

Análisis de longitud telométrica en carcinogénesis gástrica

Telomere length analysis in gastric carcinogenesis

Luis Jaime Castro¹, Juan José Yunis^{1,6}, Orlando Ricaurte¹, Diego Alexander Forero¹,
Bruno Antonio Benítez¹, Martín Gómez², William Otero², Ricardo Oliveros³, Germán Barbosa⁴,
Humberto Arboleda^{1,6}

RESUMEN

Antecedentes: El modelo de carcinogénesis gástrica de múltiples pasos implica alteraciones genéticas y epigenéticas pobremente definidas. Una de estas alteraciones conocida como disfunción telomérica ha sido propuesta como uno de los principales mecanismos generadores de la inestabilidad genética encontrada desde las etapas más tempranas en varios cánceres epiteliales, incluido el adenocarcinoma gástrico. **Métodos:** En el presente estudio, analizamos la longitud telomérica media (LTM) en tejidos gástricos tumorales y no tumorales, así como en condiciones precancerosas tales como gastritis atrófica, metaplasia y displasia, a partir de tejido fresco empleando las metodologías de Southern blot y Dot blot, con base en protocolos previamente descritos. **Resultados:** Se encontró una buena correlación entre los valores obtenidos para la LTM usando estas dos metodologías ($r^2: 0,84$). No encontramos diferencias estadísticamente significativas en la LTM entre las muestras tumorales y no tumorales ($9,38 \pm 3,2$ Kb y $8,86 \pm 0,32$ Kb, respectivamente, $P: 0,53$), tampoco encontramos una correlación significativa entre la LTM y variables tales como la edad, sexo, localización ó diagnóstico histopatológico. **Conclusiones:** Aunque no se encontraron diferencias en la LTM en esta muestra de cáncer gástrico originaria de la población colombiana, es posible que la implementación en una muestra de mayor tamaño de otras metodologías moleculares más sensibles, tales como el Q-FISH y la PCR en tiempo real, permitan identificar diferencias en la longitud telomérica más pequeñas o específicas de cromosomas en cáncer gástrico.

Palabras clave: cáncer gástrico, telómeros, telomerasa.

SUMMARY

Introduction: Gastric cancer is the second most common cancer worldwide and the leading cause of cancer deaths in Colombia. Despite identification of some environmental and genetic risk factors, little is known about molecular mechanisms of gastric carcinogenesis. Recently, telomere instability has been suggested as a key factor in epithelial cancers including gastric cancer. **Materials and Methods:** In the current study mean telomere length (MTL) in tumoral and non tumoral tissues, as well as precancerous conditions such as atrophic gastritis, metaplasia and dysplasia were analyzed. Samples were obtained from endoscopy and gastric resection surgery procedures in different health institutions in Bogotá, Colombia. Genomic DNA was isolated from 57 tissue samples corresponding to 23 tumors, 1 dysplasia, 4 metaplasias, 6 atrophic gastritis, and 23 non tumoral tissues. The MTL was measured using Southern blot and Dot blot methodologies, as previously described. **Results:** A good correlation between values obtained using these both techniques ($r^2: 0.84$) was found. No statistically significant differences in MTL between tumoral and non tumoral samples (9.38 ± 3.2 Kb and 8.86 ± 0.32 Kb, respectively, $P: 0.53$) were found. Also no any significant correlation among MTL and variables such as age, sex, localization or histopathological diagnoses was appreciated. **Conclusions:** Although differences in TLM in the studied gastric cancer samples from Colombian population were not found, it is possible that in larger patient series and using more sensitive complementary molecular analytical techniques such as Q-FISH and qPCR, smaller or chromosome specific telomere differences could be identified.

Key words: gastric cancer, telomeres, telomerase.

Rev Esp Patología 2005; 38 (4): 229-233

INTRODUCCIÓN

El cáncer gástrico es la segunda causa más frecuente de cáncer en el mundo (1), y la primera causa de morta-

lidad por cáncer en Colombia, siendo el adenocarcinoma de tipo intestinal la variante epidémica de la enfermedad (2). A partir del estudio histopatológico de lesiones precancerosas en poblaciones de alto riesgo, se planteó

Recibido el 27/6/05. Aceptado el 22/12/05.

¹ Grupo de Patología Molecular, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

² Departamento de Medicina Interna, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

³ Grupo de Gastroenterología y Cirugía, Instituto Nacional de Cancerología E.S.E., Bogotá D.C., Colombia.

⁴ Grupo de Patología, Instituto Nacional de Cancerología E.S.E., Bogotá D.C., Colombia.

⁵ Departamento de Pediatría, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

⁶ Instituto de Genética, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C., Colombia.

harboledag@unal.edu.co

como hipótesis etiológica un proceso de carcinogénesis en múltiples pasos, el cual sugiere la progresión de lesiones precancerosas que se presume es secuencial así: gastritis crónica, atrofia, metaplasia intestinal, displasia, carcinoma (3). Se reconoce que este proceso es multifactorial ya que en él intervienen varios factores etiológicos, entre los cuales se considera la infección por *Helicobacter pylori* (4). 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 procesos (5), lo cual contribuirá al descubrimiento de marcadores diagnósticos y blancos terapéuticos más específicos (6). Uno de los mecanismos moleculares más estudiados en inmortalidad, senescencia y cáncer es la dinámica de acortamiento telomérico (7,8). Se considera que con cada división celular, los extremos de los cromosomas conocidos como telómeros se acortan hasta alcanzar un punto de senescencia celular, en el cual las células no se dividen más (9). 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 cáncer (10). Además, las células cancerosas reactivan la telomerasa, una transcriptasa reversa que permite la síntesis de nuevo ADN telomérico, para estabilizar el acortamiento de sus telómeros, y permitir que los clones celulares con cromosomas aberrantes tengan una capacidad de proliferación ilimitada (11). Aunque se ha encontrado que la actividad de telomerasa es un evento temprano en cáncer gástrico (12), evaluándose por diferentes metodologías (13-18), existe poca evidencia acerca del papel del acortamiento telomérico en el proceso de progresión tumoral.

En este estudio analizamos el grado de longitud telomérica en condiciones precancerosas y cáncer gástrico utilizando dos metodologías para evaluar el posible papel de la inestabilidad telomérica en carcinogénesis gástrica.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestras de Tejido

Previo consentimiento informado, se recolectaron muestras de pacientes atendidos en el servicio de Gastroenterología y Cirugía del Instituto Nacional de Cancerología de la ciudad de Bogotá durante el periodo enero-diciembre de 2004. Se identificaron 89 pacientes, 48 de

sexo femenino y 41 de sexo masculino, con una edad promedio de 65,2 años (rango: 26 a 87 años), en los que se realizaron 76 procedimientos de endoscopia más biopsia y 18 gastrectomías, a partir de los cuales se obtuvieron un total de 158 muestras de tejido gástrico. El estudio se realizó en 57 muestras de tejido, correspondientes a 23 tumores, 23 mucosas no tumorales, 1 displasia, 4 metaplasias y 6 gastritis atróficas. La localización de las lesiones fue Cardias 6, Cuerpo 12 y Antro 5.

Estudio Histopatológico

Las biopsias de endoscopia y especímenes quirúrgicos fueron analizadas por 2 patólogos expertos de forma independiente (O.R, G.B). La histología se realizó utilizando coloración de hematoxilina y eosina siguiendo los criterios de Lauren (19) para reportar el tipo de adenocarcinoma gástrico, la nomenclatura de Riddell (20) para el grado de displasia, y la nomenclatura de Sydney (21) para valorar tanto la densidad del infiltrado inflamatorio como el grado de atrofia glandular. Las metaplasias por su parte se reportaron sobre la base de su morfología (22).

Southern Blotting y Dot Blot

Realizando modificaciones de protocolos establecidos (23), aproximadamente 25 mg de tejido se utilizaron para aislar ADN genómico (QIAamp DNA Mini Kit de QIAGEN), obteniendo concentraciones promedio de ADN de 400 ng/ μ l. Tanto la pureza como el rendimiento del ADN del alto peso molecular obtenido se verificaron mediante absorbancia a 260 y 280 nm en un espectrofotómetro ultravioleta y posterior corrido electroforético en un gel de agarosa al 0,8 % para evaluar la integridad del mismo. A continuación se utilizaron 5 μ g de ADN genómico para realizar una digestión con 25 unidades de la enzima de restricción Hinf I. Después de comprobar la restricción, las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 0,8% durante 20 horas a 50V con lo cual se alcanzó una óptima resolución, y se realizó una transferencia a una membrana de nylon positivamente cargada (Hybond H+ Amersham) en buffer a pH neutro por 3 h en aparato de blotting con bomba de vacío.

Posterior a la fijación del ADN a la membrana mediante un crosslinker a 1.200 μ J/cm², se realizó hibridización a 42°C con sonda telomérica marcada previamente en su extremo 5' con digoxigenina. A continuación se hizo una detección inmunológica con anticuerpo dirigido contra digoxigenina y conjugado con fosfatasa alcalina, utilizando lumiphos 530 como sustrato de la enzima y finalmente revelado al exponer la membrana a una película de rayos X. Las respectivas películas expuestas fueron digitalizadas usando un escaner y alma-

cenadas en un computador. Posteriormente, las imágenes de Southern blot fueron analizadas mediante el macro Telometrics para el Programa NIH Image en Macintosh (desarrollado en el Fox Chase Cancer Center, USA) (24). El macro Telometrics proporciona los datos de media, mediana, varianza y moda para cada uno de los carriles al compararlos con las señales obtenidas en los carriles de marcador de ADN de alto peso molecular.

Para el análisis por dot blot, se realizaron algunas modificaciones a las condiciones ya reportadas en ensayos spot blot para telómeros (25). En resumen, las muestras de ADN (40 ng) fueron diluidas con 1,6 vol de 0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl, y desnaturalizadas a 56°C por 40 min. El aparato de dot blot fue ensamblado de acuerdo con las instrucciones de la casa comercial. Las condiciones de hibridización y detección fueron las mismas que se utilizaron para el análisis por southern blot. Una vez obtenidos los datos, cada membrana fue sometida a remoción de sonda telomérica en solución de 0,01% SSC, 0,5% SDS a 65°C por una hora y posteriormente rehibridización utilizando una sonda control para el cromosoma 19. La relación entre los valores de intensidad relativa generados mediante la hibridización con el gen de copia única y la hibridización con sonda telomérica, da un estimativo de la cantidad de ADN telomérico presente en cada muestra.

Análisis Estadístico

La comparación de alteraciones en la LTM y las variables clinicopatológicas tales como edad, tipo de lesión precancerosa, y localización del tumor fueron realizadas mediante las pruebas estadística t de Student. Un valor de $P < 0,05$ se consideró como estadísticamente significativo. Adicionalmente se estableció un análisis de regresión para determinar la correlación de LTM analizada por southern blot, y los datos de intensidad relativa obtenidos por dot blot.

RESULTADOS

Del total de muestras señaladas con anterioridad, se analizaron 57 con base en los criterios de inclusión y exclusión: consenso de diagnósticos para los propósitos del estudio, cantidad de muestra suficiente para análisis e integridad de ADN. Se encontró que la longitud telomérica promedio para las 23 muestras provenientes de tejido tumoral fue de 9,38 kilobases, con una desviación estándar de 3,86 kb, mediana de 8,28 kb, moda de 8,21 kb y rango de 7,56-24,64 kb. La longitud telomérica promedio de las correspondientes muestras de mucosa no tumoral fue de 8,80 kb, con una desviación estándar de 0,46 kb, mediana de 8,85 kb, moda de 8,87 kb y rango de 7,83-

9,56 kb. Del total de 6 casos de gastritis atróficas multifocales, se encontró una longitud telomérica promedio de 8,99 kb, con una desviación estándar de 1,34 kb, mediana de 8,85 kb, y rango de 6,89-10,65 kb. El número de metaplasias analizadas fue de 4, encontrándose una longitud telomérica promedio de 9,02 kb, con una desviación estándar de 0,44 kb, mediana de 8,91 kb y rango de 8,61-9,64 kb. Finalmente se encontró un caso de displasia el cual tenía una longitud telomérica promedio de 8,0 Kb. Al establecer las diferentes correlaciones, no encontramos diferencias estadísticamente significativas entre las muestras analizadas: Tumoral vs no tumoral: $P: 0,53$ (t test), Tumoral vs gastritis: $P: 0,71$ (t test), Tumoral vs metaplasia: $P: 0,70$ (t test), Gastritis vs no tumoral: $P: 0,58$ (t test), Metaplasia vs no tumoral: $P: 0,40$ (t test) y Metaplasia vs gastritis: $P: 0,97$ (t test). Por último, tampoco se encontraron correlaciones significativas entre el análisis de longitud telomérica con las variables clinicopatológicas: género ($-0,003$), edad ($-0,03$), localización del tumor (cardial, fundocorporal o gastropilórica) ($r = -0,13$) y finalmente diagnóstico histopatológico ($r = -0,12$).

DISCUSIÓN

El presente estudio, muestra que no hay diferencias en cuanto a longitud telomérica promedio entre muestras de tejido tumoral y tejido no tumoral ó con otras lesiones. Igualmente no se encontró ninguna correlación entre la longitud telomérica y variables tales como edad, diagnóstico patológico específico y sexo, aunque es de resaltar que se encontró una mayor variabilidad en los valores de longitud telomérica en el grupo de muestras tumorales que en las no tumorales. En otro estudio, las diferencias de longitud telomérica entre las diferentes lesiones, tampoco fueron significativas (26), probablemente debido a que el número de muestras en cada subgrupo patológico también fue insuficiente para arrojar conclusiones estadísticas. Por otra parte, aunque algunos trabajos señalan que el acortamiento telomérico se correlaciona con el estadio de progresión tumoral gástrica (27-29), no hay una clara correlación del grado de longitud con la expresión de telomerasa, poniendo de manifiesto la necesidad de evaluar el papel que pueden jugar otros factores reguladores de la longitud telomérica. También se ha reportado actividad telomerasa en mucosa gástrica normal sin sobreexpresión en mucosa tumoral (30), lo cual a su vez dificulta la interpretación de los estudios y explica las diferencias señaladas.

Teniendo en cuenta que varios artículos teóricos y experimentales, demuestran que los datos de longitud telomérica derivados del Southern blot pueden tener diferentes significados funcionales y estar sujetos a variaciones interensayo (31), y que además esta metodología es dispendiosa en cuanto a tiempo de realización, requirién-

dose grandes cantidades de ADN (en el orden de los microgramos), decidimos realizar el análisis de longitud telomérica mediante otra técnica complementaria como lo es el Dot blot, normalizando los datos de hibridación mediante la utilización de una sonda control para el promotor del gen ApoE. Esta metodología puede facilitar un análisis de rutina en un gran número de muestras y una medición de la cantidad total de secuencias teloméricas independiente del estado de degradación del ADN utilizando tan solo 40 ng. Nosotros logramos obtener una buena correlación entre los datos obtenidos a través de estas dos metodologías ($r=0,86$), validando los resultados negativos obtenidos. La implementación de una metodología rápida y barata para la medición de longitud telomérica como lo es el dot blot, es útil para el análisis de un gran número de muestras de manera eficiente en otro tipo de patologías en las cuales se sospecha que los telómeros pueden ser importantes, incluyendo aquellos casos en los que se tiene disponible una cantidad pequeña de material biológico como es el caso de los tejidos de archivo.

Recientemente, también se ha implementado el uso de metodologías más sensibles y costosas, tales como la PCR en tiempo real (32), el FISH acoplado a citometría de flujo (33,34) y el Q-FISH (35) que permiten, estimar diferencias de longitud telomérica en cada cromosoma individual, a diferencia del Southern blot que produce un promedio de las longitudes en todos los cromosomas. Incluso, también hay evidencia acerca de diferencias de longitud entre pares de cromosomas homólogos, haciendo posible que la heredabilidad de las longitudes teloméricas pueda tener un papel en cáncer (36). El uso de estas tecnologías, permitirán aclarar los resultados encontrados para cáncer gástrico, como ya ha sido posible para otros cánceres epiteliales (37-40).

Por último, la caracterización de proteínas asociadas al telómero sugieren que la regulación de la longitud y estabilidad telomérica es más compleja de lo que se pensaba (41-44). Aunque también ha sido posible evaluar el papel de algunas de estas proteínas en cáncer gástrico (45-47), hay reportes con resultados contradictorios (48,49), posiblemente debido a la utilización de técnicas diferentes, por lo cual se considera que son aún preliminares para concluir su papel en cáncer gástrico.

En resumen, el análisis integral de la dinámica de acortamiento telomérico, junto con el estudio de la actividad telomerasa y de los niveles de expresión de proteínas asociadas al telómero contribuirán a aclarar el papel de la inestabilidad telomérica en la progresión de la carcinogénesis gástrica.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a COLCIENCIAS (Proyecto N.º 1101041416) y al XV Premio Sanofi-Aventis, Academia

Nacional de Medicina, Colombia por la financiación de este estudio, y a los Grupos de Patología, Gastroenterología y Cirugía del Instituto Nacional de Cancerología, Bogotá D.C., por el reclutamiento de pacientes para el estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Plummer M, Franceschi S, Munoz N. Epidemiology of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; (157): 311-26.
2. Piñeros Murillo R. Incidencia de cáncer en Colombia. *Rev Colomb de Cancerol* 2004; 8: 5-14.
3. Correa P. The biological model of gastric carcinogenesis. *IARC Sci Publ* 2004; (157): 301-10.
4. Correa P. New strategies for the prevention of gastric cancer: *Helicobacter pylori* and genetic susceptibility. *J Surg Oncol* 2005; 90:134-8.
5. Tahara E. Genetic pathways of two types of gastric cancer. *IARC Sci Publ* 2004; (157): 327-49.
6. Yasui W, Oue N, Kuniyasu H, Ito R, Tahara E, Yokozaki H. Molecular diagnosis of gastric cancer: present and future. *Gastric Cancer* 2001; 4: 113-21.
7. Feldser DM, Hackett JA, Greider CW. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 623-7.
8. DePinho RA. The age of cancer. *Nature* 2000; 408: 248-54.
9. Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature* 1990; 345: 458-60.
10. DePinho RA, Polyak K. Cancer chromosomes in crisis. *Nat Genet.* 2004; 36(9): 932-4.
11. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PL, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science.* 1994; 266(5193): 2011-5.
12. Kuniyasu H, Domen T, Hamamoto T, Yokozaki H, Yasui W, Tahara H, et al. Expression of human telomerase RNA is an early event of stomach carcinogenesis. *Jpn J Cancer Res* 1997; 88: 103-7.
13. Suzuki K, Kashimura H, Ohkawa J, Itabashi M, Watanabe T, Sawahata T, et al. Expression of human telomerase catalytic subunit gene in cancerous and precancerous gastric conditions. *J Gastroenterol Hepatol* 2000; 15: 744-51.
14. Yoo J, Park SY, Kang SJ, Kim BK, Shim SI, Kang CS. Expression of telomerase activity, human telomerase RNA, and telomerase reverse transcriptase in gastric adenocarcinomas. *Mod Pathol* 2003; 16: 700-7.
15. Hiyama T, Yokozaki H, Kitadai Y, Tahara E, Tahara H, Ide T, et al. In situ mRNA hybridization technique for analysis of human telomerase RNA in gastric precancerous and cancerous lesions. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 1187-94.
16. Rathi A, Hur K, Gazdar AF, Bae JS, Jang JJ, Kim DY. Telomerase RNA expression during progression of gastric cancer. *Hum Pathol* 1999; 30: 1302-8.
17. 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.
18. Yasui W, Tahara E, Tahara H, Fujimoto J, Naka K, Nakayama J, et al. Immunohistochemical detection of human

- telomerase reverse transcriptase in normal mucosa and precancerous lesions of the stomach. *Jpn J Cancer Res* 1999; 90: 589-95.
19. Lauren P. The two histological main types of gastric carcinoma: diffuse and so-called intestinal-type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1965; 64: 31-49.
 20. Riddell RH, Goldman H, Ransohoff DF, Appelman HD, Fenoglio CM, Haggitt RC, et al. Dysplasia in inflammatory bowel disease: standardized classification with provisional clinical applications. *Hum Pathol* 1983; 14: 931-68.
 21. Dixon MF, Genta RM, Yardley JH, Correa P. Classification and grading of gastritis. The updated Sydney System. International Workshop on the Histopathology of Gastritis, Houston 1994. *Am J Surg Pathol* 1996; 20: 1161-81.
 22. Matsukura N, Suzuki K, Kawachi T, Aoyagi M, Sugimura T, Kitaoka H, et al. Distribution of marker enzymes and mucin in intestinal metaplasia in human stomach and relation to complete and incomplete types of intestinal metaplasia to minute gastric carcinomas. *J Natl Cancer Inst* 1980; 65: 231-40.
 23. Aldea AI, Barnadas A, Tarrats A, Vaquero M, Munoz C, Krugger M, et al. Análisis de longitud telomérica en carcinoma epitelial de ovario. *Medicina Clínica (Barc)*. 1998; 110(15): 561-5.
 24. Grant JD, Broccoli D, Muquit M, Manion FJ, Tisdall J, et al. Telometric: a tool providing simplified, reproducible measurements of telomeric DNA from constant field agarose gels. *Biotechniques* 2001; 31: 1314-6, 1318.
 25. Fordyce CA, Heaphy CM, Griffith JK. Chemiluminescent measurement of telomere DNA content in biopsies. *Biotechniques* 2002; 33: 144-6, 148.
 26. Hiyama E, Yokoyama T, Tatsumoto N, Hiyama K, Imamura Y, Murakami Y, et al. Telomerase activity in gastric cancer. *Cancer Res* 1995; 55: 3258-62.
 27. Maruyama Y, Hanai H, Fujita M, Kaneko E. Telomere length and telomerase activity in carcinogenesis of the stomach. *Jpn J Clin Oncol*. 1997; 27: 216-20.
 28. Furugori E, Hirayama R, Nakamura KI, Kammori M, Esaki Y, Takubo K. Telomere shortening in gastric carcinoma with aging despite telomerase activation. *J Cancer Res Clin Oncol* 2000; 126: 481-5.
 29. Yang SM, Fang DC, Luo YH, Lu R, Battle PD, Liu WW. Alterations of telomerase activity and terminal restriction fragment in gastric cancer and its premalignant lesions. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 876-82.
 30. Bachor C, Bachor OA, Boukamp P. Telomerase is active in normal gastrointestinal mucosa and not up-regulated in precancerous lesions. *J Cancer Res Clin Oncol* 1999; 125: 453-60.
 31. Saldanha SN, Andrews LG, Tollefsbol TO. Assessment of telomere length and factors that contribute to its stability. *Eur J Biochem* 2003; 270: 389-403.
 32. Cawthon RM. Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: e47.
 33. Baerlocher GM, Lansdorp PM. Telomere length measurements using fluorescence in situ hybridization and flow cytometry. *Methods Cell Biol* 2004; 75: 719-50.
 34. Baerlocher GM, Lansdorp PM. Telomere length measurements in leukocyte subsets by automated multicolor flow-FISH. *Cytometry A* 2003; 55: 1-6.
 35. Meeker AK, Gage WR, Hicks JL, Simon I, Coffman JR, Platz EA, et al. Telomere length assessment in human archival tissues: combined telomere fluorescence in situ hybridization and immunostaining. *Am J Pathol* 2002; 160: 1259-68.
 36. Londoño-Vallejo JA. Telomere length heterogeneity and chromosome instability. *Cancer Lett* 2004; 212: 135-44.
 37. Plentz RR, Wiemann SU, Flemming P, Meier PN, Kubicka S, Kreipe H, et al. Telomere shortening of epithelial cells characterises the adenoma-carcinoma transition of human colorectal cancer. *Gut* 2003; 52: 1304-7.
 38. Chin K, de Solorzano CO, Knowles D, Jones A, Chou W, Rodriguez EG, et al. In situ analyses of genome instability in breast cancer. *Nat Genet* 2004; 36: 984-8.
 39. Van Heek NT, Meeker AK, Kern SE, Yeo CJ, Lillemoe KD, Cameron JL, et al. Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Pathol* 2002; 161: 1541-7.
 40. Zhang A, Wang J, Zheng B, Fang X, Angstrom T, Liu C, et al. Telomere attrition predominantly occurs in precursor lesions during in vivo carcinogenic process of the uterine cervix. *Oncogene* 2004; 23: 7441-7.
 41. Smogorzewska A, de Lange T. Regulation of telomerase by telomeric proteins. *Annu Rev Biochem* 2004; 73: 177-208.
 42. Edmonds D, Breikreutz BJ, Harrington L. A genome-wide telomere screen in yeast: the long and short of it all. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; 101: 9515-6.
 43. Vega LR, Mateyak MK, Zakian VA. Getting to the end: telomerase access in yeast and humans. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2003; 4: 948-59.
 44. Kuimov AN. Polypeptide components of telomere nucleoprotein complex. *Biochemistry (Mosc)* 2004; 69: 117-29.
 45. Miyachi K, Fujita M, Tanaka N, Sasaki K, Sunagawa M. Correlation between telomerase activity and telomeric-repeat binding factors in gastric cancer. *J Exp Clin Cancer Res* 2002; 21: 269-75.
 46. Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Tahara H, Kuniyasu H, Kitada Y, et al. Expression of MRE11 complex (MRE11, RAD50, NBS1) and hRap1 and its relation with telomere regulation, telomerase activity in human gastric carcinomas. *Pathobiology* 2001; 69: 219-24.
 47. Kondo T, Oue N, Yoshida K, Mitani Y, Naka K, Nakayama H, et al. Expression of POT1 is associated with tumor stage and telomere length in gastric carcinoma. *Cancer Res* 2004; 64: 523-9.
 48. Matsutani N, Yokozaki H, Tahara E, Tahara H, Kuniyasu H, Haruma K, et al. Expression of telomeric repeat binding factor 1 and 2 and TRF1-interacting nuclear protein 2 in human gastric carcinomas. *Int J Oncol* 2001; 19: 507-12.
 49. Yamada M, Tsuji N, Nakamura M, Moriai R, Kobayashi D, Yagihashi A, et al. Down-regulation of TRF1, TRF2 and TIN2 genes is important to maintain telomeric DNA for gastric cancers. *Anticancer Res* 2002; 22: 3303-7.