

Premio: «Análisis de longitud telomérica y actividad telomerasa en carcinogénesis gástrica»

Grupo de Patología Molecular. Facultad de Medicina.
Universidad Nacional de Colombia
Director: Humberto Arboleda

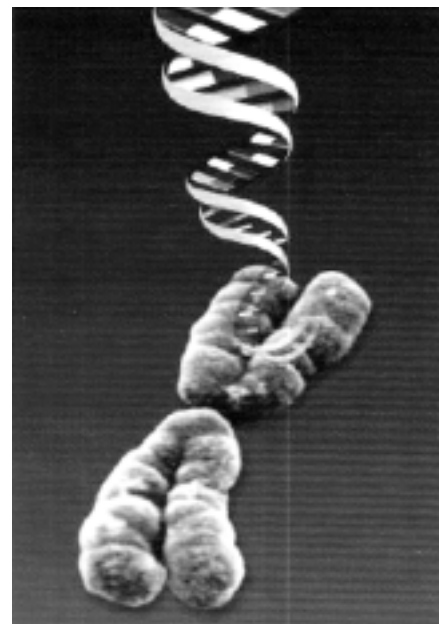
Coinvestigadores: Juan Jose Yunis, Luis Jaime Castro,
Orlando Ricaurte, William Otero Martín Gomez. Asesor: Pelayo Correa

Resumen

El adenocarcinoma gástrico representa la segunda causa más frecuente de cáncer en el mundo, así como la segunda causa de muerte por cáncer¹. Sin embargo, en regiones como Japón, Europa del Este, y Suramérica, especialmente Chile y Costa Rica esta enfermedad sigue siendo epidémica². En Colombia, el adenocarcinoma gástrico es un importante problema de salud pública, ya que representa la primera causa de muerte por cáncer³⁻⁵. Se estima que se detectan seis mil casos nuevos al año, con tasas de mortalidad del 24.1 por cada 100,000 habitantes para el sexo masculino y 17.4 por cada 100,000 habitantes para el sexo femenino. Además, esta enfermedad ocasiona 54.700 años de vida saludables perdidos por año (AVISA) lo que representa el 16.3% de los AVISA por enfermedades neoplásicas y el 1% del total anual.

Según datos del Registro Poblacional de Cáncer de Cali, el cáncer gástrico en hombres es el segundo más frecuente después del cáncer de piel, continúa siendo la tercera causa de cáncer en mujeres precedido por el cáncer de cervix y seno, es la primera causa al reunir ambos sexos, y predomina en personas de edad mediana y avanzada siendo más frecuente en mayores de cincuenta años⁶.

Los principales aportes en el conocimiento de este tipo de cáncer en nuestro país se derivan de estudios epidemiológicos, a partir de los cuales quedaron establecidas la incidencia, prevalencia y mortalidad, las variaciones geográficas, y la identificación de factores de riesgo medioambientales⁷⁻¹³.



Adicionalmente, a partir del estudio histopatológico de lesiones precancerosas en poblaciones de alto riesgo, se planteó como hipótesis etiológica para la variante de tipo intestinal un proceso de carcinogénesis en múltiples pasos. Este modelo sugiere la progresión de lesiones precancerosas que se presume es secuencial así: gastritis crónica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia, carcinoma¹⁴⁻¹⁶. Se sugiere que este proceso es multifactorial ya que en él intervienen varios factores ambientales, entre los cuales se considera la infección por *Helicobacter pylori*¹⁷⁻²⁰.

El modelo de carcinogénesis gástrica en múltiples pasos establece la acumulación de mutaciones en

células de la mucosa gástrica que con el tiempo permiten el cambio en la morfología tisular. Aunque los mecanismos moleculares de la mutagénesis química y/o biológica involucrados en la iniciación, promoción y progresión del cáncer gástrico todavía no son claros, la caracterización de las alteraciones genéticas y epigenéticas encontradas en estos tumores ha permitido conocer que genes y moléculas pueden estar implicados en estos procesos²¹⁻³⁰. El mejor conocimiento de la biología tumoral gástrica, y especialmente del proceso de carcinogénesis permitirá establecer la utilidad de marcadores moleculares en el diagnóstico temprano, pronóstico, y definición de blancos terapéuticos³¹.

La teoría de la carcinogénesis sugiere que para el desarrollo del cáncer es necesario considerar tres procesos celulares básicos: diferenciación, proliferación y senescencia³². Durante la progresión al estado maligno, las células cancerosas deben romper la barrera de senescencia y alcanzar la inmortalidad al adquirir una capacidad de proliferación celular ilimitada³³. Uno de los mecanismos moleculares más estudiados en inmortalidad, senescencia y cáncer es la dinámica del complejo funcional telómero/telomerasa³⁴.

Se considera que con cada división celular, los extremos de los cromosomas conocidos como telómeros se acortan hasta alcanzar el punto de senescencia celular, pues las células normales tienen una capacidad de replicación finita³⁵⁻³⁸. Por otro lado, la expresión de telomerasa, una transcriptasa reversa que permite la síntesis de nuevo ADN telomérico, es considerada un paso fundamental para la inmortalización celular³⁹⁻⁴¹.

Esta enzima se encuentra presente en las células germinales y hematopoyéticas, pero su expresión es reprimida en los otros tejidos⁴²⁻⁴⁴. Sin embargo, las células cancerosas reactivan la telomerasa para estabilizar el acortamiento de sus telómeros, y permitir que los clones celulares con cromosomas aberrantes tengan una capacidad de proliferación ilimitada.

La evidencia reciente sugiere que el acortamiento telomérico permite la fusión entre cromosomas, y por lo tanto contribuye a la generación de inestabilidad cromosómica en los estadios iniciales del cáncer⁴⁵. De esta forma, las células cancerosas muestran una dinámica telómero/telomerasa característica, sus cromosomas usualmente tienen telómeros cortos y una alta actividad telomerasa. Esto ha sido confirmado en el 85% de los cánceres analizados,⁴⁶⁻⁴⁷ sin embargo las pocas líneas de evidencia en lo que se refiere al adenocarcinoma gástrico son controvertidas y se requieren más estudios en poblaciones de alto riesgo para confirmar estos resultados.

En el presente estudio se analizará la longitud telomérica (I fase) y actividad telomerasa (II Fase) en el adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal. El estudio

de la dinámica de acortamiento telomérico y la actividad telomerasa en lesiones precancerosas permitirá evaluar desde el punto de vista molecular la progresión tumoral del proceso de carcinogénesis gástrica en múltiples pasos. Para confirmar el modelo de carcinogénesis en múltiples pasos, será necesario establecer una correlación histológica/molecular y analizar mediante una prueba de significancia estadística las diferencias de los hallazgos moleculares que se encuentren en lesiones precancerosas, tejido tumoral y tejido sano.

En el estudio se incluirán pacientes que lleguen al servicio de Gastroenterología de las Clínicas Carlos Lleras y San Pedro Claver de Bogotá D.C, para realización de endoscopia de vías digestivas altas mas biopsia. Con previo consentimiento informado, se obtendrán muestras de mucosa gástrica lesionada y sana del mismo paciente la cual se utilizará como control. Además también se estudiarán especímenes quirúrgicos de pacientes de la Clínica Fundadores y el Instituto Nacional de Cancerología.

La confirmación del tipo de cáncer y/o lesión precancerosa se realizará por histopatología, y el estudio molecular de las muestras comprenderá la determinación de la longitud promedio del TRF (Telomeric Restriction Fragment) de cada muestra mediante hibridización Southern blotting utilizando una sonda telomérica específica, detección por método no radioactivo, y análisis por densitometría. La actividad telomerasa a su vez se determinará a través del ensayo TRAP (Telomeric Repeat Amplification Protocol) que comprende la extracción proteica de la muestra de tejido, amplificación por PCR y detección por método no radioactivo.

Con este estudio se busca expandir las bases científicas de la prevención secundaria del cáncer, ya que el análisis del complejo funcional telómero/telomerasa podrá utilizarse como marcador de diagnóstico molecular con utilidad en la detección temprana de lesiones con riesgo de desarrollar cáncer, así como en la detección de células tumorales en los márgenes de resección. El valor pronóstico hará parte de estudios posteriores que evalúen la sensibilidad, especificidad y valores predictivos de este marcador frente al diagnóstico histopatológico.

1. Descripción del proyecto

1.1 Planteamiento del Problema y Justificación

La carcinogénesis gástrica en múltiples pasos es considerada como la acumulación de mutaciones responsables de eventos secuenciales conocidos como iniciación, promoción y progresión tumoral en un lapso de 20 a 30 años, y cuya expresión fenotípica

es evidenciada por el cambio en la morfología tisular¹⁵⁻¹⁶. Inicialmente, este proceso secuencial fue establecido a partir del estudio histopatológico de lesiones consideradas precancerosas^{48,49}. Sin embargo, debido a que lesiones como metaplasia y displasia son considerados mecanismos de adaptación celular que no necesariamente progresan a cáncer, y a que existe mucha variabilidad en la interpretación subjetiva de cada examinador, los estudios de genética y biología molecular se han enfocado en determinar las bases moleculares de la carcinogénesis gástrica²¹ buscando una mayor precisión diagnóstica con la utilización de los marcadores moleculares.

Estudios recientes han demostrado que la secuencia de cambios morfológicos se relaciona con una serie de eventos genotípicos tales como rearrreglos de la región promotora de translocación MET aparentes desde la etapa de gastritis crónica; mutaciones del oncogen k-ras con la aparición de cambios metaplásicos; mutaciones de p53 con el desarrollo de cambios displásicos; y mutación del gen DCC en el adenocarcinoma²³⁻²⁹.

Si bien estas alteraciones genéticas pueden estar presentes en lesiones precancerosas, ninguna puede considerarse como marcador de progresión tumoral, ya que su presencia no es indicador de la existencia de clones inmortales, lo cual cambiaría el valor del riesgo para las lesiones que posean dicho marcador.

El mejor conocimiento de los mecanismos moleculares implicados en los procesos celulares característicos de la carcinogénesis tales como senescencia, proliferación y diferenciación, ha permitido establecer la importancia del complejo funcional telómero/telomerasa en la biología de la progresión tumoral. Los estudios sugieren que un telómero corto y una telomerasa activa forman una poderosa fuerza directriz para que las células cancerosas continúen su evolución clonal, ya que un telómero reducido y una telomerasa activa, permiten generar cromosomas aberrantes y amplificar los efectos deletéreos de los mismos respectivamente^{45,50a,b}. De esta forma, solo aquellas lesiones precancerosas que exhiban telómeros cortos y actividad telomerasa son probablemente de mayor riesgo, pues son la evidencia objetiva de la presencia de clones celulares inmortales con gran potencial de malignidad.

El análisis del acortamiento telomérico y actividad telomerasa ha sido estudiado en modelos de carcinogénesis que muestran una progresión secuencial desde un estado premaligno hasta un estado agresivo evidenciado a partir de lesiones precancerosas⁵¹⁻⁵⁷. Sin embargo, la dinámica funcional del complejo telómero/telomerasa en carcinogénesis gástrica y su significancia clínica es aún controversial. El primer reporte de actividad telomerasa y longitud telomérica en cáncer gástrico no evaluó estos parámetros en lesiones

precancerosas,⁵⁸ mientras que en otros dos estudios no se estimó la longitud telomérica de las muestras que exhibían actividad telomerasa; además, el número de displasias fue relativamente pequeño^{59,60}. Todos estos estudios fueron realizados a partir de especímenes quirúrgicos, y en general hay inconsistencia entre la correlación de los hallazgos moleculares y algunas variables clínicopatológicas. Por otra parte, existen pocos reportes de estudios moleculares a partir de biopsias⁶¹. También se han utilizado otras metodologías como la detección de los componentes de telomerasa por análisis de ARNm mediante hibridación in situ o ensayos basados en anticuerpos, ya que de esta forma es posible estudiar tejido archivado⁶². Aunque la expresión de la subunidad ARN (hTR), y hTERT han sido detectadas en lesiones precancerosas,⁶³⁻⁶⁶ hay evidencia que sugiere que la expresión de estas no siempre es paralela a la actividad telomerasa, ya que pueden ser constitutivamente expresadas en ciertos tejidos, aún en células que no tienen normalmente actividad telomerasa^{67,68}. En conclusión, se requieren más estudios en poblaciones de alto riesgo para reevaluar el papel del complejo funcional telómero/telomerasa dados los resultados anteriormente expuestos. En este sentido, el estudio planteado, será un aporte que contribuirá no solo al conocimiento en este campo de investigación, sino a las aplicaciones directas e indirectas que se derivan del mismo.

1.2 Marco teórico y estado del arte

Cáncer gástrico en el mundo

Actualmente, a pesar de una marcada disminución en su incidencia, el adenocarcinoma gástrico representa la segunda causa más frecuente de cáncer en el mundo, así como la segunda causa de muerte por cáncer¹. Sin embargo, en regiones como Asia, Europa del Este, y Latinoamérica, especialmente Chile, Costa Rica y Colombia esta enfermedad sigue siendo epidémica². El pronóstico de los pacientes con cáncer de estómago es bastante pobre, con tasas de supervivencia entre el 5 y 15% a los 5 años. En Japón, las tasas de supervivencia han aumentado en los últimos 25 años debido a un aumento en la detección temprana de la enfermedad, y a un aumento en el número de pacientes que reciben resección curativa. Por el contrario, en los demás países con alta incidencia, muchos casos son diagnosticados en un estadio avanzado, y la enfermedad tiene una recurrencia en al menos el 80% de los pacientes sometidos a gastrectomía⁶⁹.

Cáncer gástrico en Colombia

En Colombia, el cáncer gástrico sigue siendo la primera causa de mortalidad por cáncer. Se estima

que se detectan seis mil casos nuevos al año, con tasas de mortalidad del 24.1 por cada 100,000 habitantes para el sexo masculino y 17.4 por cada 100,000 habitantes para el sexo femenino, lo que nos ubica en el grupo de países con alta tasa de mortalidad por cáncer gástrico cuya tendencia se ha mantenido constante en los últimos años. Se calcula además, que esta enfermedad ocasiona 54.700 años de vida saludables perdidos por año (AVISA) lo que representa el 16.3% de los AVISA por enfermedades neoplásicas y el 1% del total anual. Según datos del Registro Poblacional de Cáncer de Cali, el cáncer gástrico pasó de ser la primera causa de cáncer en hombres al segundo lugar después del cáncer de piel en el quinquenio⁹²⁻⁹⁶, continúa siendo la tercera causa de cáncer en mujeres precedido por el cáncer de cervix y seno, predomina en personas de edad mediana y avanzada, es más frecuente en mayores de cincuenta años y ocurre excepcionalmente en personas menores de treinta años³⁻⁶.

Estudios epidemiológicos y patológicos

En 1970 gracias a la iniciativa del Dr. Pelayo Correa, se realizaron los estudios de epidemiología descriptiva del cáncer gástrico en Colombia, a partir de los cuales se demostró una alta incidencia en poblaciones como Nariño, Cauca, el Altiplano Cundiboyacense y el Oriente Antioqueño. Al estudiar la frecuencia de tipos histológicos, se encontró que en estas poblaciones de alto riesgo, el carcinoma gástrico de tipo intestinal prevalece sobre el de tipo difuso, el cual a su vez es más frecuente en poblaciones de bajo riesgo como Cartagena. También quedaron establecidos factores de riesgo medioambientales, principalmente relacionados con hábitos alimenticios, una flora bacteriana en la cavidad gástrica capaz de reducir nitratos a nitritos, y altas concentraciones de nitratos en aguas de aljibes de las poblaciones de mayor riesgo⁷⁻¹³. Con base en todos estos estudios se planteó una hipótesis causal en la cual se considera que la variedad intestinal o epidémica del carcinoma gástrico, es el resultado final de un proceso multifactorial en múltiples pasos, en el cual los factores medioambientales son muy importantes. El modelo sugiere la progresión de lesiones precancerosas en un proceso de carcinogénesis que se presume es secuencial así: gastritis crónica - atrofia - metaplasia intestinal - displasia, ya que al estudiar la historia natural de estas lesiones se pudo demostrar que cada una de estas alteraciones morfológicas se asocian con un incremento del riesgo para cáncer gástrico. Además se estableció que los cambios fenotípicos de la mucosa gástrica requieren un largo período de incubación¹⁴⁻¹⁶. La evidencia reciente sugiere además que la infección por *Helicobacter pylori* en las edades tempranas de la vida también es un factor de riesgo importante¹⁷⁻²⁰. El mecanismo de carcino-

génesis todavía no está muy claro pero se considera que induce la proliferación celular, permite la progresión de gastritis a atrofia, y estimula una respuesta inflamatoria que con el tiempo es genotóxica, ya que el estrés oxidativo de especies reactivas del oxígeno generadas por monocitos y polimorfonucleares tiene potencial carcinogénico causando alteraciones genéticas en la mucosa gástrica^{20b}.

Carcinogénesis en múltiples pasos

El modelo del Dr. Correa establece la acumulación de mutaciones en las células de la mucosa gástrica que con el tiempo permiten el cambio en la morfología tisular. Aunque los mecanismos moleculares de la mutagénesis química y/o biológica involucrados en la iniciación y promoción del cáncer gástrico todavía no son claros, la caracterización de las alteraciones genéticas y epigenéticas encontradas en estos tumores ha permitido conocer que genes y moléculas pueden estar implicados en la progresión tumoral²¹. Se observa por ejemplo, la secuencia de cambios morfológicos arriba mencionados; y acortamiento del telómero y actividad telomerasa en metaplasia, displasia y pólipos hiperplásicos²³⁻²⁹. De esta forma, será posible plantear modelos que evidencien las bases moleculares del proceso de carcinogénesis en múltiples pasos para el adenocarcinoma gástrico, de manera similar a como fue planteado para el cáncer colorectal.

La teoría de la carcinogénesis sugiere que la proliferación celular ilimitada es requerida para el desarrollo de la enfermedad maligna, y que las células cancerosas deben alcanzar la inmortalidad para la progresión al estado maligno³⁹. Los avances en genética y biología molecular han permitido la comprensión de algunos mecanismos responsables de estos procesos, principalmente en lo que se refiere al papel del complejo funcional telómero/telomerasa. Esto ha permitido evaluar su utilidad como marcador de progresión tumoral en varios tipos de cánceres, lo cual puede ser útil como herramienta diagnóstica temprana, ya que su presencia en lesiones precancerosas son la evidencia objetiva de clones celulares inmortales con mayor riesgo de progresión a cáncer, pues lesiones como metaplasia o displasia son consideradas desde el punto de vista histopatológico mecanismos de adaptación celular que no necesariamente progresan a neoplasia. Además, dado que la telomerasa no se expresa en tejidos normales adyacentes al tejido tumoral, su presencia puede permitir en algunos casos la detección de células tumorales en los márgenes de resección.

Telómeros

Los telómeros son estructuras nucleoprotéicas complejas que consisten en una secuencia repetitiva

de ADN ubicada en los extremos de los cromosomas, y proteínas asociadas. Para los humanos y muchos otros organismos, esta secuencia es (5'-TTAGGG-3')ⁿ extendida a lo largo de aproximadamente 8-14 kb.^{70,71} La mayoría del ADN telomérico existe en una conformación de doble hebra, sin embargo, las últimas secuencias de la cadena rica en guaninas orientada en la dirección 5'-3' conforman una única hebra de ADN^{72a,b}. Esta hebra puede adoptar un número de configuraciones de apareamiento de bases no convencional formando estructuras conocidas como G-cuadruplex en asociación con proteínas de unión a cadena sencilla de ADN⁷³. Esta estructura tridimensional evita que los extremos cromosómicos sean reconocidos como un extremo libre de ADN dañado, lo cual llevaría a una parada del ciclo celular y la activación de los mecanismos de reparación del ADN para reestablecer los extremos fragmentados. Además de proteger los extremos cromosómicos de eventos como recombinación, fusión y degradación por exonucleasa y ligasas, los telómeros también participan en procesos nucleares tales como represión transcripcional (efecto de posición del telómero), formación de heterocromatina, regulación del apareamiento y separación de cromosomas homólogos durante la mitosis, y organización espacial de los cromosomas (topología) en la matriz nuclear⁷⁴.

Los telómeros son metabolizados por un acortamiento progresivo a partir de la replicación del ADN en cultivos de células humanas normales, y también con la edad *in vivo*^{35-38,75,76}. En cada división celular, los telómeros pierden 50-200 bp en el extremo 3' de la molécula de ADN, reflejando la inhabilidad de las polimerasas de ADN convencionales para replicar los extremos de los cromosomas, y los efectos de la exonucleasa 5'-3'. Se ha sugerido que este problema de la replicación de los extremos⁷⁷ opera como un reloj mitótico a través del cual la célula contabiliza el número de divisiones celulares hasta llegar al punto de senescencia celular, convirtiéndose en un importante mecanismo de control ya que se conoce que las células inmortalizadas mantienen la longitud telomérica para incrementar el número de divisiones celulares^{78,79}.

Para compensar el acortamiento telomérico, los organismos han desarrollado complejos mecanismos. Por ejemplo, en células humanas, el principal mecanismo es la síntesis de novo de los telómeros por la telomerasa, una enzima que elonga la cadena sencilla de ADN telomérico en la fase S del ciclo celular⁸⁰. En *Drosophila melanogaster*, el ADN telomérico puede ser elongado por transposición de retrotransposones específicos (HeT-A y TART) a los extremos cromosómicos, mientras que en otros organismos la extensión de los telómeros puede ocurrir por recombinación^{81,82}. De esta forma, la longitud de los telómeros depende de una dinámica de equilibrio entre la tasa de acortamiento de ADN telomérico dependiente de la replica-

ción, y el grado de alargamiento compensatorio a través de procesos tales como la reactivación de telomerasa.

Otro grupo de importantes reguladores de la función del telómero son las proteínas de unión al telómero. En levaduras, las proteínas de unión al telómero son las proteínas de unión a cadena doble Rap1 y Taz1p, y las proteínas de unión a cadena sencilla Rif6p, Cdc13, Est1p y Est2p⁸³. En humanos, los factores de unión a cadena doble son TRF1 y TRF2, y las proteínas de unión a cadena sencilla son TERT, proteína asociada a telomerasa 1 TEP1, y hnRNP A1^{84,85}. Las proteínas de unión al ADN telomérico forman un complejo de orden superior que reconocen al telómero de una manera específica de secuencia, y además tienen interacciones con otras proteínas. Estas proteínas interactúan a través de interacciones proteína-proteína y comprometen un gran dominio cromosómico funcional llamado «telosoma». Ejemplos de estas proteínas son SIR3/SIR4 y la proteína RIF1 en *Saccharomyces cerevisiae*. Estas proteínas se asocian con RAP1 y estabilizan el telómero silenciándolo y regulando su longitud respectivamente⁸³.

La longitud del telómero humano se mide usualmente por análisis Southern blot en el cual, el ADN genómico previamente aislado del material de estudio es digerido con una o varias enzimas de restricción. Posteriormente, los fragmentos de restricción terminal (TRF) son hibridizados con una sonda telomérica, y finalmente se hace una cuantificación densitométrica de la señal^{145,146}.

Telomerasa

La enzima dependiente de ARN denominada transferasa terminal o telomerasa fue identificada inicialmente en *Tetrahymena* como un complejo ribonucleoprotéico que utiliza secuencias de su propio ARN como molde para la síntesis de novo de secuencias de ADN telomérico.^{86,87} Estudios posteriores en otros organismos, incluyendo humanos han permitido la clonación molecular de los componentes de la holoenzima ((300 kDa).⁸⁸ Un grupo funcional cataliza la adición de nucleótidos en la cadena sencilla de ADN telomérico orientado en la dirección 5'-3' mientras que la síntesis de la hebra complementaria esta mediada por la ADN polimerasa convencional. Los mecanismos básicos de reacción de la telomerasa son reconocimiento, apareamiento adición de nucleótidos y traslocación^{89,90}.

La subunidad catalítica de la telomerasa humana es una ADN polimerasa dependiente de ARN o transcriptasa reversa hTERT (Human Telomerase Reverse Transcriptase)⁹¹ que utiliza el componente ARN (hTR) como molde para elongar la cadena sencilla de ADN 3' gracias a la síntesis de novo de secuencias teloméricas. El análisis del gen que codifica hTR reveló

que tiene 445 nucleótidos, y la presencia de la secuencia (5'-CUAACCCUAAC-3') que codifica para la secuencia telomérica (TTAGGG) n^{88} . La subunidad ARN además de servir como templete, también está implicada en el sitio activo enzimático, probablemente con nucleótidos específicos interactuando con componentes estructurales del sustrato primer de ADN y las subunidades protéicas. El complejo holoenzima telomerasa humana también comprende la proteína hTEP1 requerida para el ensamblaje y la actividad de la enzima^{83b}. Estas y otras proteínas pueden funcionar como elementos regulatorios de la procesividad de la enzima⁸³. Sin embargo, se reconoce que solo la proteína catalítica hTERT es el factor limitante de la activación de telomerasa, por lo cual la regulación de su expresión puede ser un factor clave en la extensión de la replicación celular y la inmortalización⁹².

Muchos tejidos exhiben actividad telomerasa durante el desarrollo embrionario temprano con la subsecuente represión en la medida que progresa la diferenciación celular⁹³. Esta situación es paralela con la pérdida de la actividad telomerasa en células inmortales tratadas con inductores de la diferenciación⁹⁴. El mecanismo por el cual la telomerasa es reprimida en tejidos somáticos normales parece involucrar la regulación transcripcional y postranscripcional del gen hTERT⁹⁵.

El ensayo TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol), es utilizado para probar la actividad telomerasa. Este incluye la preparación de un extracto protéico por lisis celular y adición de dNTPs. Si la telomerasa es activa en el extracto, esta elonga el templete, y el producto de elongación es amplificado por PCR. Usando este protocolo de amplificación, es posible detectar una célula telomerasa positiva entre 10,000^{96,145}.

Modelo de crisis telomérica

Los estudios usando modelos de cultivo celular indicaron que las células para hacerse inmortales necesitan vencer dos estadios críticos, los estadios de Mortalidad 1 (M1) y 2 (M2). El acortamiento del telómero hasta un punto crítico conduce a una parada de la proliferación sin pérdida de la función bioquímica o la viabilidad (M1). Una hipótesis para la inducción de M1 sugiere que el acortamiento del telómero produce una señal de daño del ADN, lo cual induce p53 y p21. A su vez, p21 inhibe las CDK previniendo la fosforilación de pRb. La presencia de pRb desfosforilado se acopla con otras acciones de p53 y p21 resultando en la parada M1. Si estos reguladores del ciclo celular son mutados o bloqueados, las células continúan dividiéndose hasta alcanzar M2 y así los telómeros continúan acortándose. Algunas células murinas y casos raros de células humanas vencen este

estadio M2 y crecen inmortalmente en cultivo. Se ha encontrado que la telomerasa es reactivada concomitantemente para sobrepasar M2. Estas observaciones de células inmortalizadas in vitro llevaron a proponer que las células cancerosas activan la telomerasa para crecer inmortalmente. Este modelo de «crisis telomérica» ha sido enmarcado dentro de la teoría de la evolución clonal del cáncer^{50a}. Cuando dos cromosomas pierden la función del telómero, se hacen inestables y se fusionan el uno al otro generando lo que se conoce como cromosoma dicéntrico⁴⁵. Durante la mitosis, los dos centrómeros son separados por el huso, y como resultado de la tensión mecánica, se genera una nueva fragmentación, y los dos cromosomas resultantes no tienen telómeros funcionales llevando así a un nuevo ciclo de fusión. Una variedad de cromosomas aberrantes son producidos por este mecanismo. Sin embargo, mientras la telomerasa no sea activada, el nuevo cromosoma formado seguirá sin telómero funcional, y las células sujetas a estos ciclos eventualmente mueren. Sin embargo, si las células tienen un telómero reducido y telomerasa activa, ello puede activamente producir cromosomas aberrantes y estables. Bajo estas condiciones, la oportunidad para formar un cromosoma modificado se incrementará significativamente. Esta habilidad da una ventaja enorme a las células cancerosas, por lo cual se ha sugerido que un telómero corto y una telomerasa activa forman una poderosa fuerza directriz para que las células cancerosas continúen con su evolución clonal^{50a,b}.

Evidencia clínica

Cerca del 85% de los tumores sólidos tienen actividad telomerasa detectable, y fragmentos de restricción terminal (TRF) cromosómicos con una longitud dramáticamente reducida a 2-4 kb a diferencia de la línea germinal y células fetales con 20 kb^{46,47}. La siguiente descripción es un resumen de lo que ha sido reportado hasta la fecha describiendo las implicaciones de la biología del complejo funcional telómero/telomerasa en el desarrollo del cáncer.

Los tumores con telómeros más cortos que el tejido original han sido detectados en muchos tipos de cáncer. En neuroblastoma, cáncer endometrial, cáncer de mama, leucemias y cáncer de pulmón, una correlación entre la disminución de la longitud del telómero y un incremento en la severidad de la enfermedad han sido descritos⁹⁷⁻¹⁰². Los tumores con telómeros igual o más largos que el tejido normal original son raros pero han sido descritos en tumores intracraneales, carcinoma de células basales y carcinoma de células renales¹⁰³⁻¹⁰⁶. Sin embargo, es posible que la telomerasa (cuya actividad no fue estudiada) elongara los telómeros, o que las células tumorales no hayan tenido

aún bastantes divisiones celulares para inducir el acortamiento de los telómeros. Por esta razón, para describir la dinámica del telómero de las células cancerosas en relación con el mecanismo del desarrollo del cáncer, es importante considerar tanto la longitud del telómero como la actividad telomerasa, ya que ninguno de los dos por separado es prueba suficiente de cáncer.

La alta sensibilidad del ensayo TRAP ha permitido el análisis de muestras de tejido mínimas, tales como aspirado con aguja fina de mama y tiroides, extendidos cervicales, células tumorales en líquido ascítico, y lavados orales y urinarios¹⁰⁷⁻¹¹⁹. La sensibilidad y especificidad de estos ensayos en la detección de células tumorales en estos especímenes ha sido superior que el estándar de oro citológico.

También hay evidencia acerca de la alta actividad telomerasa correlacionada con peor pronóstico en leucemias, meningiomas, neuroblastomas, y cánceres de mama, colorectal y de pulmón¹²⁰⁻¹²⁷. Por ejemplo, la longitud del telómero fue reducida en todos los casos de leucemia mieloide aguda (LMA) y crónica (LMC) comparados con células sanguíneas normales derivadas de grupos de edad similares. En cuanto a la actividad telomerasa, todos los casos de LMC en fase crónica mostraron muy bajos niveles de actividad, similares a los encontrados en las células sanguíneas. En contraste todos los casos de crisis blástica mostraron altos niveles de actividad¹²⁰. De esta forma se demostró que la telomerasa es altamente activa durante la progresión de la enfermedad. De la misma forma ciertos tipos de tumor tales como el neuroblastoma, muestran la actividad telomerasa más baja en los estadios iniciales del cáncer, mientras que la expresión en los estadios tardíos es mayor. En un estudio, los neuroblastomas de estadio IV, los cuales tienen telómeros cortos y ninguna o débil actividad telomerasa, regresaron espontáneamente, posiblemente como prueba de la correlación entre una muy débil actividad de la enzima para permitir un estado de inmortalidad, y un resultado favorable para el paciente¹²³. Así, la determinación de la actividad telomerasa puede ser particularmente importante en la evaluación de los bordes del tumor en pacientes bajo terapia para predecir el riesgo de recidiva.

La utilidad de los marcadores tumorales es a menudo medida por su efectividad en la detección temprana de lesiones premalignas. Los ensayos de actividad telomerasa han sido aplicados a un número de órganos donde las lesiones exhiben estadios precancerosos bien definidos⁵¹⁻⁵⁷. En tejido cervical uterino, la progresión de neoplasia intraepitelial cervical a carcinoma franco se correlaciona con un incremento en los porcentajes de células telomerasa positivas⁵². En lesiones de próstata hay una correlación similar entre la actividad telomerasa y la progresión de neoplasia intraepitelial prostática a cáncer de próstata⁵¹.

De esta forma, la detección de la actividad telomerasa en estadios de crecimiento preneoplásicos y benignos puede significar progresión de la enfermedad y ser de valor diagnóstico. Por ejemplo, la actividad telomerasa ha sido encontrada en algunos casos de hiperplasia prostática benigna y tumores gigantes benignos de hueso, tejidos que pueden progresar a tumores malignos^{128,129}.

En tumores premalignos y benignos, incluyendo enfermedad fibroquística de la mama y fibroadenomas, hiperplasia prostática benigna, adenoma colorectal, astrocitoma anaplásico meningiomas y leiomiomas benignos, la actividad telomerasa detectada fue débil; sin embargo, se encontró en los estadios tumorales malignos^{124,128-131}. De esta forma, la actividad telomerasa se asocia con la adquisición de malignidad.

Por otra parte, algunos tumores tienen una baja incidencia de actividad telomerasa. Por ejemplo, la actividad está presente en el 50% de las muestras de glioblastomas y retinoblastomas, y la actividad se encuentra raramente en astrocitomas y meningiomas^{132,133,130}. Los investigadores han reportado la elongación en células humanas inmortalizadas sin actividad telomerasa detectable¹³⁴⁻¹³⁶. No está claro aún si la estabilización del telómero en estas células es alcanzado por mecanismos de recombinación o transposición, o si las células transformadas pueden desarrollar mecanismos alternativos para hacer frente a cualquier posible inhibición de la telomerasa.

La detección de la actividad telomerasa en tejidos que normalmente tienen actividad telomerasa tales como leucemias y lesiones de endometrio presentan dificultades en la interpretación como indicador de estado tumoral^{137,138}. El análisis de posibles lesiones malignas en nódulos linfáticos es también complicada por el hecho de que nódulos linfáticos benignos han demostrado actividad telomerasa¹³⁹. Además, el ensayo TRAP puede detectar el 0.01% de células telomerasa positivas en una mezcla de poblaciones celulares. De esta forma, en tejidos de tumor homogeneizados, pequeños números de células madre positivas o linfocitos pueden alterar los resultados¹⁴⁰.

En otros estudios también se ha estimado la expresión de las subunidades de telomerasa hTR y hTERT^{141,142}. Sin embargo, la correlación de estas con la actividad telomerasa no siempre es paralela^{67,68}. Por último, también se ha estimado el valor de hTERT en suero de pacientes con cáncer, sin embargo hacen falta más estudios al respecto¹⁴³.

En conclusión, la actividad telomerasa es un marcador tumoral confiable, pero no es un fenómeno del todo o nada. Son necesarios por lo tanto más estudios clínicos retrospectivos y prospectivos con grandes números de muestras y seguimiento clínico para evaluar la validez de la dinámica del telómero y la telomerasa como marcadores diagnósticos y pronósticos en muchos tipos de cáncer.

1.3 Objetivos

Objetivo general

Evaluar el papel de la longitud telomérica y actividad telomerasa en la progresión tumoral a partir de biopsias y especímenes quirúrgicos en una muestra de población colombiana con diagnóstico patológico de lesiones precancerosas y/o adenocarcinoma gástrico tipo intestinal.

Objetivos específicos

1. Analizar el grado de longitud telomérica y actividad telomerasa en adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal a partir de tejido biopsiado y especímenes quirúrgicos.
2. Determinar el grado de longitud telomérica y actividad telomerasa en lesiones precancerosas tales como: gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia gástrica a partir de biopsias de mucosa gástrica y especímenes quirúrgicos.
3. Correlacionar el análisis de longitud telomérica y actividad telomerasa con los diagnósticos histopatológicos de lesiones precancerosas, cáncer y mucosa gástrica sana del mismo paciente.
4. Correlacionar el análisis de longitud telomérica y actividad telomerasa con las siguientes variables clinicopatológicas: género, edad, localización del tumor (cardial, fundocorporal o gastropilórica), tamaño del tumor, grado de invasión, grado de displasia y estadiaje TNM.
5. Estimar la correlación entre la actividad telomerasa y la longitud telomérica de las muestras de estudio.
6. Establecer una cohorte para estudios posteriores tendientes a valorar sensibilidad, especificidad y valores predictivos de los marcadores moleculares frente a la histopatología convencional.

1.4 Metodología

Tipo de estudio: Estudio piloto no experimental/ Analítico/Casos y Controles/Transversal

Población de estudio: Pacientes del servicio de Gastroenterología y Endoscopia de la Clínica Los Fundadores, y del servicio de Cirugía de la Clínica San Pedro Claver e Instituto Nacional de Cancerología Bogotá D.C.

Casos: En el estudio se seleccionarán durante el período Enero-Junio de 2004 cincuenta pacientes con evidencia endoscópica y/o histopatológica de adenocarcinoma gástrico de tipo intestinal y/o lesiones precancerosas tales como, gastritis atrófica, metaplasia intestinal o displasia gástrica. Los pacientes pueden presentar cualquier sexo y edad, tendrán una historia

clínica detallada y firmarán el respectivo consentimiento informado.

Controles: Muestras de mucosa gástrica sana de la población de estudio.

Endoscopia y biopsia

El examen endoscópico será realizado en la forma usual por un endoscopista experimentado, con el paciente en decúbito lateral izquierdo, y aplicación de lidocaína «spray» en la orofaringe y sin sedación. Se utilizará equipo de videoscopia EVIS 140 para realizar la ubicación y clasificación endoscópica de las lesiones, y se tomarán biopsias según el Sistema Sydney (dos muestras del antro, una de la incisura angularis y dos del cuerpo) con pinza Jumbo para lograr una muestra de aproximadamente 50-100 mg. Un set de biopsias será para estudio histopatológico convencional por lo cual se sumergirán las muestras en formol tamponado al 2% y se enviarán al laboratorio de Patología. El otro set de biopsias será para estudio de biología molecular para lo cual se congelarán inmediatamente en nitrógeno líquido para ser transportadas al laboratorio del Instituto de Genética -UN donde se almacenarán a -80°C hasta su uso. Todas las muestras serán codificadas y se almacenarán los datos en la base de datos Access para el posterior análisis.

Especímenes Quirúrgicos

Se recuperará la pieza quirúrgica de los pacientes con cáncer sometidos a gastrectomía e inmediatamente se realizará la anatomía macroscópica. Se realizará la clasificación TNM144 y se ubicarán y registrarán las regiones de interés para tomar las correspondientes muestras de tejido lesionado y mucosa sana las cuales serán sometidas a estudio histopatológico y de biología molecular. Estas muestras se conservarán en formol tamponado al 2% y nitrógeno líquido respectivamente. Estas últimas se almacenarán a -80°C hasta su uso.

Diagnóstico Patológico

Al menos dos patólogos expertos realizarán en consenso el estudio de anatomía microscópica de biopsias y especímenes quirúrgicos. La histología se realizará utilizando coloración de hematoxilina eosina. No obstante, tomando en cuenta las equivalencias entre las diferentes nomenclaturas¹⁴⁵, se seguirán los criterios de Lauren¹⁴⁶ para reportar el tipo de adenocarcinoma gástrico, la nomenclatura de Riddell¹⁴⁷ para el grado de displasia, y la nomenclatura Sydney para valorar tanto la densidad del infiltrado inflamatorio como el grado de atrofia glandular¹⁴⁸. Además se reportará sobre la base de su morfología el tipo de metaplasia

intestinal como completa e incompleta según sea el caso¹⁴⁹.

Estudio Molecular de Muestras: Cada muestra de estudio será dividida en dos grupos, uno de ellos para realizar el análisis de longitud telomérica mediante hibridización southern blotting, y el otro para determinar la actividad telomerasa a partir del ensayo TRAP. Probablemente no todas las muestras sean analizadas para actividad telomerasa dada la limitante en la cantidad de tejido disponible.

Ensayo para establecer la longitud telomérica

El análisis para establecer la longitud telomérica, ha sido tradicionalmente a través de Southern blotting. En términos generales, debe aislarse la población celular de estudio, y purificar el ADN genómico. Posteriormente, este ADN es digerido con enzimas de restricción cuya secuencia de corte no involucra la región telomérica. De esta forma, el ADN es cortado en pequeños fragmentos dejando indemne el Fragmento de Restricción Terminal (TRF) compuesto por el telómero y la región subtelomérica. Los fragmentos de ADN son separados en un gel de agarosa y transferidos a una membrana para el análisis Southern blotting. La hibridización se hace con una sonda específica para la secuencia telomérica. La detección de la posición de la sonda hibridizada sobre la membrana puede ser realizada utilizando un sistema de quimioluminiscencia o radiactivo. Finalmente, el la longitud promedio del TRF de cada muestra de estudio se calcula a partir de la posición de la señal detectada con respecto a la posición de estándares de tamaño conocido^{150,151}.

Aislamiento de ADN: Para el aislamiento de ADN de las muestras de estudio se utilizará el protocolo para aislamiento de ADN de tejido QIAamp DNA Mini Kit, 152 y se confirmará la ausencia de degradación por electroforesis.

Digestión de ADN genómico: La digestión de ADN genómico se realizará utilizando una mezcla de endonucleasas de restricción RsaI/Hinfi, al menos 2.5µg ADN por muestra serán utilizados. Los fragmentos de ADN se resolverán en un gel de agarosa al 0.8%. El gel se correrá a 20V por 25 horas.

Southern Blotting: Se utilizará una membrana de nylon cargada positivamente y se usará buffer alcalino NaOH. La transferencia se hará a temperatura ambiente toda la noche.

Hibridización: Se adicionará la sonda telomérica marcada con digoxigenina al buffer de hibridización y se realizará la detección por quimioluminiscencia con lumiphos 530.

Cálculo de la longitud telomérica: Este cálculo puede obtenerse, comparando visualmente el tamaño del barrido obtenido de la muestra de estudio con el

del marcador de peso molecular Lambda Hind III. La longitud del telómero de cada muestra se estimará como el cálculo de la longitud telomérica promedio. Se medirá tanto el grado de acortamiento como la señal de intensidad telomérica a partir del análisis densitométrico.

Ensayo TRAP para determinar actividad telomerasa

El ensayo para determinar la actividad telomerasa en extractos celulares es denominado TRAP (Telomere Repeat Amplification Protocol), e incluye la preparación de un extracto proteico por lisis celular y adición de dNTPs. Si la telomerasa es activa en el extracto, esta elonga el template, y el producto de elongación es amplificado por PCR.

Estos productos son después visualizados utilizando fluorocromos de ADN altamente sensibles, o por autoradiografía después de utilizar un primer marcado radioactivamente. El número, y la intensidad de la secuencia telomérica son usados como medida de la actividad telomerasa en el tejido de estudio. Usando este protocolo de amplificación, es posible detectar una célula telomerasa positiva entre 10,000.

Determinación de la concentración proteica: Se utilizarán dos soluciones stock de 0.1 mg/ml y 1 mg/ml de BSA, se prepararán varias concentraciones estándar de BSA con buffer de lisis. Para cada estándar se preparará un volumen total de 50 µl. Se utilizará reactivo de Coomassie, y se utilizarán 50 µl de cada extracto celular. Se elaborará la curva estándar usando los datos de OD595 de varias muestras estándar y se utilizará esta curva para determinar la concentración de proteína del extracto de tejido.

Amplificación por PCR: Para detectar la actividad telomerasa, a la muestra que contiene telomerasa se adicionarán secuencias teloméricas en el extremo 3' del primer sintético TS. En un segundo paso, los productos de telomerasa extendidos se amplificarán por PCR utilizando los primers TS y RP. La actividad telomerasa se establecerá a partir de la detección de fluorocromo por método no radiactivo. Cada tubo contendrá aproximadamente 48 µl de mezcla maestra, 2 µl de muestra, y 200 µl de aceite mineral. Los ciclos podrán programarse como sigue: 30°C/10-30 min para un ciclo, y luego 94°C/30 seg y 60°C/30 seg para 25-30 ciclos. Además se sugiere un rango de temperatura entre 50°C-60°C.

PAGE: Se preparará una PAGE vertical al 12.5-15% en TBE 0.5X para resolver los productos de PCR. Las muestras se correrán a 500V por 1 hora. Finalmente para visualizar el material de estudio se utilizará una dilución 1/10000 de verde SYBR por 30 min, y posteriormente se utilizará una fuente UV. El control interno TSNT aparecerá como una banda de 36 pb, y el producto más pequeño de telomerasa será de 50 pb.

Cuantificar la actividad Telomerasa: El nivel de telomerasa en una muestra es determinado al comparar la señal obtenida de la muestra de cada carril con la señal de la muestra obtenida utilizando cantidades conocidas estándar. El oligonucleótido R8 estándar usado para el ensayo TRAP contiene la misma secuencia del producto de telomerasa de 8 secuencias. Con este estándar, se observa un patrón característico de 6 bandas que corresponden del primero al sexto producto TRAP observado. También se utilizará la línea celular Hela como control positivo. El control interno TSNT es la banda más pequeña de 36 bp y estará presente en cada carril incluyendo el buffer control negativo, la muestra control tratada con calor y las muestras de estudio. La siguiente banda TRAP más pequeña será de 50 bp, y todas las siguientes bandas tendrán incrementos de 6 bp (56, 62 y 68 bp, e.t.c.).

Análisis estadístico

Las muestras de estudio serán divididas en dos grupos, uno con actividad telomerasa detectable y otro con actividad telomerasa indetectable. Entre estos dos grupos se compararán datos clínicopatológicos tales como: género, edad, tipo de lesión precancerosa, tamaño del tumor, localización del tumor, grado de invasión, grado de displasia, estadiaje TNM y alteraciones del TRF mediante un test de Fisher ó X2. El grado de significancia estadística lo darán valores de $P < 0.05$. La longitud telomérica de muestras telomerasa positivas de lesiones precancerosas y adenocarcinomas se comparará con la de muestras telomerasa negativas de mucosa gástrica sana correspondiente mediante la prueba estadística t de Student.

1.5 Disposiciones vigentes

Consideraciones éticas

La metodología y el manejo de la información dentro de esta investigación se encuentra en el marco de la legislación nacional, cumpliendo lo estipulado por el Ministerio de Salud en lo concerniente a la reglamentación en ciencia y tecnología, Resolución No. 008430 de 1993, en la cual se establecen las normas científicas, técnicas y administrativas para el desarrollo de la actividad investigativa en salud¹⁵⁴.

El Comité de ética, previo aval del Comité de Investigación de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional de Colombia evaluó de manera crítica la pertinencia de la propuesta y formuló las respectivas sugerencias.

El estudio propuesto se fundamenta sobre la base de estudios previos realizados por investigadores principalmente Japoneses y aún Colombianos en los que se ha estudiado la historia natural de las lesiones

precancerosas, inicialmente a partir de la histopatología convencional y más recientemente con la búsqueda de marcadores de progresión tumoral a partir de material biológico obtenido mediante endoscopia. En estos estudios se ha demostrado que este tipo de procedimiento convencional en la evaluación gastroenterológica no conlleva riesgos significativos, y que por el contrario, las endoscopias seriadas en poblaciones de alto riesgo han demostrado ser de gran beneficio, ya que de esta forma se ha logrado la disminución de la mortalidad por cáncer de estómago cuando éste se detecta a tiempo.

Teniendo en cuenta que la participación de los pacientes dentro del proyecto ofrece un riesgo mayor que el mínimo, puesto que la toma de biopsias por endoscopia es un método invasivo, es importante aclarar que este procedimiento se realizará por un endoscopista experto y que se aclararán con detalle a cada paciente que desee participar en la investigación tanto los riesgos mínimos como los beneficios del mismo.

La selección de los pacientes se realizará con la independencia y voluntad de cada una de sus familias o de los individuos en particular, en la que expresan su deseo de participar en la investigación y la firma del consentimiento informado respectivo, mediante el cual el sujeto de investigación o en su caso, su representante legal, autoriza su participación en la investigación, con pleno conocimiento de la naturaleza de los procedimientos, beneficios y riesgos a que se someterá, con la capacidad de libre elección y sin coacción alguna.

Para proteger la privacidad del individuo sujeto de investigación, en todo momento se mantendrá la más estricta confidencialidad y su nombre no será mencionado en ninguno de los informes acerca del estudio, identificándolo solo cuando los resultados lo requieran y éste lo autorice.

Además, para todos los individuos se tomarán en cuenta el respeto a su dignidad y la protección de sus derechos y su bienestar. Por lo tanto, si cualquiera de ellos desea no continuar en la investigación, será respetada su decisión sin que esto afecte la calidad de sus servicios médicos. Así mismo se tomarán las medidas pertinentes para evitar cualquier riesgo o daño a los sujetos de investigación, y si esto ocurre, se proporcionará la atención médica para aliviar el problema al sujeto que sufra algún daño sin perjuicio de la indemnización que legalmente le corresponda.

1.6 Resultados/Productos esperados y potenciales beneficiarios

Con este estudio se espera identificar el grado de longitud telomérica en adenocarcinomas gástricos de tipo intestinal, y lesiones precancerosas tales como gastritis atrófica, metaplasia intestinal y displasia para

correlacionarlas con variables clínicopatológicas. Esta investigación permitirá determinar la utilidad de este marcador molecular en el diagnóstico temprano de lesiones con riesgo de progresión a cáncer gástrico.

Este estudio permitirá complementar los trabajos que actualmente se están llevando a cabo en el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia, por parte del Grupo de Patología Molecular, los cuales buscan caracterizar las principales alteraciones genéticas del proceso de carcinogénesis gástrica a partir de tejido archivado. En esta oportunidad, se analizará la parte correspondiente a la longitud telomérica en tejido fresco.

El desarrollo de este tipo de proyectos permitirá la introducción en la Universidad Nacional de Colombia y particularmente en el Departamento de Patología de metodologías moleculares que ayuden a esclarecer la patogénesis de las enfermedades, con impacto en el diagnóstico y pronóstico de diferentes patologías, así como la creación de un grupo interdisciplinario para el estudio molecular de enfermedades con vinculación de estudiantes de posgrado para la realización de proyectos de investigación encaminados a generar conocimiento en las áreas de la Patología Molecular y la Biología Tumoral, contribuyendo con ello a la promoción, formación y capacitación de personal científico de alta calidad.

Este tipo de conocimiento permitirá generar una utilidad clínica, ya que de él podrán beneficiarse gastroenterólogos, patólogos, oncólogos y por supuesto pacientes con adenocarcinoma gástrico.

Una vez finalizado el proyecto, los resultados obtenidos serán publicados en un artículo en revista internacional arbitrada, y se llevarán a cabo conferencias en eventos nacionales e internacionales presentando los resultados de los mismos. Así, de esta investigación también podrán beneficiarse grupos de investigación nacionales e internacionales, al tener acceso a la información generada en esta propuesta, lo cual repercutirá en la formulación de convenios, contratos y proyectos interinstitucionales.

Además, estos resultados también serán difundidos en medios masivos de comunicación como reportajes que permitan al público en general conocer los desarrollos y resultados de la propuesta.

1.7 Impacto esperado

El proyecto planteado significaría un aporte muy importante para el conocimiento de las bases moleculares de la carcinogénesis gástrica, así como para determinar la utilidad clínica de la longitud telomérica como marcador de diagnóstico temprano en pacientes con lesiones precancerosas. En este país, considerado de alto riesgo para el desarrollo del adenocarcinoma gástrico, es muy necesario evaluar estas herramientas

moleculares con el objetivo de incursionarlas en la clínica y de esta forma disminuir las tasas de mortalidad por cáncer gástrico.

1.8 Impacto ambiental del proyecto

La ejecución del proyecto de investigación propuesto no confiere un impacto ambiental negativo. Además se aclara que no se manipulará material radioactivo y se garantiza que se manejarán adecuadamente los residuos químicos de laboratorio por parte del personal del Instituto de Genética encargado para ello.

1.9 Trayectoria del grupo investigador

El Investigador principal y los Coinvestigadores de la propuesta cuyas hojas de vida están registradas en el GrupLAC y CvLAC conforman el Grupo de Patología Molecular de la Universidad Nacional de Colombia, el cual culminó recientemente un estudio tendiente a caracterizar las principales alteraciones genéticas del proceso de carcinogénesis gástrica, específicamente realizando microdissección manual, inmunohistoquímica para p53 y análisis mutacional de los genes p53, APC, MCC y K-ras en metaplasia intestinal, displasia y adenocarcinoma gástrico a partir de tejido archivado. Actualmente, se está adelantando la primera fase del presente proyecto (Análisis de Longitud Telomérica) con recursos de Colciencias y esperamos continuar pronto con la segunda fase (Expresión de Telomerasa). Además, también se planteará la posibilidad de estudiar la expresión de proteínas asociadas al telómero tales como TRF1, TRF2 y POT1, las cuales se han considerado como factores importantes en la estabilización de la longitud telomérica. Lo anterior permitirá extender esta línea de investigación en Genética Molecular del Telómero para desarrollar proyectos relacionados en otros tipos de cáncer.

1.10 Cronograma de actividades

Fase/mes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Ubicación de muestras												
Extracción de ADN												
Diagnóstico patológico												
Estandarizar Técnicas Moleculares												
Southern blotting												
Ensayo TRAP												
Análisis resultados												
Divulgación de resultados												

Referencias

1. Fuchs CS, Mayer RJ. Gastric Carcinoma. *N Engl J Med* 1995;333:32-41.
2. Alexander R, Kelsen D, Tepper J. Cancer of the Stomach. In: V. T. DeVita, S. Hellmann, and S. A. Rosenberg (eds), *Cancer: Principles and Practice of Oncology*. New York: Lippincott-Raven, 1997.
3. Instituto Nacional de Cancerología, Subdirección General de Investigación –Vigilancia Epidemiológica– Promoción y Prevención. Registro Institucional de Cáncer Año 2001. República de Colombia, Ministerio de Salud. Santafé de Bogotá.
4. Arias V, Paul M, Yunis J, Ricaurte O, Palacios D. Tumores gástricos en el Hospital San Juan y Clínica Carlos Lleras Restrepo de Bogotá. *Rev Facult de Medicina* 2001;49:65-69.
5. Gómez M, Gutiérrez O, Ricaurte O. Características epidemiológicas del cáncer gástrico. *Acta Med Colomb* 1998; 23:229.
6. Liga Colombiana de Lucha Contra el Cáncer Seccional Bogotá. Reporte epidemiológico 1999.
7. Correa P, Cuello C, Duque E. Carcinoma and intestinal metaplasia of the stomach in colombian migrants. *J Nat Cancer Inst* 1970;44:297-306.
8. Cuello C, Correa P. Estudio de la etiología del cáncer gástrico. I. Epidemiología del cáncer y lesiones precancerosas. *Acta Med Valle* 1978;9:1-9.
9. Cuello C, Correa P. Estudio de la etiología del cáncer gástrico. II. Epidemiología analítica de lesiones precancerosas estudios ambientales. Hipótesis etiológica. *Acta Med Valle* 1978;9:10-14.
10. Cuello C, Correa P, Haenszel W, Gordillo G, Brown C, Archer M, Tannenbaum S. Gastric cancer in Colombia. I. Cancer risk and suspect enviromental agents. *J Nat Cancer Inst* 1976;57:1015-20.
11. Haenszel W, Correa P, Cuello C, Guzman N, Burbano L, Lores H, Muñoz J. Gastric cancer in Colombia. II. Case-control epidemiologic study of precursor lesions. *J Nat Cancer Inst* 1976;57:1021-1026.
12. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: cross-sectional studies. *Cancer Res* 1990;50:4731-4736.
13. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Zavala D, Fontham E, Zarama G, Tannenbaum S, Collazos T, Ruiz B. Gastric precancerous process in a high risk population: Cohort follow-up. *Cancer Res* 1990; 50:4737-4741.
14. Correa P, Haenszel W, Cuello C, Tannenbaum S, Archer M. A model for gastric cancer epidemiology. *The Lancet* 1975;12:58-60.
15. Correa P. A human model of gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1988;48:3554-60.
16. Correa P. Human gastric carcinogenesis: a multistep and multifactorial process. First American Cancer Society Award Lecture on Cancer Epidemiology and Prevention. *Cancer Res* 1992; 52:6735-40.
17. Correa P. Is gastric carcinoma an infectious disease? *N Engl J Med* 1991;325:1170-1171.
18. Correa P. Helicobacter Pylori and human carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 (supple 1):35-43.
19. Ricaurte O. Asociacion entre el cáncer gástrico y la infección por Helicobacter Pylori. *Rev Col Gastroent* 1997; 12:25-30.
20. Uemura N, Okamoto S, Yamamoto S, Matsumura N, Yamaguchi S, Yamakido M, Taniyama K, Sasaki N, Schlemper RJ. Helicobacter pylori Infection and the Development of Gastric Cancer. *N Engl J Med* 2001;345:784-789. b) Obst B, Wagner S, Sewing KF and Beil W. Helicobacter pylori causes DNA damage in gastric epithelial cells. *Carcinogenesis* 2000;21:1111-1115.
21. Yokozaki H, Yasui W, Tahara E. Genetic and epigenetic changes in stomach cancer. *International Review of Cytology* 2001;204:49-95.
22. Tahara E. Genetic alterations in human gastrointestinal cancers. *Cancer* 1994;75:1410-1417.
23. Shiao Y, Rugge M, Correa P, Lehmann H, Scheer W. p53 alteration in gastric precancerous lesions. *Am J Pathol* 1994;144:511-517.
24. Cahill RJ et al. Gastric epithelial cells kinetics in the progression from normal mucosa to gastric carcinoma. *Gut* 1996;38:177-181.
25. Correa P, Shiao Y. Phenotypic and genotypic events in gastric carcinogenesis. *Cancer Res* 1994;54:1941-43. Chan A, Luk J, Hui W, Lam S. Molecular biology of gastric carcinoma: From laboratory to bedside. *Journal of Gastroenterology and Hepatology* 1999;14:1150-60.
26. Mori Masaki et al. Analysis of the gene-expression profile regarding the progression of human gastric carcinoma. *Surgery* 2002 Jan 131(1 (Part 2)) Supplement S39-S47.
27. Kim YS, Yoo HS, Lee KT, Goh SH, Jung JS, Oh SW, Baba M, Yasuda T, Matsubara K, Nagai H. Detection of genetic alterations in the human gastric cancer cell lines by two-dimensional analysis of genomic DNA. *Int J Oncol* 2000;17:297-308.
28. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T and Tahara E. Telomerase activity in preneoplastic and neoplastic gastric and colorectal lesions *Clinical Cancer Research* 1995;1:1245-1251.
29. Tahara E. Molecular mechanisms of stomach carcinogenesis. *J Cancer Res Clin Oncol* 1993;119:265-272.
30. Tahara E. Molecular biology of gastric cancer. *World J Surg* 1995;19:484-490.
31. Stadländer CT, waterbor JW. Molecular epidemiology, pathogenesis and prevention of gastric cancer. *Carcinogenesis* 1999;20:2195-2208.
32. Heppner G, Miller F. The cellular basis of tumor progression. *International Review of cytology* 1998;177:1-56.
33. Hayflick L. Mortality and Immortality at the Cellular Level. *Biochemistry (Moscow)*, 1997;62.
34. Skulachev VP. Special issue: telomere, telomerase, cancer, and aging. *Biochemistry (Moscow)*, 1997;62.
35. Huffman K, Levene S, Tesmer V, Shay J, and Wright W. Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. *J Biol Chem* 2000; 275: 19719-19722.
36. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shortening during ageing of human fibroblasts. *Nature (Lond.)* 1990;345:458-460.
37. Harley CB, and Allsopp RC. Evidence for a critical telomere length in senescent human fibroblasts. *Exp Cell Res* 1995; 219:130-136.

38. Allsopp RC, Vaziri H, Patterson C, Goldstein S, Younglai EV, Futcher AB, Greider CW, Harley CB. Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:10114-10118.
39. Hanahan D and Weinberg R. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57-70.
40. Hahn W, Counter C, Lundberg A, Beijersbergen M and Weinberg R. Creation of human tumour cells with defined genetic elements. *Nature* 1999; 400:464-468.
41. Greider C. Telomerase activity, cell proliferation, and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:90-92.
42. Wright W, Piatyzsek M, Rainey W, Byrd W, Shay J. Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. *Dev Genet* 1996;18:173-179.
43. Liu K, Schoonmaker M, Levine B, June C, Hodes R, Weng N. Constitutive and regulated expression of telomerase reverse transcriptase (hTERT) in human lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:5147-5152.
44. Notaro R, Cimmino A, Tabarini D, Rotoli B, Luzzatto L. In vivo telomere dynamics of human hematopoietic stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:13782-13785.
45. Gisselson D, Jonson T, Petersen A, Strombeck B, Cin P, Hoglund M, Mitelman F, Mertens F, Mandahl N. Telomere dysfunction triggers extensive DNA fragmentation and evolution of complex chromosome abnormalities in human malignant tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:12683-12688.
46. Kim NW, Piatyzsek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, Coviello GM, Wright WE, Weinrich SL, Shay JW. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-2015.
47. Shay JW, Bacchetti. A survey of telomerase activity in human cancer. *Eur J Cancer* 1997;33:787-791.
48. Morson BC, Sobin LH, Grundman E, Lohansen A, Nagayo T, Serck-Hansen A. Precancerous conditions and epithelial dysplasia in the stomach. *J Clin Pathol* 1980; 33:711-721.
49. El-Zimaity HMT, Ramchatesingh J, Ali Saeed M, Graham DY. Gastric intestinal metaplasia: subtypes and natural history. *J Clin Pathol* 2001;54:679-683.
50. Ishikawa F. Telomere crisis, the driving force in cancer cell evolution. *Bioch Biophys Res Com* 1997;230:1-6. b). Muser RS, Depinho R. Connecting chromosomes, crisis and cancer. *Science* 2002;26:565-569.
51. Zhang W, Kapusta LR, Slingerland JM, Klotz LH. Telomerase activity in prostate cancer, prostatic intraepithelial neoplasia, and benign prostatic epithelium. *Cancer Res* 1998;58:619-621.
52. Pao CC, Tseng CJ, Lin CY, et al. Differential expression of telomerase activity in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions. *J.Clin.Oncol* 1997;15: 1932-1937.
53. Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J and Moore MA. Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 1997;3:1931-1941.
54. Kyo S, Takakura M, Tanaka M, Murakami K, Saitoh R, Hirano H and Inoue M. Quantitative differences in telomerase activity among malignant, premalignant, and benign ovarian lesions. *Clinical Cancer Research* 1998;2:399-405.
55. Kannan S, Tahara H, Yokozaki H, Mathew B, Nalinakumari KR, Nair MK and Tahara E. Telomerase activity in premalignant and malignant lesions of human oral mucosa. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention* 1997;6:413-420.
56. Yashima K, Litzky LA, Kaiser L, Rogers T, Lam S, Wistuba II, Milchgrub S, Srivastava S, Meeker A, Wesley R. Gage, Jessica L. Hicks, Inpakala Simon, Jonathan R. Coffman, Piatyzsek MA, Shay JW and Gazdar AF. Telomerase expression in respiratory epithelium during the multistage pathogenesis of lung carcinomas. *Cancer Research* 1997;57:2373-2377.
57. Yashima K, Milchgrub S, Gollahon LS, Maitra A, Saboorian MH, Shay JW and Gazdar A. Telomerase enzyme activity and RNA expression during the multistage pathogenesis of breast carcinoma. *Clinical Cancer Research* 1998;4:229-234.
58. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, Kodama T, Piatyzsek M, Shay J, Matsuura Y. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995;55:3258-3262.
59. Tahara H, Kuniyasu H, Yokozaki H, Yasui W, Shay JW, Ide T. Telomerase activity in premalignant and neoplastic gastric and colorectal lesions. *Clin Cancer Res* 1995; 1:1245-51.
60. Zhan WH, Ma JP, Peng JS, Gao JS, Cai SR, Wang JP, Zheng ZQ, Wang L. Telomerase activity in gastric cancer and its clinical implications. *World J Gastroent* 1999;5:316-319.
61. Maruyama Y et al. Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Japanese Journal of Clinical Oncology*, 1997.
62. Elizabeth A. Platz, Gerron E. March and Angelo M. De Marzo. Telomere length assessment in human archival tissues combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *American Journal of Pathology* 2002; 160:1259-1268.
63. Rathi A, Hur K, Gazdar AF, Bae JS, Jang JJ, Kim DY. Telomerase RNA expression during progression of gastric cancer. *Hum Pathol* 1999;30:1302-1308.
64. Heine B, Hummel M, Demel G, Stein H. Demonstration of constant upregulation of the telomerase RNA component in human gastric carcinomas using in situ hybridization. *J Pathol* 1998;185:139-44.
65. Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E, Tahara H, Ide T, Hatuma K, Yasui W, Kajiyama G, Tahara E. In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J Cancer Res* 1998;89:1187-1194.
66. Jong HS, Park YI, Kim S, Sohn JH, Kang SH, Song SH, Bang YJ, Kim NK. Up-regulation of human telomerase catalytic subunit during gastric carcinogenesis. *Cancer* 1999; 86:559-565.
67. Kameshima H, Yagihashi A, Yajima T, Kobayashi D, Hirata K, Watanabe N. Expression of telomerase-associated genes: reflection of telomerase activity in gastric cancer? *World J Surg* 2001;25:285-289.
68. Blasco M, Rizen M, Greider C, Hanahan D. Differential regulation of telomerase activity and telomerase RNA during multi-stage tumorigenesis. *Nat Genet* 1996; 12:200-204.
69. Siewert R, Sandler A. The current management of gastric cancer. *Advances in Surgery* 1999;33:69-90.
70. Moyzis R, Buckingham J, Cram S, Dani M, Deaven L, Jones M, Meyne J, Ratliff R, Wu J. A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of

- human chromosomes. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;85:6622-26.
71. Meyne J, Ratliff RL, Moyzis RK. Conservation of the human telomere sequence (TTAGGG)_n among vertebrates. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989;86:7049-53.
 72. McElligott R, Wellinger RJ. The terminal DNA structure of mammalian chromosomes. *EMBO J* 1997;16:3705-3714. b). Henderson ER, Blackburn EH. An overhanging 3 terminus is a conserved feature of telomeres. *Mol Cell Biol* 1989;9:345-348.
 73. Griffith J, Comeau L, Rosenfield S, Stansel R, Bianchi A, Moss H, de Lange T. Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell* 1999;97:503-514.
 74. Kipling D. *The telomere*. Oxford University Press 1995.
 75. Lindsey J, McGill N, Lindsey L, Green D, Cooke H. In vivo loss of telomeric repeats with age in humans. *Mut Res* 1991;256:45-48.
 76. Hastie N, Dempster, Maureen, Dunlop, Malcolm, Thompson, Alastair, Green, Daryll, Allshire, Robin. Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature* 1990;346: 866-868.
 77. Levy MZ, Allsopp RC, Fucher B, Greider CW, Harley CB. Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992;225:951-60.
 78. Bryan TM, Englezou A, Dunham MA, Reddel RR. Telomere length dynamics in telomerase-positive immortal human cell populations. *Exp Cell Res* 1998;239:370-378.
 79. Bryan TM and Reddel RR. Telomere dynamics and telomerase activity in in vitro immortalised human cells. *Eur J Cancer* 1997;33:767-773.
 80. Sun D, Lopez C, Quada J, Hurley L, Von Hoff D. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry* 1999;38:4037-4044.
 81. Biessman H, Carter SB, and Mason JM. Chromosome ends in *Drosophila* without telomeric DNA sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990;87:1758-1761.
 82. McEachern MJ, Blackburn EH. Cap-prevented recombination between terminal telomeric repeat arrays (telomere CPR) maintains telomeres in *K. lactis* lacking telomerase. *Genes Dev* 1996;10:1822-1834.
 83. McEachern MJ, Krauskopf, and Blackburn EH. Telomeres and their control. *Ann Rev Genet* 2000;34:331-358. b). Harrington I, McPhail T, Mar V, Zhou W, Oulton R, Bass M, Arruda I, Robinson M. A mammalian telomerase associated protein. *Science* 1997;275: 973-977.
 84. Broccoli D, Smogorzewska A, Chong L, de Lange T. Human telomeres contain two distinct Myb-related proteins, TRF1 and TRF2. *Nat Genet* 1997;17:231-235.
 85. Smogorzewska A, van Steensel B, Bianchi A, Oelmann S, Schaefer MR, Schnapp G, de Lange T. Control of human telomere length by TRF1 and TRF2. *Mol Cell Biol* 2000;20:1659-1668.
 86. Greider C, Blackburn E. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell* 1985;43:405-413.
 87. Greider C, Blackburn E. A telomeric sequence in the RNA of *Tetrahymena* telomerase required for telomere repeat synthesis. *Nature* 1989;337:331-336.
 88. Feng J, Funk W, Wang S, Weinrich S, Avilion A, Chiu C, Adams R, Chang E, Allshop R, Yu J, Le S, West M, Harley C, Andrews W, Greider C, Villeponteau B. The RNA component of human telomerase. *Science* 1995;269:1236-1239.
 89. Sun D, Lopez C, Quada J, Hurley L, Von Hoff D. Regulation of catalytic activity and processivity of human telomerase. *Biochemistry* 1999;38:4037-4044.
 90. Liu J. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999;13:2091-2104.
 91. Cong YS, Wen J, Bacchetti S. The human telomerase catalytic subunit hTERT: organization of the gene and characterization of the promoter. *Hum Mol Genet* 1999;8:137-142.
 92. Weinrich SL, Pruzan R, Ma L, Ouellette M, Tesmer VM, Holt SE, Bodnar AG, Lichtsteiner S, Kim NW, Trager JB, Taylor RD, Carlos R, Andrews WH, Wright WE, Shay JW, Harley CB, Morin GB. Reconstitution of human telomerase with the template RNA component hTR and the catalytic protein subunit hTERT. *Nat Genet* 1997;17:498-502.
 93. Greenberg RA, Allsopp RC, Chin L, Morin GB, and DePinho RA. Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene* 1998;16:1723-1730.
 94. Holt SE, Wright WE, and Shay JW. Regulation of telomerase activity in immortal cell lines. *Mol Cell Biol* 1996;16:2932-2939.
 95. Elenitoba-Johnson, K. S. J. Complex Regulation of Telomerase Activity: Implications for cancer therapy. *Am J Pathol* 2001;159:405-410.
 96. Kim NW, Wu F. Advances in quantification and characterization of telomerase activity by the telomeric repeat amplification protocol (TRAP). *Nucleic Acids Res* 1997;25:2595-2597.
 97. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Ishikawa T, Matsuura Y: Length of telomere repeats in neuroblastoma: correlation with prognosis and biological characteristics. *Jpn J Cancer Res* 1992;83:159-164.
 98. Smith J, Yeh G. Telomere reduction in endometrial adenocarcinoma. *Am J Obstet Gynecol* 1992;167:1883-1887.
 99. Odagiri E, Kanda N, Jibiki K, Demura R, Aikawa E, Demura H. Reduction of telomeric length and c-erbB-2 gene amplification in human breast cancer, fibroadenoma and gynecomastia. *Cancer* 1994;73:2978-84.
 100. Ohyashiki J, Ohyashiki K, Fujimura T, Kawakubo K, Shimamoto T, Iwabuchi A, Toyama K. Telomere shortening associated with disease evolution patterns in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res* 1994;54:3557-3560.
 101. Boultonwood J, Fidler C, Kusec R, Rack K, Elliott PJ, Atoyebi O, Chapman R, Oscier DG, Wainscoat JS. Telomere length in myelodysplastic syndromes. *Am. J. Hematol* 1997;56:266-271.
 102. Hiyama K, Hiyama E, Ishioka S, Yamakido M, Inai K, Gazdar A, et al. Telomerase activity in small-cell and non-small-cell lung cancers. *J Natl Cancer Inst* 1995;87:895-902.
 103. Schmitt H, Blin N, Zankl H, Scherthan H. Telomere length variation in normal and malignant human tissues. *Genes Chromosomes Cancer* 1994;11:171-177.
 104. Nurnberg P, Thiel G, Weber F, Epplen J. Changes of telomere lengths in human intracranial tumors. *Hum Genet* 1993;91:190-192.
 105. Wainwright J, Middleton PG, Rees JL. Changes in mean telomere length in basal cell carcinomas of the skin. *Genes Chromosom Cancer* 1995;12:45-49.
 106. Dahse R, Fiedler W, Ernst G, Kosmehl H, Schlichter A, Schubert J, Claussen U. Changes in telomere lengths in renal cell carcinomas. *Cell Mol Biol* 1996;42:477-85.

107. Poremba C, Shroyer KR, Frost M, Diallo R, Fogt F, Schafer KL, Burger H, Shroyer AL, Dockhorn-Dworniczak B, Boecker W. Telomerase is a highly sensitive and specific molecular marker in fine-needle aspirates of breast lesions. *J Clin Oncol* 1999;17:2020-2020.
108. Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku J, et al. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine needle aspirates. *Int J Cancer* 1996;69:301-306.
109. Aogi K, Kitahara K, Buley I, et al. Telomerase activity in lesions of the thyroid: application to diagnosis of clinical samples including fine-needle aspirates. *Clin Cancer Res* 1998;4:1965-70.
110. Kyo S, Takakura M, Ishikawa H, et al. Application of telomerase assay for the screening of cervical lesions. *Cancer Res* 1997;57:1863-1867.
111. Gorham H, Yoshida K, Sugino T, et al. Telomerase activity in human gynaecological malignancies. *J Clin Pathol* 1997;50:501-504.
112. Duggan Bd, Wan M, Yu MC, et al. Detection of ovarian cancer cells: comparison of a telomerase assay and cytologic examination. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:238-42.
113. Pisit Tangkijvanich, Dumrong Tresukosol, Pichet Sampatanukul, Sairoong Sakdikul, Narin Voravud, Varocha Mahachai, and Apiwat Mutirangura. Telomerase assay for differentiating between malignancy-related and nonmalignant ascites. *Clinical Cancer Research* 1999;5:2470-2475.
114. Mori N, Oka M, Hazama S, Iizuka N, Yamamoto K, Yoshino S, Tangoku A, Noma T, Hirose K. Detection of telomerase activity in peritoneal lavage fluid from patients with gastric cancer using immunomagnetic beads. *Br J Cancer* 2000 83:1026-1032.
115. Califano J, Ahrendt SA, Meiningner G, et al. Detection of telomerase activity in oral rinses for head and neck squamous cell carcinoma patients. *Cancer Res* 1996;56:5720-5722.
116. Kinoshita H, Ogawa O, Kakehi Y, et al. Detection of telomerase activity in exfoliated cells in urine from patients with bladder cancer. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:724-730.
117. Yoshida K, Sugino T, Tahara H, et al. Telomerase activity in bladder carcinoma and its implication for noninvasive diagnosis by detection on exfoliated cancer cells in urine. *Cancer* 1997;79:362-369.
118. Lee DH, Yang SC, Hong SJ, Chung BH and Kim IY. Telomerase: a potential marker of bladder transitional cell carcinoma in bladder washes. *Clinical Cancer Research* 1998;4:535-538.
119. Gelmini S, Crisci A, Salvadori B, Pazzagli M, Selli C, and Orlando C. Comparison of telomerase activity in bladder carcinoma and exfoliated cells collected in urine and bladder washings, using a quantitative assay. *Clinical Cancer Research* 2000;6:2771-2776.
120. Ohyashiki K, Ohyashiki J, Iwama H, Hayashi S, Shay J, Toyama K. Telomerase activity and cytogenetic changes in chronic myeloid leukemia with disease progression. *Leukemia (Baltimore)* 1997;11:190-194.
121. Uchida N, Otsuka T, Arima F, et al. Correlation of telomerase activity with development and progression of adult T cell leukemia. *Leukemia Res* 1999;23:311-316.
122. Lahgford LA, Piatyszek MA, Xu R, et al. Telomerase activity in ordinary meningiomas predicts poor outcome. *Human Pathol* 1997;28:416-420.
123. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995;1:249-255.
124. Hiyama E, Gollahon L, Kataoka T, et al. Telomerase activity in human breast tumors. *J Natl Cancer Inst* 1996;85:741-749.
125. Carey LA, Kim NW, Goodman S, Marks J, Henderson G, Umbricht CB, Dome JS, Dooley W, Amshey SR, Sukumar S. Telomerase activity and prognosis in primary breast cancers. *J Clin Oncol* 1999;17:3075-3081.
126. Albanell J, Leonardo F, Rusch V, Engelhardt M, Langenfeld J, Han W, Klimstra D, Venkatraman E, Moore MA, Dmitrovsky E. High telomerase activity in primary lung cancers: association with increased cell proliferation rates and advanced pathologic stage. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1609-1615.
127. Tatsumoto N, Hiyama E, Murakami Y, Imamura Y, Shay J, Matsuura Y and Yokoyama T. High Telomerase Activity is an independent prognostic indicator of poor outcome in colorectal cancer. *Clinical Cancer Research* 2000;6:2696-2701.
128. Sommerfeld HJ, Meeker AK, Piatyszek MA, Bova GS, Shay JW and Coffey DS. Telomerase activity: a prevalent marker of malignant human prostate tissue. *Cancer Research* 1996;56:218-222.
129. Schwartz H, Juliao S, Sciadini M, Miller L, Butler M. Telomerase activity and oncogenesis in giant cell tumors of bone. *Cancer*;1995;75:1094-1099.
130. Langford L, Piatyszek M, Xu R, Schold S, Shay J. Telomerase activity in human brain tumours. *Lancet* 1995;346:1267-1268.
131. Chandeneau C, Hay K, Hirte H, Gallinger S, Bacchetti S. Telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995;55:2533-2536.
132. Gupta J, Han LP, Wan P et al. Development of retinoblastoma in the absence of telomerase activity. *J Natl Cancer Inst* 1996;88:1152-1157.
133. DeMasters BK, Markham N, Lillehei KO, Shroyer KR. Differential telomerase expression in human primary intracranial tumors. *Am J Clin Pathol* 1997;107:548-554.
134. Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR. Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumor-derived cell lines. *Nat Med* 1997;3:1271-1274.
135. Bryan TM, Englezou A, Gupta J, Bacchetti S, and Reddel RR. Telomere elongation in immortal human cells without detectable telomerase activity. *EMBO J* 1995;14:4240-4248.
136. Reddel RR, Bryan TM, Murnane JP. Immortalized cells with no detectable telomerase activity. *Biochemistry* 1997;62:1254-1262.
137. Broccoli D, Young JW, de Lange T. Telomerase activity in normal and malignant hematopoietic cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995;92:9082-9086.
138. Brien TP, Kallakury BV, Lowry CV et al. Telomerase activity in benign endometrium and endometrial carcinoma. *Cancer Res* 1997;57:2760-2764.
139. Yashima K, Piatyszek MA, Saboorian HM et al. Telomerase activity and in situ telomerase RNA expression in malignant and non-malignant lymph nodes. *J Clin Pathol* 1997;50:110-117.

140. Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Guillem J, Scher H, Reuter V and Moore A. Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of the prostate, colon, and sarcoma. *Clinical Cancer Research* 1997;3: 1849-1857.
141. Zhang A, Zheng C, Lindvall C, Hou M, Ekedahl J, Lewensohn R, Yan Z, Yang X, Henriksson M, Blennow E, Nordenskjöld M, Zetterberg A, Björkholm M, Gruber A, Xu D. Frequent Amplification of the Telomerase Reverse Transcriptase Gene in Human Tumors. *Cancer Res* 2000; 60: 6230-6235.
142. Dome JS, Chung S, Bergemann T, Umbricht C, Saji M, Carey LA, Grundy PE, Perlman EJ, Breslow NE, Sukumar S. High telomerase reverse transcriptase (hTERT) messenger RNA level correlates with tumor recurrence in patients with favorable histology Wilms' tumor. *Cancer Res* 1999; 59:4301-4307.
143. Dasí F, Lledó S, García-Granero E, Ripoll R, Marugán M, Tormo M, García-Conde J, Aliño SF. Real-time quantification in plasma of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) mRNA: A simple blood test to monitor disease in cancer patients. *Lab Invest* 2001;81:767-769.
144. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965;64:31-49.
145. Shay J, Brasiskyte M, Ouellette, et al. Analysis of telomerase and telomeres. *Meth Mol Genet* 1994;5:263-280.
146. Pharmingen. Telomere length and telomeric repeat amplification protocol (TRAP) assay kits. 3 ed. 1998.
147. QIAGEN. QIAamp DNA Mini Kit Handbook. 1999.
148. Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY. 1989.