

## **Determinación por quimioluminiscencia del contenido de telómero en biopsias de archivo de cáncer de colon.**

Yeinmy Morán<sup>1</sup>, Elvis Valderrama<sup>2</sup>, María Eugenia Camargo<sup>1</sup>, María Belén Rivero<sup>1</sup> y Miguel Ángel Chiurillo<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Laboratorio de Genética Molecular “Dr. Jorge Yunis-Turbay” y

<sup>2</sup>Departamento de Anatomía Patológica, Decanato de Medicina, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”. Barquisimeto, Venezuela.

Correo electrónico: mchiurillo@ucla.edu.ve

**Palabras clave:** Telómeros, marcador pronóstico, “slot blot”, adenocarcinoma de colon.

**Resumen.** Los telómeros son complejos nucleoproteicos que protegen los extremos de cromosomas eucariotas de fenómenos de degradación y recombinación. En humanos, los telómeros miden 10-12 kpb en células somáticas normales, pero pueden reducirse hasta apenas 1-2 kpb en células tumorales de rápido crecimiento, debido a la replicación incompleta de estas estructuras en cada división mitótica. Los telómeros se acortan con la edad, lo cual puede estar asociado a inestabilidad genómica y a un incremento del riesgo de sufrir cáncer. El análisis de fragmentos de restricción teloméricos por Southern blot es en la actualidad el método estándar para la medición de la longitud de los telómeros. Sin embargo, una determinación precisa no es posible cuando el ADN está fragmentado o es escaso, como es el caso de las biopsias incluidas en parafina. En este trabajo se adecuó un ensayo de *slot blot* para cuantificar el contenido relativo, en lugar de la longitud, del ADN telomérico a partir de muestras de archivo de adenocarcinoma de colon. El contenido de ADN telomérico pudo ser medido de manera reproducible con apenas 75 ng de ADN genómico altamente degradado empleando detección de la hibridación por quimioluminiscencia.

## **Chemiluminescent measurement of telomere DNA content in archival biopsies of colon adenocarcinoma.**

*Invest Clín 2007; 48(4): 485 - 493*

**Key words:** Telomere, prognostic marker, slot blot, colon adenocarcinoma.

**Abstract.** Telomeres are nucleoprotein complexes that protect the ends of eucaryotic chromosomes from degradation and recombination. In humans, telomeres measure 10-12 kbp in normal somatic cells, but they scarcely reach 1-2 kbp in tumor cells of rapid growth, due to the incomplete replication of these structures in each mitotic division. Telomeres shorten with age, which can be associated to genomic instability and to an increment of the risk of suffering from cancer. The standard method to measure the telomere length is the analysis of telomeric restriction fragments by Southern blot. However, a precise determination is not possible when the DNA is broken into small fragments or if it is scarce. In this work, a slot blot assay was adapted to quantify the relative content, instead of the length, of telomeric DNA from paraffin-embedded archival specimens of colon adenocarcinoma. The telomeric DNA content could be reproducibly measured with hardly 75 ng of highly degraded genomic DNA by chemiluminescent detection for hybridization.

*Recibido: 20-11-2006. Aceptado: 15-03-2007.*

### **INTRODUCCIÓN**

Los telómeros son estructuras esenciales compuestas por secuencias de ADN repetitivo formando complejos con proteínas, localizados a los extremos de cada cromosoma humano (1). El ADN telomérico que, en humanos está típicamente compuesto por 1000 a 2000 repeticiones del hexanucleótido TTAGGG (constituyendo 5-15 kilobases en total), es una entidad dinámica (2). Los telómeros no pueden ser replicados completamente por la enzima ADN polimerasa debido a que la misma es incapaz de completar o continuar copiando los extremos de hebras de ADN (3). Por lo tanto, la longitud de los telómeros decrece gradualmente con las sucesivas divisiones celulares, resultando en inestabilidad cromosomal y cambios genéticos que pueden llevar al envejecimiento celular y/o desarrollo de tumores (4, 5).

Los telómeros pueden mantener o incrementar su longitud, por medio de la acción de la enzima telomerasa (6), o en ocasiones, por eventos de amplificación o recombinación génica (7, 8). Durante la división de células somáticas normales, la ausencia de telomerasa ocasiona la erosión de las repeticiones teloméricas y la reducción de su longitud. Telómeros críticamente cortos se relacionan con el cese de la división celular, el inicio del proceso de envejecimiento y la génesis de enfermedades relacionadas con la edad avanzada (9, 10). Sin embargo, en células con alta tasa de replicación, tales como las germinativas y células tumorales, la telomerasa es expresada estabilizando la longitud de los telómeros y su estado inmortal (11). Debido a la importancia de los telómeros en varios procesos celulares, la determinación de la longitud de los mismos sirve como un indicador útil

y tiene valor clínico en el estudio de la estabilidad cromosomal, la actividad de la telomerasa, la capacidad proliferativa y los procesos de envejecimiento celular, y puede ser usada en el pronóstico de enfermedad, incluyendo varias malignas (12-16). Desde el punto de vista de la telomerasa como blanco quimioterapéutico contra el cáncer, se consideran que aquellos tumores con telómeros cortos serían los más sensibles a una inhibición de esta enzima (17).

La reducción de la longitud de los telómeros ha sido reportada en un grupo de tumores, incluyendo cáncer colorectal, renal, prostático y de mama, así como leucemias en la infancia (18-22). En el carcinoma colorectal, la variación en la longitud de los telómeros en muestras diferentes puede representar distintos estadios de carcinogénesis, y por lo tanto, el comportamiento biológico de los tumores. Ha sido reportado que el acortamiento de los telómeros ocurre frecuentemente tanto en carcinoma colorectal como en adenoma colónico, pero una escasa activación de la telomerasa ha sido notada en adenoma colónico, mientras que es fuertemente activada en el carcinoma colorectal inicial (18, 23).

El método tradicional de medición de la longitud de telómeros en muestras de ADN genómico (ADNg) determina el promedio de la longitud de los fragmentos de restricción terminales o fragmentos de restricción teloméricos (TRF) (24). Sin embargo, el método tiene cuatro limitaciones significativas. El procedimiento requiere grandes cantidades de ADN (0,5-10  $\mu\text{g}$ /individuo), el protocolo completo consume de 3 a 5 días, la fragmentación del ADN reduce la longitud observada de los telómeros (25) y finalmente, el promedio relativo de longitud de cada TRF puede variar hasta un 5%, dependiendo de las enzimas de restricción particulares empleadas, sugiriendo la existencia de sitios de restricción polimórficos en la región subtelomérica que pueden con-

fundir la identificación de los principales factores que originan las variaciones interindividuales en la longitud promedio de las repeticiones teloméricas (26).

Recientemente se han diseñado varios métodos para la cuantificación o determinación de la longitud de los telómeros intentando superar las limitaciones de los TRF. Algunos de ellos emplean dispositivos de PCR en tiempo real, lo que los hacen más costosos y dependientes de esa tecnología (26).

Fordyce y col. (27), adaptaron un ensayo de determinación del contenido de telómeros por *slot blot* para su detección por quimioluminiscencia. Dicho método mostró ser más sensible y rápido que los previamente publicados. Igualmente, estos autores evaluaron la capacidad del ensayo para ser usado en muestras de ADN purificadas de tejidos recién fijados con formaldehído, mostrando ser insensible al efecto de este último. Sin embargo, hasta la actualidad ningún trabajo publicado ha empleado muestras provenientes de biopsias de archivo incluidas en parafina sin emplear hibridización *in situ* fluorescente. Por ello, nos propusimos en el presente trabajo evaluar y adaptar la metodología de *slot blot* y la detección por quimioluminiscencia para determinar el contenido de telómero en biopsias de archivo, utilizando muestras con diagnóstico de adenocarcinoma de colon.

## MATERIALES Y METODOS

### Aislamiento de ADN genómico

Se seleccionaron 10 muestras de archivo incluidas en parafina con diagnóstico de adenocarcinoma de colon moderado o altamente diferenciado. Las biopsias fueron proporcionadas por el Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central "Antonio María Pineda" de Barquisimeto, realizadas en los años 2004 y 2005. De cada tumor

también se obtuvo biopsias de los bordes sanos de la lesión.

Como control, se extrajo ADN<sub>g</sub> de tejido sano procedente de los bordes de piezas de colectomía parcial de biopsias incluidas en parafina.

Se confirmó el diagnóstico histopatológico de las biopsias, tanto de los tumores como del tejido sano adyacente, y se tomó hasta un máximo de 25 mg de tejido obtenido por corte con micrótopo. Inicialmente los cortes fueron desparafinados con xilol, y luego lavados con etanol 99%. Luego de secar el tejido a 37°C se procedió a la extracción del ADN mediante el Kit DNeasy Tissue (QIAGEN) según las recomendaciones del fabricante. La presencia y calidad del ADN fue evaluada mediante electroforesis en geles de agarosa al 0,7% y observados luego de teñir con bromuro de etidio en un transiluminador de luz ultravioleta Foto/uv<sup>®</sup> 26 (Fotodyne<sup>®</sup>-Incorporated).

#### Cuantificación del ADN

Diluciones de las muestras fueron cuantificadas por espectrofotometría a 260 nm en un equipo Genequant pro (Amersham Biosciences). También se determinó la relación 260/280 nm para precisar la pureza y calidad del ADN obtenido.

#### Preparación e hibridización de *Slot blots*

Las muestras de ADN (0, 25, 50, 75, 100, 125 y 150 ng) fueron diluidas con dos volúmenes de 0,4 N NaOH y desnaturalizadas a 37°C por 30 min. De cada muestra de tumor se colocó 75 ng (por duplicado) de ADN. Como control negativo de la hibridización se empleó ADN plásmido bacteriano pGEM T-easy vector (Promega), que no debe reaccionar con la sonda telomérica. El equipo Hybri-Slot<sup>™</sup> Manifold (BRL) fue ensamblado según las especificaciones del fabricante, empleando la membrana de Nylon Hybond<sup>®</sup>-N<sup>+</sup> (Amersham Biosciences) sobre dos tiras de papel Whatman 1. Los pozos

fueron enjuagados dos veces con 0,4 N NaOH antes de cargar las muestras. Finalmente se lavaron los pozos con 0,4 N NaOH. Los filtros se enjuagaron con 2X SSC (cloruro de Sodio/Citrato de Sodio) y se dejaron secar a temperatura ambiente. Si no se utilizaron inmediatamente se almacenaron a 4°C.

Para las hibridaciones se empleó el kit de hibridación y detección por quimioluminiscencia North2South<sup>®</sup> (Pierce). Las prehibridaciones e hibridaciones fueron realizadas en botellas de cristal en un horno Hybaid<sup>®</sup> (Labnet) a 58°C. Se utilizó como sonda telomérica el oligonucleótido (5'-TTAGGG-3')<sub>4</sub> marcado con biotina. Cada filtro fue prehibridado por al menos 1 hora, e hibridado hasta un máximo de 15 horas. Al término de ese lapso se procedió con cuatro lavados de 5 min cada uno con solución 2X SSC/0,1% SDS a 58°C.

#### Detección y cuantificación de ADN telomérico

Posterior a la hibridación, el contenido de ADN telomérico fue determinado a través de la reacción por quimioluminiscencia con conjugado de streptavidina-peroxidasa en presencia de Luminol y solución con peróxido de hidrógeno, según las recomendaciones del fabricante (North2South<sup>®</sup>, Pierce). Luego de la incubación con el conjugado más luminol, los filtros fueron envueltos en plástico expuestos a películas Hyperfilm ECL<sup>®</sup> (Amersham-Biosciences), de 5 a 20 min.

#### Cuantificación del contenido de telómero

Las autoradiografías fueron digitalizadas con un equipo HP Scanjet 4670 a 300 dpi. La intensidad de la señal de la hibridación con la sonda telomérica fue determinada analizando las imágenes digitalizadas de las autoradiografías con el programa Molecular Imaging (Kodak). El contenido de telómero de cada muestra fue determinado

al comparar la señal generada con la pendiente o curva realizada con muestras control de ADN de concentración conocida por el programa Molecular Imaging (Kodak) y graficadas con el programa GraphPad Prism versión 4.00.

## RESULTADOS

Las biopsias de tumores y tejidos sanos analizadas procedían de pacientes de ambos sexos con edades comprendidas entre los 46 y 80 años de edad.

Al comparar el ADN de alto peso molecular comercial y el extraído de leucocitos de sangre periférica con el ADN purificado o extraído de las biopsias, se pudo observar que este último estaba altamente degradado (Fig. 1, carriles 2 y 3 vs 4 y 5, respectivamente). Esto determinó que no podía ser analizado por Southern blot (TRF), ya que el estado de fragmentación del ADN llevaría a un sesgo por la detección de fragmentos teloméricos pequeños.

Para realizar la curva patrón para el ensayo de *Slot blot* se empleó ADN de tejido sano de colon, obtenido de una biopsia de archivo correspondiente a uno de los tumores. El contenido de telómero en el ADN de las células de biopsia de tejido sano representa células somáticas normales, pero sometidas a las mismas condiciones de tiempo y tratamiento.

Previamente se probaron tres métodos para la fijación del ADN a las membranas de Nylon. Estos fueron: 1) exposición a luz ultravioleta en un equipo DNA Transfer lamp (Fotodyne®) a 1200 mJ por 2 minutos, 2) incubación en horno a 80°C por 2 horas, y 3) fijación con 0,4 N NaOH durante la transferencia por vacío. De los tres métodos empleados, éste último mostró mejores resultados finales a la hibridización y fue el que se usó en todos los casos.

En la Fig. 2A se observa una autoradiografía del Slot blot obtenida con duplicados

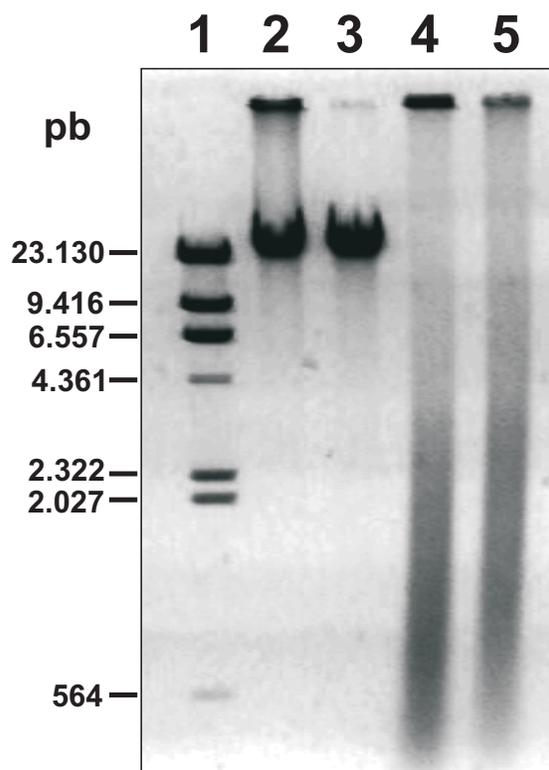


Fig. 1. Evaluación de Calidad de ADN. Electroforesis en gel de agarosa al 0,7% teñido con Bromuro de Etidio. Carril 1, marcador de peso molecular  $\lambda$  Hind III (Promega); carril 2, ADN humano (Promega); carril 3, ADN extraído a partir de leucocitos de sangre periférica; carril 4, ADN extraído de biopsia del Tumor N° 405-05; carril 5, ADN extraído de biopsia de tejido sano correspondiente al Tumor N° 405-05.

de las diluciones de un ADN obtenido a partir de tejido sano adyacente a uno de los tumores con los cuales se realizó una curva patrón. Igualmente, se muestra la señal obtenida para 75 ng de cuatro de los tumores. No hubo señal cuando cantidades equivalentes de ADN plasmídico (pGEM® T-easy vector; Promega) fueron empleadas como control de ADN no humano, verificando la especificidad de las hibridizaciones. Es importante destacar que bajo esta técnica se logró obtener una señal cuantificable con apenas 10 ng de ADN (datos no mostrados).

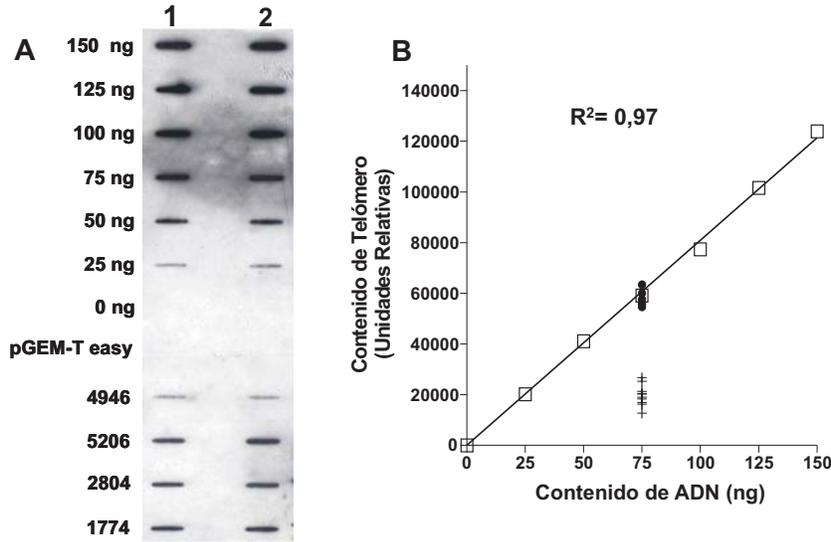


Fig. 2. Determinación del contenido de telómeros. A) Slot blot mostrando las señales obtenidas al hibridizar con sonda telomérica los ADN obtenidos a partir de biopsias incluidas en parafina, de tejido sano (0-150 ng) y de 4 muestras de adenocarcinoma de colon (75 ng), así como, del control de ADN no humano (pGEM). Todos los ensayos se hicieron por duplicado. B) Gráfico de contenido de ADN vs contenido de telómero. La recta fue generada con la titulación de ADN de tejido sano adyacente a los tumores (□). También se ubican el contenido de telómero presente en muestras de tejido normal (●, n = 5), y de los tumores analizados (+, n = 10) (p < 0,0001). Ver materiales y métodos para los detalles.

Para asegurar que la intensidad de la señal era dependiente de la concentración de ADN, se analizaron los datos de los *slot blots* en un modelo lineal. Se obtuvo una relación lineal ( $R^2 = 0,97$ ) entre el contenido de ADN telomérico y la cantidad de ADN colocado en cada pozo como curva patrón (Fig. 2B). Es posible observar en la gráfica (Fig. 2B) como el contenido de telómero de las biopsias de tejido sano (n = 5) se ubica sobre el control para la misma cantidad de ADN total (75 ng). Por otra parte, la intensidad de la señal originada con ADN de los tumores (n = 10) se ubicó por debajo del control, lo que implica que el contenido de telómero era menor.

El contenido de telómero en el ADN de las biopsias de carcinoma de colon se determinó entre 23 y 46% del control sano, con una media de 35,27% (DE  $\pm$  5,52) (Fig. 3). Por otra parte, el contenido de telómero de las biopsias de tejido sano fue en promedio 98,63% (DE  $\pm$  5,99).

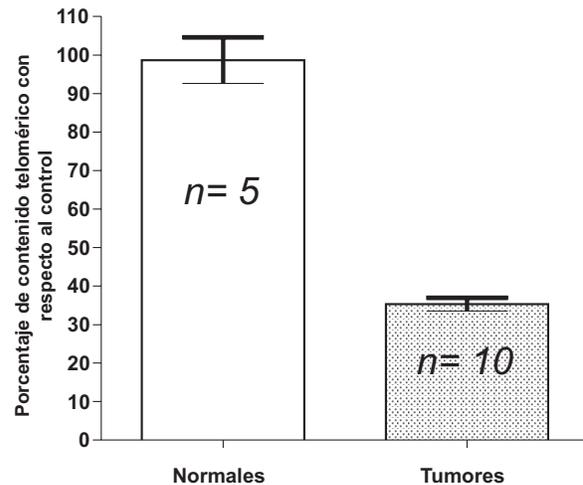


Fig. 3. Porcentaje de contenido de telómeros. Las barras representan el contenido de telómero promedio expresado en porcentaje al considerar como 100% el contenido detectado en la curva patrón para 75 ng de tejido.

## DISCUSIÓN

La técnica empleada mostró una señal comparable con apenas 75 ng de ADN<sub>g</sub> fragmentado, lo cual contrasta y muestra una ventaja importante con la técnica de Southern blot donde se requiere, además de un ADN<sub>g</sub> intacto, entre 1-10  $\mu$ g de ADN por muestra. Es importante destacar, que la metodología empleada en este trabajo, incluyendo la extracción del ADN de las biopsias, se puede completar en apenas 2 días.

La cuantificación de telómeros por *slot blot* representa una variación de la técnica de TRF que permite el análisis a partir de un número menor de células ( $\sim$  1000 células) (25). Desafortunadamente, la información de la distribución del tamaño de telómeros resulta perdida en esta aproximación, debido a que la medición produce un único valor representando la cantidad total de ADN telomérico presente en la muestra.

Por lo tanto, la principal limitación que presenta es que no provee información acerca de la variabilidad del contenido de ADN telomérico o de longitud de los telómeros en los cromosomas de una célula o de un grupo de ellas, por ejemplo cuando el tumor no es clonal o contiene células normales. Sin embargo, con la sensibilidad demostrada, el contenido de ADN telomérico podría ser medido en microdisecciones o subpoblaciones de células tumorales obtenidas por citometría de flujo, pudiendo reducirse significativamente la contaminación con células normales.

Aunque se ha demostrado que la sensibilidad del ensayo de *slot blot* es independiente de la fragmentación del ADN (27), en lugar de ADN<sub>g</sub> de tejido fresco se empleó ADN de biopsias de archivo de tejido colónico sano para utilizarlas como referencia, fundamentalmente para asegurar que las mismas presentaran iguales condiciones de tratamiento.

La relación entre longitud de telómeros y la evolución de cáncer ha sido mostrada por varios autores. Así, las neoplasias hematológicas son las mejor caracterizadas, donde se ha mostrado que la reducción de los telómeros está asociada con una disminución de la supervivencia en varios tipos de leucemia y mieloma (28, 29). Sin embargo, hay menos investigaciones sobre el potencial que posee la longitud de los telómeros como marcador de pronóstico en tumores sólidos, los cuales determinan principalmente la incidencia de cáncer. Esta situación es causada fundamentalmente por la cantidad limitada y la pobre calidad del ADN que es típicamente recuperado a partir de tejidos de archivos, lo que imposibilita el uso de la técnica de Southern blot para la determinación de la longitud de telómeros.

Recientemente, Bisoffi y col. (30) revisan la determinación de la longitud de telómeros o sucedáneos como marcador pronóstico en tumores sólidos de próstata, colon, pulmón, mama, y sistema nervioso. Estos autores consideran que estos métodos serán usados en el futuro para la evaluación de riesgo, estadificación y pronóstico para tumores sólidos.

Aunque el objetivo de este trabajo no era correlacionar la reducción del contenido de telómeros con el grado de evolución de adenocarcinoma de colon, si se obtuvieron resultados similares a otros estudios que han evaluado la longitud de telómeros en neoplasias benignas y malignas de colon (31-33).

En resumen, se mejoró un método para la medición de la longitud de telómeros basado en la determinación del contenido de telómeros empleando ADN degradado procedente de biopsias de archivo incluidas en parafina, las cuales pueden ser la única fuente de material disponible, como en casos de estudios retrospectivos. La determinación del contenido de telómeros también

parece ser muy útil para la estimación de la longitud de telómeros cuando las cantidades disponibles de ADN sean escasas. Quizás lo más relevante resulta del hecho de que la técnica no se ve afectada por el tratamiento convencional con formaldehído al que son sometidas las biopsias antes de ser incluidas en parafina.

Por último, la principal importancia de estas técnicas de determinación del tamaño de telómeros o de contenido de ADN telomérico, vendrá dada por la posibilidad de que una estrategia de quimioterapia que inhiba a la telomerasa tendrá seguramente más posibilidades de éxito en un tejido tumoral con telómeros cortos, en donde ante la ausencia de actividad telomerasa, a la célula no le quedaría seguramente otra opción que conducirse hacia la apoptosis.

#### AGRADECIMIENTOS

A la Histotecnólogo Lolymar Mendoza del Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Central Antonio María Pineda de Barquisimeto por el manejo de las biopsias de archivo. Este trabajo fue financiado por CDCHT-UCLA 006-ME-2004.

#### REFERENCIAS

1. **Blackburn EH.** Structure and function of telomeres. *Nature* 1991; 350:569-572.
2. **De Lange T, Sigue L, Myers RM, Cox DR, Naylor SL, Killery AM, Varmus HE.** Structure and variability of human chromosomes ends. *Mol Cell Biol* 1990; 10:518-527.
3. **Olovnikov AM.** A theory of marginotomy: the incomplete copying of template margining in enzymatic synthesis of polynucleotides and biological significance of the phenomenon. *J Theor Biol* 1973; 41:181-190.
4. **Harley CB.** Telomeres loss: mitotic clock or genetic time bomb? *Mutat Res* 1991; 256:271-282.
5. **Levy MZ, Allsopp RC, Fitcher AB, Greider CW, Harley CB.** Telomere end-replication problem and cell aging. *J Mol Biol* 1992; 225:951-960.
6. **Greider CW, Blackburn, EH.** Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. *Cell* 1985; 43:405-413.
7. **Bryan TM, Englezou A, Dalla-Pozza L, Dunham MA, Reddel RR.** Evidence for an alternative mechanism for maintaining telomere length in human tumors and tumors-derived cell lines. *Nat Med* 1997; 3: 1271-1274.
8. **Reddel RR, Bryan TM, Colgin LM, Perrem KT, Yeager TR.** Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiat Res* 2001; 155:194-200.
9. **Aragona M, Maisano R, Panetta S, Giudice A, Morelli M, La Torre I, La Torre R.** Telomere length maintenance in aging and carcinogenesis. *Int J Oncol* 2000; 17:981-989.
10. **Von Zglinicki T.** Telomeres and replicative senescence: Is it only length that counts? *Cancer Lett* 2001; 168:111-116.
11. **Dhaene K, Van Marek E, Parwaresch R.** Telomeres, telomerase and cancer: an update. *Virchows Arch* 2000; 437:1-16.
12. **Engelhardt M, Albanell J, Drullinsky P, Han W, Guillem J, Scher HI, Reuter V, Moore MA.** Relative contribution of normal and neoplastic cells determines telomerase activity and telomere length in primary cancers of prostate, colon, and sarcoma. *Clin Cancer Res* 1997; 1849-1857.
13. **Engelhardt M, Drullinsky P, Guillem J, Moore MA.** Telomerase and telomere length in the development and progression of premalignant lesions to colorectal cancer. *Cancer Res* 1997; 3:1931-1941.
14. **Johnson FB, Sinclair DA, Guarente L.** Molecular biology of aging. *Cell* 1999; 96: 291-302.
15. **Hahn WC.** Role of telomeres and telomerase in the pathogenesis of human cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21:2034-2043.
16. **Judy MYW, Collins K.** Telomere maintenance and disease. *Lancet* 2003; 362: 983-988.

17. **Kim S, Kaminker P, Campisi J.** Telomeres, aging and cancer: In search of happy ending. *Oncogene* 2002; 21:503-511.
18. **Hastie NM, Demster M, Dunlop MG, Thomson AM, Green DK, Allshire RC.** Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with aging. *Nature* 1990; 346:866-868.
19. **Adamson DJ, King DJ, Haites NE.** Significant telomere shortening in childhood leukemia. *Cancer Genet Cytogenet* 1992; 61: 203-206.
20. **Mehle C, Ljungberg B, Roos G.** Telomere shortening in renal cell carcinoma. *Cancer Res* 1994; 54:236-241.
21. **Griffith JK, Bryant J, Fordyce C, Gilliland F, Joste N, Moyzis R.** Reduced telomere DNA content is correlated with genomic instability and metastasis in invasive human breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat* 1999; 54:59-64.
22. **Fordyce CA, Heaphy CM, Joste NE, Smith AY, Hunt WC, Griffith JK.** Association between cancer-free survival and telomere DNA content in prostate tumors. *J Urol* 2005; 173:610-614.
23. **Chadeneau C, Hay K, Hirte HW, Gallinger S, Bacchetti S.** telomerase activity associated with acquisition of malignancy in human colorectal cancer. *Cancer Res* 1995; 55:2533-2536.
24. **Allshire RC, Dempster M, Hastie ND.** Human telomeres contain at least three types of G-rich repeat distributed non-randomly. *Nucleic Acids Res* 1989; 17:4611-4627.
25. **Bryant JE, Hutchings KG, Moyzis RK, Griffith JK.** Measurement of Telomeric DNA Content in Human Tissues. *Biotechniques* 1997; 23:476-484.
26. **Cawthon RM.** Telomere measurement by quantitative PCR. *Nucleic Acids Res* 2002; 30:e47.
27. **Fordyce CA, Heaphy CM, Griffith JK.** Chemiluminescent Measurement of telomere DNA content in Biopsies. *Biotechniques* 2002; 33:144-6, 148.
28. **Grabowski P, Hultdin M, Karlsson K, Tobin G, Aleskog A, Thunberg U, Laurell A, Sundstrom C, Rosenquist R, Roos G.** Telomere length as a prognostic parameter in chronic lymphocytic leukemia with special reference to VH gene mutation status. *Blood* 2005; 105:4807-4812.
29. **Kubuki Y, Suzuki M, Sasaki H, Toyama T, Yamashita K, Maeda K, Ido A, Matsuoka H, Okayama A, Nakanishi T, Tsubouchi H.** Telomerase activity and telomere length as prognostic factors of adult T-cell leukemia. *Leuk Lymphoma* 2005; 46:393-399.
30. **Bisoffi M, Heaphy CM, Griffith JK.** Telomeres: Prognostic markers for solid tumors. *Int J Cancer* 2006; 119:2255-2260.
31. **Kim HR, Kim YJ, Kim HJ, Kim SK, Lee JH.** Telomere Length Changes in Colorectal Cancers and Polyps. *J Korean Med Sci* 2002; 17:360-365.
32. **Gertler R, Rosenberg R, Stricker D, Friederichs J, Hoos A, Werner M, Ulm K, Holzmann B, Nekarda H, Siewert JR.** Telomere length and human telomerase reverse transcriptase expression as markers for progression and prognosis of colorectal carcinoma. *J Clin Oncol* 2004; 22:1807-1814.
33. **Garcia-Aranda C, de Juan C, Diaz-Lopez A, Sanchez-Pernaute A, Torres AJ, Diaz-Rubio E, Balibrea JL, Benito M, Iniesta P.** Correlations of telomere length, telomerase activity and telomeric-repeat binding factor 1 expression in colorectal carcinoma. *Cancer* 2006; 106:541-551.