabajos han resaltado ese efecto provocado por la deficiencia de disquerina. Particularmente, se ha descrito el arresto en la fase G2/M del ciclo celular en células de levadura con mutaciones en Cbf5, en células depletadas de disquerina, en fibroblastos derivados de pacientes con DC y en fibroblastos embrionarios de ratón que sobreexpresan solo una disquerina catalíticamente inactiva (Angrisani A, 2014). No obstante, la susceptibilidad al cáncer es una de las características principales presentadas por los pacientes de DC,

siendo los carcinomas de cuello de células escamosas los más frecuentes, seguido de cáncer de piel y anorectal. Adicionalmente, la incidencia de cáncer en pacientes de DC ha sido reportada con valores cercanos al 40-50% a la edad de 50 años (Alter BP, 2009).

Considerando las funciones ejercidas por la disquerina como componente de los complejos H/ACA snoRNPs y telomerasa, es de esperar que su deficiencia impacte sobre la capacidad proliferativa de las células, provocando entonces que la predisposición tumoral observada en los pacientes sea difícil de explicar. Cuando se estudió este aspecto en ratones hipomorfos, la susceptibilidad a la formación del tumor fue creciente en la primer y segunda generación. Esto se debe a que estos ratones la pseudouridinilación es significativamente reducida, mientras que la deficiencia en el mantenimiento de la longitud telomérica no era aún evidente. Esta observación sugirió en primera instancia una relación entre una desregulación de las modificaciones de los ARNr y la formación tumoral. Esta hipótesis fue luego sustentada por varios trabajos que revelaron que el proceso deficiente de pseudouridinilación de los ribosomas afecta a la traducción de un *subset* de ARNm que contienen secuencias IRES (del inglés, *Internal Ribosome Entry Site*), los cuales presentan un rol central en cáncer (Angrisani A, 2014).

Por otra parte, alterando el balance entre factores pro y anti apoptóticos, el grado de pseudouridinilación de los ARNr puede promover la susceptibilidad neoplásica en células con DC. Vale la pena notar que la deficiencia en disquerina puede contribuir a la tumorigenesis también alterando el *splicing* de ARNm específicos, o por modulación del nivel de ciertos snoRNAs. Más aún, fluctuaciones en el nivel de varios snoRNAs han sido observados hace algunos años en distintos tipos de cáncer, estableciendo una relación novedosa entre la desregulación en la expresión de estos genes con la proliferación celular y la respuesta a stress. Se observaron 38 mutaciones adicionales en DKC1 en distintos tipos de cáncer esporádicos, siendo valioso resaltar que ninguna de esas mutaciones corresponde exactamente a las halladas en pacientes de DC, aunque unas pocas de ellas se encuentran justo al lado de las reportadas para esta enfermedad. Sin embargo, debido a la complejidad intrínseca que posee la célula tumoral, no es fácil predecir cómo y si son capaces estas mutaciones de afectar la función de ciertos genes. Es importante resaltar que la sobreexpresión de disquerina ha sido observada en varios tipos de cáncer, sugiriendo que puede ser una característica importante del aumento en la tasa de crecimiento y proliferación típica de las células tumorales. En efecto, una gran cantidad de trabajos propusieron la correlación entre una alta expresión de disquerina con el grado de avance de la enfermedad, sugiriendo que la cantidad de proteína puede ser utilizada como un marcado pronóstico de la enfermedad, al menos en algunos tipos de tumor. Por ejemplo, altos niveles de disquerina, GAR1 y NHP2 pueden ser identificados de manera independiente como predictores de un peor pronóstico en neuroblastoma, mientras que la medición conjunta de los niveles de expresión

de estas 3 proteínas componen una “Firma de SnoRNP”, la cual presenta un gran valor pronóstico para evaluar la progresión de este tipo tumoral. De manera análoga a este modelo, para la pérdida y reactivación de la telomerasa durante la progresión de cáncer de próstata y linfoma de células T, se sugirió que las células que presentan una baja expresión en los niveles de estos componentes pueden derivar en alteraciones e inestabilidad genética, acompañado por disfunción de la telomerasa. Estas condiciones podrían caracterizar estadios tempranos preclínicos de desarrollo tumoral. En los estadios subsecuentes de desarrollo tumoral, la sobreexpresión de componentes H/ACA RNP, acoplados con la reactivación de la telomerasa, puede superar al bloque de proliferación celular debido a la apoptosis o mitosis abortiva, favoreciendo la progresión tumoral. En este aspecto, niveles altos de disquerina, GAR1 y NHP2 podrían mantener la actividad telomerasa y reducir la inestabilidad genética, estabilizando a los tumores avanzados y favoreciendo su agresividad (Angrisani A, 2014).

Objetivo

Si bien aún quedan por dilucidar varios mecanismos relacionados a la sobreexpresión de disquerina relacionada con la progresión del cáncer, se ha obtenido gran cantidad de información que revela el papel que presenta esta proteína en el desarrollo tumoral. En este contexto, haciendo principal foco en el rol que presenta la disquerina en la arquitectura y mantenimiento de la holoenzima telomerasa y la relevancia del dominio PUA para el ensamblaje de la misma, el objetivo de este capítulo es obtener un modelado de la estructura tridimensional de la disquerina humana, para realizar sobre el la búsqueda de nuevos compuestos que interfieran la unión DKC1/hTR, logrando de esta manera desestabilizar el complejo proteico e inhibir a la telomerasa.

Materiales y Métodos

Análisis y Reclutamiento de las secuencias proteicas de disquerinas emparentadas. Se realizó una búsqueda de las secuencias aminoacídicas de la disquerina humana y de sus homólogos de otras especies, en la base de datos Uniprot (<http://www.uniprot.org/>). Se obtuvieron y compararon las estructuras de distintas disquerinas en formato Blast y PDB. Se realizó un análisis de homología de secuencias a partir de alineamientos múltiples con el software MEGA 7 (*Molecular Evolutionary Genetic Analysis*; (Kumar S, 2016)). Por otra parte se calculó el porcentaje de cobertura e identidad de secuencia mediante el método de ajuste por matriz composicional con el software Blast (Altschul SF, 2005)

Modelado y estudio de la disquerina humana. Se realizó un modelado de la secuencia de la disquerina humana por homología con el software MODELLER (<https://salilab.org/modeller/>). Se analizaron los perfiles energéticos de los distintos modelos obtenidos y la estabilidad de las mutaciones reportadas mediante el software FoldX (<http://foldxsuite.crg.eu/>). Por otro lado, se realizó un modelado *ab initio* de la secuencia de la disquerina humana con el software I-TASSER (<http://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) en sus dos variantes: con y sin molde. Una vez obtenidos los distintos modelados, se procedió al análisis estructural y de mutaciones de la proteína, con el fin de determinar la elección de sitios con capacidad de unión de ligandos. La visualización de las diferentes estructuras modeladas se realizó mediante el uso del software AutoDockTools (<http://autodock.scripps.edu/resources/adt>).

Búsqueda de ligandos por docking. A partir de los modelos obtenidos, se realizó el ensayo de *docking* sobre la zona definida con el software AutoDock Vina (<http://vina.scripps.edu/>) y la biblioteca de compuestos de Enamine (<http://www.enamine.net/>), utilizando como centro la Lisina 293 (K293) y como tamaño de la caja una longitud de 25 Å, siendo la caja el espacio cubico de la proteína destinado al *docking* que tiene como centro al residuo K293. Los servidores utilizados fueron "Medusa" y "Upsilon2, ambos situados en la Universidad Nacional de Quilmes. Una vez concluido el ensayo, se tomaron los mejores ligandos de cada modelo y se ordenaron según su valor de estabilidad de la unión con el blanco elegido. Se solicitó la síntesis y envío de los primeros 20 compuestos obtenidos a la empresa Enamine.

Resultados

Análisis de la secuencia proteica de disquerina humana.

Se realizó la búsqueda en la base de datos Uniprot, encontrándose secuencias de disquerina correspondientes a ratón, pollo y humanos. Dentro de las humanas se encontraron 3 variantes (Uniprot 060832): la variante original, que contiene del aminoácido 1 al 514, denominada Isoforma 1; una variante activa que contiene del aminoácido 1 al 420, llamada Isoforma 3 y por último una isoforma editada, la cual carece de las secuencias de señalización correspondientes al N- terminal (1-21) y al C-terminal (446-514). Las secuencias de las 3 variantes se pueden observar en la Figura 1.

DKC1 Isoforma 1	1-60	M A D A E V I I L P K K H K K K K E R K	S L P E E D V A E I Q H A E E F L I K P E S K V A K L D T S	Q W P L L L K N F D
DKC1 Isoforma 3	1-60	M A D A E V I I L P K K H K K K K E R K	S L P E E D V A E I Q H A E E F L I K P E S K V A K L D T S	Q W P L L L K N F D
DKC1 Editada	22-60	- - - - -	- L P E E D V A E I Q H A E E F L I K P E S K V A K L D T S	Q W P L L L K N F D
DKC1 Isoforma 1	61-120	K L N V R T T H Y T P L A C G S N P L K	R E I G D Y I R T G F I N L D K P S N P S S H E V V A W I R	R I L R V E K T G H
DKC1 Isoforma 3	61-120	K L N V R T T H Y T P L A C G S N P L K	R E I G D Y I R T G F I N L D K P S N P S S H E V V A W I R	R I L R V E K T G H
DKC1 Editada	61-120	K L N V R T T H Y T P L A C G S N P L K	R E I G D Y I R T G F I N L D K P S N P S S H E V V A W I R	R I L R V E K T G H
DKC1 Isoforma 1	121-180	S G T L D P K V T G C L I V C I E R A T	R L V K S Q Q S A G K E Y V G I V R L H N A I E G G T Q L S	R A L E T L T G A L
DKC1 Isoforma 3	121-180	S G T L D P K V T G C L I V C I E R A T	R L V K S Q Q S A G K E Y V G I V R L H N A I E G G T Q L S	R A L E T L T G A L
DKC1 Editada	121-180	S G T L D P K V T G C L I V C I E R A T	R L V K S Q Q S A G K E Y V G I V R L H N A I E G G T Q L S	R A L E T L T G A L
DKC1 Isoforma 1	181-240	F Q R P P L I A A V K R Q L R V R T I Y	E S K M I E Y D P E R R L G I F W V S C E A G T Y I R T L C	V H L G L L L G V G
DKC1 Isoforma 3	181-240	F Q R P P L I A A V K R Q L R V R T I Y	E S K M I E Y D P E R R L G I F W V S C E A G T Y I R T L C	V H L G L L L G V G
DKC1 Editada	181-240	F Q R P P L I A A V K R Q L R V R T I Y	E S K M I E Y D P E R R L G I F W V S C E A G T Y I R T L C	V H L G L L L G V G
DKC1 Isoforma 1	241-300	G Q M Q E L R R V R S G V M S E K D H M	V T M H D V L D A Q W L Y D N H K D E S Y L R R V V Y P L E	K L L T S H K R L V
DKC1 Isoforma 3	241-300	G Q M Q E L R R V R S G V M S E K D H M	V T M H D V L D A Q W L Y D N H K D E S Y L R R V V Y P L E	K L L T S H K R L V
DKC1 Editada	241-300	G Q M Q E L R R V R S G V M S E K D H M	V T M H D V L D A Q W L Y D N H K D E S Y L R R V V Y P L E	K L L T S H K R L V
DKC1 Isoforma 1	301-360	M K D S A V N A I C Y G A K I M L P G V	L R Y E D G I E V N Q E I V V I T T K G E A I C M A I A L M T T A V I S T C D H	
DKC1 Isoforma 3	301-360	M K D S A V N A I C Y G A K I M L P G V	L R Y E D G I E V N Q E I V V I T T K G E A I C M A I A L M T T A V I S T C D H	
DKC1 Editada	301-360	M K D S A V N A I C Y G A K I M L P G V	L R Y E D G I E V N Q E I V V I T T K G E A I C M A I A L M T T A V I S T C D H	
DKC1 Isoforma 1	361-420	G I V A K I K R V I M E R D T Y P R K W	G L G P K A S Q K K L M I K Q G L L D K H G K P T D S T P A	T W K Q E Y V D Y S
DKC1 Isoforma 3	361-420	G I V A K I K R V I M E R D T Y P R K W	G L G P K A S Q K K L M I K Q G L L D K H G K P T D S T P A	T W K Q E Y V D Y R
DKC1 Editada	361-420	G I V A K I K R V I M E R D T Y P R K W	G L G P K A S Q K K L M I K Q G L L D K H G K P T D S T P A	T W K Q E Y V D Y S
DKC1 Isoforma 1	421-480	E S A K K E V V A E V V K A P Q V V A E	A A K T A K R K R E S E S E S D E T P P A A P Q L I K K E K	K K S K K D K K A K
DKC1 Isoforma 3	421-480	E S A K K E V V A E V V K A P Q V V A E	A A K T A K R K R E S E S E S D E T P P A A P Q L I K K E K	K K S K K D K K A K
DKC1 Editada	421-445	E S A K K E V V A E V V K A P Q V V A E	A A K T A K R K R E S E S E S D E T P P A A P Q L I K K E K	K K S K K D K K A K
DKC1 Isoforma 1	481-514	A G L E S G A E P G D G D S D T T K K K	K K K K K A K E V E L V S E	
DKC1 Isoforma 3	481-514	A G L E S G A E P G D G D S D T T K K K	K K K K K A K E V E L V S E	
DKC1 Editada	481-514	A G L E S G A E P G D G D S D T T K K K	K K K K K A K E V E L V S E	

Figura 1. Secuencias de las distintas isoformas de la disquerina humana obtenidas a partir de Uniprot. En color azul se señalan las mutaciones reportadas; en celeste el aminoácido catalítico y subrayado se encuentran los aminoácidos correspondientes al dominio PUA. Dentro de este dominio, en color naranja se señala la mutación en el residuo K314, la cual se ha reportado como una de las mutaciones más relevantes relacionadas con las variantes más agresivas de la DC.

Reclutamiento de estructuras de disquerinas emparentadas.

Dado que la disquerina humana no se encuentra cristalizada, se realizó una búsqueda de estructuras de disquerinas de otros organismos, las cuales se visualizaron y compararon mediante el software Protein Blast y la base de datos PDB. Las estructuras reclutadas más interesantes resultaron ser dos provenientes de *Saccharomyces cerevisiae* denominadas 3U28/A y 3UAI/A, encontrándose las

analizar el perfil energético comparado con la estructura de referencia. Este análisis permitió verificar ausencia de complicaciones estéricas (Figura 3.a). Adicionalmente, se realizó una predicción *in silico* de las mutaciones reportadas en disquerina para evaluar el impacto de las mismas en la estabilidad de la proteína, obteniéndose solo 4 residuos que podrían estar interfiriendo, mientras que todas las demás presentan un perfil neutral (Figura 3.b).

Continuando con el análisis estructural, tanto en los extremos N- como C- terminal no se encontraron estructuras secundarias establecidas, lo cual indica que el modelado de los extremos no representa la estructura real de la proteína. Sumado a esto, dentro de estas secuencias se encuentran reportadas mutaciones que pueden interferir en el correcto funcionamiento de la proteína. Existe evidencia que sugiere que los extremos se acomodan para darle lugar al dominio PUA de la disquerina. Debido a estos inconvenientes se procedió a realizar un modelado *ab initio* de la secuencia elegida. Este modelado se abordó de dos maneras: la primera fue realizando el modelado sin ningún molde (Figura 4.a), en donde el software establece cuál es el mejor molde desde la base de datos PDB. La segunda es forzando al software a modelar en base a una estructura definida, que en este caso fue 3UAI/A (Figura 4.b). De cada una de estas maneras se realizaron 5 modelados, por lo que se obtuvieron 10 en total. Ambas estrategias permitieron obtener mejores resultados que el obtenido por homología, pudiéndose observar que los extremos se encontraban más estructurados en comparación con la estructura de 3UAI/A (Figura 4.c).

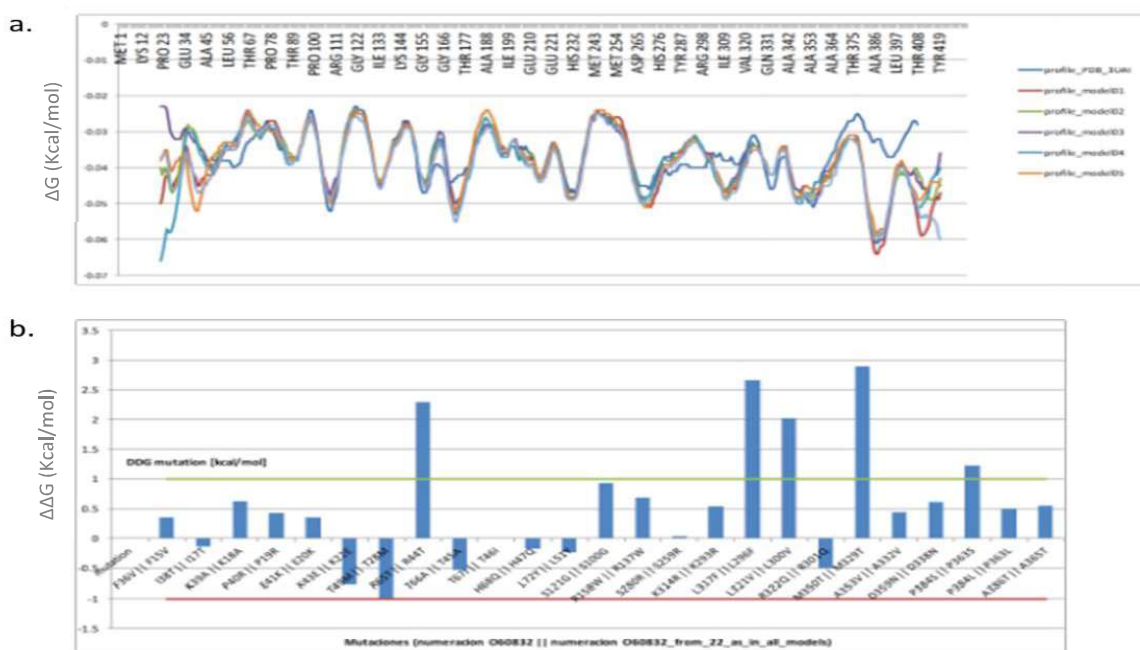


Figura 3. Evaluación de la estabilidad de los modelados obtenidos por homología .a. Perfiles de energía de los modelados obtenidos en comparación con la estructura 3UAI/A. **b.** Estabilidad de las mutaciones reportadas en la estructura de la proteína modelada.

Si se observa la estructura de la disquerina modelada *ab initio* a partir de la disquerina de levadura (Figura 4. B.), y la estructura de 3UAI/A (Figura (4.c.)), se puede ver que las colas se estructuran de manera similar. Particularmente, se ve que la cola C- terminal constituye un surco abierto donde, por bibliografía, se sabe que se une la proteína Shq1 y a TR. Además, en esta zona se forma una cavidad con características que posibilitan la unión de ligandos y está cercana a la zona dónde se encuentran reportadas varias mutaciones que causan patologías asociadas a la disfunción de la telomerasa (Dominio PUA). Dadas estas características, se definió como zona a para el *docking* este dominio, utilizando como centro el residuo K293.

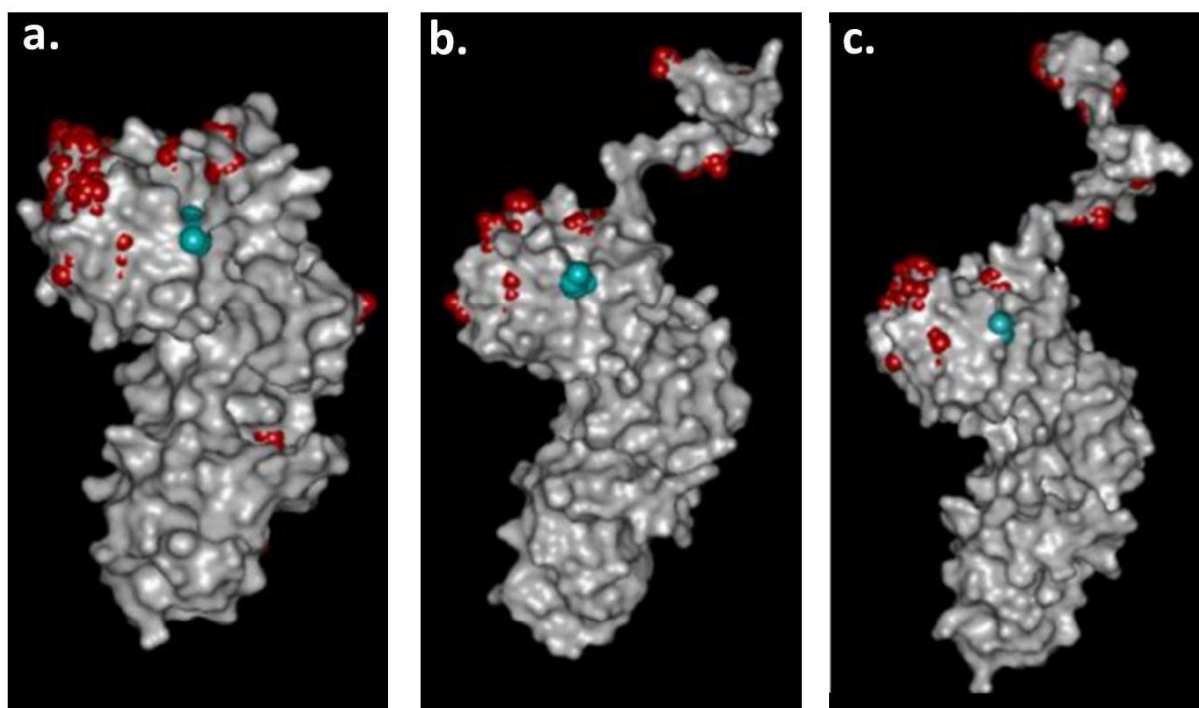


Figura 4. Modelados mediante el I-Tasser de la disquerina humana. a. Modelado obtenido *ab initio*. b. Modelado obtenido forzando al software a modelar a partir de la estructura de 3UAI/A. c. Estructura de 3UAI/A, Disquerina de *Saccharomyces cerevisiae*. En celeste se observa una mutación en el residuo K293, según el modelo.

Búsqueda de ligandos por *docking*

Para realizar el ensayo de *docking* se utilizaron los dos modelos generados por el I-Tasser. A partir de los resultados obtenidos para cada uno de ellos, se seleccionaron las primeras 10 moléculas con menor energía de *docking*, obteniéndose una lista de 20 candidatos, los cuales se encuentran listados en la Tabla 1. Los 20 compuestos fueron solicitados a la empresa Enamine LTD.

Código Enamine	Energía de <i>docking</i> (kcal/mol)	Código Enamine	Energía de <i>docking</i> (kcal/mol)
z2200	-8.5	z1388	-7.7
z5110	-8.2	z4034	-7.6
z5909	-8.2	z1131	-7.6
z7428	-8.2	z2792	-7.5
z7066	-8.2	z8696	-7.3
z6281	-8.2	z6341	-7.2
z8692	-8.1	z0048	-7.1
z4050	-8	z0054	-7.1
z1717	-7.9	z0338	-7
z6285	-7.8	z4979	-6.7

Tabla 1. Ranking de compuestos obtenidos a partir del ensayo de *docking*. Se muestran los primeros 20 compuestos, ordenados según su energía de *docking*.

Discusión

Durante los últimos años se ha generado un gran avance en las herramientas moleculares. Esto provocó que el entendimiento molecular de las distintas enfermedades y patologías haya aumentado de manera exponencial, generando nuevos interrogantes por resolver. Esto conlleva al desarrollo de nuevos enfoques y problemáticas que contribuyan a generar soluciones para los problemas de salud humanos. A nivel mundial, en la actualidad se están destinando gran cantidad de recursos a la prevención, diagnóstico y tratamiento de distintas enfermedades, como el cáncer (Morgan S, 2011). En lo que respecta a terapias antitumorales, si bien se han logrado identificar compuestos citotóxicos efectivos, quedan aún por elucidar tratamientos dirigidos contra un blanco específico. Este cambio de paradigma abrió las puertas a una forma de estudio multidisciplinaria, en donde la conjunción de conocimientos de biología básica, bioquímica, bioinformática, herramientas computacionales y biología molecular, dieron lugar a lo que hoy en día podemos llamar “diseño racional de fármacos”. Teniendo en cuenta la experiencia del grupo en el estudio de la telomerasa y la posibilidad de contar con las herramientas computacionales y de biología molecular, se decidió llevar a cabo un *screening* virtual basado en *docking* sobre el dominio PUA de la disquerina humana, con el objetivo de generar nuevos compuestos con actividad inhibitoria de esta enzima para el tratamiento del cáncer.

Como se ha mencionado anteriormente, la base para realizar un *screening* virtual basado en *docking*, es la necesidad de contar con la estructura cristalizada de la proteína diana. Existen varios estudios en los cuales se utiliza la estructura cristalizada de la disquerina para explicar de manera muy interesante interacciones y procesos en los cuales se encuentra involucrada, pero los mismos cuentan con las estructuras provenientes de levadura (Li S, 2011; Singh M, 2015) o de *archeas* (Rashid R 2006; Li L, 2006). Si bien para este tipo de estudios estas estructuras son funcionales, el objetivo de este trabajo está dirigido hacia el desarrollo de nuevos fármacos, y por tanto cada paso debe ser lo más exacto posible para evitar el fracaso del proyecto. Dado que la disquerina humana, hasta el momento, no se ha logrado cristalizar, la necesidad de tener un modelo lo más aproximado posible a su estructura se convirtió en uno de los pasos más relevantes. Para llevar a cabo este objetivo, se optó por la utilización de las herramientas bioinformáticas Modeller e I-Tasser. Estos softwares se encuentran reportados varias veces en la literatura. Por ejemplo, para la investigación en cáncer, se ha utilizado para realizar el modelado por homología de la proteína RAB38, relevante en melanoma (Abdelmonsef A, 2016) y RASSF2, estudiada en distintos tipos tumorales (Kanwal S, 2017); en el estudio de la malaria, se obtuvo el modelado de M17LAP para luego ser utilizado como proteína blanco en un *screening* virtual basado en *docking* (Rout S, 2016); de igual manera y con el mismo objetivo, se reportó la estructura por homología de la Sortasa A, involucrada en la enfermedad Listeriosis (Rashidieh B, 2015).

Para llevar a cabo este objetivo en este trabajo se decidió utilizar la secuencia aminoacídica de la disquerina humana correspondiente con los aminoácidos 21 al 420, ya que los primeros 20 aminoácidos y los últimos 96 son zonas de señalización con pocas mutaciones relevantes reportadas (Angrisani A, 2014). A partir de esta secuencia, mediante el programa Modeller y utilizando como molde la estructura cristalizada de la disquerina *S. cerevisiae* (3UAI), se realizó el modelado por homología de la disquerina humana. Es importante aclarar que la disquerina de levadura se encuentra cristalizada junto a Shq1, la cual es una proteína del complejo (Li S, 2011). Esto brinda información más aproximada a la conformación real de la proteína en el contexto biológico. Como resultado, se obtuvo un modelado coherente con lo esperado, aunque los extremos C-y N-terminal se presentaron parcialmente desestructurados. Dado esto, se decidió realizar un nuevo modelado de esta secuencia con el software I-Tasser de dos maneras: *ab initio*, en dónde el software “decide” cuál es la mejor estructura a partir de bases de datos; y “forzado”, en el cuál el operador define una estructura (en este caso la disquerina *S. cerevisiae* (3UAI)) sobre la cual se acomoda la secuencia a modelar. Ambos procesos convergieron en modelados apropiados, en dónde se analizaron los perfiles de energía de los modelados y la estabilidad de las mutaciones, arrojando resultados apropiados. Por otra parte se observó que en la zona C-terminal existía una gran variabilidad de estructura, por lo que se decidió determinar otra zona con menor movilidad en dónde realizar el ensayo de *docking*, ya que esa diversidad conformacional local podría hacer muy variable la afinidad con el ligando, y muy dependiente de las condiciones que afectan al equilibrio de conformeros (pH, temperatura, fuerza iónica) (ten Brink T, 2010).

La elección del centro para desarrollar el *docking* se basó en varios puntos: El centro asignado se encuentra en el dominio PUA, el cuál ha sido reportado reiteradas veces como el dominio que contiene la mayoría de las mutaciones relacionadas con patologías como la DC y la unión al hTR, por lo que representa una zona importante para la función del complejo telomérico (Yu YT, 2014; Savage S, 2009; Cerrudo C, 2014). Este dominio presenta una cavidad con una disposición espacial apropiada para unión de ligandos. Dentro de este dominio, se determinó como centro del *docking* el residuo correspondiente con la Lisina 293 de nuestro modelado (K314 en la secuencia completa de la disquerina). Además, la asignación de este residuo como centro se debe a que está reportado como el sitio de una de las mutaciones más relevantes asociada a la manifestación más severa de la DC y al impedimento de estabilizar el hTR en el complejo (Zeng XL, 2012).

El razonamiento que se encuentra tras la elección de este sitio es la búsqueda de una molécula capaz de interactuar con este sitio de la disquerina, impidiendo la estabilización del hTR y, por lo tanto, la formación del complejo. A partir de la evaluación de todos estos parámetros, se obtuvieron dos

modelados con características apropiadas para llevar a cabo el ensayo de *docking*, tomando como centro el aminoácido K293.

Existen distintas aproximaciones a la hora de comenzar un ensayo de *Screening Virtual*. En la literatura, los estudios se dividen, principalmente, en las búsquedas basadas en ligando y en *docking*. Ejemplo de las primeras se pueden ver representadas en los siguientes casos: Desarrollo de drogas contra PDE2, una enzima relevante en hipertensión pulmonar y enfermedades del sistema nervioso central, a partir de un *screening* virtual basado en estructura, utilizando como base de compuestos drogas ya aprobadas por la FDA (Qiu X, 2017); otro caso representativo es la búsqueda de inhibidores de CLIC1, el cual es un blanco reportado en distintos tipos tumorales, la cual utiliza como base de compuestos un conjunto de medicamentos tradicionales chinos (Wang W, 2017). Respecto a la búsqueda basadas en *docking*, las cuales son las principales, se pueden nombrar ejemplos tales como la búsqueda de inihidores de la helicasa NS3 del virus Dengue, en la cual se evaluó por *docking* una biblioteca de más de un millón de compuestos (ZINC) contra la estructura cristalizada de este blanco (Halim SA, 2017); otro caso es el de inhibidores de RAC1 en líneas de mama altamente agresivas, también utilizando ensayos de *docking* con la biblioteca de compuestos ZINC (Cardama GA, 2014).

En este trabajo la estrategia utilizada se basó en un *screening* virtual basado en *docking* mediante el software Autodock Vina, utilizando como blanco los modelados de la disquerina humana obtenidos a partir del I-Tasser, siendo la fuente de compuestos la biblioteca “*Advanced Collection*” de más de 300.000 compuestos de tipo “*drug like*” de Enamine. Los compuestos de esta biblioteca tienen propiedades del tipo molécula líder, con un peso molecular menor a 350, valores de lipoficidad adecuados ($\log P < 3$) y grupos farmacoforos relevantes, tales como carboxilos, aminas primarias y amidas, parámetros que son importantes en el desarrollo de una nueva droga (Lipinski CA, 2001). Esta colección se puede considerar como una fuente importante de compuestos para el diseño de bibliotecas dirigidas hacia un blanco. La cantidad de grupos funcionales y propiedades del tipo molécula líder que tienen los compuestos hacen que esta biblioteca sea una de las herramientas más útiles en la búsqueda de nuevas drogas (Enamine). La biblioteca de Enamine presenta gran cantidad y variedad de compuestos con características útiles para la realización de ensayos de *High Throughput Screening*, teniendo en algunos casos hasta 10 veces más compuestos que otras bibliotecas como TCM, NCI, *May Bridge*, *Wombat*, entre otras (Cheng T, 2012). Sumado a esto, varios estudios de estas características se han llevado a cabo utilizando las bibliotecas proporcionadas por Enamine, siendo algunos de ellos inhibidores de tirosin quinasa (Chiba S, 2017); Inhibidores de STAT3 (Kolosenko I, 2017); Inhibidores de la sintasa de *Mycobacterium tuberculosis* (Billones JB, 2017), entre otros. Esta información representa un gran soporte en la elección de esta biblioteca para el desarrollo de nuestro trabajo, al encontrarse reportada en distintos trabajos que concluyeron de manera exitosa.

Como resultado del ensayo de *screening* virtual basado en *docking*, se seleccionaron los primeros 10 compuestos obtenidos a partir de cada modelado, teniendo en cuenta sus valores de energía mínima, generando una lista de 20 candidatos a ser evaluados.

La utilización de estos métodos para el desarrollo de un nuevo fármaco para el tratamiento del cáncer ya se encuentra reportada en bibliografía. Respecto al uso de la estructura modelada de una proteína para un ensayo de *screening* virtual, se ha demostrado que existe una correlación entre el éxito en el modelado por softwares tales como el I-Tasser, versus el éxito relativo en el proceso de *screening* virtual (Du H, 2015). Esto sugiere que la combinación de ensayos de *docking* y los métodos avanzados de modelado de estructura son una aproximación valiosa en los estudio de desarrollo de nuevas drogas por *screening* virtual, especialmente cuando existe una falta de estructuras cristalizadas de proteínas blanco, como es el caso del presente trabajo. Sumado a esta evidencia, ya existen moléculas con acción antitumoral que son productos de esquemas de trabajo similares al aquí propuesto. Este es el caso del trabajo realizado por Tarazi y colaboradores sobre la protein-quinasa dependiente de ADN (ADN-PK), la cual se encuentra involucrada en el proceso de recombinación del ADN no homologa y, por tanto, es un blanco relevante a nivel tumoral. En este trabajo realizaron un modelo por homología de la enzima, el cual fue utilizado en un ensayo de *screening* virtual basado en *docking*. Una vez obtenidos los compuestos, evaluaron su respuesta *in vitro*, obteniendo una inhibición de la actividad quinasa y el descenso de la capacidad proliferativa en un tratamiento combinado con doxorrubicina y cisplatino en líneas tumorales de mama y pulmón (Tarazi H, 2016). Otro caso, en el cual aparte del cáncer se aplica a otras patologías virales y cardiovasculares, es el de la búsqueda de inhibidores de transportadores de nucleósidos (hCNTs). Los mismos no se encuentran cristalizados, por lo que generaron modelos de homología de distintas variantes de los transportadores humanos basados en la similitud y conservación que mantienen con los de *Vibrio cholerae*, los cuales sí se encuentran cristalizados. Los modelos obtenidos fueron utilizados para llevar a cabo un *screening* virtual basado en *docking*. Los compuestos fueron evaluados *in vitro*, obteniendo como resultado una molécula que tiene una capacidad inhibitoria 25 veces mayor que el inhibidor comercial (Kumar Deokar H, 2017). Estos resultados crean un soporte para la hipótesis planteada en este trabajo, teniendo en cuenta que validan el método que se utilizó para el desarrollo de nuevos inhibidores de la holoenzima telomerasa, obteniendo resultados prometedores.

Conclusión

Hasta el momento se han logrado cumplir los primeros pasos en el proceso de desarrollo de nuevas drogas en cáncer. Se ha seleccionado al complejo telomerasa como blanco dada su presencia y actividad en más del 90% de los tumores sólidos. Como blanco específico a drogar, se seleccionó el dominio PUA de la proteína disquerina, el cual está vinculado con varias enfermedades que implican disfunción de actividad telomerasa. Teniendo en cuenta que la disquerina humana no se encuentra cristalizada, se realizaron varias estrategias de modelado *in silico*. Se obtuvieron así 2 estructuras acordes para realizar el ensayo de *screening* virtual basado en *docking*. A partir de este último, se confeccionó un listado de 20 moléculas candidatas con características de compuestos del tipo “*drug like*”. Estos compuestos son el producto de un camino hasta el momento exitoso, siendo la base de los ensayos necesarios para continuar con el desarrollo de nuevas drogas. El efecto biológico de estos compuestos sobre la línea tumoral MDA-MB-231 se evaluará en el siguiente capítulo de esta tesis.

Capítulo 3: “Evaluación *in vitro* de los compuestos candidatos sobre las funciones del complejo telomerasa”

Introducción

Telomerasa como blanco en oncología: Desarrollo de nuevas moléculas

La telomerasa es uno de los principales blancos para el desarrollo de terapias efectivas en contra del cáncer, debido, tanto a su expresión en la mayoría de los tipos tumorales, como en células tumorales del tipo “stem”. Además, las células normales humanas, incluyendo las progenitoras, presentan baja actividad telomerasa y generalmente mantienen la longitud de sus telómeros en valores más altos que las células tumorales. Estas características le otorgan a la telomerasa una ventaja como blanco terapéutico, disminuyendo el riesgo de acortamiento telomérico en células normales (Jafri MA, 2016).

Basado en la evidencia experimental que vincula la homeostasis telomérica con la resistencia a drogas y tratamientos anti tumorales (Lipinska N, 2017; Berardinelli F, 2017), el desarrollo de fármacos que tengan como blanco a la telomerasa representa una herramienta prometedora para la terapia anti tumoral, no solo *per se*, sino también en combinación con otros tratamientos. El complejo telomerasa se encuentra regulado en varios niveles, tales como regulación epigenética, procesamiento transcripcional y post traduccional, compartimentalización intracelular, y reclutamiento y accesibilidad a su sustrato (Berardinelli F, 2017). Teniendo en cuenta estos procesos, hasta el momento se han adoptado distintas estrategias para llevar adelante el desarrollo de nuevas terapias inhibitorias de la telomerasa, las cuales se pueden clasificar de diversas maneras (Mengual Gomez, DL, 2016). A continuación se analizarán algunas de ellas, basados en las características principales de las moléculas inhibitorias de esta holoenzima:

Nucleósidos

Como se ha mencionado anteriormente, el AZT fue el primer inhibidor reportado de la telomerasa. El mismo es un análogo de la timidina y funciona como inhibidor de la retrotranscriptasa. Se ha demostrado que el tratamiento crónico en células tumorales provoca inhibición de la telomerasa, acortamiento telomérico, entrada en senescencia y apoptosis (Gomez DE, 1998). El AZT se utiliza para el tratamiento de varios tipos tumorales asociados a virus y se ha utilizado en combinación con otros agentes en Fase I y II de ensayos clínicos para el tratamiento de tumores sólidos (Falcone A, 1997; Jordheim LP, 2013). Otros nucleósidos han sido evaluados como potenciales inhibidores de la telomerasa, entre los cuales se encuentran el Carbovir, Azdd-GTP y COXT-GTP, entre otros. Si bien todos mostraron actividad inhibitoria de la telomerasa y actividades antivirales exitosas,

son necesarios más ensayos clínicos utilizando nucleósidos para mejorar el entendimiento del potencial que presentan estos agentes en la clínica (Armando RG, 2016).

Oligonucleótidos

Se ha reportado el uso de oligonucleótidos antisentido complementarios a la secuencia de hTR, los cuales provocan una disminución de la actividad telomerasa (Feng J, 1995). Los avances tecnológicos en los métodos de síntesis de este tipo de moléculas ha permitido introducirles modificaciones, incrementando su estabilidad, vida media y especificidad contra el blanco seleccionado. Las principales modificaciones utilizadas en los oligonucleótidos contra telomerasa incluyen: 2'-5'-oligoadenilato, nucleótidos modificados por fosforotiatos y ácidos nucleicos peptídicos (PNA) (Cunningham AP, 2006). *hTR ASODN* es un oligonucleótido anti hTR que se encuentra en estado preclínico, mostrando hasta el momento acción inhibitoria de la actividad telomerasa e inducción de apoptosis en células NB4 (Asqhari-Kia L, 2017). Dentro de esta categoría, uno de los productos más relevantes es el Imetelstat, el cual es un oligonucleótido complementario a hTR conjugado con un lípido que presenta una alta resistencia a nucleasas. Esto último le confiere una gran estabilidad en plasma y tejidos. Actualmente, se encuentra en evaluación en distintas fases de ensayos clínicos para varias indicaciones (cáncer de mama, linfoma, NSCLC, tumores del sistema nervioso central, etc.), tanto solo como en combinación con distintos agentes quimioterápicos (www.cancertrials.gov)

ARN de interferencia (ARNi)

El silenciamiento post transcripcional por ARNi conlleva a la reducción de ARNm y, por lo tanto, de la proteína blanco. Distintos ARNi han sido evaluados para la supresión de la expresión de la telomerasa, dirigidos tanto contra hTERT como hTR (Berardinelli F, 2017). Ejemplos de los mismos son el tratamiento de células de glioma de alto grado LN18 con un ARNi dirigido contra hTERT (Lavanya Ch, 2016) o el trabajo realizado sobre células de adenocarcinoma mamario MCF7, en las cuáles se evalúa un sistema de *delivery* basado en Polietilenimina (PEI) para un ARNi contra hTERT (Liu L, 2015). Si bien existen diversos estudios sobre este tipo de inhibidores, solo se trata de evaluaciones preclínicas que requieren mayor investigación.

Inhibidores de tipo "small molecules"

Entre todas las moléculas evaluadas en la inhibición de la telomerasa, BIBR1532 es uno de los ejemplos más relevantes. El mismo se trata de un inhibidor no competitivo de hTERT y hTR que reduce la longitud telomérica *in vitro* (Pascolo E, 2002). Si bien los resultados obtenidos en los ensayos

preclínicos sobre cáncer de mama y leucemia linfoblástica aguda (Shi Y, 2015; Bashash D 2013) resultaron alentadores, hasta el momento no ha progresado ni se ha incluido en ningún ensayo clínico. Otro ejemplo es el Pterostilbeno, un dimetil éter análogo del resveratrol. El mismo presenta efectos antitumorales como arresto del ciclo celular, apoptosis, necrosis y autofagia en varias líneas celulares. Hace pocos años se realizó un estudio de *docking* molecular de este compuesto sobre la estructura de hTERT, indicando una buena interacción del mismo con el sitio activo de esta enzima (Tippani R, 2014). Recientemente, se realizaron ensayos en líneas celulares de pulmón que demostraron el efecto de este compuesto sobre la actividad telomerasa y la entrada en senescencia (Chen RJ, 2017).

Estabilización del G-cuadruplex

Una de las formas de inhibir la actividad telomerasa es mediante la estabilización del G-cuadruplex, con el objetivo de impedir la interacción del telómero con hTR. La mayoría de los inhibidores diseñados bajo este concepto contienen una estructura policíclica heteroaromática. Ejemplos de los mismos son el Telomestatin, RHPS5 y BRACO19 (Kim MY, 2002; Gomez D, 2006; Taetz S, 2006). Si bien son efectivos, son poco solubles en agua e ineficientes en cruzar barreras biológicas, reduciendo de esta manera su relevancia clínica. En los últimos años se han desarrollado moléculas análogas a Telomestatin, con características mejoradas (Chung WJ, 2013). Sin embargo, hasta el momento no se han incorporado en ningún ensayo clínico.

Terapia génica dirigida

Los promotores de hTERT en células tumorales son los blancos elegidos para la terapia génica. El uso de los mismos permite el control de la expresión de proteínas terapéuticas selectivamente en células tumorales (Jäger K, 2016). De manera similar, se desarrollaron adenovirus, como el denominado Telomelysin (Oncolys BioPharma Inc) que utilizan el promotor de hTERT y replican selectivamente en las células tumorales, provocando su muerte por lisis celular (Nemunaitis J, 2010). Actualmente Telomelysin, se encuentra en un ensayo clínico para el tratamiento de hepatocarcinoma (www.clinicaltrials.gov). Tanto la terapia génica como la viroterapia oncolítica han sido utilizadas para tratar a las células que expresan telomerasa, sin afectar a las células sanas (Jäger K, 2016).

Inmunoterapia

En las células tumorales, la degradación de la telomerasa por el proteosoma, resulta en la formación de fragmentos de proteínas o péptidos de telomerasa que son presentados en la superficie celular por el HLA (del inglés, *human leukocyte antigen*) de clase 1 (Lev A, 2002). De esta manera, estos

epitopes antigénicos pueden ser reconocidos por células T citotóxicas y generar el ataque hacia el tumor (Vonderheide RH, 2002). En base a esta información, el racional de este tipo de terapia es el de sensibilizar al sistema inmune para que detecte a las células tumorales que expresan hTERT, con el objetivo de activar y generar células CD8 (+) específicas para hTERT y así aumentar el efecto antitumoral. GV1001 y GRNVAC1 son vacunas basadas en péptidos de hTERT que se utilizaron para evaluar la respuesta inmune anti telomerasa en pacientes. Actualmente se encuentran incorporadas a ensayos clínicos para evaluar su eficacia en NSCLC, Cáncer Pancreático, Melanoma y Leucemia Mieloide Aguda (www.clinicaltrials.gov)

Compuestos contra proteínas asociadas

Otra de las estrategias utilizadas es dirigir la inhibición contra proteínas no principales del complejo telomero/telomerasa. Una de estas proteínas es la chaperona HSP90, la cual forma un complejo con la co-chaperona p23, el cual es requerido para la maduración de la telomerasa. Dada esta información, se evaluó el efecto de un inhibidor de HSP90 denominado Geldanamicina y sus derivados (Tanespimicina, Alvespimicina) sobre la actividad telomerasa, demostrando su efecto negativo sobre la misma (Villa R, 2003; Chaklader M, 2012; Hu Y, 2015). Actualmente existen 5 inhibidores de HSP90 en ensayos clínicos, aunque hasta el momento ninguna droga de este tipo ha sido aprobada (Yuno A, 2018)

Inhibidores provenientes de fuentes microbianas.

A partir de hongos y bacterias se pudieron identificar moléculas con capacidad de inhibir la telomerasa. Algunos de ellos fueron modificados químicamente para aumentar su potencia (Kiran KG, 2015; Wei C, 2013). Uno de los organismos más estudiados a la hora de buscar moléculas con capacidad inhibitoria, es *Actinomycetes spp.*, ya que el mismo produce compuestos que poseen anillos benzofuranos y benzodipirenos, los cuales se han estudiado como potenciales inhibidores de la telomerasa (Mengual Gomez DL, 2016). La Rubromicina es uno de los compuestos ampliamente estudiados por su capacidad de inducir apoptosis, y actualmente también está siendo evaluada por su capacidad inhibitoria de la actividad telomerasa. Este compuesto contiene distintos grupos aromáticos que interactúan de manera competitiva con hTERT y/o hTR y una estructura espiralada que le permiten ejercer su acción inhibitoria (Ueno T, 2000; Mizushina Y, 2012). Otros ejemplos de estos compuestos son Thelavin A y B proveniente de *Thielavia terricola* (Togashi K, 2001). Si bien se han realizado ensayos que demostraron el efecto de estos compuestos sobre la actividad telomerasa, los mismos no fueron incorporados en ensayos clínicos y no son estudiados profundamente en la actualidad.

Otras moléculas

Dentro de este grupo se puede encontrar al ácido oleico, el cual es un ácido graso que se encuentran en varios organismos animales y vegetales. El mismo fue reportado como inhibidor de la telomerasa hace unos años (Mizushina Y, 2012). Por otra parte se encuentra la Helenalina, una lactona natural que también presenta alta potencia y selectividad para inhibir a esta enzima en células tumorales hematopoyéticas (Huang PR, 2005); y la Curcumina, un compuesto fenólico aislado de la *Curcuma longa Linn*, y que ha sido reportado por poseer propiedades inhibitorias sobre la actividad telomerasa y pro apoptóticas en células de leucemia humana (Chakraborty S, 2006). Otro ejemplo relevante como terapia antitumoral es el MST-312, un análogo del EGCG (del inglés, *green tea epigallocatechin-3-gallate*), el cual ha demostrado actividad antitumoral *in vitro* sobre líneas de glioblastoma, meduloblastoma y adenocarcinoma de mama (Gurung RL, 2014; 2015). Si bien todos estos compuestos presentan actividad inhibitoria de la telomerasa, hasta el momento los mismos se encuentran en desarrollo preclínico.

Como se ha desarrollado hasta el momento, existen diversos compuestos reportados con actividad inhibitoria de la telomerasa con distintos mecanismos de acción y características estructurales. En la Imagen 1, se observan algunos de los ejemplos mencionados.

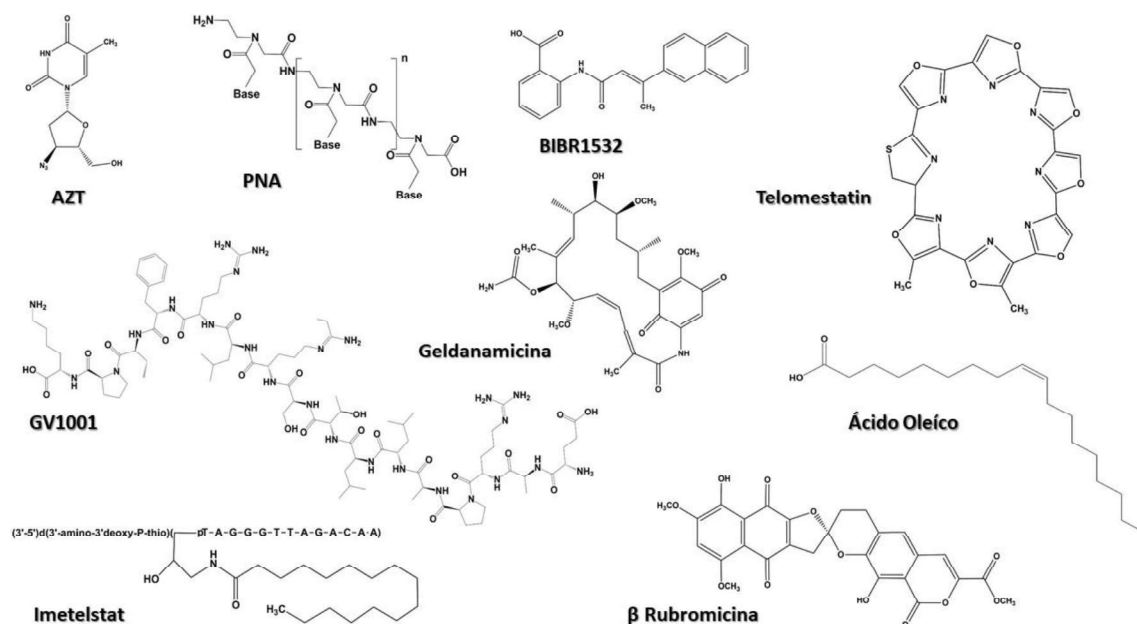


Imagen 1. Estructuras químicas de algunos de los inhibidores de la telomerasa reportados.

Respecto a su relevancia clínica, solo algunos presentan iniciados ensayos clínicos, sin encontrarse ninguna de estas drogas aún en el mercado (Tabla 1).

Compuesto	Combinación	Indicación	Estado	Fase	Sponsor	Fecha Inicio
Telomelysin	Radioterapia	Cáncer de Esófago	En Reclutamiento	I	Oncolys Biofarma Inc.	Julio de 2017
Telomelysin	-	Melanoma III y IV	En Reclutamiento	II	Oncolys Biofarma Inc./INC Research	Diciembre de 2016
Telomelysin	-	Carcinoma Hepatocelular	En Reclutamiento	I y II	Oncolys Biofarma Inc./Medigen Biotechnology Corp.	Octubre de 2014
GRNVAC1	-	Leucemia Mieloide Aguda	Reclutamiento Completo	II	Asterias Biotherapeutics Inc.	Julio de 2007
GV1001	Gemcitabina/Capecitabina	Cáncer Pancreático	En Reclutamiento	III	Samsung Pharmaceutical Co.	Noviembre de 2015
GV1001	-	NSCLC Inoperable (III)	Desconocido	III	Kael-GemVax Co/Quintiles, Inc	Mayo de 2012
Imetelstat	Paclitaxel/Bevacizumab	Cáncer de Mama metastásico recurrente	Reclutamiento Completo	II	Geron Corporation	Noviembre de 2010
Imetelstat	Bevacizumab	NSCLC	Reclutamiento Completo	II	Geron Corporation	Mayo de 2010

Tabla 1. Ejemplos de ensayos clínicos que contienen inhibidores de la telomerasa. NSCLS: del inglés, *non small cells lung cancer*. Fuente: www.clinicaltrials.gov (Diciembre 2017)

Si bien cada uno de los compuestos aquí descriptos presentan varias diferencias entre sí, el principal objetivo que comparten todas las terapias antitumorales basadas en telomerasa es el de inducir selectivamente muerte celular en las células tumorales, minimizando el efecto en las células normales (Jäger K, 2016).

Objetivo

Evaluar el efecto de los candidatos obtenidos durante el presente trabajo a partir del *screening* virtual sobre la actividad telomerasa, el acortamiento telomérico y los procesos de senescencia y apoptosis, en la línea celular de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 231.

Materiales y Métodos

Preparación de las drogas. Los compuestos liofilizados (10mg) fueron solubilizados en DMSO estéril dentro de un flujo laminar, a fin de obtener soluciones *stock* 10mM.

Células tumorales y condiciones de cultivo. Las células MDA MB 231, provenientes de un adenocarcinoma de mama, se mantuvieron en medio DMEM suplementado con 10% SFB, glutamina 2mM y 80 µg/ml de gentamicina. La línea celular se cultivó en frascos plásticos de 25 o 75 cm² a 37°C en atmósfera húmeda con 5% de CO₂ en aire. La cuantificación del número celular se realizó por recuento en hemocitómetro. Las células se trataron con los inhibidores durante 55 pasajes, colectando muestra cada 5 pasajes. Se utilizó como control de tratamiento, el vehículo de la droga (DMSO).

Ensayo de sobrevida celular. Las células tumorales se trataron con diversas dosis de los compuestos para determinar su IC₅₀. Se estudió su capacidad antiproliferativa en placas de 96 *wells* mediante la siembra de 10.000 células con una incubación de 72 horas con los diversos compuestos, revelándose con MTT.

Determinación de actividad telomerasa. La actividad de telomerasa de células tumorales controles y tratadas con los compuestos se determinó mediante un ensayo de PCR en tiempo real por el método de SyBR Green con *primers* específicos, como ya se mencionó anteriormente. Las células tumorales en cultivo se cosecharon y lavaron una vez con PBS, se transfirieron 1 x 10⁶ células a tubos cónicos de 1,5 ml y se centrifugaron por 8 minutos a 450 x g. El pellet se lisó con 200 µl de buffer CHAPS, cuantificó y almacenó a -20°C hasta su utilización.

Determinación de longitud telomérica. El ADN de alto peso molecular de células tumorales controles y tratadas con los compuestos se extrajo utilizando el kit Puro gDNA (PB-L) según indicaciones del proveedor. El ADN extraído se cuantificó mediante absorbancia a 260; 230 y 280 nm, utilizando el espectrofotómetro NanoDrop 1000 [Thermo Fisher Scientific]. En primer lugar, *primers* específicos (Anexo, Tabla 1) para la secuencia de repeticiones teloméricas se utilizaron para cuantificar la longitud telomérica de forma relativa de las muestra a analizar. En segundo lugar, se utilizaron *primers* específicos para el gen de copia única *rplp0* (Anexo, Tabla 1) para determinar las copias de genomas presentes en la muestra. El perfil de ciclado utilizado se puede observar en la Figura 1.B del Anexo. Una vez definidos todos los parámetros de la reacción, los resultados fueron analizados con el StepOne® Software versión v2.3.

Extracción de ARN y Síntesis de ADN copia (ADNc). Para cada tratamiento, se aisló el ARN total de las células mediante el reactivo QuickZol [Kalium], siguiendo instrucciones del proveedor. El ARN extraído se cuantificó mediante absorbancia a 260; 230 y 280 nm, utilizando el

espectrofotómetro NanoDrop 1000 [Thermo Fisher Scientific]. La síntesis de ADNc se realizó a partir de 1µg de ARN total en 20µl de reacción, utilizando oligodT 18 [PB-L] y Superscript III [Invitrogen], siguiendo las instrucciones del proveedor.

Evaluación sobre la inducción de senescencia. La senescencia celular durante el tratamiento con los inhibidores encontrados se evaluó mediante dos técnicas. En primer lugar se evaluó la expresión diferencial de genes asociados a la senescencia replicativa, tales como: *glb1*, y *p16ink4A* (Anexo, Tabla 1), mediante qPCR (método $\Delta\Delta C_t$). El perfil de ciclado se puede observar en la Figura 1.A del Anexo. Una vez definidos todos los parámetros de la reacción, los resultados se analizaron con el Software StepOne® v2.3, utilizando como control de carga el gen *hprt1*. Por otra parte, se realizó la determinación cuantitativa de actividad SA-β-gal mediante la utilización del kit *Senescence β-Galactosidase Staining* [Cell Signalling], según instrucciones del proveedor.

Evaluación sobre la inducción de apoptosis. La determinación de apoptosis también se realizó por vías alternativas. Se determinó comparativamente entre células tratadas con los compuestos y control la expresión diferencial de los genes asociados a apoptosis: *bcl2*, *bclx*, y *bax* (Anexo, Tabla 1), mediante qPCR (método $\Delta\Delta C_t$). El perfil de ciclado se puede observar en la Figura 1.A del Anexo. Una vez definidos todos los parámetros de la reacción, los resultados fueron analizados mediante el Software StepOne® v2.3, utilizando como control de carga el gen *hprt1*. Por otra parte, se determinó apoptosis mediante la medición de la actividad caspasa 3 con el kit *CaspACE™ Assay System*, según instrucciones del proveedor [Promega].

Análisis Estadísticos. Todos los datos fueron representados como el promedio ± el error estándar de la media (SEM). La significancia de las diferencias fue determinada utilizando ANOVA de simple vía contrastado con Dunnett y con ANOVA de doble vía con el test de comparaciones múltiples de Tukey. Los análisis se llevaron a cabo mediante el software *GraphPad Prism 6®* [GraphPad software, La Jolla, CA, USA]. El criterio para la significancia estadística fue $p < 0.05$.

Resultados

Ensayo de sobrevida celular

Una vez obtenidos los compuestos, se procedió a solubilizarlos a fin de poder realizar los distintos ensayos previstos. A partir de la búsqueda bibliográfica y las características de los compuestos se decidió utilizar DMSO como solvente, en una concentración stock de 10 mM. Sin embargo, 6 de los compuestos adquiridos no pudieron ser solubilizados en este vehículo, motivo por lo cual no pudieron ser evaluados.

Una vez obtenidas las soluciones stock, se realizaron ensayos de viabilidad celular sobre la línea MDA MB 231, los cuales se muestran en la Figura 1. La mayoría de los compuestos no presenta efectos citotóxicos en el rango de dosis evaluado, mientras que unos pocos sí los presentan. Para estos últimos se determinó el valor de IC_{50} , la cual se encuentra indicada en la misma figura.

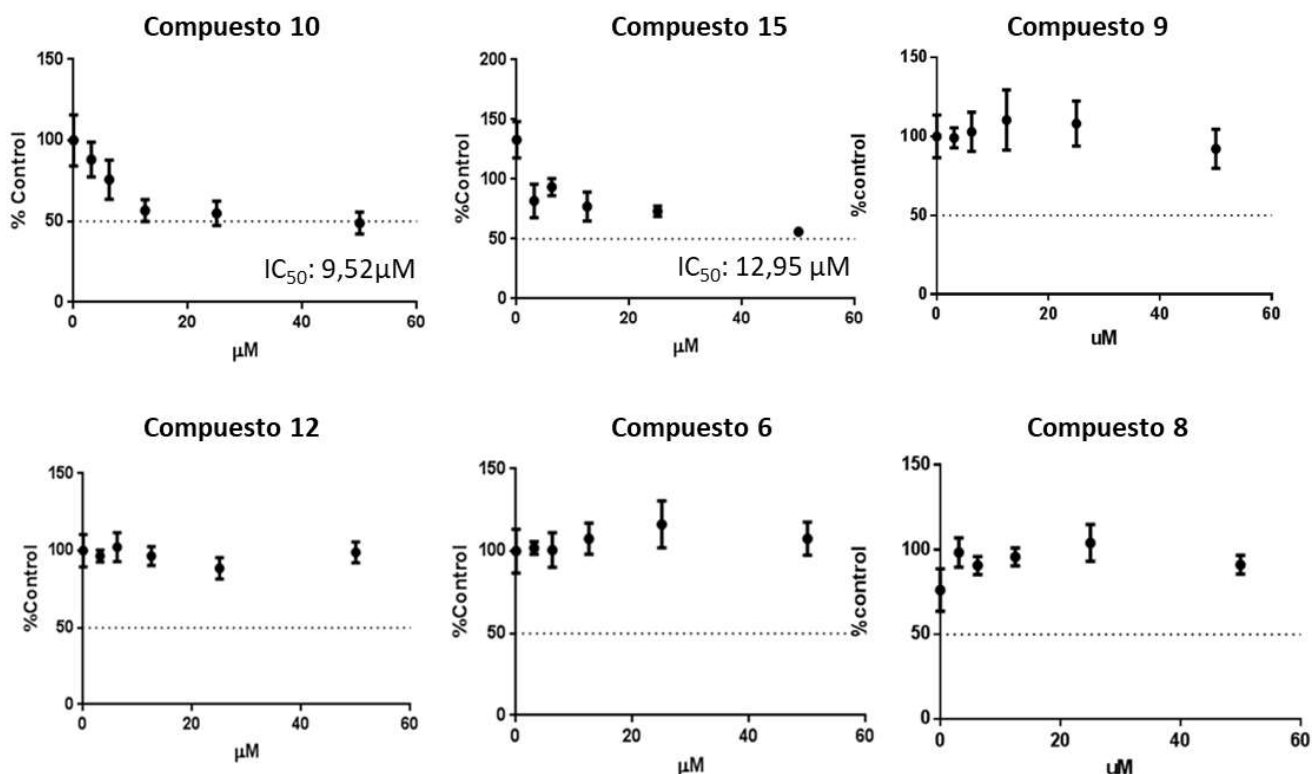


Figura 1. Efecto de los compuestos sobre la proliferación celular de células de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 231. El efecto sobre la proliferación celular se midió por medio del ensayo de MTT descrito previamente. Los valores representan media \pm SEM y son representativas de tres experimentos independientes. A partir del valor de este ensayo se determinó 10 μ M como la concentración de uso para los tratamientos, excepto para los compuestos 10 y 15, para los cuales fue 2 μ M. Los compuestos no representados en la figura mostraron un efecto similar a los expuestos por los compuestos 6, 8, 9 y 12.

A partir de estos ensayos y los datos encontrados en la bibliografía, se definió como condición de tratamiento una dosis de 10µM para todos los compuestos, excepto el compuesto 10 y el 15, los cuales se utilizaron a una concentración 2µM.

Efecto de los compuestos sobre de la Actividad Telomerasa

Una vez definida la dosis en la cual los compuestos no presentaban efectos citotóxicos, se realizó un *screening* por actividad de los mismos mediante el tratamiento por 48 hs con los potenciales inhibidores y la posterior determinación de actividad telomerasa. Los resultados obtenidos se encuentran representados en la Figura 2.

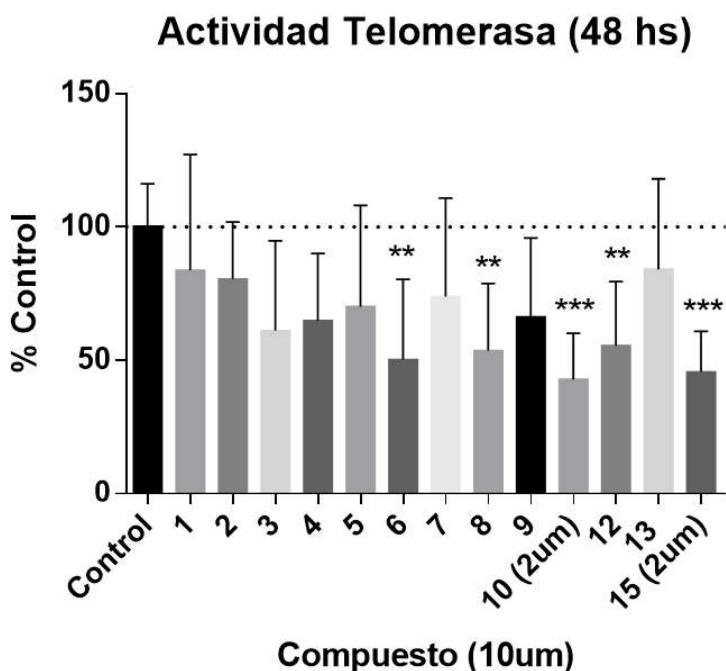


Figura 2. Determinación de actividad telomerasa mediante qPCR. Se realizó una cuantificación mediante *Real Time PCR* con *primers* específicos utilizando como molde a los lisados proteicos obtenidos a partir de las células tratadas. Los valores representan media \pm SEM (n=6, **p<0,01 ***p< 0,001 vs control ANOVA contrastado con Dunnett).

Como se puede observar, los compuestos 6, 8, 10, 12 y 15 presentan un efecto inhibitorio de la actividad telomerasa del 49,7; 46,6; 57,3; 44,8 y 54,6% respectivamente (p<0,01; p< 0,001). En la Tabla 1 se muestra un resumen de los distintos parámetros evaluados hasta el momento para cada compuesto. A partir de estos resultados, se seleccionaron los compuestos que presentaron mayor inhibición a menor dosis para continuar con los ensayos posteriores. Para esto, con los compuestos 10 y 15 se comenzó el tratamiento crónico de las células a una dosis 2 µM, con el objetivo de ir evaluando distintos parámetros conforme avanza el tratamiento.

Compuesto N°	Código Enamine	Energía de <i>docking</i> (kcal/mol)	Concentración <i>in vitro</i> (µM)	Inhibición Actividad Telomerasa (%)
1	z1717	-7.9	10	ns
2	z8696	-7.3	10	ns
3	z4050	-8	10	ns
4	z1388	-7.7	10	ns
5	z8692	-8.1	10	ns
6	z2200	-8.5	10	49.7 (p<0.01)
7	z2792	-7.5	10	ns
8	z0338	-7	10	46.6 (p<0.01)
9	z4979	-6.7	10	ns
10	z5110	-8.2	2	57.3 (p<0.001)
11	z6341	-7.2	Insoluble DMSO	-
12	z5909	-8.2	10	44.8 (p<0.01)
13	z7428	-8.2	10	ns
14	z7066	-8.2	Insoluble DMSO	-
15	z4034	-7.6	2	54.6 (p<0.001)
16	z6281	-8.2	Insoluble DMSO	-
17	z6285	-7.8	Insoluble DMSO	-
18	z0048	-7.1	Insoluble DMSO	-
19	z0054	-7.1	Insoluble DMSO	-
20	z1131	-7.6	Insoluble DMSO	-

Tabla 1. Parámetros *in silico* e *in vitro* de los compuestos analizados. (ns: no significativo)

Efecto del tratamiento crónico de los compuestos sobre la longitud telomérica

Se determinó la longitud telomérica de los distintos tratamientos luego de 10, 25, 40 y 55 pasajes de exposición a los compuestos. Como se puede observar en la Figura 3.A, el tratamiento crónico con el compuesto 10 provoca una disminución progresiva en la longitud telomérica, alcanzando un 66% luego de 55 pasajes (p<0,001). Se puede observar el mismo fenómeno en lo que respecta al tratamiento con el compuesto 15 (Figura 3.B), en el cual se alcanza un acortamiento telomérico del 43%.

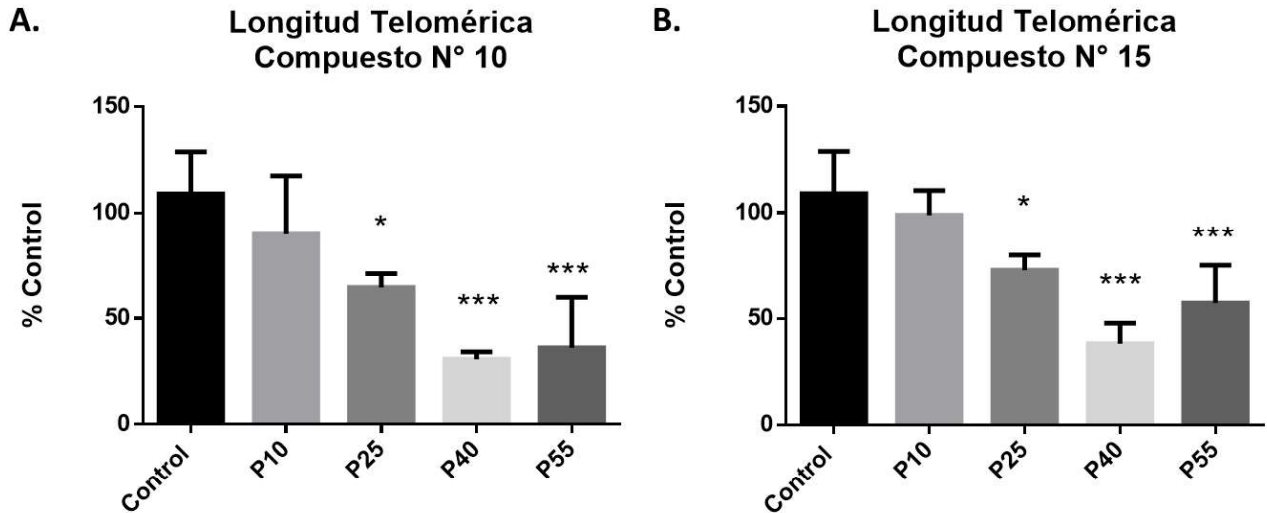


Figura 3. Determinación de la longitud telomérica relativa en la línea MDA MB 231 luego del tratamiento durante 10, 25, 40 y 55 pasajes con los compuestos 10 y 15. A. Células tratadas con el compuesto 10. B. Células tratadas con el compuesto 15. C. Las cuantificaciones se realizaron utilizando como control del número de células el gen de copia única *rplp0*. Los valores representan media \pm SEM (n=6, * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs control (ANOVA contrastado con Tukey).

A partir de lo observado, se procedió a evaluar si las células post tratamiento presentaban indicios de entrada en senescencia.

Evaluación de la capacidad de los compuestos de inducir senescencia.

Para evaluar este proceso celular, en una primera aproximación se procedió a evaluar la expresión génica de dos marcadores relacionados con senescencia. Como se puede observar en la Figura 4.A, la expresión del *gbl1* no presenta cambios respecto al control luego del tratamiento con ambos compuestos. Resultados similares se obtienen respecto a la expresión de *p16ink4a* luego del tratamiento con el compuesto 15. Sin embargo, se puede observar que luego del tratamiento crónico con el compuesto 10, la expresión de este marcador se ve aumentada más de 4 veces respecto a las células no tratadas (Figura 4.B)

Por otra parte, se decidió evaluar la actividad β galactosidasa asociada a senescencia sobre las células tratadas. Como se muestra en la Figura 5, las células control y las tratadas con el compuesto 15, no presentan tinción positiva para la actividad. Por el contrario, en lo que corresponde al tratamiento con el compuesto 10, se pueden observar células que presentan un precipitado azul coincidente con la actividad de esta enzima, sumado a una morfología coincidente con un estado de senescencia celular.

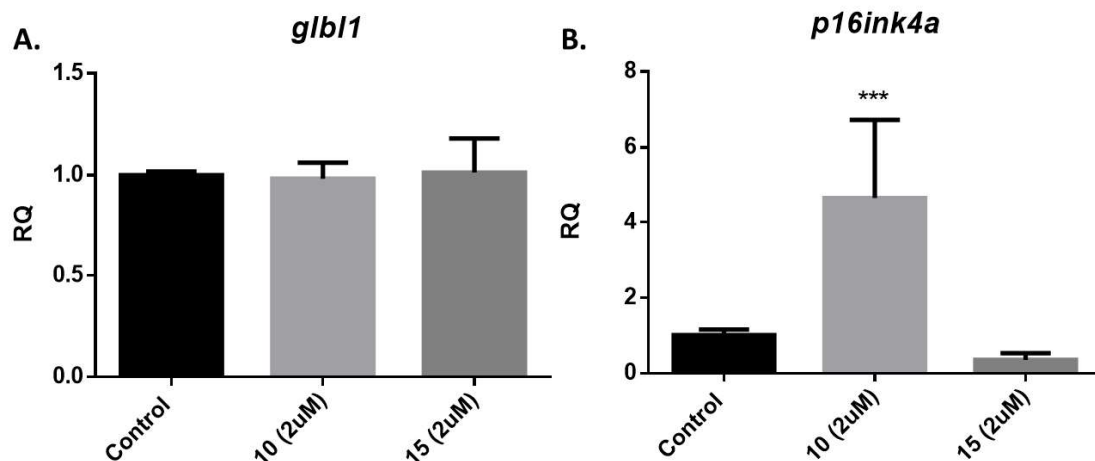


Figura 4. Evaluación sobre la expresión génica de genes relacionados con la senescencia celular en la línea MDA MB 231 luego del tratamiento durante 55 pasajes con los compuestos 10 y 15. A. Expresión relativa del gen *p16ink4a*. B. Expresión relativa del gen *gbl1*. C. Las cuantificaciones se realizó utilizando como control de carga el gen *hprt1*. Los valores representan media \pm SEM (n=3, *p<0,05 **p< 0,01 ***p<0,001 vs control (ANOVA contrastado con Dunnett).

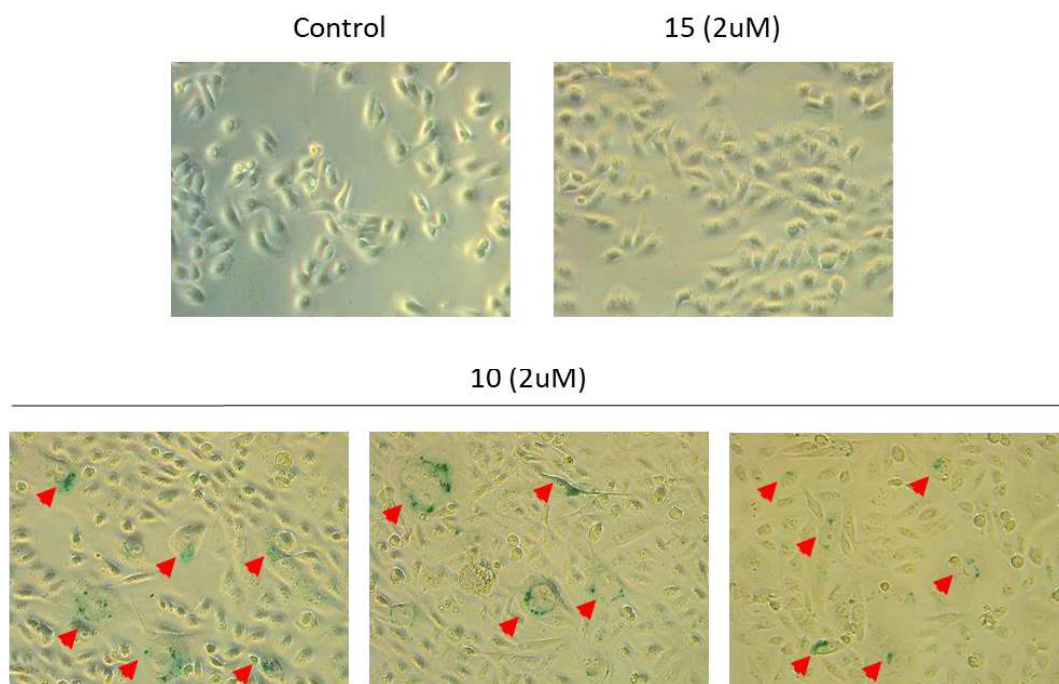
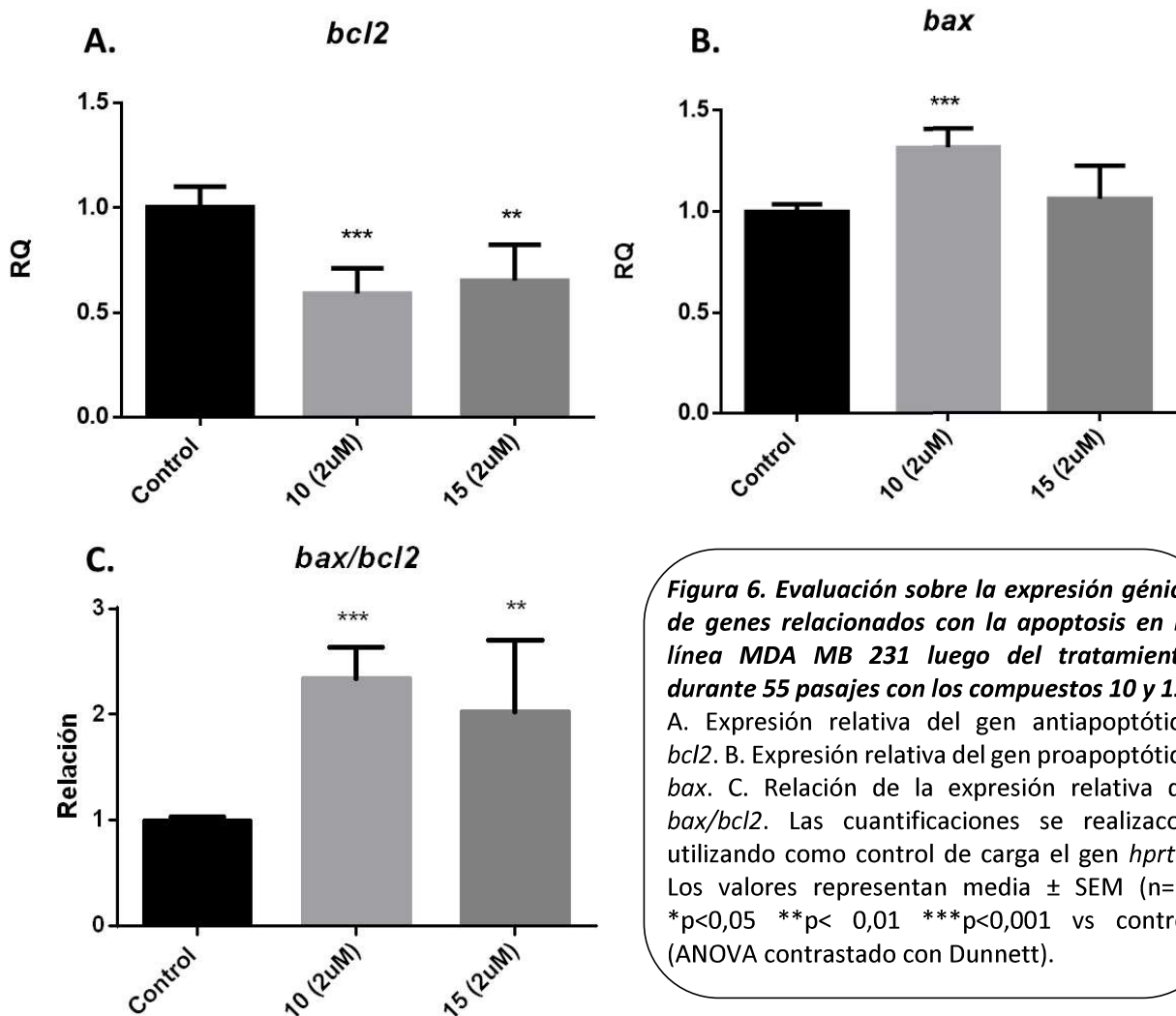


Figura 5. Determinación de la actividad de la β galactosidasa asociada a senescencia en la línea MDA MB 231 luego del tratamiento durante 55 pasajes con los compuestos 10 y 15. El ensayo se realizó con el kit *Senescence β -Galactosidase Staining Kit* de Cell Signalling. Las flechas indican las células positivas para la tinción. Las imágenes son representativas de 3 ensayos independientes. Magnificación: 200X

Dados estos resultados, se procedió a evaluar el efecto del tratamiento sobre marcadores de apoptosis celular.

Evaluación de la capacidad de los compuestos de inducir apoptosis.

Para evaluar este proceso celular se llevaron a cabo dos tipos de determinaciones: se evaluó la expresión de los genes anti y pro apoptóticos *bcl2/bax* y se determinó la actividad caspasa 3 de las células sometidas al tratamiento crónico con los compuestos 10 y 15. Como se puede observar en la Figura 6 A., el tratamiento con el compuesto 10 y el 15 provoca una disminución en la expresión de *bcl2* del 40% y 35%, respectivamente ($p < 0,001$; $p < 0,01$). Respecto a la expresión de *bax*, se puede apreciar un aumento del 30% luego del tratamiento con el compuesto 10, aunque no se observan diferencias con el compuesto 15 (Figura 6.B). Cuando se analiza la relación entre ambos genes (Figura 6.C), se obtiene una relación de 2,3 y 2 veces de *bax* respecto a *bcl2* para el tratamiento con los compuestos 10 y 15 respectivamente ($p < 0,001$; $p < 0,01$).



Por otra parte, se midió la actividad caspasa 3, a partir de lisados provenientes de las células con tratamiento crónico. Como se puede observar en la Figura 7, el tratamiento con el compuesto 10 provoca un aumento del 55% de actividad respecto a las células control ($p < 0,01$). Sin embargo, el tratamiento con el compuesto 15 presenta valores similares a los obtenidos para las células sin tratamiento.

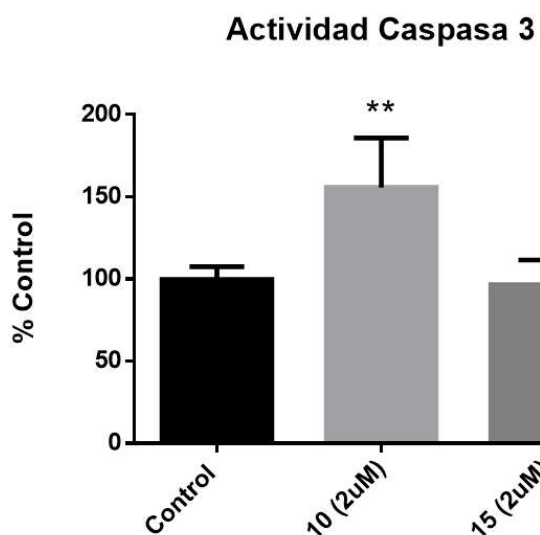


Figura 7. Determinación de la actividad Caspasa 3 sobre lisados de células MDA MB 231 luego del tratamiento durante 55 pasajes con las moléculas 10 y 15. Se realizó una cuantificación de la actividad caspasa 3 mediante el kit colorimétrico *CaspACE™ Assay System* (Promega). Se utilizaron 75 µg de lisado proteico por reacción. Los valores representan media \pm SEM (n=3), * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ *** $p < 0,001$ vs control (ANOVA contrastado con Dunnett).

Dado los resultados obtenidos, se realizó un modelado de la interacción del compuesto 10 con la proteína DKC1, con el objetivo de observar como dicho compuesto se dispone espacialmente en el sitio de *docking* definido. El resultado se observa en la Figura 8.

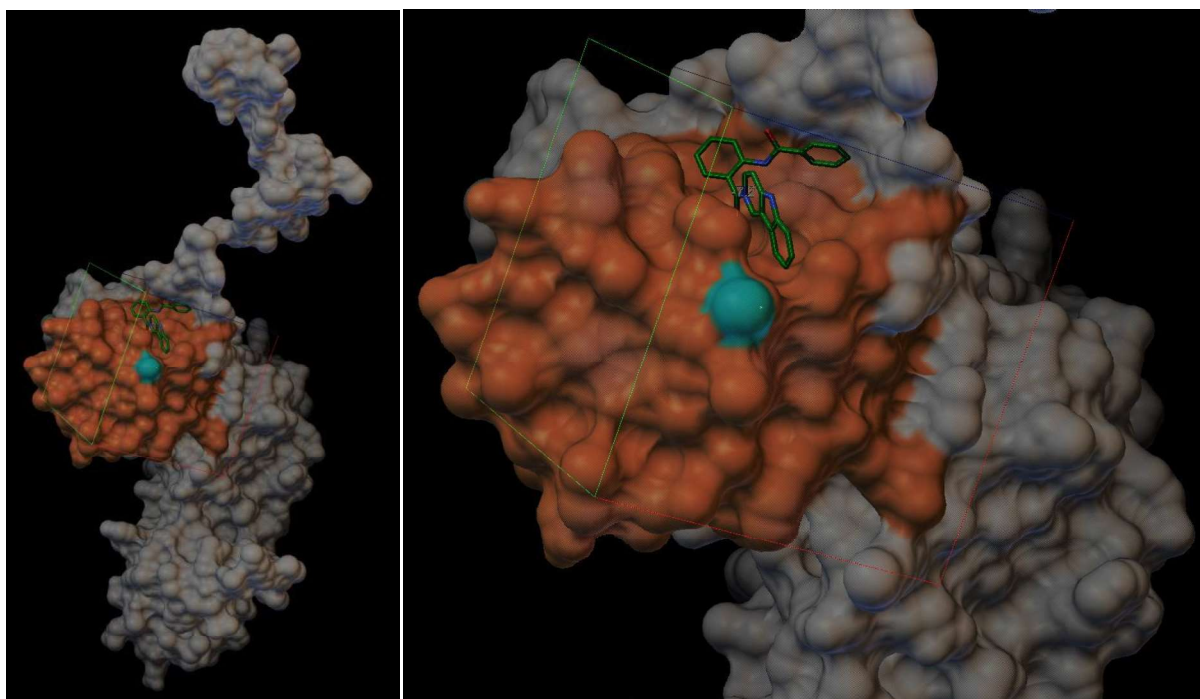


Figura 8. Modelado de la estructura 3D de DKC1 junto con el compuesto 10. En color naranja se observa el dominio PUA.; en celeste, el residuo K293; en RGB, la caja definida para el ensayo de *docking*, la cual presenta como centro el residuo K293.

Discusión

El uso de la telomerasa como un blanco anti tumoral presenta varias ventajas. En principio, es un componente esencial y específico de la mayoría de las células tumorales y se encuentra ampliamente expresado en comparación con otros marcadores tumorales (Jäger K, 2016). Además, la telomerasa es el mecanismo más eficiente para resolver la mortalidad replicativa, existiendo solo un mecanismo compensatorio menos robusto (ALT). Este hecho podría limitar el riesgo de desarrollar resistencia a terapias basadas en la inhibición de la telomerasa. Por otra parte, la baja o nula expresión de la telomerasa en tejidos normales junto con la mayor longitud que presentan los telómeros de células *stem* normales versus las células tumorales, permite que exista un grado de especificidad y minimiza el riesgo de toxicidad en células sanas (Shay, J.W, 2010)

Entre las estrategias utilizadas en la búsqueda de inhibidores de este blanco, se pueden destacar compuestos naturales, de tipo “*small molecule*”, inmunoterapias, oligonucleótidos, terapia génica, análogos de nucleósidos, etc. (Mengual Gomez DL, 2016). En este trabajo particularmente se evaluó la capacidad inhibitoria de compuestos del tipo “*small molecule*” provenientes de una biblioteca comercial utilizada en un ensayo de *screening* virtual basado en *docking*. En bibliografía sólo se encuentran reportados unos pocos trabajos que utilizan una estrategia similar a la aquí propuesta. Tal es el caso del trabajo realizado sobre análogos de benzylidin-hidrazona, en el cual a partir de 15 compuestos con características del tipo “*small molecule*” realizan ensayos *in vitro* sobre células de pulmón, ovario, melanoma y colon y un *screening por docking* contra la subunidad catalítica de la telomerasa, con el objetivo de evaluar la capacidad de unión de los análogos (Alam MS, 2016). Otro grupo de estudio ha desarrollado una estrategia de identificación de inhibidores de la telomerasa a partir de compuestos que se unan a hTR. Para el mismo, se utilizó como blanco una región de hTR y se realizó un *screening virtual* basado en *docking* a partir de una biblioteca de 3000 compuestos aprobados por la FDA (Disney MD, 2014). Otro ejemplo es el de la búsqueda de compuestos estabilizadores del G-cuadruplex, a través de un *screening virtual* sobre la estructura de la región telomérica utilizando una biblioteca de más de 30000 compuestos naturales (Artese A, 2013).

Los compuestos evaluados en este trabajo, presentan características del tipo “*small molecule*”, es decir, presentan un peso molecular menor a 350 Da, valores de lipoficidad adecuados ($\log P < 3$) y grupos farmacóforos relevantes, tales como carboxilos, aminas primarias y amidas, parámetros que son importantes en el desarrollo de una nueva droga (Lipinski CA, 2001).

Como se ha mencionado anteriormente, para el desarrollo de este trabajo se han obtenido 20 compuestos, de los cuales 13 presentaron aceptable solubilidad en DMSO. Luego se evaluó su capacidad citotóxica sobre las células MDA MB 231 en un rango de concentraciones de 0 hasta 50 μM , en donde luego de 72 horas de incubación, se obtuvieron valores de IC_{50} de 9,52 y 12,95 μM para el

compuesto 10 y 15 respectivamente. Estos resultados coinciden con lo reportado en la literatura para distintos inhibidores de la telomerasa: el inhibidor BIBR1532 presenta solubilidad en DMSO y no tiene efectos citotóxicos a una concentración de 2,5 μM en las líneas MDA MB 231 y MCF7 (Wardi L, 2014); en el caso de MST312, el mismo presenta solubilidad en DMSO y no presenta efectos citotóxicos a una dosis 1 μM en las líneas MDA MB 231 y MCF7 (Gurung RL, 2014); otro ejemplo es el caso de la Curcumina, en donde la misma también presenta solubilidad en DMSO y un IC_{50} de 15 μM luego de 72 hs de incubación en la línea de cáncer mamario T47D (Kazemi-Lomedash F, 2013).

Por otra parte, se evaluó la capacidad inhibitoria de los compuestos sobre la actividad telomerasa a una dosis de 2 μM para los compuestos 10 y 15, y 10 μM para los demás compuestos durante 48 hs, obteniéndose una inhibición del 49,7; 46,6; 57,3; 44,8 y 54,6% para los compuestos 6, 8, 10, 12 y 15 respectivamente. Estos valores coinciden con lo reportado para el inhibidor Imetelstat, en donde el tratamiento con una dosis de 2 μM durante 72 horas sobre células de osteosarcoma provoca una reducción del 50% sobre la actividad telomerasa (Hu Y, 2015). Sin embargo, en comparación con otros inhibidores ya reportados, nuestros compuestos presentan una mayor inhibición en menor tiempo y dosis. Por ejemplo, en el caso del Pterostilbeno, si bien se observa una inhibición del 80% de la actividad telomerasa sobre células de cáncer de pulmón, la misma se obtiene a una dosis 80 μM durante 72 hs (Chen RJ, 2017). Del mismo modo, en el caso de BIBR1532, el mismo alcanza un porcentaje similar de inhibición al alcanzado por nuestros compuestos, aunque a una dosis de 60 μM sobre células de leucemia linfoblástica aguda (Bashash D, 2017). Por último, el tratamiento con AZT sobre células de hepatocarcinoma, provoca un descenso del 50% de la actividad telomerasa a 48 hs, pero a una dosis 100 μM (Fang JI, 2009). Estos resultados sugieren que los compuestos obtenidos presentan mayor efectividad sobre la inhibición de la telomerasa, teniendo en cuenta que alcanzan una inhibición mayor al 50% en 48 hs de tratamiento a una dosis similar al de un inhibidor ya reportado que se encuentran en ensayos clínicos, como lo es el Imetelstat. Esto es un parámetro importante ya que, teniendo en cuenta que se trata del desarrollo de nuevas drogas antitumorales, en algún momento se realizará el escalado de esta dosis “*in vitro*” a una dosis “*in vivo*” y, por lo tanto, obtener el efecto deseado a la menor dosis posible es un objetivo relevante a la hora de la toma de decisiones, ya que minimiza la aparición de efectos no deseados. Teniendo en cuenta esto último, a raíz de este ensayo se seleccionaron como candidatos para continuar con los estudios a los compuestos 10 y 15.

Teniendo en cuenta que el objetivo de este trabajo era evaluar la capacidad de los compuestos de inhibir la telomerasa y, por lo tanto, provocar acortamiento telomérico, senescencia y apoptosis, se decidió realizar un tratamiento durante 55 pasajes, lo cual equivale a aprox. 22 semanas, con los compuestos 10 y 15 a una dosis 2 μM . En lo que respecta a inhibidores de la telomerasa, considerando

que los procesos a evaluar dependen de las duplicaciones celulares, la duración del tratamiento suele estar dentro de este rango y se denominan como tratamientos crónicos o “*Long Term*”. Tal es el caso del tratamiento con imetelstat sobre líneas de osteosarcoma, en el cual la duración del tratamiento a una dosis 1 μ M varía entre 14 a 36 semanas (Hu Y, 2015). Otro trabajo llevado a cabo sobre células de carcinoma pulmonar con varios inhibidores de la telomerasa (BRACO19, BIBR1532, 2'-O-methyl RNA, y PNA) con una dosis de entre 0,1 y 1 μ M se realizó durante 99 días (Kleideiter E, 2007). Otro ejemplo es el del AZT, con el cual se realizó un tratamiento durante 50 pasajes sobre una línea celular de adenocarcinoma mamario (Tejera AM, 2001).

Una vez comenzado el tratamiento crónico, uno de los primeros parámetros a evaluar fue el efecto del tratamiento sobre la longitud telomérica. Para evaluar este parámetro se puso a punto un ensayo de determinación relativa de la longitud telomérica basado en qPCR, tomando como punto de partida el trabajo publicado por Richard Cawthon (Cawthon RM, 2002). Como ya se ha mencionado, el tratamiento con los compuestos provocó un descenso de la longitud telomérica, alcanzando una disminución del 66% y 43% para los compuestos 10 y 15 respectivamente, luego de 55 pasajes. Resultados similares se encuentran reportados para el tratamiento crónico con imetelstat sobre distintas líneas de NSCLC (Frink RE, 2016); para el inhibidor MST312 luego del tratamiento crónico sobre células de adenocarcinoma mamario MCF7 (Morais KS, 2017) y para el tratamiento prolongado con el inhibidor BIBR1532 sobre células tumorales germinales (Mueller S, 2007).

Teniendo en cuenta la teoría telomérica (Bernadotte A, 2016) la entrada en un estado de senescencia celular es principalmente provocada por el acortamiento telomérico. El proceso de senescencia implica cambios, no solo en la capacidad replicativa, sino también en la morfología celular, expresión génica, metabolismo, etc. (Van Deursen JM, 2014). Existen distintos marcadores que permiten observar este proceso; El marcador más comúnmente utilizado, principalmente por su fácil detección, es la actividad de la SA- β galactosidasa a pH 6 con el sustrato artificial X-gal. La β -galactosidasa endógena, la cual está codificada por el gen *gbl1* es una enzima lisosomal que presenta actividad optima a pH 4.0-4.5, por lo que su detección a un pH subóptimo de 6 correlaciona con su gran nivel de expresión en células senescentes (Sharpless N, 2015). Por otra parte, se encuentra la expresión del gen supresor de tumor p16INK4a, el cual codifica para una proteína que juega un rol principal en los procesos de ciclo celular y senescencia (Zhao R, 2016). Con el objetivo de evaluar si el tratamiento con los nuevos compuestos provocaba un fenotipo senescente, se realizaron cuantificaciones relativas mediante qPCR de los ARNm de *gbl1* y *p16INK4a*, obteniéndose un aumento de 4 veces en la expresión de este último para el tratamiento con el compuesto 10, pero ninguna diferencia significativa en lo que respecta a la expresión de este gen para el compuesto 15 y de *gbl1* para ambos compuestos. Por otra parte, se evaluó la actividad de la SA- β galactosidasa, obteniéndose

células azules y con una morfología asociada a senescencia para el tratamiento con el compuesto 10, pero no para el correspondiente al compuesto 15. Respecto a la actividad del compuesto 10 sobre la senescencia, se puede ver que el mismo provoca el aumento de *p16ink4a* y la actividad de la SA- β galactosidasa, lo cual sugiere la entrada en senescencia provocada por el acortamiento telomérico. Además la morfología celular se ve afectada en las células positivas, observándose células de mayor tamaño, redondeadas y con vacuolización. Si bien se esperaba que el tratamiento genere un aumento de la expresión del gen *glib1*, como se puede apreciar en las imágenes, no todas las células presentan actividad positiva para esta enzima. Además, se trata de un gen de expresión constitutiva en las células no senescentes. Dada esta situación y que el análisis de la qPCR incluye todo el cultivo, una de las posibilidades es que las diferencias quedan enmascaradas.

En lo que respecta al tratamiento con el compuesto 15, con los marcadores evaluados no se aprecian diferencias entre las células tratadas y el control. Este fenómeno se puede explicar teniendo en cuenta que la disminución en la longitud telomérica para este compuesto fue menor que la que presentó el compuesto 10. Tratándose de dos compuestos químicos con características diferentes entre sí, puede resultar lógico pensar que presentan distinta capacidad de unión con el blanco, haciendo más eficiente la inhibición en el tiempo en un caso que en el otro. Teniendo en cuenta esto, si se alargara el tiempo de tratamiento con el compuesto 15, se podrían obtener resultados similares a los obtenidos con el compuesto 10.

Los resultados de este novedoso compuesto son similares a los encontrados en bibliografía. Por ejemplo, en el tratamiento crónico con el inhibidor Imetelestat sobre células de cáncer pancreático, se observó acortamiento telomérico, seguido de actividad positiva para SA- β galactosidasa luego de 100 días de tratamiento (Burchett KM, 2014). Resultados similares sobre la actividad SA- β galactosidasa se obtuvieron bajo el tratamiento prolongado con el inhibidor MST312 sobre la línea celular MCF7 (Morais KS, 2017).

Así como el acortamiento telomérico es capaz de disparar el proceso de senescencia, también puede desencadenar apoptosis. Cuando hay disfunción telomérica, se activa la respuesta de daño a ADN, lo cual activa a la proteína supresora de tumor p53. Esta última es la encargada de dirigir a la célula hacia el proceso de muerte celular programada (Roake CM, 2017). Existen varios protagonistas en el proceso de apoptosis. Entre ellos que se pueden destacar a la familia de proteínas Bcl-2 (Bax, Bak, Bcl-2, Bcl-xL), cuyo equilibrio entre proteínas pro y anti apoptóticas regulan el proceso de apoptosis; y a las caspasas efectoras 3 y 6 que inducen la muerte celular o retroalimentan la vía intrínseca de la apoptosis mediante el clivado de la proteína BID (Su Z, 2015). Teniendo en cuenta el acortamiento telomérico provocado por el tratamiento con los compuestos, se evaluó el efecto de las

moléculas sobre la expresión de los genes *bcl2/bax* y sobre la actividad caspasa 3. Luego del tratamiento con el compuesto 15, no se vieron cambios respecto a la expresión de *bcl2*, aunque si se evidenció un aumento en la expresión de *bax*. Sin embargo, tampoco se observó un aumento en la actividad caspasa 3. Se supone que, al igual que con el proceso de senescencia, se pueden llegar a observar cambios significativos si se extendiera el tratamiento con este compuesto. Respecto al tratamiento crónico con el compuesto 10, el mismo generó un descenso del 40% en la expresión del gen anti apoptótico *bcl-2* y un aumento del 30% del gen pro apoptótico *bax*. Esto generó que la relación *bax/bcl2* sea de 2,3 veces uno sobre el otro, lo que indicaría un escenario pro apoptótico respecto al control. Sumado a esta evidencia, se determinó un aumento de más del 50% de actividad caspasa 3 luego del tratamiento con este compuesto, indicando un claro escenario apoptótico. Resultados similares se obtuvieron mediante el tratamiento con distintos inhibidores de la telomerasa: en el caso del inhibidor BIBR1532 en células de leucemia linfoblástica aguda, donde se observaron aumentos en la relación *bax/bcl2* y actividad caspasa 3 luego del tratamiento crónico (Bashash D, 2013); el tratamiento con el inhibidor hTR ASODN, un oligonucleótido antisentido contra hTR, sobre células NB4 provoca un aumento en la actividad caspasa 3 (Asqhari-Kia L, 2017) ; del mismo modo, tanto el tratamiento con el BIBR1532 sobre células MDA MB 231 y MCF7, como el tratamiento con Imetelstat sobre células de cáncer pancreático, provocaron un aumento de apoptosis (Wardi L, 2014; Burchett KM 2014).

Teniendo en cuenta los resultados hasta aquí expuestos, hemos desarrollado un inhibidor novedoso de la telomerasa, proveniente de un ensayo de *screening* virtual basado en *docking* sobre el dominio PUA de la disquerina que presenta actividad inhibitoria de la telomerasa, generando acortamiento telomérico y entrada en senescencia y apoptosis (Imagen 1).

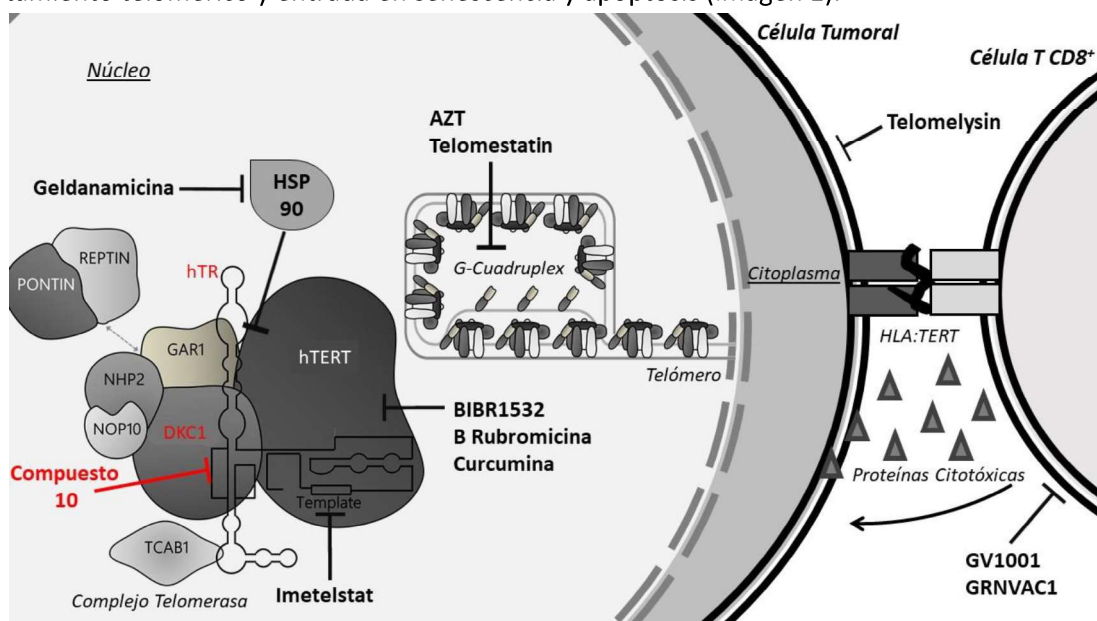


Imagen 1. Mecanismos diana de los principales inhibidores de la telomerasa reportados. En color rojo se incorpora el inhibidor desarrollado durante este trabajo con el mecanismo de acción planteado para el mismo.

Conclusión

Este capítulo consistió en la evaluación de la actividad de los compuestos obtenidos como potenciales inhibidores de la telomerasa, teniendo en cuenta que los mismos provienen de un *screening virtual* basado en *docking*, como ya se discutió anteriormente. Este salto del ensayo *in silico* a los ensayos *in vitro* constituye uno de los pasos más importantes en el diseño racional de nuevas drogas, ya que el encontrar la actividad buscada establece la base en la validación de todo el diseño experimental planteado.

Como se ha mencionado anteriormente, el principal objetivo que comparten todas las terapias antitumorales basadas en telomerasa es el de inducir selectivamente la muerte celular en las células tumorales. Este objetivo es lógico de formular teniendo en cuenta que la inmortalidad celular es uno de las características más importantes de la célula tumoral, ya sea por la capacidad replicativa ilimitada proporcionada por la telomerasa, como por la evasión del proceso de apoptosis.

A partir de la evaluación *in vitro* de los candidatos sobre la línea de adenocarcinoma mamario humano MDA MB 231, se encontró que el compuesto 10, el cual presenta características de tipo “*drug like*”, es capaz de inhibir la actividad telomerasa con una dosis similar a los inhibidores de la telomerasa que actualmente se encuentran en ensayos clínicos; provocar acortamiento telomérico e inducir la entrada en senescencia y apoptosis.

Cabe destacar que se ha utilizado una estrategia original de inhibición contra un blanco novedoso dentro del estudio de la telomerasa, ya que hasta el momento no se encuentra reportada ninguna investigación sobre inhibidores que tengan como blanco a la interacción hTR/DKC1 para desestabilizar al complejo telomerasa. Teniendo en cuenta esta información, los resultados aquí obtenidos no solo permiten dar por satisfecho el objetivo de desarrollar una terapia dirigida basada en telomerasa; sino también contribuyen con un objetivo mucho mayor: el diseño racional de nuevas drogas antitumorales.

Como producto final de este capítulo, se obtuvo un compuesto con características tipo “*drug like*” de potencial utilidad clínica, contra un blanco novedoso dentro los inhibidores de telomerasa ya existentes, y con capacidad inhibitoria de la telomerasa. El mismo es capaz de conducir a la célula hacia un proceso de senescencia y apoptosis, aportando evidencia significativa al estudio de esta enzima en el proceso tumoral.

Teniendo en cuenta el camino en el desarrollo de nuevas drogas, y los objetivos alcanzados hasta el momento, se considera que este compuesto se encuentra en condiciones de continuar con los ensayos preclínicos necesarios para caracterizar su especificidad, funcionamiento, propiedades de

tipo ADME y efectividad como terapia antitumoral en diversos modelos, a fin de demostrar su potencialidad de inserción en la clínica.

Conclusión General

El cáncer de mama sigue siendo la patología oncológica con mayor incidencia en la Argentina, presentándose como una de las enfermedades con mayor tasa de mortalidad en mujeres de entre 50 y 80 años (<http://www.msal.gov.ar/inc/>). Dentro del mismo, se pueden clasificar distintos subtipos según su perfil molecular. Entre estos grupos se encuentra el cáncer de mama triple negativo, el cual representa a un grupo heterogéneo de enfermedades, caracterizado por una variabilidad significativa en las características morfológicas y patológicas. Estos tumores carecen de los 3 marcadores terapéuticos más significativos: el receptor de crecimiento epidérmico humano tipo 2 (HER2), el receptor de estrógeno alfa (ER) y el de progesterona (PR) y son la causa de, al menos, entre el 15% y 20% de todos los tumores mamarios. Dentro de las características clínico-patológicas de este grupo se incluyen: inicio de la enfermedad en edades jóvenes; tamaño tumoral medio mayor; mayor grado e incidencia de nódulos positivos en comparación con los esperados respecto al tamaño tumoral. Adicionalmente, los pacientes con este tipo tumoral tienen una alta probabilidad de una recaída temprana luego del diagnóstico, siendo más propensos a desarrollar metástasis cerebrales y presentando mayor riesgo de muerte. Esto genera que la identificación de mejoras en la terapia adyuvante sea un foco interesante para la investigación (Perez E, 2010).

Las terapias adyuvantes para el cáncer de mama triple negativo se encuentran en constante crecimiento, debido a las características biológicas más agresivas que presenta este subtipo tumoral, y la falta de terapias dirigidas aprobadas. La quimioterapia sistémica representa el pilar principal para el tratamiento de esta patología. Si bien, por ejemplo, la quimioterapia neoadyuvante ha demostrado una alta respuesta, la mayoría de los pacientes presentan enfermedad residual con un mayor riesgo de recaída. Con el objetivo de mejorar el tratamiento para el cáncer de mama triple negativo, se están evaluando nuevas combinaciones con quimioterapia. Entre ellas se encuentran diferentes compuestos dirigidos, tales como anti angiogénicos, inhibidores de PARP y otros inhibidores del tipo “*small molecule*” (Carbognin L, 2015).

Dentro de los procesos involucrados en el desarrollo tumoral, el mantenimiento telomérico se está estudiando de manera intensiva, generando que nuestro entendimiento en lo que respecta al rol de la telomerasa en cáncer haya aumentado de manera significativa en los últimos años. Los avances en el estudio de los mecanismos por los cuales las células tumorales regulan los distintos eventos moleculares involucrados en el mantenimiento telomérico se encuentran en un período de crecimiento constante (Jafri M, 2016).

Uno de los principales interrogantes dirigidos a los inhibidores de telomerasa es si el bloqueo de la elongación telomérica es una estrategia terapéutica eficiente. Sin embargo, la gran cantidad de literatura sobre las funciones no canónicas de TERT y de otras proteínas asociadas genera una

oportunidad para la búsqueda más allá de la inhibición de la telomerasa como enzima de mantenimiento de la longitud telomérica. El estudio y/o desarrollo de drogas que definan como blanco a proteínas asociadas a la telomerasa con funciones extra teloméricas, puede proveer una gran cantidad de efectos antitumorales y eludir el efecto terapéutico tardío que es inherente a los compuestos que tienen como blanco a la telomerasa en su rol de mantención de los telómeros. TERT y disquerina son blancos atractivos para esto último teniendo en cuenta que su expresión es elevada en células tumorales en comparación con las células normales, y ambas están reportadas como participantes en funciones independientes de telómero que permiten la supervivencia y replicación de las células tumorales (Arndt G y MacKenzie K, 2016). En este sentido, junto a los resultados obtenidos en esta tesis, el estudio del AZT como droga antitumoral toma mayor relevancia, ya que el tratamiento con el mismo sobre el modelo de adenocarcinoma mamario murino F3II, provoca la regulación de dos vías de gran importancia para el desarrollo tumoral. Si bien la dosis evaluada durante este trabajo es comparativamente alta respecto a la de otros inhibidores, la misma fue determinada a raíz del efecto observado sobre la actividad telomerasa. Teniendo en cuenta que los efectos evaluados sobre la vía Wnt β -catenina y NF κ B son independientes de esta actividad, lo que resta evaluar es si a menores dosis se logra un efecto similar y determinar si el AZT efectivamente evita que TERT se una a los complejos transcripcionales de ambas vías. Además, sería interesante realizar estos ensayos en líneas de carcinoma mamario humano, como MDA MB 231, para eventualmente evaluar el efecto *in vivo* en un modelo murino xenogénico, con el objetivo de incorporar al AZT en un esquema de tratamiento combinado con otros quimioterápicos.

Para obtener una noción más profunda de la activación de la telomerasa en la carcinogénesis es necesaria mayor investigación. Sin embargo, el desarrollo de nuevas drogas dirigidas contra esta enzima se presenta como una estrategia prometedora para el tratamiento del cáncer. Teniendo en cuenta que los ensayos realizados con inhibidores de la telomerasa han resultado satisfactorios en lo que respecta a la validación del blanco, pero presentan una respuesta clínica tardía desde la administración de la droga, el tratamiento combinado de estos inhibidores con terapias ya utilizadas en la clínica abre una ventana de oportunidad para la evaluación de estas nuevas drogas, tanto en ensayos preclínicos como clínicos.

En lo que respecta a drogas antitumorales que tienen como blanco a la telomerasa, algunas de ellas plantean su uso en combinación con quimioterapias. Tal es el caso del Imetelstat, el cual ha sido evaluado en combinación con Trastuzumab sobre células de cáncer de mama her2+, obteniéndose resultados prometedores (Kozziel JE, 2015). Este inhibidor también se encuentra en un ensayo clínico en Fase II para el tratamiento combinado con Paclitaxel en cáncer de mama metastásico recurrente (NCT01256762, ClinicalTrials.gov). Por otra parte, se evaluó el efecto del inhibidor

BIBR1532 en combinación con Paclitaxel, obteniéndose un efecto sinérgico sobre la inhibición de la proliferación de células MCF7. De manera similar se evaluó el efecto del tratamiento con Telomelysin en combinación con Docetaxel, y Gemcitabina sobre distintos tipos de cáncer humano (Fujiwara T, 2012). Actualmente, si bien no son para el tratamiento de cáncer de mama, se están llevando a cabo ensayos clínicos con terapias dirigidas contra telomerasa en combinación con otros agentes quimioterápicos. Estos son los casos de GV1001 en combinación con Gemcitabina o Capecitabina para el tratamiento del cáncer pancreático o del Imetelstat en combinación con Bevacizumab para el tratamiento de NSCLC (NCT02854072; NCT01137968 Clinicaltrials.gov).

Teniendo en cuenta la información existente y los resultados obtenidos en esta tesis, actualmente disponemos de un compuesto novedoso con capacidad inhibitoria de la actividad telomerasa, el cual presentó sus efectos sobre una línea de cáncer de mama con características de tipo triple negativo. Teniendo en cuenta que este compuesto está dirigido contra un blanco que se encuentra presente en la mayoría de los tumores, resta evaluar su potencial utilidad para el tratamiento de otras estirpes tumorales. Particularmente, se trata de un compuesto de tipo *small molecule* que presenta originalidad no sólo por ser DKC1 el blanco elegido, sino también por estar diseñada para interrumpir una interacción ARN - Proteína. Los resultados nos permiten hipotetizar que el compuesto 10 resultante de este trabajo presenta un uso potencial como terapia adyuvante para el tratamiento de cáncer de mama triple negativo. El abordaje que se propone para continuar en esta línea de trabajo es, a grandes rasgos, determinar en distintos modelos el efecto *in vitro* del tratamiento sobre líneas celulares de cáncer de mama triple negativo y completar la preclínica del compuesto. En el caso de obtener resultados prometedores, se buscará evaluar el potencial sinergismo del tratamiento combinado con otros agentes ya utilizados en la clínica, con el objetivo de establecer dosis aplicables a modelos *in vivo*, como pasos previos a un eventual estudio en fase clínica.

De aquí en adelante nuestros estudios estarán dirigidos a complementar la información necesaria para afirmar esta hipótesis y, por lo tanto, contribuir al estudio de esta enzima como blanco en el desarrollo de nuevas terapias contra el cáncer.

Agradecimientos

Siempre que algún compañero se doctora, la parte que más me gusta leer son los agradecimientos. Y creo que es porque a pesar del cansancio que tenés de escribir, en este momento salís de la objetividad científica y escritura formal, estás feliz, y algo adentro tuyo quiere compartirlo con toda la gente que estuvo con vos durante todo este proceso... Y ese algo que escribís es de las cosas más genuinas y sinceras que uno puede producir. Hoy me toca a mí, y espero poder contagiar el “Gracias” gigante que siento ahora a todas las personas que están acá.

Gracias a....

Los “Danieles” por abrirme las puertas del laboratorio para desarrollar esta tesis. Gracias Daniel A. por tus aportes científicos y por siempre brindarnos una mirada fresca que nos ayudó a mejorar nuestro trabajo más de una vez. A Daniel G, “jefe”, gracias por el aguante durante estos más de 6 años! Gracias por combatir mis inseguridades, por hacerme crecer profesionalmente y por confiar en mi para llevar adelante este trabajo. A pesar de nuestras diferencias creo que logramos establecer una relación equilibrada y productiva, y esta tesis es fruto de la misma! Por muchos logros más del “*dream team telomerasa*”.

A los de “arriba”, Gi, Hernan y Marian (aunque ahora solo está Gi arriba jaja). Gracias a los tres por la ayuda y aportes que me brindaron. Particularmente, gracias Gi por las charlas y mates compartidos; Gracias Hernan por los viajes divertidos a SAIC; y Gracias Marian por intentar enseñarme cuáles son moluscos y cuáles son crustáceos jaja.

A los de “abajo”, los “oncoamigos”. Gracias por el soporte, la paciencia, las ganas, la alegría, las comidas!!... Son un grupo de personas increíbles, laboradoras, humildes, siempre dispuestas a ayudar al otro. Creo que esas cualidades son de las más difíciles de encontrar. Y por eso agradezco el haberme encontrado con este grupo de trabajo tan genial, que te contagia una sonrisa en los peores momentos, que te contiene si tenés un problema y que está formado por gente con la que se puede contar. Todos saben que soy muy maricona, y este es el momento dónde debería serlo aún peor... Pero para que no sea todo tan “Faivel”, decidí agradecerles todo lo que me llevo de ustedes en este tiempo, no tanto desde lo profesional, sino más bien con algo más personal y divertido =) :

Valita, gracias por compartir conmigo el amor por los cortos de Pixar, por los perritos bebés y por enseñarme que las rayitas de la cinta del autoclave aparecen solas y no hay que dibujarlas! Sos una gran persona y profesional, gracias por estar siempre!

Georgi, gracias por no cansarte de ir en contra de la entropía de mi persona e intentar siempre peinarme y acomodarme los breteles! Fuiste de mis primeras “profes” en el labo y siempre estuviste dispuesta a ayudarme en lo que necesité! Muchas gracias!

Juancho, si los agradecimientos tuvieran audio es obvio que estaría sonando la canción de “me gusta la gente” jaja. Gracias por soportar mis baile del perrito... y por intentar evitar que viera al gato atrapar a la paloma =)

Carloxa, fuiste mi primer maestra ciruela del cultivo... y sigo usando tu técnica para abrir los falcons y no pasarles por encima! Jaja... Gracias por cantar durante medio año “buen día con Pampers” cada vez que abríamos la puerta del labo, por ser mi compañera resctadora de gatos y por la inolvidable marcha peronista en el ukelele!!

Mari P, si hoy en día tengo más cultura política, no tengo a nadie más que agradecértelo que a vos! Tenés un ángel increíble para contagiar todo lo que sabés y generar conciencia en las personas (tanto política como estadísticamente hablando)! Sos un gran ejemplo de persona que defiende sus ideales, gracias por compartir todo eso conmigo! Y dejando un poco lo serio, sos una gran generadora de historias divertidas de Kahl Drogos en el tren, que generaron miles de carcajadas! PD: Gracias por ser co-autora de la tapa de esta tesis =)

Nazarench, compañero de doctorado desde el principio, con el que tuvimos que entregar 5 veces el formulario de matriculación a posgrado jaja. Tengo mil anécdotas con vos, pero no quiero que estos agradecimientos sean tan largos como la distancia que había hasta el mar en Dubai jaja... Gracias por ser un gran compañero, por mantenerte siempre fiel a lo que pensás y por musicalizar el labo día a día jaja...

Maruchi, oncoamiga, miembro fundador de la comunidad LOM, compañera de la vaca margarita... Sos una de las personas más importantes que me permitió conocer el labo, con la que puedo reirme hasta llorar. Sos transparente, directa, divertida y sobre todo una buena amiga en la que sé que puedo confiar para lo que necesite. Gracias por el aguante durante todos estos años, espero que sean muchísimos años más compartidos!

Hec, mi compañero de canciones de cualquier cantautor que se me ocurra! Gracias por compartir tu alegría y amistad conmigo! Sos una gran persona con la que me encanta compartir miles de cosas, con la que podría bailar sin parar y con la que sé que puedo contar “*forever and ever*”. Si la ciencia te llega a fallar, sabés que voy a estar ahí como manager de tu carrera de modelo culinario *hot* jajaja, te adoro!

Cyn, mi compañera de contabilidad y subsidios. Gracias por los mates a la mañana temprano, por las horas en el banco Nación y por odiar al ASI tanto como yo jajaja. También por haber llevado a cabo el trabajo “Efecto del número de placas por estante sobre el consumo de material de plástico estéril en un modelo de comportamiento humano” (Gulino et al, 2017), con resultados tan

prometedores jaja. Quiero que sepas que de pequeña M no tenés nada, sos una gran persona y laboradora. Ojalá podamos compartir muchos años más!

Ro, compañera de fanatismo por las cosas con forma de sandía! Jaja! Gracias por escucharme cada vez que lo necesite y ofrecerme tu ayuda una y otra vez para que yo me quede escribiendo! Espero que sepas que también podés contar conmigo para lo que necesites, tanto personal como científicamente! Y que en tu próxima fiesta todos coman mucha comida antes! Jajaja

Joy, la loca linda sin filtro jajaja. Gracias por hacerme reír más de una vez con tus salidas y por hacerme poner de todos colores mientras fui instructora jajaja. Te lo he dicho mil veces, pero lo repito, sos de las personas más frontales que conozco y eso te hace una persona en la que sé que puedo confiar. Me encanta poder compartir día a día el labo con vos y tu "outfit" de marshmallow jaja.

Juli, "él es el chico del otro lado de la barra..." Jajaja. Creo que desde el día 1 pegamos buena onda, y mientras no me sigas cargando con lo que sucedió ese día en La Plata, sé que se va a mantener por mucho tiempo más jaja. Gracias por tu compañerismo, por hacerme reír y por confiarme el cuidado del pequeño Rammus (lo escribí bien? Jaja). PD: anotaste las cosas en la planilla? =)

Nani, la chica seria...jaja. Debo confesar que me costó encontrarte la onda al principio, pero detrás de esa primera impresión de chica con pocas pulgas (lo cual es un poco cierto también, jaja), apareció una Nani copada, divertida y siempre dispuesta a ayudar! Gracias Nani!

Flor, la chica del vestido rosa jaja... Hace poquito que nos conocemos, pero no hace falta más tiempo para darme cuenta de la gran compañera que sos. Desde el primer día te preocupaste por cómo iba la escritura, me ofreciste tu ayuda y paciencia para todo lo que necesité y fuiste el primer paso para que Coco esté en casa =) Espero que podamos seguir compartiendo muchas más cosas!! Gracias Flor!

Nori y Humbert, los chicos cubanos. La parte dónde la gente dice que ustedes traen el caribe en la sangre es totalmente cierta (en Nori se nota más jaja). Gracias por las charlas, las risas, los saltitos de Humbert mientras baila y la compañía! Ah, y por enseñarme lo que quiere decir espejuelo regado! Jajaja!

Lore, la chica de la risa contagiosa. Mientras escribo, me acuerdo de vos riéndote y me causa mucha gracia! Jajaja! Gracias por la compañía, risas y por siempre estar para brindar la ayuda que sea necesaria!! Ojalá tengamos mil cosas más de que reírnos y que tu marido tenga la oportunidad de ver que no somos tan malos jajaja =)

Fuera del labo, pero dentro de la UNQ: a la gente de los labos, Yami S, Rami, Mati G, Aye C, Marian, Cin, Vicky, Facu, Marcos, Cris, Marce, a los Cronos, a todos, gracias por siempre estar dispuestos a ayudar, ya sea prestándonos algo, como brindándonos sus conocimientos o, simplemente, compartiendo un mate. Y gracias a Ale Zinni, por la buena predisposición de siempre y por ponerle magia a tus firmar de papeles de Conicet para que a todos nos salgan las becas!!

A Pablo y Maia, por ayudarme e intentar darme paz miles de veces a lo largo de esta escritura. Gracias por los consejos, por las cenas y por la paciencia! Los Quiero!

A Mati, Tade y Maca. Pasamos toda la carrera juntos, todo el doctorado y todavía Mati me sigue mirando raro cuando bailo en el pasillo jajaja. Gracias por los mates, los almuerzos, las cervezas, las risas, la compañía, los chistes contra Maqui y por seguir estando juntos después de tanto tiempo. Los quiero mucho!

A los Marte amigos, Jose, Fer, Charly, Mir, Nuni... Gracias por las comidas geniales, por crear un espacio dónde uno puede volcar el mambo que lo atormenta y los demás intentan hacerlo desaparecer. Gracias por los juegos, las risas y por hacerla enojar a Maqui cuándo le hacían comer 12 cartas en el UNO, jaja, los quiero =)

A las "Good Girls", Anas, Noe y Andre. Gracias por las juntadas, las risas, las escapadas a Cariló, las charlas por Whatsapp y todos los momentos compartidos! Las quiero!

A Andrew, por ser mi consejero a la distancia y tener siempre una palabra de aliento! Gracias por la buena onda!

A los Fabio amigos, Andre, Fabio, Cane, Simi, Andy, Bel, Sole, Romi C, Roco. Sin dudas, de mis cables a tierras preferidos. Son de las amistades más nobles que tengo y me hacen muy feliz! Gracias por estar siempre, por los mates que nunca llegan de Andre, por las palabras con "R" y canciones de Fabio, por las ocurrencias y "simpatía" de Canela, por los chistes de Simón, por la organización de juntadas de Andy, por la amistad sincera de Sole, y por los comentarios de Bel y Romi C respecto a los pilotos de Roco jaja. Respecto a vos Roquito, gracias amiga por haber estado siempre durante los últimos 11 años. Pese a nuestras diferencias gigantes al principio de nuestra relación, nuestra amistad evolucionó y hoy sos una de las personas más importantes y que más me banca! Gracias amiga! Gracias a todos por acompañarme siempre, pase lo que pase! Los adoro con todo el corazón!

A mi Familia... A mi mamá, que es el ejemplo de todo lo que me gustaría ser... El ejemplo de perseverancia, de lucha, de amor... Sos la que siempre confía en mí, la que me da su palabra de aliento, la que me enseñó a que no hay que bajar nunca los brazos y pelear por lo que uno ama, la que comparte videos en Facebook con las que lloramos las dos... Sos todo Ma, no alcanza la palabra gracias

para decirte lo que siento... Te amo! Y a Silvio, por aguantar las locuras de mi mamá y quererla tanto! Y habernos adoptado como parte de la familia! Gracias Sil, Te Quiero!!

A mi hermana, Nati Lu. Gracias por haberme bancado siempre y entender al 100% lo difícil de esta carrera que elegimos! Gracias por ser ejemplo de valores y defensa de ideales! Te quiero mucho y me pone muy orgullosa tener una hermana tan genial =) Love you Sis! Y a mi cuñita cordobés, Nata! Gracias por formar parte de esta familia y estar siempre disponible para dar una mano en lo que sea! Te quiero! Y no me olvido de mis sobrinos Chimu y Fantu! Son los mejores gatos sobrinos del mundo!

A mi primo, Gabibriel. Sos más hermano que primo, nos criamos juntos y hoy en día te convertiste en un gran hombre y persona! Gracias por creer que porque entendía matemática tenía un super cerebro jaja, y por estar siempre que te necesité! Te adoro hasta el infinito y más allá!

A mi abuelo, Lelo. Podría copiar y pegar lo que pienso de mamá en esta parte, porque realmente te salió igualita a vos. Fuiste nuestro abuelo y papá al mismo tiempo, nos criaste, enseñaste, jugaste, consentiste... y todo el amor y paciencia que nos brindaste hacen que hoy los 3 seamos personas felices y de bien. Sos otro Gracias gigante que sé que no alcanza con escribirlo! Te Quiero Mucho Lelito!

A mi abuela, Lela. Casi no viviste nada de toda esta etapa doctoral, te fuiste mucho antes de lo que todos esperábamos. Pero también fuiste un pilar más que importante en mi vida, y sé que hoy desde arriba estás mirándome, probablemente rodeada de perritos “cachos de carne” y cuidándome como siempre. Esto en parte también es tuyo. Gracias por todo Lelita! Te quiero!

A mi Tio, el Tio Ten, que aunque no compartamos mucho tiempo juntos, cada vez que pudiste me preguntaste por cómo iba mi trabajo y mi vida. Gracias por hacerme reír con tus chiste constantes! Te quiero!

A mis mascotas, Frida, Coco y Miau, que aún sin hablar me hicieron el aguante todas las tardes al lado de la compu, me llenaron de besos cada vez que paraba de escribir y me ayudan a bajar mil cambios cada vez que me escapaba de la tesis y me tiraba en el sillón =)

Llegó tu turno, “Diego Boss”. Tuviste la capacidad rescatista en dos momentos claves de este último tiempo, y por eso el agradecimiento es doble. El primero fue apenas empecé este doctorado, cuando llegaste a meterle onda a una Romi llena de dudas, con un kit de Millipore del infierno, y con más miedos que certezas. Gracias por haber cumplido el rol de co-director desde el día 1, y no cansarte de hacerme ver las cosas de una forma más positiva cuando creo que todo está mal. (AVISO: Viene un momento Cursi jaja). La segunda vez fue hace casi 2 años, cuando nos elegimos para ser compañeros de ruta. Cada uno veía con su mochila, frustraciones, miedos y mambos, pero nada de eso logró

empañar la visión que teníamos de nosotros 2 juntos. No hace falta ni recordarte la cantidad de obstáculos que nos tocó superar, pero no hubo ni uno en el que me haya sentido sola, y eso no tiene precio para mí. Gracias por elegirme, por confiar, por ser mi compañero en todo, por cuidarme y por quererme de una manera tan sana. Mi mayor deseo es que podamos cumplir este proyecto de familia que encaramos juntos, y llegar a ser compañeros de aventura como los viejitos de UP jaja. Te amo mucho!

Por último, aunque no por eso menos importante, quiero agradecer a la Universidad Nacional de Quilmes. Llegué hasta ella en el 2007 con muchos miedos y expectativas. Y con lo que me encontré fue con una universidad pública hermosa, cuidada, llena de gente copada, profesores altamente calificados y dispuestos a enseñar dando lo mejor de sí mismos. La universidad me permitió completar mi carrera de grado, con una calidad docente, de contenidos, y material a los que sé que no todos los estudiantes universitarios tienen acceso. La misma oportunidad se me volvió a brindar para realizar mi carrera de posgrado, inclusive dándome la chance de convertirme en docente UNQ y poder devolver un poco de todo lo que esta universidad me dio. Creo que cualquier persona que decida empezar una carrera universitaria, tiene derecho a tener la misma experiencia que yo tuve en la UNQ. Y sé que como egresada y científica de la universidad pública, es nuestro deber el de contagiar la idea de defensa de estas oportunidades que son de todos. Así que agradezco a todos aquellos que trabajan, luchan y me hicieron tomar conciencia sobre lo importante que es defender la Educación Pública y a la Ciencia Argentina, y espero que, cada uno desde su lugar y con lo que pueda aportar, se pueda ir sumando a esta tarea.



Anexo

Gen	Secuencia nucleotídica		Concentración Final	Perfil de Ciclado	
<i>Bactina</i> (R)	Fwd	5' CAAgATCATTgCTCCTCCTg	3'	400 nM	A
	Rev	5' AgCACTTgCggTgCACgATg	3'	400 nM	
<i>cyc-d1</i> (R)	Fwd	5' AgTgCgTgCAGAAggAgATTg	3'	400 nM	A
	Rev	5' TAGTTCATgGCCAgCgggAAg	3'	400 nM	
<i>c-myc</i> (R)	Fwd	5' CCTTTgggCgTTggAAACC	3'	400 nM	A
	Rev	5' TCgTCgCAGATgAAATAggg	3'	400 nM	
<i>tert</i> (R)	Fwd	5' gAgCCTCACCTTCCAgAgTg	3'	900 nM	A
	Rev	5' TgACACTTCAACCgCAAgAC	3'	900 nM	
<i>il6</i> (R)	Fwd	5' CCggAgAggAgACTTCACAg	3'	300 nM	A
	Rev	5' TCCACgATTTCCCAgAgAAC	3'	300 nM	
<i>tnf-α</i>	Fwd	5' TTTCACTCACTggCCCAAgg	3'	500 nM	A
	Rev	5' TCgCggATCATgCTTTCTg	3'	500 nM	
Actividad Telomerasa	ACX	5' gCgCggCTTACCCTTACCCTTACCCTAACC	3'	250 nM	C
	TS	5' AATCCgTCgAgCAGAgTT	3'	800 nM	
Longitud Telomérica	Fwd	5' CggTTTgTTTgggTTTgggTTTgggTTTgggTTTgggTT	3'	500 nM	B
	Rev	5' ggCTTgCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT	3'	500 nM	
<i>rplp0</i> (H)	Fwd	5' CAgCAAgtgggaAggTgTAATCC	3'	250 nM	B
	Rev	5' CCCATTCTATCATCAACgggTACAA	3'	250 nM	
<i>gbl1</i> (H)	Fwd	5' CCACgATCgAgCATATgTTg	3'	900 nM	A
	Rev	5' CAgAgTggCTCCAgCTTTC	3'	900 nM	
<i>p16ink4a</i> (H)	Fwd	5' gCgATgTCgCACggTACCTg	3'	600 nM	A
	Rev	5' ggCATggTTACTgCCTCTgg	3'	600 nM	
<i>bax</i> (H) ¹	Fwd	5' ggCCgggTTgTCgCCCTTTT	3'	500 nM	A
	Rev	5' CCgCTCCCGgAggAAgTCCA	3'	500 nM	
<i>bcl2</i> (H) ²	Fwd	5' ggATgCCTTTgTggAACTgTAC	3'	125 nM	A
	Rev	5' TTCACTTgTggCCCAGATAgg	3'	125 nM	
<i>hprt1</i> (H) ³	Fwd	5' AACgTCTTgCTCgAgATgTg	3'	300 nM	A
	Rev	5' gCTTTgATgTAATCCAAGCagg	3'	300 nM	

Tabla 1. Secuencias y Condiciones de Reacción de los primers utilizados. (R) Ratón. (H) Humano. ¹ Primers diseñados y puestos a punto por la Licenciada Marina Pifano. ² Primers diseñados y puestos a punto por la Dra. Maia Cabrera (Cabrera M, 2017). ³ Primers diseñados y puestos a punto por el Licenciado Hector Cuello).

En la Figura 1 se observan los perfiles de ciclado utilizados. En la Figura 2 se encuentran los valores de eficiencia para cada gen analizado. Para los genes *Bactina*, *c-myc*, *cyc-d1*, *tnf-α*, *il6*, y *gbl1* las diluciones seriadas utilizadas fueron 1/10, tomando como punto de inicio 1µl de ADNc realizado a partir de 1µg de ARN. Para el gen *p16ink4a*, se realizaron diluciones 1/5, con el mismo punto de inicio. En el caso de la determinación de actividad telomerasa, se realizaron diluciones seriadas 1/10, tomando como punto de inicio 2µl de lisado proteico correspondiente a 1000 células. Respecto a la determinación del gen *rplp0*, se realizaron diluciones seriadas 1/10, tomando como punto de inicio 1µl que contenía 10⁸ copias de este gen. Para el caso de longitud telomérica, se utilizaron diluciones seriadas 1/5, considerando como punto de inicio 1µl de un stock de ADNg 10 ng/µl.

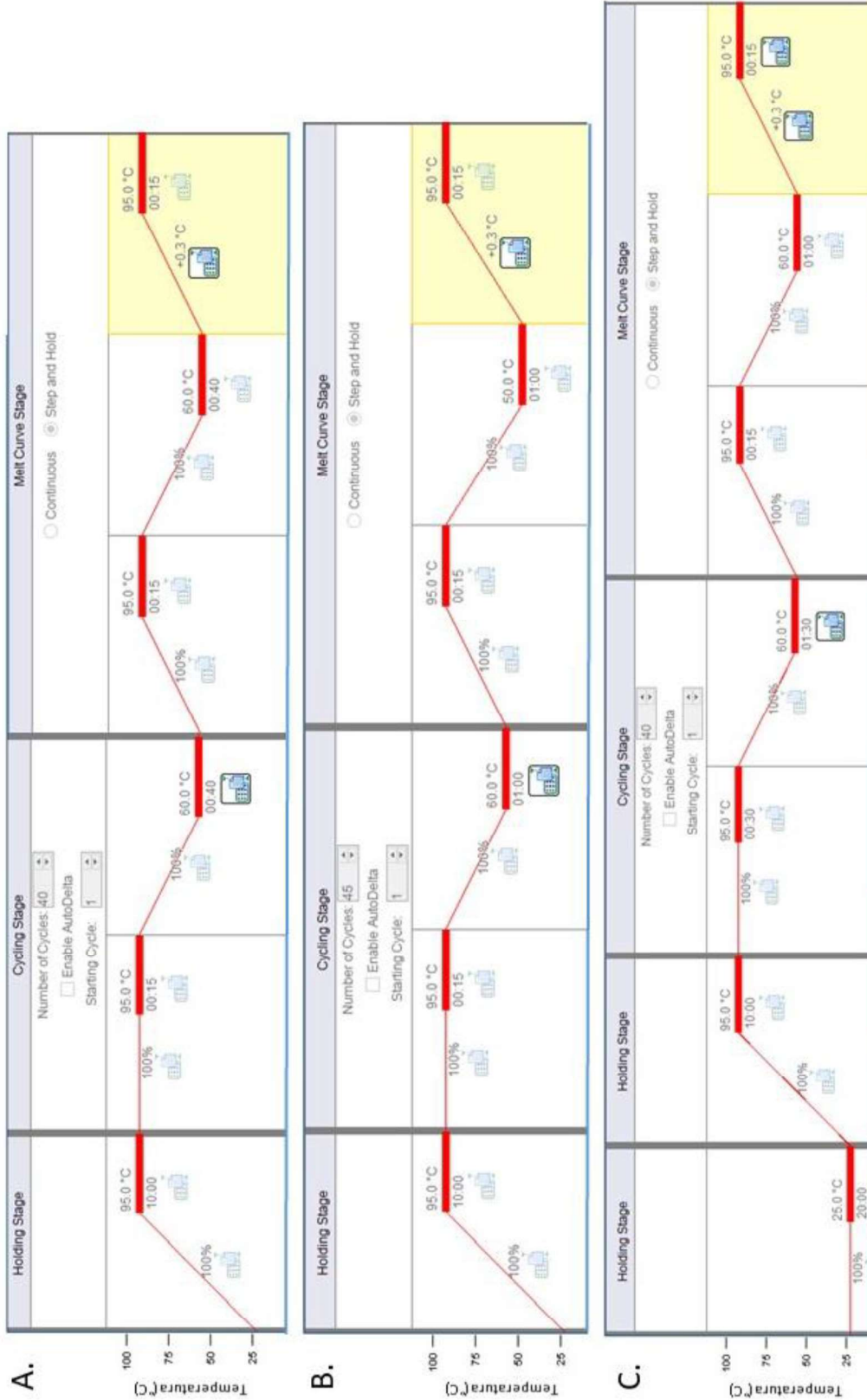


Figura 1. Perfiles de ciclado utilizados.

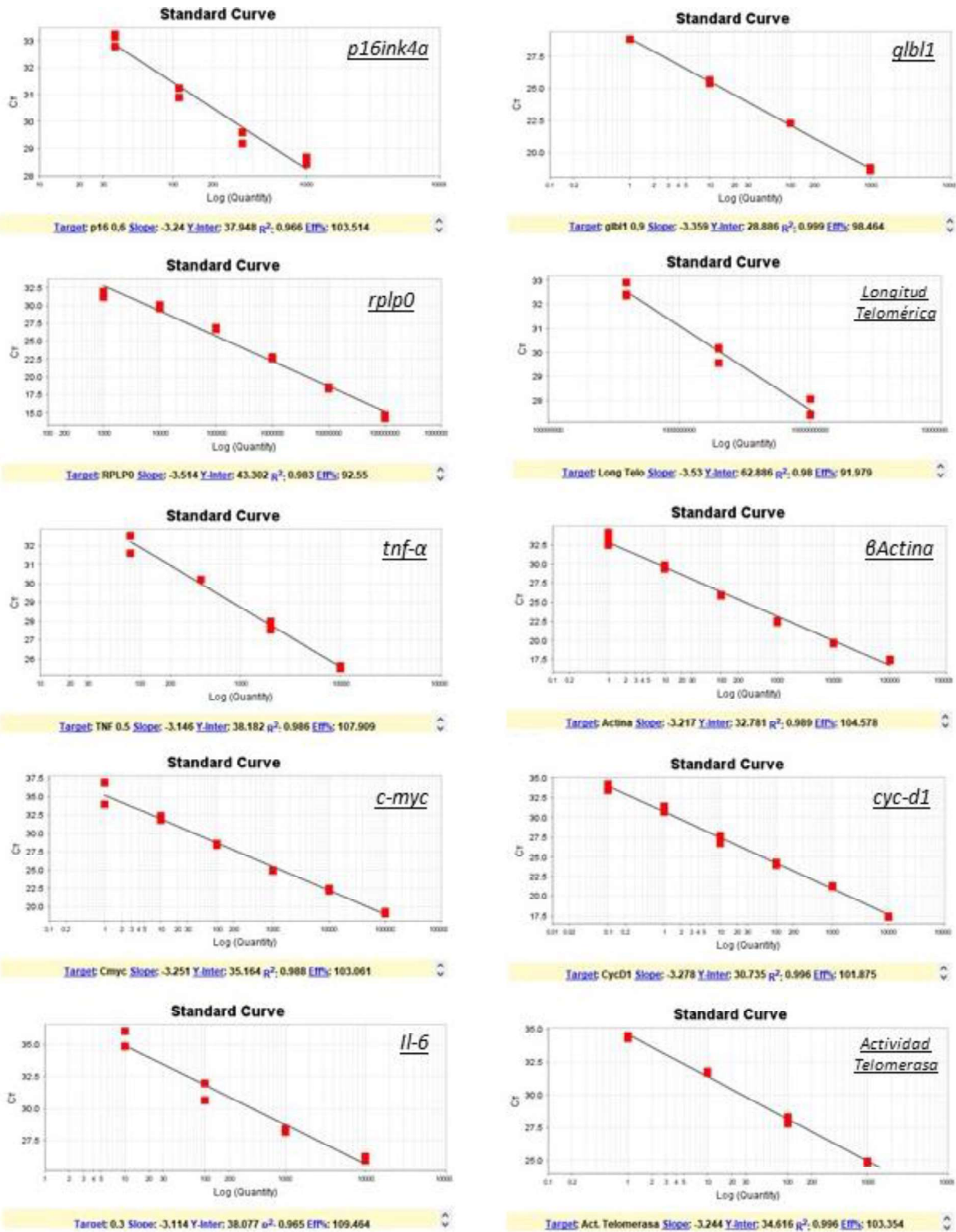


Figura 2. Curvas de eficiencia para los distintos genes evaluados.

Bibliografía

(18/12/17). "Base de Datos de Ensayos Clínicos." Retrieved Diciembre, 2017, from <https://clinicaltrials.gov/>.

A.S., N. and D. D.S. (2009). *Anticancer Drug Development. Pharmaceutical Perspectives of Cancer Therapeutics*. L. Y. and M. R. Nueva York, Springer.

Abbas, T. and A. Dutta (2009). "p21 in cancer: intricate networks and multiple activities." *Nat Rev Cancer* 9(6): 400-414.

Abdelmonsef, A. H., R. Dulapalli, T. Dasari, L. S. Padmarao, T. Mukkera and U. Vuruputuri (2016). "Identification of Novel Antagonists for Rab38 Protein by Homology Modeling and Virtual Screening." *Comb Chem High Throughput Screen* 19(10): 875-892.

Alam, M. S. and D. U. Lee (2016). "Synthesis, biological evaluation, drug-likeness, and in silico screening of novel benzylidene-hydrazone analogues as small molecule anticancer agents." *Arch Pharm Res* 39(2): 191-201.

Alter, B. P., N. Giri, S. A. Savage and P. S. Rosenberg (2009). "Cancer in dyskeratosis congenita." *Blood* 113(26): 6549-6557.

Altschul, S. F., Wootton, J. C., Gertz, E. M., Agarwala, R., Morgulis, A., Schäffer, A. A., & Yu, Y. K. (2005). Protein database searches using compositionally adjusted substitution matrices. *The FEBS journal*, 272(20), 5101-5109.

Allsopp, R. C. and C. B. Harley (1995). "Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts." *Exp Cell Res* 219(1): 130-136.

Angrisani, A., R. Vicidomini, M. Turano and M. Furia (2014). "Human dyskerin: beyond telomeres." *Biol Chem* 395(6): 593-610.

Armando, R. G., D. M. Gomez and D. E. Gomez (2016). "AZT exerts its antitumoral effect by telomeric and non-telomeric effects in a mammary adenocarcinoma model." *Oncol Rep* 36(5): 2731-2736.

Arndt, G. M. and K. L. MacKenzie (2016). "New prospects for targeting telomerase beyond the telomere." *Nat Rev Cancer* 16(8): 508-524.

Artese, A., G. Costa, F. Ortuso, L. Parrotta and S. Alcaro (2013). "Identification of new natural DNA G-quadruplex binders selected by a structure-based virtual screening approach." *Molecules* 18(10): 12051-12070.

Asghari-Kia, L., D. Bashash, A. Safaroghli-Azar, M. Momeny, M. Hamidpour and S. H. Ghaffari (2017). "Targeting human telomerase RNA component using antisense oligonucleotide induces rapid cell death and increases ATO-induced apoptosis in APL cells." *Eur J Pharmacol* 809: 215-223.

Banin Hirata, B. K., J. M. Oda, R. Losi Guembarovski, C. B. Ariza, C. E. de Oliveira and M. A. Watanabe (2014). "Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior." *Dis Markers* 2014: 513158.

Barma, D. K., A. Elayadi, J. R. Falck and D. R. Corey (2003). "Inhibition of telomerase by BIBR 1532 and related analogues." *Bioorg Med Chem Lett* 13(7): 1333-1336.

Bashash, D., S. H. Ghaffari, R. Mirzaee, K. Alimoghaddam and A. Ghavamzadeh (2013). "Telomerase inhibition by non-nucleosidic compound BIBR1532 causes rapid cell death in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells." *Leuk Lymphoma* 54(3): 561-568.

Bashash, D., S. H. Ghaffari, F. Zaker, M. Kazerani, K. Hezave, S. Hassani, M. Rostami, K. Alimoghaddam and A. Ghavamzadeh (2013). "BIBR 1532 increases arsenic trioxide-mediated apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells: therapeutic potential for APL." *Anticancer Agents Med Chem* 13(7): 1115-1125.

Bashash, D., M. Zareii, A. Safaroghli-Azar, M. D. Omrani and S. H. Ghaffari (2017). "Inhibition of telomerase using BIBR1532 enhances doxorubicin-induced apoptosis in pre-B acute lymphoblastic leukemia cells." *Hematology* 22(6): 330-340.

Baumann, P. and C. Price (2010). "Pot1 and telomere maintenance." *FEBS Lett* 584(17): 3779-3784.

Beltz, L., R. Moran, O. Elsayy, J. Sadler and J. Jurgenson (1999). "The effects of telomerase inhibitors on lymphocyte function." *Anticancer Res* 19(4B): 3205-3211.

Berardinelli, F., E. Coluzzi, A. Sgura and A. Antocchia (2017). "Targeting telomerase and telomeres to enhance ionizing radiation effects in in vitro and in vivo cancer models." *Mutat Res* 773: 204-219.

Bernadotte, A., V. M. Mikhelson and I. M. Spivak (2016). "Markers of cellular senescence. Telomere shortening as a marker of cellular senescence." *Aging (Albany NY)* 8(1): 3-11.

Bhushan, B. and L. Kush (2014). "Pharmacophoric studies of anti-telomerase drugs." *International Journal of Innovative Research and Development*.

Bianchi, A., R. M. Stansel, L. Fairall, J. D. Griffith, D. Rhodes and T. de Lange (1999). "TRF1 binds a bipartite telomeric site with extreme spatial flexibility." *EMBO J* 18(20): 5735-5744.

Billones, J. B., M. C. Carrillo, V. G. Organo, J. B. Sy, N. A. Clavio, S. J. Macalino, I. A. Emnacen, A. P. Lee, P. K. Ko and G. P. Concepcion (2017). "In silico discovery and in vitro activity of inhibitors against *Mycobacterium tuberculosis* 7,8-diaminopelargonic acid synthase (Mtb BioA)." *Drug Des Devel Ther* 11: 563-574.

Bodnar, A. G., M. Ouellette, M. Frolkis, S. E. Holt, C. P. Chiu, G. B. Morin, C. B. Harley, J. W. Shay, S. Lichtsteiner and W. E. Wright (1998). "Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells." *Science* 279(5349): 349-352.

Bretones, G., M. D. Delgado and J. Leon (2015). "Myc and cell cycle control." *Biochim Biophys Acta* 1849(5): 506-516.

Bunnage, M. (2011). "Getting pharmaceutical R&D back on target." *Nature Chemical Biology* 7.

Burchett, K. M., Y. Yan and M. M. Ouellette (2014). "Telomerase inhibitor Imetelstat (GRN163L) limits the lifespan of human pancreatic cancer cells." *PLoS One* 9(1): e85155.

Cabrera, M., E. Echeverria, F. R. Lenicov, G. Cardama, N. Gonzalez, C. Davio, N. Fernandez and P. L. Menna (2017). "Pharmacological Rac1 inhibitors with selective apoptotic activity in human acute leukemic cell lines." *Oncotarget* 8(58): 98509-98523.

- Cai, Y., V. Kandula, R. Kosuru, X. Ye, M. G. Irwin and Z. Xia (2017). "Decoding telomere protein Rap1: Its telomeric and nontelomeric functions and potential implications in diabetic cardiomyopathy." *Cell Cycle* 16(19): 1765-1773.
- Campisi, J. (1997). "The biology of replicative senescence." *Eur J Cancer* 33(5): 703-709.
- Carbognin, L., J. Furlanetto, C. Vicentini, R. Nortilli, S. Pilotto, M. Brunelli, F. Pellini, G. P. Pollini, E. Bria and G. Tortora (2015). "Neoadjuvant strategies for triple negative breast cancer: 'state-of-the-art' and future perspectives." *Anticancer Agents Med Chem* 15(1): 15-25.
- Cardama, G. A., M. J. Comin, L. Hornos, N. Gonzalez, L. Defelipe, A. G. Turjanski, D. F. Alonso, D. E. Gomez and P. L. Menna (2014). "Preclinical development of novel Rac1-GEF signaling inhibitors using a rational design approach in highly aggressive breast cancer cell lines." *Anticancer Agents Med Chem* 14(6): 840-851.
- Cawthon, R. M. (2002). "Telomere measurement by quantitative PCR." *Nucleic Acids Res* 30(10): e47.
- Cerni, C. (2000). "Telomeres, telomerase, and myc. An update." *Mutat Res* 462(1): 31-47.
- Cerrudo, C. S., P. D. Ghiringhelli and D. E. Gomez (2014). "Protein universe containing a PUA RNA-binding domain." *FEBS J* 281(1): 74-87.
- Cohen, S. B., M. E. Graham, G. O. Lovrecz, N. Bache, P. J. Robinson and R. R. Reddel (2007). "Protein composition of catalytically active human telomerase from immortal cells." *Science* 315(5820): 1850-1853.
- Collins, I. and P. Workman (2006). "New approaches to molecular cancer therapeutics." *Nat Chem Biol* 2(12): 689-700.
- Coppe, J. P., C. K. Patil, F. Rodier, Y. Sun, D. P. Munoz, J. Goldstein, P. S. Nelson, P. Y. Desprez and J. Campisi (2008). "Senescence-associated secretory phenotypes reveal cell-nonautonomous functions of oncogenic RAS and the p53 tumor suppressor." *PLoS Biol* 6(12): 2853-2868.
- Cunningham, A. P., W. K. Love, R. W. Zhang, L. G. Andrews and T. O. Tollefsbol (2006). "Telomerase inhibition in cancer therapeutics: molecular-based approaches." *Curr Med Chem* 13(24): 2875-2888.
- Chaklader, M., P. Das, J. A. Pereira, A. Law, S. Chattopadhyay, R. Chatterjee, A. Mondal and S. Law (2012). "17-AAG mediated targeting of Hsp90 limits tert activity in peritoneal sarcoma related malignant ascites by downregulating cyclin D1 during cell cycle entry." *Exp Oncol* 34(2): 90-96.
- Chakraborty, S., U. Ghosh, N. P. Bhattacharyya, R. K. Bhattacharya and M. Roy (2006). "Inhibition of telomerase activity and induction of apoptosis by curcumin in K-562 cells." *Mutat Res* 596(1-2): 81-90.
- Chen, C. H. and R. J. Chen (2011). "Prevalence of telomerase activity in human cancer." *J Formos Med Assoc* 110(5): 275-289.
- Chen, D., J. Huang, K. Zhang, B. Pan, J. Chen, W. De, R. Wang and L. Chen (2014). "MicroRNA-451 induces epithelial-mesenchymal transition in docetaxel-resistant lung adenocarcinoma cells by targeting proto-oncogene c-Myc." *Eur J Cancer* 50(17): 3050-3067.

- Chen, R. J., P. H. Wu, C. T. Ho, T. D. Way, M. H. Pan, H. M. Chen, Y. S. Ho and Y. J. Wang (2017). "P53-dependent downregulation of hTERT protein expression and telomerase activity induces senescence in lung cancer cells as a result of pterostilbene treatment." *Cell Death Dis* 8(8): e2985.
- Chen, Y., Y. Yang, M. van Overbeek, J. R. Donigian, P. Baciú, T. de Lange and M. Lei (2008). "A shared docking motif in TRF1 and TRF2 used for differential recruitment of telomeric proteins." *Science* 319(5866): 1092-1096.
- Cheng, T., Q. Li, Z. Zhou, Y. Wang and S. H. Bryant (2012). "Structure-based virtual screening for drug discovery: a problem-centric review." *AAPS J* 14(1): 133-141.
- Cheung, D. H., H. F. Kung, J. J. Huang and P. C. Shaw (2012). "PinX1 is involved in telomerase recruitment and regulates telomerase function by mediating its localization." *FEBS Lett* 586(19): 3166-3171.
- Chiba, S., T. Ishida, K. Ikeda, M. Mochizuki, R. Teramoto, Y. H. Taguchi, M. Iwadate, H. Umeyama, C. Ramakrishnan, A. M. Thangakani, D. Velmurugan, M. M. Gromiha, T. Okuno, K. Kato, S. Minami, G. Chikenji, S. D. Suzuki, K. Yanagisawa, W. H. Shin, D. Kihara, K. Z. Yamamoto, Y. Moriwaki, N. Yasuo, R. Yoshino, S. Zozulya, P. Borysko, R. Stavniichuk, T. Honma, T. Hirokawa, Y. Akiyama and M. Sekijima (2017). "An iterative compound screening contest method for identifying target protein inhibitors using the tyrosine-protein kinase Yes." *Sci Rep* 7(1): 12038.
- Chong, L., B. van Steensel, D. Broccoli, H. Erdjument-Bromage, J. Hanish, P. Tempst and T. de Lange (1995). "A human telomeric protein." *Science* 270(5242): 1663-1667.
- Chung, W. J., B. Heddi, M. Tera, K. Iida, K. Nagasawa and A. T. Phan (2013). "Solution structure of an intramolecular (3 + 1) human telomeric G-quadruplex bound to a telomestatin derivative." *J Am Chem Soc* 135(36): 13495-13501.
- Datta, A., M. Bellon, U. Sinha-Datta, A. Bazarbachi, Y. Lepelletier, D. Canioni, T. A. Waldmann, O. Hermine and C. Nicot (2006). "Persistent inhibition of telomerase reprograms adult T-cell leukemia to p53-dependent senescence." *Blood* 108(3): 1021-1029.
- De Clercq, E. (2009). "The history of antiretrovirals: key discoveries over the past 25 years." *Rev Med Virol* 19(5): 287-299.
- de Lange, T. (2005). "Shelterin: the protein complex that shapes and safeguards human telomeres." *Genes Dev* 19(18): 2100-2110.
- Del Prete, A., P. Allavena, G. Santoro, R. Fumarulo, M. M. Corsi and A. Mantovani (2011). "Molecular pathways in cancer-related inflammation." *Biochem Med (Zagreb)* 21(3): 264-275.
- Deng, Y., S. S. Chan and S. Chang (2008). "Telomere dysfunction and tumour suppression: the senescence connection." *Nat Rev Cancer* 8(6): 450-458.
- Deng, Z., J. Dheekollu, D. Broccoli, A. Dutta and P. M. Lieberman (2007). "The origin recognition complex localizes to telomere repeats and prevents telomere-circle formation." *Curr Biol* 17(22): 1989-1995.

- Deng, Z., J. Norseen, A. Wiedmer, H. Riethman and P. M. Lieberman (2009). "TERRA RNA binding to TRF2 facilitates heterochromatin formation and ORC recruitment at telomeres." *Mol Cell* 35(4): 403-413.
- DeVita, V. T., Jr. and E. Chu (2008). "A history of cancer chemotherapy." *Cancer Res* 68(21): 8643-8653.
- Dhaene, K., E. Van Marck and R. Parwaresch (2000). "Telomeres, telomerase and cancer: an up-date." *Virchows Arch* 437(1): 1-16.
- Ding, D., J. Zhou, M. Wang and Y. S. Cong (2013). "Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer." *FEBS J* 280(14): 3205-3211.
- Disney, M. D., I. Yildirim and J. L. Childs-Disney (2014). "Methods to enable the design of bioactive small molecules targeting RNA." *Org Biomol Chem* 12(7): 1029-1039.
- Dokal, I. (2011). "Dyskeratosis congenita." *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2011: 480-486.
- Du, H., J. R. Brender, J. Zhang and Y. Zhang (2015). "Protein structure prediction provides comparable performance to crystallographic structures in docking-based virtual screening." *Methods* 71: 77-84.
- E, B. D. K. J., P. L and A. D (2008). *Biología tumoral: claves celulares y moleculares del cáncer.*, EUDEBA.
- Falcone, A., M. Lencioni, I. Brunetti, E. Pfanner, G. Allegrini, A. Antonuzzo, M. Andreuccetti, G. Malvaldi, R. Danesi, M. Del Tacca and P. F. Conte (1997). "Maximum tolerable doses of intravenous zidovudine in combination with 5-fluorouracil and leucovorin in metastatic colorectal cancer patients. Clinical evidence of significant antitumor activity and enhancement of zidovudine-induced DNA single strand breaks in peripheral nuclear blood cells." *Ann Oncol* 8(6): 539-545.
- Falchetti, A., A. Franchi, C. Bordi, C. Mavilia, L. Masi, F. Cioppi, R. Recenti, L. Picariello, F. Marini, F. Del Monte, V. Ghinoi, V. Martinetti, A. Tanini and M. L. Brandi (2005). "Azidothymidine induces apoptosis and inhibits cell growth and telomerase activity of human parathyroid cancer cells in culture." *J Bone Miner Res* 20(3): 410-418.
- Fang, J. L. and F. A. Beland (2009). "Long-term exposure to zidovudine delays cell cycle progression, induces apoptosis, and decreases telomerase activity in human hepatocytes." *Toxicol Sci* 111(1): 120-130.
- Fang, J. L., L. J. McGarrity and F. A. Beland (2009). "Interference of cell cycle progression by zidovudine and lamivudine in NIH 3T3 cells." *Mutagenesis* 24(2): 133-141.
- Feng, J., W. D. Funk, S. S. Wang, S. L. Weinrich, A. A. Avilion, C. P. Chiu, R. R. Adams, E. Chang, R. C. Allsopp, J. Yu and et al. (1995). "The RNA component of human telomerase." *Science* 269(5228): 1236-1241.
- Ferlay, J., E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman and F. Bray (2013). "Cancer incidence and mortality patterns in Europe: estimates for 40 countries in 2012." *Eur J Cancer* 49(6): 1374-1403.
- Frink, R. E., M. Peyton, J. H. Schiller, A. F. Gazdar, J. W. Shay and J. D. Minna (2016). "Telomerase inhibitor imetelstat has preclinical activity across the spectrum of non-small cell lung cancer oncogenotypes in a telomere length dependent manner." *Oncotarget* 7(22): 31639-31651.

- Fujiwara, T., S. Kagawa and H. Tazawa (2012). "Synergistic interaction of telomerase-specific oncolytic virotherapy and chemotherapeutic agents for human cancer." *Curr Pharm Biotechnol* 13(9): 1809-1816.
- Gauthier, L. R., C. Granotier, J. C. Soria, S. Faivre, V. Boige, E. Raymond and F. D. Boussin (2001). "Detection of circulating carcinoma cells by telomerase activity." *Br J Cancer* 84(5): 631-635.
- Ghosh, A., G. Saginc, S. C. Leow, E. Khattar, E. M. Shin, T. D. Yan, M. Wong, Z. Zhang, G. Li, W. K. Sung, J. Zhou, W. J. Chng, S. Li, E. Liu and V. Tergaonkar (2012). "Telomerase directly regulates NF-kappaB-dependent transcription." *Nat Cell Biol* 14(12): 1270-1281.
- Ghosh, S. K., C. Wood, L. H. Boise, A. M. Mian, V. V. Deyev, G. Feuer, N. L. Toomey, N. C. Shank, L. Cabral, G. N. Barber and W. J. Harrington, Jr. (2003). "Potentiation of TRAIL-induced apoptosis in primary effusion lymphoma through azidothymidine-mediated inhibition of NF-kappa B." *Blood* 101(6): 2321-2327.
- Gomez, D., A. Kassim and O. Olivero (1995). "Preferential incorporation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (azt) in telomeric sequences of cho cells." *Int J Oncol* 7(5): 1057-1060.
- Gomez, D., T. Wenner, B. Brassart, C. Douarre, M. F. O'Donohue, V. El Khoury, K. Shin-Ya, H. Morjani, C. Trentesaux and J. F. Riou (2006). "Telomestatin-induced telomere uncapping is modulated by POT1 through G-overhang extension in HT1080 human tumor cells." *J Biol Chem* 281(50): 38721-38729.
- Gomez, D. E., R. G. Armando and D. F. Alonso (2012). "AZT as a telomerase inhibitor." *Front Oncol* 2: 113.
- Gomez, D. E., A. M. Tejera and O. A. Olivero (1998). "Irreversible telomere shortening by 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine (AZT) treatment." *Biochem Biophys Res Commun* 246(1): 107-110.
- Gong, Y. and T. de Lange (2010). "A Shld1-controlled POT1a provides support for repression of ATR signaling at telomeres through RPA exclusion." *Mol Cell* 40(3): 377-387.
- Green, D. R. and F. Llambi (2015). "Cell Death Signaling." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7(12).
- Gurung, R. L., S. N. Lim, G. K. Low and M. P. Hande (2014). "MST-312 Alters Telomere Dynamics, Gene Expression Profiles and Growth in Human Breast Cancer Cells." *J Nutrigenet Nutrigenomics* 7(4-6): 283-298.
- Halim, S. A., S. Khan, A. Khan, A. Wadood, F. Mabood, J. Hussain and A. Al-Harrasi (2017). "Targeting Dengue Virus NS-3 Helicase by Ligand based Pharmacophore Modeling and Structure based Virtual Screening." *Front Chem* 5: 88.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* 144(5): 646-674.
- Harley, C. B., A. B. Futcher and C. W. Greider (1990). "Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts." *Nature* 345(6274): 458-460.
- Hassani, S., S. H. Ghaffari, F. Zaker, R. Mirzaee, H. Mardani, D. Bashash, A. Zekri, M. Yousefi, A. Zaghal, K. Alimoghaddam and A. Ghavamzadeh (2013). "Azidothymidine hinders arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells by induction of p21 and attenuation of G2/M arrest." *Ann Hematol* 92(9): 1207-1220.

- Hoelder, S., P. A. Clarke and P. Workman (2012). "Discovery of small molecule cancer drugs: successes, challenges and opportunities." *Mol Oncol* 6(2): 155-176.
- Holen, I., V. Speirs, B. Morrissey and K. Blyth (2017). "In vivo models in breast cancer research: progress, challenges and future directions." *Dis Model Mech* 10(4): 359-371.
- Hsiao, S. J. and S. Smith (2008). "Tankyrase function at telomeres, spindle poles, and beyond." *Biochimie* 90(1): 83-92.
- Hu, Y., D. Bobb, J. He, D. A. Hill and J. S. Dome (2015). "The HSP90 inhibitor alvespimycin enhances the potency of telomerase inhibition by imetelstat in human osteosarcoma." *Cancer Biol Ther* 16(6): 949-957.
- Huang, P. R., Y. M. Yeh and T. C. Wang (2005). "Potent inhibition of human telomerase by helenalin." *Cancer Lett* 227(2): 169-174.
- Jafri, M. A., S. A. Ansari, M. H. Alqahtani and J. W. Shay (2016). "Roles of telomeres and telomerase in cancer, and advances in telomerase-targeted therapies." *Genome Med* 8(1): 69.
- Jager, K. and M. Walter (2016). "Therapeutic Targeting of Telomerase." *Genes (Basel)* 7(7).
- Janouskova, E., I. Necasova, J. Pavlouskova, M. Zimmermann, M. Hluchy, V. Marini, M. Novakova and C. Hofr (2015). "Human Rap1 modulates TRF2 attraction to telomeric DNA." *Nucleic Acids Res* 43(5): 2691-2700.
- Jeitany, M., D. Bakhos-Douaihy, D. C. Silvestre, J. R. Pineda, N. Ugolin, A. Moussa, L. R. Gauthier, D. Busso, M. P. Junier, H. Chneiweiss, S. Chevillard, C. Desmaze and F. D. Boussin (2017). "Opposite effects of GCN5 and PCAF knockdowns on the alternative mechanism of telomere maintenance." *Oncotarget* 8(16): 26269-26280.
- Jeng, K. S., I. S. Sheen and W. J. Jeng (2011). "Azidothymidine treatment of hepatocellular carcinoma in rats: an in vivo study of telomerase inhibition." *Hepatogastroenterology* 58(112): 2091-2096.
- Ji, H. J., S. Y. Rha, H. C. Jeung, S. H. Yang, S. W. An and H. C. Chung (2005). "Cyclic induction of senescence with intermittent AZT treatment accelerates both apoptosis and telomere loss." *Breast Cancer Res Treat* 93(3): 227-236.
- Jin, R. R., R. Chao, Y. M. Xi, C. Chen, H. Y. Chu, M. Li and H. Zhang (2012). "[Effects of AZT on leukemia cell line KG-1a proliferation and telomerase activity]." *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* 20(2): 277-281.
- Jordheim, L. P., D. Durantel, F. Zoulim and C. Dumontet (2013). "Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases." *Nat Rev Drug Discov* 12(6): 447-464.
- Kanwal, S., F. Jamil, A. Ali and S. A. Sehgal (2017). "Comparative Modeling, Molecular Docking, and Revealing of Potential Binding Pockets of RASSF2; a Candidate Cancer Gene." *Interdiscip Sci* 9(2): 214-223.
- Karlseder, J., D. Broccoli, Y. Dai, S. Hardy and T. de Lange (1999). "p53- and ATM-dependent apoptosis induced by telomeres lacking TRF2." *Science* 283(5406): 1321-1325.

Kazemi-Lomedasht, F., A. Rami and N. Zarghami (2013). "Comparison of inhibitory effect of curcumin nanoparticles and free curcumin in human telomerase reverse transcriptase gene expression in breast cancer." *Adv Pharm Bull* 3(1): 127-130.

Kim, M. Y., H. Vankayalapati, K. Shin-Ya, K. Wierzba and L. H. Hurley (2002). "Telomestatin, a potent telomerase inhibitor that interacts quite specifically with the human telomeric intramolecular g-quadruplex." *J Am Chem Soc* 124(10): 2098-2099.

Kim, N. W., M. A. Piatyszek, K. R. Prowse, C. B. Harley, M. D. West, P. L. Ho, G. M. Coviello, W. E. Wright, S. L. Weinrich and J. W. Shay (1994). "Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer." *Science* 266(5193): 2011-2015.

Kiran, K. G., M. Palaniswamy and J. Angayarkanni (2015). "Human telomerase inhibitors from microbial source." *World J Microbiol Biotechnol* 31(9): 1329-1341.

Kleideiter, E., K. Piotrowska and U. Klotz (2007). "Screening of telomerase inhibitors." *Methods Mol Biol* 405: 167-180.

Kolosenko, I., Y. Yu, S. Busker, M. Dyczynski, J. Liu, M. Haraldsson, C. Palm Aperi, T. Helleday, K. P. Tamm, B. D. G. Page and D. Grandt (2017). "Identification of novel small molecules that inhibit STAT3-dependent transcription and function." *PLoS One* 12(6): e0178844.

Koziel, J. E. and B. S. Herbert (2015). "The telomerase inhibitor imetelstat alone, and in combination with trastuzumab, decreases the cancer stem cell population and self-renewal of HER2+ breast cancer cells." *Breast Cancer Res Treat* 149(3): 607-618.

Kumar Deokar, H., H. P. Barch and J. K. Buolamwini (2017). "Homology Modeling of Human Concentrative Nucleoside Transporters (hCNTs) and Validation by Virtual Screening and Experimental Testing to Identify Novel hCNT1 Inhibitors." *Drug Des* 6(1).

Kumar, S., Stecher, G., & Tamura, K. (2016). MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Molecular biology and evolution*, 33(7), 1870-1874.

Lamarche, B. J., N. I. Orazio and M. D. Weitzman (2010). "The MRN complex in double-strand break repair and telomere maintenance." *FEBS Lett* 584(17): 3682-3695.

Latrick, C. M. and T. R. Cech (2010). "POT1-TPP1 enhances telomerase processivity by slowing primer dissociation and aiding translocation." *EMBO J* 29(5): 924-933.

Lavanya, C., M. K. Sibin, M. M. Srinivas Bharath, M. J. Manoj, M. M. Venkataswamy, D. I. Bhat, K. V. Narasinga Rao and G. K. Chetan (2016). "RNA interference mediated downregulation of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) in LN18 cells." *Cytotechnology* 68(6): 2311-2321.

Lee, C. C. and T. S. Huang (2001). "A novel topoisomerase II poison GL331 preferentially induces DNA cleavage at (C/G)T sites and can cause telomere DNA damage." *Pharm Res* 18(6): 846-851.

Leelananda, S. P. and S. Lindert (2016). "Computational methods in drug discovery." *Beilstein J Org Chem* 12: 2694-2718.

Lev, A., G. Denkberg, C. J. Cohen, M. Tzukerman, K. L. Skorecki, P. Chames, H. R. Hoogenboom and Y. Reiter (2002). "Isolation and characterization of human recombinant antibodies endowed with the antigen-specific, major histocompatibility complex-restricted specificity of T cells directed toward the

widely expressed tumor T-cell epitopes of the telomerase catalytic subunit." *Cancer Res* 62(11): 3184-3194.

Li, L. and K. Ye (2006). "Crystal structure of an H/ACA box ribonucleoprotein particle." *Nature* 443(7109): 302-307.

Li, S., J. Duan, D. Li, B. Yang, M. Dong and K. Ye (2011). "Reconstitution and structural analysis of the yeast box H/ACA RNA-guided pseudouridine synthase." *Genes Dev* 25(22): 2409-2421.

Li, Y. and V. Tergaonkar (2014). "Noncanonical functions of telomerase: implications in telomerase-targeted cancer therapies." *Cancer Res* 74(6): 1639-1644.

Lipinska, N., A. Romaniuk, A. Paszel-Jaworska, E. Toton, P. Kopczynski and B. Rubis (2017). "Telomerase and drug resistance in cancer." *Cell Mol Life Sci* 74(22): 4121-4132.

Lipinski, C. A., F. Lombardo, B. W. Dominy and P. J. Feeney (2001). "Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings." *Adv Drug Deliv Rev* 46(1-3): 3-26.

Listerman, I., F. S. Gazzaniga and E. H. Blackburn (2014). "An investigation of the effects of the core protein telomerase reverse transcriptase on Wnt signaling in breast cancer cells." *Mol Cell Biol* 34(2): 280-289.

Liu, L., H. Li, M. Zhang and X. Lv (2015). "Effects of targeted nano-delivery systems combined with hTERT-siRNA and Bmi-1-siRNA on MCF-7 cells." *Int J Clin Exp Pathol* 8(6): 6674-6682.

Lukong, K. E. (2017). "Understanding breast cancer - The long and winding road." *BBA Clin* 7: 64-77.

MacDonald, B. T., K. Tamai and X. He (2009). "Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases." *Dev Cell* 17(1): 9-26.

Marhold, M., R. Bartsch and C. Zielinski (2016). "Recent developments and translational aspects in targeted therapy for metastatic breast cancer." *ESMO Open* 1(3): e000036.

Martinez, P. and M. A. Blasco (2011). "Telomeric and extra-telomeric roles for telomerase and the telomere-binding proteins." *Nat Rev Cancer* 11(3): 161-176.

Martinez, P., M. Thanasoula, A. R. Carlos, G. Gomez-Lopez, A. M. Tejera, S. Schoeftner, O. Dominguez, D. G. Pisano, M. Tarsounas and M. A. Blasco (2010). "Mammalian Rap1 controls telomere function and gene expression through binding to telomeric and extratelomeric sites." *Nat Cell Biol* 12(8): 768-780.

Masoud, V. and G. Pages (2017). "Targeted therapies in breast cancer: New challenges to fight against resistance." *World J Clin Oncol* 8(2): 120-134.

McCullough, L. E., E. E. Miller, L. E. Calderwood, N. Shivappa, S. E. Steck, M. R. Forman, A. M. M, R. Maguire, B. F. Fuemmeler, S. H. Kollins, D. B. S, Z. Huang, A. P. Murtha, S. K. Murphy, J. R. Hebert and C. Hoyo (2017). "Maternal inflammatory diet and adverse pregnancy outcomes: Circulating cytokines and genomic imprinting as potential regulators?" *Epigenetics* 12(8): 688-697.

Melana, S. M., J. F. Holland and B. G. Pogo (1998). "Inhibition of cell growth and telomerase activity of breast cancer cells in vitro by 3'-azido-3'-deoxythymidine." *Clin Cancer Res* 4(3): 693-696.

Melzer, C., J. von der Ohe and R. Hass (2017). "Breast Carcinoma: From Initial Tumor Cell Detachment to Settlement at Secondary Sites." *Biomed Res Int* 2017: 8534371.

Mengual Gomez, D. L., R. G. Armando, C. S. Cerrudo, P. D. Ghiringhelli and D. E. Gomez (2016). "Telomerase as a Cancer Target. Development of New Molecules." *Curr Top Med Chem* 16(22): 2432-2440.

Mengual Gomez, D. L., R. G. Armando, H. G. Farina and D. E. Gomez (2014). "[Telomerase and telomere: their structure and dynamics in health and disease]." *Medicina (B Aires)* 74(1): 69-76.

Mizushina, Y., T. Takeuchi, F. Sugawara and H. Yoshida (2012). "Anti-cancer targeting telomerase inhibitors: beta-rubromycin and oleic acid." *Mini Rev Med Chem* 12(11): 1135-1143.

Morais, K. S., A. F. R. Guimaraesb, D. A. R. Ramos, F. P. Silva and D. M. de Oliveira (2017). "Long-term exposure to MST-312 leads to telomerase reverse transcriptase overexpression in MCF-7 breast cancer cells." *Anticancer Drugs* 28(7): 750-756.

Morgan, S., P. Grootendorst, J. Lexchin, C. Cunningham and D. Greyson (2011). "The cost of drug development: a systematic review." *Health Policy* 100(1): 4-17.

Morgan, S. P. (2011). "Can new optical techniques for in vivo imaging and flow cytometry of the microcirculation benefit sickle cell disease research?" *Cytometry A* 79(10): 766-774.

Moye, A. L., K. C. Porter, S. B. Cohen, T. Phan, K. G. Zyner, N. Sasaki, G. O. Lovrecz, J. L. Beck and T. M. Bryan (2015). "Telomeric G-quadruplexes are a substrate and site of localization for human telomerase." *Nat Commun* 6: 7643.

Mueller, S., U. Hartmann, F. Mayer, S. Balabanov, J. T. Hartmann, T. H. Brummendorf and C. Bokemeyer (2007). "Targeting telomerase activity by BIBR1532 as a therapeutic approach in germ cell tumors." *Invest New Drugs* 25(6): 519-524.

Nemunaitis, J., A. W. Tong, M. Nemunaitis, N. Senzer, A. P. Phadke, C. Bedell, N. Adams, Y. A. Zhang, P. B. Maples, S. Chen, B. Pappen, J. Burke, D. Ichimaru, Y. Urata and T. Fujiwara (2010). "A phase I study of telomerase-specific replication competent oncolytic adenovirus (telomelysin) for various solid tumors." *Mol Ther* 18(2): 429-434.

Nergadze, S. G., B. O. Farnung, H. Wischnewski, L. Khoriauli, V. Vitelli, R. Chawla, E. Giulotto and C. M. Azzalin (2009). "CpG-island promoters drive transcription of human telomeres." *RNA* 15(12): 2186-2194.

Oeberst, A., I. von der Beck, D. B. M, U. Cress and S. Nestler (2017). "Biases in the production and reception of collective knowledge: the case of hindsight bias in Wikipedia." *Psychol Res*.

Oeckinghaus, A. and S. Ghosh (2009). "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 1(4): a000034.

Olivero, O. A. (2007). "Mechanisms of genotoxicity of nucleoside reverse transcriptase inhibitors." *Environ Mol Mutagen* 48(3-4): 215-223.

Olivero, O. A. and M. C. Poirier (1993). "Preferential incorporation of 3'-azido-2',3'-dideoxythymidine into telomeric DNA and Z-DNA-containing regions of Chinese hamster ovary cells." *Mol Carcinog* 8(2): 81-88.

Olivero, O. A., A. M. Tejera, J. J. Fernandez, B. J. Taylor, S. Das, R. L. Divi and M. C. Poirier (2005). "Zidovudine induces S-phase arrest and cell cycle gene expression changes in human cells." *Mutagenesis* 20(2): 139-146.

Paikari, A., D. B. C. D. Saw and R. Blelloch (2017). "The eutheria-specific miR-290 cluster modulates placental growth and maternal-fetal transport." *Development* 144(20): 3731-3743.

Palm, W. and T. de Lange (2008). "How shelterin protects mammalian telomeres." *Annu Rev Genet* 42: 301-334.

Park, J. I., A. S. Venteicher, J. Y. Hong, J. Choi, S. Jun, M. Shkreli, W. Chang, Z. Meng, P. Cheung, H. Ji, M. McLaughlin, T. D. Veenstra, R. Nusse, P. D. McCrea and S. E. Artandi (2009). "Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin." *Nature* 460(7251): 66-72.

Pascolo, E., C. Wenz, J. Lingner, N. Huel, H. Priepke, I. Kauffmann, P. Garin-Chesa, W. J. Rettig, K. Damm and A. Schnapp (2002). "Mechanism of human telomerase inhibition by BIBR1532, a synthetic, non-nucleosidic drug candidate." *J Biol Chem* 277(18): 15566-15572.

Patel, S. A. and A. DeMichele (2017). "Adding Adjuvant Systemic Treatment after Neoadjuvant Therapy in Breast Cancer: Review of the Data." *Curr Oncol Rep* 19(8): 56.

Patel, T. N., R. Vasani, D. Gupta, J. Patel and M. Trivedi (2015). "Shelterin proteins and cancer." *Asian Pac J Cancer Prev* 16(8): 3085-3090.

Perez, E. and H. B. Muss (2005). "Optimizing adjuvant chemotherapy in early-stage breast cancer." *Oncology (Williston Park)* 19(14): 1759-1767; discussion 1768, 1772-1754, 1777-1758.

Perez, E. A., A. Moreno-Aspitia, E. Aubrey Thompson and C. A. Andorfer (2010). "Adjuvant therapy of triple negative breast cancer." *Breast Cancer Res Treat* 120(2): 285-291.

Perkins, L. A., L. Holderbaum, R. Tao, Y. Hu, R. Sopko, K. McCall, D. Yang-Zhou, I. Flockhart, R. Binari, H. S. Shim, A. Miller, A. Housden, M. Foos, S. Randkelv, C. Kelley, P. Namgyal, C. Villalta, L. P. Liu, X. Jiang, Q. Huan-Huan, X. Wang, A. Fujiyama, A. Toyoda, K. Ayers, A. Blum, B. Czech, R. Neumuller, D. Yan, A. Cavallaro, K. Hibbard, D. Hall, L. Cooley, G. J. Hannon, R. Lehmann, A. Parks, S. E. Mohr, R. Ueda, S. Kondo, J. Q. Ni and N. Perrimon (2015). "The Transgenic RNAi Project at Harvard Medical School: Resources and Validation." *Genetics* 201(3): 843-852.

Pfizenmaier, J., W. J. Ellis, E. W. Arfman, S. Hawley, P. O. McLaughlin, P. H. Lange and R. L. Vessella (2006). "Telomerase activity in disseminated prostate cancer cells." *BJU Int* 97(6): 1309-1313.

Pompili, L., M. Porru, C. Caruso, A. Biroccio and C. Leonetti (2016). "Patient-derived xenografts: a relevant preclinical model for drug development." *J Exp Clin Cancer Res* 35(1): 189.

Pornprasert, S., A. Faye, J. Y. Mary, G. Dolcini, P. Leechanachai, G. Chaouat, N. Ngo, F. Barre-Sinoussi and E. Menu (2006). "Down modulation of TNF-alpha mRNA placental expression by AZT used for the prevention of HIV-1 mother-to-child transmission." *Placenta* 27(9-10): 989-995.

Qiu, X., Y. Huang, D. Wu, F. Mao, J. Zhu, W. Yan, H. B. Luo and J. Li (2018). "Discovery of novel purine nucleoside derivatives as phosphodiesterase 2 (PDE2) inhibitors: Structure-based virtual screening, optimization and biological evaluation." *Bioorg Med Chem* 26(1): 119-133.

- Ramlee, M. K., T. Yan, A. M. Cheung, C. T. Chuah and S. Li (2015). "High-throughput genotyping of CRISPR/Cas9-mediated mutants using fluorescent PCR-capillary gel electrophoresis." *Sci Rep* 5: 15587.
- Rashid, R., B. Liang, D. L. Baker, O. A. Youssef, Y. He, K. Phipps, R. M. Terns, M. P. Terns and H. Li (2006). "Crystal structure of a Cbf5-Nop10-Gar1 complex and implications in RNA-guided pseudouridylation and dyskeratosis congenita." *Mol Cell* 21(2): 249-260.
- Rashidieh, B., Z. Madani, M. K. Azam, S. K. Maklavani, N. R. Akbari, S. Tavakoli and G. Rigi (2015). "Molecular docking based virtual screening of compounds for inhibiting sortase A in *L.monocytogenes*." *Bioinformation* 11(11): 501-505.
- Rhodes, D. and H. J. Lipps (2015). "G-quadruplexes and their regulatory roles in biology." *Nucleic Acids Res* 43(18): 8627-8637.
- Rivero, J., L. A. Henriquez-Hernandez, D. B. L, J. Pestano, P. L. O, M. Camacho, M. Zumbado and F. V. P (2017). "Simvastatin down-regulates differential genetic profiles produced by organochlorine mixtures in primary breast cell (HMEC)." *Chem Biol Interact* 268: 85-92.
- Roake, C. M. and S. E. Artandi (2017). "Control of Cellular Aging, Tissue Function, and Cancer by p53 Downstream of Telomeres." *Cold Spring Harb Perspect Med* 7(5).
- Rout, S. and R. K. Mahapatra (2016). "In silico screening of novel inhibitors of M17 Leucine Amino Peptidase (LAP) of *Plasmodium vivax* as therapeutic candidate." *Biomed Pharmacother* 82: 192-201.
- Roy, A., A. Kucukural and Y. Zhang (2010). "I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction." *Nat Protoc* 5(4): 725-738.
- Rubovszky, G. and Z. Horvath (2017). "Recent Advances in the Neoadjuvant Treatment of Breast Cancer." *J Breast Cancer* 20(2): 119-131.
- Saharia, A., L. Guittat, S. Crocker, A. Lim, M. Steffen, S. Kulkarni and S. A. Stewart (2008). "Flap endonuclease 1 contributes to telomere stability." *Curr Biol* 18(7): 496-500.
- Sarthy, J. F. and P. Baumann (2010). "Apollo-taking the lead in telomere protection." *Mol Cell* 39(4): 489-491.
- Savage, S. A. (1993). *Dyskeratosis Congenita*. GeneReviews((R)). M. P. Adam, H. H. Ardinger, R. A. Pagon et al. Seattle (WA).
- Schwartzmann, G., Winograd, B., & Pinedo, H. M. (1988). The main steps in the development of anticancer agents. *Radiotherapy and oncology*, 12(4), 301-313.
- Schmidt, J. C. and T. R. Cech (2015). "Human telomerase: biogenesis, trafficking, recruitment, and activation." *Genes Dev* 29(11): 1095-1105.
- Schnitt, S. J. (2010). "Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy." *Mod Pathol* 23 Suppl 2: S60-64.
- Schoeftner, S. and M. A. Blasco (2008). "Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II." *Nat Cell Biol* 10(2): 228-236.
- Seimiya, H. (2006). "The telomeric PARP, tankyrases, as targets for cancer therapy." *Br J Cancer* 94(3): 341-345.

Seow, H. F., W. K. Yip and T. Fife (2016). "Advances in targeted and immunobased therapies for colorectal cancer in the genomic era." *Onco Targets Ther* 9: 1899-1920.

Sharpless, N. E. and C. J. Sherr (2015). "Forging a signature of in vivo senescence." *Nat Rev Cancer* 15(7): 397-408.

Shay, J. W. and W. E. Wright (2010). "Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells." *FEBS Lett* 584(17): 3819-3825.

Shi, J. W., W. Liu, T. T. Zhang, S. C. Wang, X. L. Lin, J. Li, J. S. Jia, H. F. Sheng, Z. F. Yao, W. T. Zhao, Z. L. Zhao, R. Y. Xie, S. Yang, F. Gao, Q. R. Fan, M. Y. Zhang, M. Yue, J. Yuan, W. W. Gu, K. T. Yao and D. Xiao (2013). "The enforced expression of c-Myc in pig fibroblasts triggers mesenchymal-epithelial transition (MET) via F-actin reorganization and RhoA/Rock pathway inactivation." *Cell Cycle* 12(7): 1119-1127.

Shi, Y., L. Sun, G. Chen, D. Zheng, L. Li and W. Wei (2015). "A combination of the telomerase inhibitor, BIBR1532, and paclitaxel synergistically inhibit cell proliferation in breast cancer cell lines." *Target Oncol* 10(4): 565-573.

Singh, M., Z. Wang, D. Cascio and J. Feigon (2015). "Structure and interactions of the CS domain of human H/ACA RNP assembly protein Shq1." *J Mol Biol* 427(4): 807-823.

Smogorzewska, A., B. van Steensel, A. Bianchi, S. Oelmann, M. R. Schaefer, G. Schnapp and T. de Lange (2000). "Control of human telomere length by TRF1 and TRF2." *Mol Cell Biol* 20(5): 1659-1668.

Soria, J. C., L. R. Gauthier, E. Raymond, C. Granotier, L. Morat, J. P. Armand, F. D. Boussin and L. Sabatier (1999). "Molecular detection of telomerase-positive circulating epithelial cells in metastatic breast cancer patients." *Clin Cancer Res* 5(5): 971-975.

Starr, M. C., D. J. Askenazi, S. L. Goldstein, J. W. MacDonald, T. K. Bammler, Z. Afsharinejad, D. B. P, S. E. Juul, D. E. Mayock and S. R. Hingorani (2018). "Impact of processing methods on urinary biomarkers analysis in neonates." *Pediatr Nephrol* 33(1): 181-186.

Strahl, C. and E. H. Blackburn (1994). "The effects of nucleoside analogs on telomerase and telomeres in Tetrahymena." *Nucleic Acids Res* 22(6): 893-900.

Strahl, C. and E. H. Blackburn (1996). "Effects of reverse transcriptase inhibitors on telomere length and telomerase activity in two immortalized human cell lines." *Mol Cell Biol* 16(1): 53-65.

Su, Z., Z. Yang, Y. Xu, Y. Chen and Q. Yu (2015). "Apoptosis, autophagy, necroptosis, and cancer metastasis." *Mol Cancer* 14: 48.

Sun, Y. S., Z. Zhao, Z. N. Yang, F. Xu, H. J. Lu, Z. Y. Zhu, W. Shi, J. Jiang, P. P. Yao and H. P. Zhu (2017). "Risk Factors and Preventions of Breast Cancer." *Int J Biol Sci* 13(11): 1387-1397.

Taetz, S., C. Baldes, T. E. Murdter, E. Kleideiter, K. Piotrowska, U. Bock, E. Haltner-Ukomadu, J. Mueller, H. Huwer, U. F. Schaefer, U. Klotz and C. M. Lehr (2006). "Biopharmaceutical characterization of the telomerase inhibitor BRACO19." *Pharm Res* 23(5): 1031-1037.

Takai, K. K., T. Kibe, J. R. Donigian, D. Frescas and T. de Lange (2011). "Telomere protection by TPP1/POT1 requires tethering to TIN2." *Mol Cell* 44(4): 647-659.

- Tarazi, H., E. Saleh and R. El-Awady (2016). "In-silico screening for DNA-dependent protein kinase (DNA-PK) inhibitors: Combined homology modeling, docking, molecular dynamic study followed by biological investigation." *Biomed Pharmacother* 83: 693-703.
- Tejera, A. M., D. F. Alonso, D. E. Gomez and O. A. Olivero (2001). "Chronic in vitro exposure to 3'-azido-2', 3'-dideoxythymidine induces senescence and apoptosis and reduces tumorigenicity of metastatic mouse mammary tumor cells." *Breast Cancer Res Treat* 65(2): 93-99.
- Tejera, A. M., M. Stagno d'Alcontres, M. Thanasoula, R. M. Marion, P. Martinez, C. Liao, J. M. Flores, M. Tarsounas and M. A. Blasco (2010). "TPP1 is required for TERT recruitment, telomere elongation during nuclear reprogramming, and normal skin development in mice." *Dev Cell* 18(5): 775-789.
- ten Brink, T. and T. E. Exner (2010). "pK(a) based protonation states and microspecies for protein-ligand docking." *J Comput Aided Mol Des* 24(11): 935-942.
- Tippani, R., L. J. Prakhya, M. Porika, K. Sirisha, S. Abbagani and C. Thammidala (2014). "Pterostilbene as a potential novel telomerase inhibitor: molecular docking studies and its in vitro evaluation." *Curr Pharm Biotechnol* 14(12): 1027-1035.
- Togashi, K., H. R. Ko, J. S. Ahn and H. Osada (2001). "Inhibition of telomerase activity by fungus metabolites, CRM646-A and thielavin B." *Biosci Biotechnol Biochem* 65(3): 651-653.
- Tuccinardi, T. (2009). "Docking-based virtual screening: recent developments." *Comb Chem High Throughput Screen* 12(3): 303-314.
- Turashvili, G. and E. Brogi (2017). "Tumor Heterogeneity in Breast Cancer." *Front Med (Lausanne)* 4: 227.
- Ueno, T., H. Takahashi, M. Oda, M. Mizunuma, A. Yokoyama, Y. Goto, Y. Mizushina, K. Sakaguchi and H. Hayashi (2000). "Inhibition of human telomerase by rubromycins: implication of spiroketal system of the compounds as an active moiety." *Biochemistry* 39(20): 5995-6002.
- van Deursen, J. M. (2014). "The role of senescent cells in ageing." *Nature* 509(7501): 439-446.
- van Steensel, B. and T. de Lange (1997). "Control of telomere length by the human telomeric protein TRF1." *Nature* 385(6618): 740-743.
- van Steensel, B., A. Smogorzewska and T. de Lange (1998). "TRF2 protects human telomeres from end-to-end fusions." *Cell* 92(3): 401-413.
- Velloso, F. J., A. F. Bianco, J. O. Farias, N. E. Torres, P. Y. Ferruzo, V. Anschau, H. C. Jesus-Ferreira, T. H. Chang, M. C. Sogayar, L. F. Zerbini and R. G. Correa (2017). "The crossroads of breast cancer progression: insights into the modulation of major signaling pathways." *Onco Targets Ther* 10: 5491-5524.
- Verbrugge, I., R. W. Johnstone and M. J. Smyth (2010). "SnapShot: Extrinsic apoptosis pathways." *Cell* 143(7): 1192, 1192 e1191-1192.
- Victorelli, S. and J. F. Passos (2017). "Telomeres and Cell Senescence - Size Matters Not." *EBioMedicine* 21: 14-20.

- Villa, R., M. Folini, C. D. Porta, A. Valentini, M. Pennati, M. G. Daidone and N. Zaffaroni (2003). "Inhibition of telomerase activity by geldanamycin and 17-allylamino, 17-demethoxygeldanamycin in human melanoma cells." *Carcinogenesis* 24(5): 851-859.
- Vogan, J. M. and K. Collins (2015). "Dynamics of Human Telomerase Holoenzyme Assembly and Subunit Exchange across the Cell Cycle." *J Biol Chem* 290(35): 21320-21335.
- Vonderheide, R. H. (2002). "Telomerase as a universal tumor-associated antigen for cancer immunotherapy." *Oncogene* 21(4): 674-679.
- Wang, H., S. Mannava, V. Grachtchouk, D. Zhuang, M. S. Soengas, A. V. Gudkov, E. V. Prochownik and M. A. Nikiforov (2008). "c-Myc depletion inhibits proliferation of human tumor cells at various stages of the cell cycle." *Oncogene* 27(13): 1905-1915.
- Wang, W., M. Wan, D. Liao, G. Peng, X. Xu, W. Yin, G. Guo, F. Jiang, W. Zhong and J. He (2017). "Identification of Potent Chloride Intracellular Channel Protein 1 Inhibitors from Traditional Chinese Medicine through Structure-Based Virtual Screening and Molecular Dynamics Analysis." *Biomed Res Int* 2017: 4751780.
- Wardi, L., N. Alaaeddine, I. Raad, R. Sarkis, R. Serhal, C. Khalil and G. Hilal (2014). "Glucose restriction decreases telomerase activity and enhances its inhibitor response on breast cancer cells: possible extra-telomerase role of BIBR 1532." *Cancer Cell Int* 14: 60.
- Webb, B. and A. Sali (2017). "Protein Structure Modeling with MODELLER." *Methods Mol Biol* 1654: 39-54.
- Wei, C., L. Ren and N. Gao (2013). "Interactions of terpyridines and their Pt(II) complexes with G-quadruplex DNAs and telomerase inhibition." *Int J Biol Macromol* 57: 1-8.
- Wilding, J. L. and W. F. Bodmer (2014). "Cancer cell lines for drug discovery and development." *Cancer Res* 74(9): 2377-2384.
- Wu, X., J. Chen, Y. Cao, B. Xie, H. Li, P. Zhou, Y. Qiu and J. Pang (2015). "Antitumor effect of COOH-terminal polypeptide of human TERT is associated with the declined expression of hTERT and NF-kappaB p65 in HeLa cells." *Oncol Rep* 34(6): 2909-2916.
- Yang, J. and Y. Zhang (2015). "Protein Structure and Function Prediction Using I-TASSER." *Curr Protoc Bioinformatics* 52: 5 8 1-15.
- Yaswen, P., K. L. MacKenzie, W. N. Keith, P. Hentosh, F. Rodier, J. Zhu, G. L. Firestone, A. Matheu, A. Carnero, A. Bilisland, T. Sundin, K. Honoki, H. Fujii, A. G. Georgakilas, A. Amedei, A. Amin, B. Helferich, C. S. Boosani, G. Guha, M. R. Ciriolo, S. Chen, S. I. Mohammed, A. S. Azmi, D. Bhakta, D. Halicka, E. Niccolai, K. Aquilano, S. S. Ashraf, S. Nowsheen and X. Yang (2015). "Therapeutic targeting of replicative immortality." *Semin Cancer Biol* 35 Suppl: S104-S128.
- Yegorov, Y. E., D. N. Chernov, S. S. Akimov, N. L. Bolsheva, A. A. Krayevsky and A. V. Zelenin (1996). "Reverse transcriptase inhibitors suppress telomerase function and induce senescence-like processes in cultured mouse fibroblasts." *FEBS Lett* 389(2): 115-118.
- Yu, Y. T. and U. T. Meier (2014). "RNA-guided isomerization of uridine to pseudouridine--pseudouridylation." *RNA Biol* 11(12): 1483-1494.

Yuno, A., M. J. Lee, S. Lee, Y. Tomita, D. Rekhman, B. Moore and J. B. Trepel (2018). "Clinical Evaluation and Biomarker Profiling of Hsp90 Inhibitors." *Methods Mol Biol* 1709: 423-441.

Zeng, X. L., N. R. Thumati, H. B. Fleisig, K. R. Hukezalie, S. A. Savage, N. Giri, B. P. Alter and J. M. Wong (2012). "The accumulation and not the specific activity of telomerase ribonucleoprotein determines telomere maintenance deficiency in X-linked dyskeratosis congenita." *Hum Mol Genet* 21(4): 721-729.

Zhang, Y. (2009). "Protein structure prediction: when is it useful?" *Curr Opin Struct Biol* 19(2): 145-155.

Zhao, Q., C. Gao, P. Lee, L. Liu, S. Li, T. Hu, J. Shen, S. Pan, H. Ye, Y. Chen, W. Cao, Y. Cui, P. Zeng, S. Yu, Y. Gao, L. Chen, B. Mo, X. Liu, S. Xiao, Y. Zhao, S. Zhong, X. Chen and L. Jiang (2015). "Fast-suppressor screening for new components in protein trafficking, organelle biogenesis and silencing pathway in *Arabidopsis thaliana* using DEX-inducible FREE1-RNAi plants." *J Genet Genomics* 42(6): 319-330.

Zhao, R., B. Y. Choi, M. H. Lee, A. M. Bode and Z. Dong (2016). "Implications of Genetic and Epigenetic Alterations of CDKN2A (p16(INK4a)) in Cancer." *EBioMedicine* 8: 30-39.

Zhou, J., D. Ding, M. Wang and Y. S. Cong (2014). "Telomerase reverse transcriptase in the regulation of gene expression." *BMB Rep* 47(1): 8-14.