

## Detección de la actividad de la telomerasa en lesiones cervicales, mediante el Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (PART) no radioactivo

*Joanna Pinto-Tang<sup>1</sup>, Thais Castro<sup>2</sup> y Gloria Premoli<sup>2</sup>*

<sup>1</sup>Departamento de Microbiología y Parasitología, Facultad de Farmacia y Bioanálisis.

<sup>2</sup>Centro de Investigaciones Odontológicas, Facultad de Odontología.

Universidad de Los Andes, Mérida 5101-A, Venezuela.

Correo electrónico: joannapintotang@yahoo.es

Palabras clave: Telomerasa, cáncer, marcador tumoral, VPH.

**Resumen.** Mundialmente el cáncer cervical es reconocido como el segundo tipo de malignidad más común en la mujer. La implementación del frotis de Papanicolaou ha contribuido notablemente a disminuir su morbi-mortalidad. Sin embargo, este examen tiene una sensibilidad sólo del 80%. La detección de la actividad de la telomerasa (AT) ha sido propuesta como marcador de diagnóstico y pronóstico en una amplia variedad de tumores y sus lesiones precursoras. En este estudio se realizó la detección de la AT a partir de muestras de exfoliado cervical y se evaluó su asociación con lesiones cervicales y virus del papiloma humano (VPH) oncogénicos tipo 16 y 18. Se analizó un total de 32 muestras de exfoliado cervical, 15 de pacientes con cérvix normal, 9 con lesión intraepitelial escamosa (LIE) y 8 con cáncer cervical. En este último grupo, la AT detectada por el Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (PART) no radioactivo se presentó en un 88%, y en un 11% de los casos con LIE. Ninguna de las 15 muestras de cérvix normal resultó positiva para la detección de la telomerasa. El 75% de los exfoliados cervicales con AT mostraron amplificados de VPH tipo 16, VPH tipo 18 ó ambos. Estos resultados son consistentes con los estudios que señalan una estrecha relación entre los VPH oncogénicos y la presencia de la AT en los queratinocitos humanos y consolida el potencial de la detección de esta enzima en el hallazgo de alteraciones cervicales, especialmente cuando es aplicada como una herramienta diagnóstica complementaria del examen clínico-citológico.

Detection of telomerase activity in cervical lesions by non-radioactive Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP). *Invest Clín* 2005; 46(3): 255 - 263

Keys words: Telomerase, cancer, tumoral marker, HPV.

**Abstract.** Worldwide, the cervical cancer is recognized as the second most common type or malignancy in women. The implementation of the Papanicolaou smear has contributed notably to diminish its morbi-mortality. However, this test has a sensibility of just 80%. The detection of telomerase activity (TA) has been proposed as a diagnostic and prognostic maker of a wide variety of tumors and their precursor lesions. In this study the detection of TA was made from samples of cervical exfoliates and its association with cervical lesions and oncogenic human papillomavirus (HPV) types 16 and 18 was evaluated. A total of 32 samples of cervical exfoliates were analyzed, 15 from patients with normal cervices, 9 with squamous intraepithelial lesions (SIL) and 8 with cervical cancer. In this last group the TA, detected by the non-radioactive Telomeric Repeat Amplification Protocol (TRAP), was present in 88% of the cases and in 11% of the cases with SIL. None of the 15 samples of normal cervices was positive for the detection of the telomerase. 75% of the cervical exfoliates with TA showed amplifications of HPV type 16, HPV type 18 or both. These results are consistent with studies that point out a narrow relationship between oncogenic HPV and the presence of TA in human keratinocytes and consolidate the detection potential of this enzyme in the discovery of cervical alterations, especially when the technique is applied as a complementary tool of the clinical-citologic exam.

*Recibido: 05-10-2004. Aceptado: 31-03-2005.*

## INTRODUCCIÓN

La telomerasa conforma un complejo enzimático de ribonucleoproteína capaz de sintetizar una secuencia determinada de ADN (1). Está formada por dos componentes: ARN de la telomerasa (TER o TR RNA) y un componente proteico con actividad enzimática (TERT) (2). La actividad de esta enzima provoca la elongación de los extremos cromosómicos denominados telómeros. Este hecho permite compensar la pérdida fisiológica y progresiva del ADN terminal producto del proceso de proliferación rápida y constante de algunos tejidos o células normales (3). Tal es el caso de las cé-

lulas germinales, en las que se asegura que la totalidad de la información genética contenida en los cromosomas sea pasada de generación en generación. Por el contrario, en la mayor parte de los tejidos normales la actividad telomerásica es inhibida poco después del nacimiento (1). Sin embargo, ante la evidente reactivación enzimática observada durante el ciclo celular de varios tipos de cáncer en el humano, se supone que la telomerasa también participa en los procesos de inmortalización celular y proliferación indefinida de tumores (4). Estas observaciones contribuyen al concepto de que las células normales poseen una capacidad proliferativa adecuada para no sufrir ciclos mu-

tacionales repetitivos, ni la expansión clonal requerida para acumular las múltiples anomalías genéticas presentes en las células cancerosas (5). Se presume que la reactivación o sobreexpresión de la telomerasa en células humanas este dada por un mecanismo multifactorial complejo que regula sus componentes estructurales, y cuyas vías de regulación varían según el tipo de línea celular (6).

Una vía por la cual la telomerasa es activada es la expresión eficiente de la oncoproteína E6, de los VPH de alto riesgo, en los queratinocitos humanos durante los períodos previos de inmortalización. Este hecho sugiere una interacción molecular favorecedora en el desarrollo y mantenimiento de la malignidad celular (7-11).

Numerosos estudios epidemiológicos y moleculares (12, 13) han proporcionado suficiente evidencia acerca del papel causal de la infección por ciertos tipos de VPH en el desarrollo del carcinoma cervicouterino. La capacidad oncogénica de estos virus ha sido atribuida principalmente a la actuación de las proteínas virales E6 y E7 (14). No obstante, se ha observado que aunque los tipos oncogénicos de VPH pueden transformar e inmortalizar los queratinocitos cervicales humanos, la infección persistente por sí sola no constituye una causa suficiente para conferir tumorogenicidad, por lo que factores adicionales al huésped son requeridos para que un porcentaje de estas infecciones logren, en algún momento, progresar y dar lugar al cáncer (15). En la actualidad, es un desafío interesante acertar la predicción y el grado de progresión del cáncer cervicouterino a través de eventos moleculares (16).

La detección de la actividad telomerasa ha demostrado ser una herramienta eficaz en el hallazgo de alteraciones del funcionamiento celular normal, por lo que se ha propuesto su establecimiento como un amplio marcador de diagnóstico clínico y

de pronóstico certero de una gran variedad de cánceres, así como de sus lesiones precursoras (17-21). Dada la relación entre la actividad de la telomerasa y la presencia de tumores se ha empleado *in vitro* un ensayo basado en la reacción en cadena de la polimerasa (RCP) denominado Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (PART) en el que la telomerasa sintetiza productos de extensión telomérica que posteriormente sirven como templado para las subsecuentes amplificaciones (4). Esta herramienta molecular ha permitido incrementar la sensibilidad, rapidez y eficiencia de la detección específica de la telomerasa en un gran número y diversidad de lesiones malignas mínimas. Es por ello, que este estudio tiene como objetivo determinar la AT a partir de muestras de exfoliado cervical mediante el PART no radioactivo y, así, establecer su asociación con lesiones cervicouterinas y VPH oncogénicos.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La muestra estuvo conformada por 32 pacientes seleccionadas de un estudio epidemiológico previo sobre VPH en mujeres de 25 a 60 años de edad, con o sin antecedentes de lesiones cervicales, que acudieron a la consulta ginecológica del Departamento de Especialidades de la Clínica de Prevención del Cáncer, Sociedad Anticancerosa (estado Mérida, Venezuela), durante el período de septiembre de 2002 a marzo de 2003.

Bajo previa autorización de las pacientes, los datos clínicos y epidemiológicos fueron recolectados en fichas de registro identificadas por un código de número. Durante el examen ginecológico de cada paciente, se tomaron dos muestras cervicales con hisopo estéril para realizar extendidos en láminas portaobjetos y colorear mediante la técnica de tinción de Papanicolaou (Frotis Pap), para analizar los mismos acor-

de al sistema Bethesda (22). Luego, se tomaron dos muestras de exfoliado cervical por la técnica del cepillado (Cytobrush), una para la detección del ADN de los VPH tipo 16 y 18 y otra para la detección de la AT; éstas fueron transportadas en buffer fosfato salino (PBS) 1X en frío. Las pacientes con anormalidades citológicas o signos clínicos sospechosos fueron examinadas bajo colposcopia para determinar la realización del estudio histopatológico.

#### Protocolo de Amplificación de Repeticiones Teloméricas (PART)

Previo al procesamiento de las muestras de exfoliado cervical por el PART no radioactivo, se establecieron las condiciones de la técnica en el laboratorio, según lo descrito por Kyo y col. (23). Para ello, se utilizó como control positivo (por expresar constitutivamente telomerasa) el extracto proteico de la línea celular inmortalizada derivada de la leucemia Jurkat J77, facilitadas por el Instituto de Inmunología Clínica de la Universidad de los Andes.

**Extracción de proteínas totales.** Se realizó el lavado de una de las muestras de exfoliado cervical de cada paciente con PBS 1X en frío. El botón celular fue resuspendido en buffer de lisis CHAPS 1X (Intergen®) (200 µL de CHAPS /10<sup>5</sup>-10<sup>6</sup> células) tratado con inhibidor de RNasas 200 U/mL (Promega®); posteriormente, se incubó en hielo por 30 minutos, se centrifugó a 12000 × g por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante obtenido se dividió en alícuotas de 10 µL y se llevó a congelación a -80°C hasta su procesamiento. La determinación de la concentración total de proteínas se realizó mediante el ensayo Bradford (Sigma®).

**Detección de la actividad de la telomerasa.** Ante la presencia de la telomerasa en las muestras de exfoliado cervical ocurre un primer paso en el que el componente ribonucleico de la enzima se une a un sustrato oligonucleótido sintético (Cebador TS),

que se extenderá dada la adición de un número variado de hexanucleótidos o repeticiones teloméricas. Posteriormente, los sustratos extendidos por la enzima son amplificados por RCP generándose una escalera de productos desde 50 pb con un incremento de 6 en 6. La mezcla de reacción utilizada para un volumen total de 50 µL fue: buffer TRAP 1X [Tris-HCl 20 mM (pH 8,3), KCl 60 mM, 0.005% tween 20 y EGTA 1 mM], MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, cebador TS (5'-AATCCGTC GAGCAGAGTT-3') 0,4 µM, cebador Cx-ext (5'-GTGCCCTTACCCTTACCCTTACCCTTA-3') 0,2 µM (Bio-synthesis®), mezcla de dNTPs (Promega®) 50 µM, albúmina de suero bovino no acetilada (Sigma®) 300 ng/µL, Taq polimerasa (Promega®) 2.5 U/µL y extracto celular 2 µg. Cada mezcla de reacción fue colocada en un bloque del termociclador (Perkin Elmer, modelo 2400) bajo las siguientes condiciones: Una primera etapa de extensión del sustrato TS a 30°C por 30 minutos. Posteriormente, una etapa de 5 minutos a 94°C para inactivar la telomerasa y 31 ciclos de amplificación a 95°C por 45 segundos, 50°C por 45 segundos y un paso único de extensión a 72°C por 10 minutos. El producto amplificado (25 µL) se resolvió por electroforesis en un gel de poliacrilamida no desnaturizada (sin urea) al 12% y se visualizó por tinción con nitrato de plata.

#### Detección del ADN proveniente de los VPH tipo 16 y 18

Se realizó la extracción de ADN a partir de una segunda muestra de exfoliado cervical de cada paciente, de acuerdo a lo descrito por Rolf y col. (24). La integridad genómica fue verificada luego del proceso de extracción mediante la detección de un fragmento de 110 pb del gen de la Betaglobina humana, según Saiki y col. (25). El ADN extraído fue sometido a los ensayos de detección específica de los VPH tipo 16 y 18 (120 y 172 pb, respectivamente) por medio de la RCP utilizando cebadores específi-

cos seleccionados a partir de regiones altamente conservadas del genoma viral (regiones e6 y e7), de acuerdo a Karlsen y col. y Zazove y col. (26, 27). Como control positivo de este ensayo se incluyó una reacción que contenía como blanco plásmidos portadores del genoma de los VPH tipo 16 ó 18, según el caso. Los productos de amplificación se resolvieron electroforéticamente en un gel de agarosa al 2% y se visualizaron por tinción con bromuro de etidio 0,01% en un transiluminador de luz ultravioleta.

RESULTADOS

La presencia o detección de la actividad de la telomerasa y el ADN de los VPH tipo 16 y 18 fueron estudiados en muestras de exfoliado cervical provenientes de 15 pacientes con citología normal y sin signos clínicos sospechosos, 9 con lesión intraepitelial escamosa (LIE) y 8 con cáncer cervical. Se detectó la actividad de la telomerasa en 7/8 (88%) casos de cáncer cervical y en 1/9 (11%) casos de LIE, este último correspondiente a una lesión intraepitelial escamosa de bajo grado (Tabla I, Fig. 1). En ninguna de las 15 muestras de exfoliado de cérvix normal se evidenció la AT. Las muestras que resultaron negativas fueron consideradas definitivamente como tales al no mostrar señal enzimática al ser sometidas nuevamente al PART no radioactivo, esta vez con una concentración de extracto menor y mayor que la inicial (1 y 3 µg) (datos no mostrados).

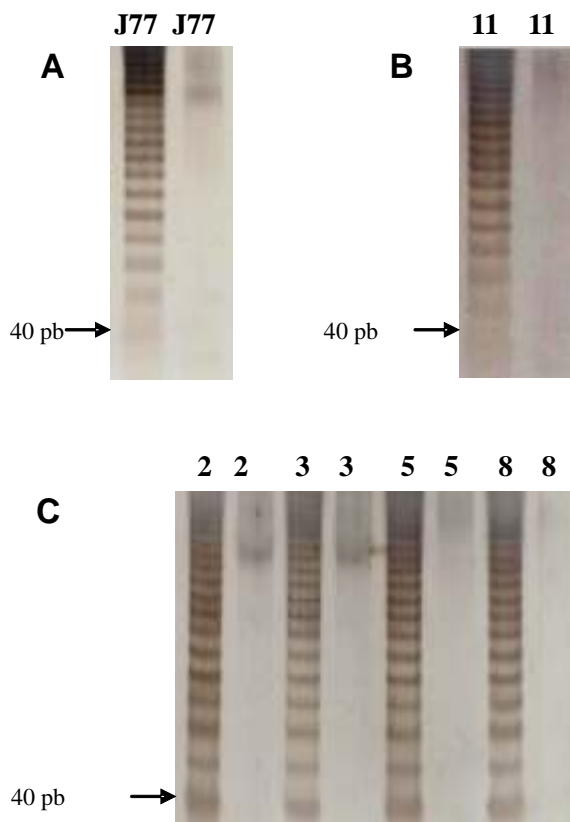


Fig. 1. Imagen de la corrida electroforética en gel de poliacrilamida al 12% de los productos del ensayo PART no radioactivo. La escalera de bandas representa la señal de la AT de: extracto de las células inmortalizadas J77 tomadas como control positivo del ensayo (A), lesión intraepitelial escamosa (B) y cáncer cervical (C). Para la interpretación óptima de los resultados y como control negativo de cada muestra se cargó en carriles alternos muestras tratadas por calentamiento ( ) a 90°C durante 10 minutos.

TABLA I  
DISTRIBUCIÓN DE LA DETECCIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LA TELOMERASA Y EL ADN DE LOS VPH TIPO16 Y 18 EN LAS MUESTRAS DE EXFOLIADO CERVICAL ESTUDIADAS

Condición cervical	n= 32	Actividad de la telomerasa	VPH 16, VPH 18 ó ambos
Normal	15	0 (0%)	2 (13%)
LIE	9	1 (11%)	2 (22%)
Cáncer	8	7 (88%)	6 (75%)

n: número de casos. LIE: lesión intraepitelial escamosa. VPH: ADN de los virus del papiloma humano.



Un caso de cáncer cervical con AT no presentó hallazgo de células cancerosas en el examen citológico; sin embargo, el estudio histopatológico realizado por la evidencia de signos clínicos sospechoso, reveló su condición de carcinoma *in situ*. Contrariamente, otro caso de cáncer cervical con citología positiva no mostró actividad de la telomerasa. El caso de LIE de bajo grado con señal telomérica reveló un NIC I (neoplasia intraepitelial cervical) por estudio de biopsia cervicouterina, y correspondió a una lesión recidivante.

Se realizó la extracción de ADN del total de 32 muestras de exfoliado cervical. En promedio, la concentración de ADN extraído fue de 535 ng/ $\mu$ L, con un mínimo de 120 ng/ $\mu$ L y un máximo de 950 ng/ $\mu$ L (datos no mostrados). Se encontró que 10/32 exfoliados cervicales presentaron ADN de VPH tipo 16, VPH tipo 18 ó ambos; 2/15 (13%) correspondieron a casos de cérvix normal, 2/9 (22%) a LIE y 6/8 (75%) a cáncer cervical (75%) (Tabla I). Los resultados de la detección del ADN de los VPH tipo 16 y 18 se compararon con los correspondientes a los resultados de la detección de la telomerasa, observándose que 6/8 (75%) exfoliados cervicales con AT mostraron amplificados de ADN de uno o ambos tipos virales. 5 casos (63%) se trataban de cáncer cervical y uno (12%) de un LIE de bajo grado (Fig. 2).

## DISCUSIÓN

Mundialmente, el carcinoma de cuello uterino es reconocido como el segundo tipo de tumor maligno más común en la mujer, por lo que los esfuerzos por optimizar su diagnóstico, prevención y control son cada vez mayores (15, 28). Estudios recientes han demostrado que la AT es detectada excepcionalmente en cérvix uterino normal, moderadamente frecuente en lesiones del epitelio cervical y casi universalmente detectada en todos los carcinomas cervicales (29).

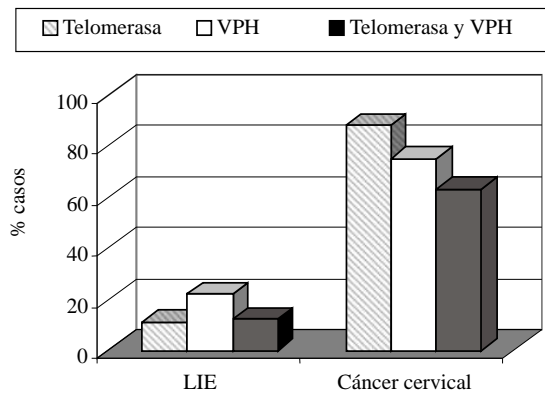


Fig. 2. Distribución de los casos estudiados, según la presencia de la actividad de la telomerasa y el ADN de los VPH tipo 16 y 18.

En el presente estudio, el 88% de los casos de cáncer cervical demostraron AT. Por el contrario, la misma no fue detectada en las muestras de exfoliado cervical de pacientes sanas, quedando evidenciado el rol crucial que desempeña la enzima en el desarrollo de procesos tumorales tal y como lo señala Urquidí y col. (18). Sin embargo, un caso de cáncer cervicouterino, cuya muestra fue tomada previo a la terapia de irradiación, demostró reiteradamente ausencia de actividad enzimática. Al respecto, estudios previos han reportado que aún cuando casi la totalidad de los casos de cáncer cervical han mostrado ser telomerasa-positivos, existen excepciones en las que la carcinogénesis puede ser el resultado de un mecanismo aún no bien definido independientemente de la AT, por lo que no siempre ante la falta de señal enzimática hay ausencia de malignidad celular (30, 31).

En este estudio, se encontró que un caso de LIE de bajo grado presentó señal telomérica. Numerosas investigaciones (29, 32) han demostrado que la detección de la actividad de la telomerasa, generalmente de gran intensidad en diferentes órganos y tejidos, está asociada con mayor frecuencia

a casos de cáncer franco que a lesiones precursoras o sospechosas. Esta expresión diferencial de la enzima (en intensidad de señal y frecuencia de positividad) se ha demostrado a través de estudios semicuantitativos, existiendo una importante correlación entre los niveles enzimáticos y los diferentes grados de afección (30). En atención a esto, el mencionado caso de LIE de bajo grado con actividad enzimática encontrado en este estudio, justifica un estado de vigilancia riguroso en el que la medición de los niveles enzimáticos de la telomerasa pueda considerarse como un instrumento adicional a la evaluación del estado clínico-citológico. Este señalamiento cobra un valor significativo, en este caso particular, dada la presencia concomitante de un tipo de VPH de alto riesgo. Sin embargo, la presencia de actividad telomérica en una muestra de cuello uterino tiene utilidad diagnóstica y de pronóstico ante resultados de LIE de bajo grado, con o sin demostración de VPH de alto riesgo.

No obstante, la frecuencia de positividad de la telomerasa en las muestras de LIE de este estudio fue menor a lo reportado por otros autores (23, 33). Se han señalado diversos factores a considerar para una adecuada interpretación de la verdadera falta de señal enzimática en algunas lesiones preneoplásicas. Por un lado, la presencia aleatoria de inhibidores en la etapa de amplificación del ensayo, cuyo significado es incierto y tal vez atribuida a ciertos tipos de malignidades y sitios anatómicos específicos (17). Para aclarar este hecho, algunos autores han incorporado un control de amplificación interno independiente de la telomerasa con lo que se ha incrementado la sensibilidad del PART (33). Por otro lado, Kyo y col. (23) señalan que la medición de la positividad de la telomerasa puede estar afectada por la diferencia en el número de células cancerosas recolectadas de una lesión maligna franca y una lesión temprana.

Ya que estas últimas son menos extensas y graves, es menor la posibilidad de que se expresen niveles detectables de actividad telomérica. En este trabajo, al analizar nuevamente las muestras de exfoliado cervical variando las concentraciones de extracto proteico (equivalente a la variación en el número de células), no se encontró discrepancia con los resultados en la detección de la AT obtenidos inicialmente, por lo que los mismos se mantuvieron. Adicionalmente, se debe resaltar que metástasis, micrometástasis y lesiones cervicales con citologías normales, han sido halladas por la presencia de la actividad de la telomerasa, destacando la sensibilidad del ensayo aun en la detección de lesiones mínimas u ocultas (31).

Por otra parte, el examen citológico demostró una vez más su valor como técnica de despistaje de lesiones preneoplásicas y de cáncer de cuello uterino. Sin embargo, un importante porcentaje de casos de lesiones ocultas, generalmente asociadas a VPH de alto riesgo, escapan de su capacidad de detección. Tal es el caso de mujeres postmenopáusicas, grupo de mayor frecuencia con carcinomas uterinos, en las que la zona de transformación es poco accesible (29). Al analizar conjuntamente los resultados del examen citológico con los del ensayo de detección de la AT, se observó una coincidencia importante entre ambas pruebas, al detectarse dos casos de cáncer cervical cada uno mediante ensayos distintos. Estos hallazgos demuestran que es factible mejorar la sensibilidad en el tamizaje de alteraciones cervicouterinas mediante la aplicación de estas dos técnicas, lo que implica una toma de muestra sencilla y de fácil ejecución en las consultas ginecológicas de rutina.

El ADN de los VPH tipo 16, VPH tipo 18 ó ambos fue detectado en el 75% de los casos de cáncer/LIE con actividad de la telomerasa, comparado con un 13% (2/15) de las muestras con citología normal y sin señal enzimática. Este resultado coincide con

reportes que señalan una estrecha relación entre los VPH oncogénicos 16 y 18 y la presencia de la AT en los queratinocitos humanos (34, 35).

En los países en desarrollo existe una necesidad real de mejorar los programas de vigilancia y control del cáncer de cuello uterino mediante pruebas más sensibles y certeras (15, 36). Este es el primer estudio sobre actividad de la telomerasa en muestras de exfoliado cervical realizado en Venezuela. Nuestros resultados consolidan el potencial del ensayo de detección de la telomerasa como marcador de tumor cervicouterino y sostiene la estrecha asociación que existe entre la enzima y los VPH oncogénicos 16 y 18. Nos hemos planteado futuras investigaciones enfocadas a continuar evaluando el comportamiento de la telomerasa en cérvix uterino normal y con alteraciones, con el propósito de unir esfuerzos con numerosos estudios que plantean el ensayo de detección de esta enzima como una herramienta prometedoras en el diagnóstico, pronóstico y tratamiento del cáncer.

#### AGRADECIMIENTOS

Agradecemos al CONICIT (SI-2000 000475, F-2001 001203) y CDCHT (0-062-99-07-D, 0-097-04-07B Proyecto VPH-Telomerasa).

#### REFERENCIAS

1. Luque J, Herráez A. Texto Ilustrado de Biología Molecular e Ingeniería Genética: Conceptos, técnicas y aplicaciones en Ciencias de la Salud. España: Harcourt. 2001.
2. Blackburn E. Structure and function of telomeres. *Nature*. 1991; 350:569-573.
3. Marcand S, Brevet V, Mann C, Gilson E. Cell cycle restriction of telomere elongation. *Curr Biol* 2000; 10: 487-490.
4. Kim N, Piatyszek M, Prowse K, Harley C, West M, Ho P, Coviello G, Wright W, Weinrich S, Shay J. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266: 2011-2014.
5. Zhang X, Mar V, Harrington L, Robinson M. Telomere shortening and apoptosis in telomerase-inhibited human tumor cells. *Genes Dev* 1999; 13:2388-2399.
6. Liu J. Studies of the molecular mechanisms in the regulation of telomerase activity. *FASEB J* 1999; 13: 2091-2104.
7. Kinoshita T, Shirasawa H, Shino Y, Moriya H, Desbarats L, Eilers M, Simizu B. Transactivation of prothymosin and c-Myc promoters by human papillomavirus type 16 E6 protein. *Virology* 1997; 232:53-61.
8. Greider C. Telomerase activation: One step on the road to cancer? *Trends genet* 1999; 15: 109-112.
9. Gewin L, Myers H, Kiyono T, Galloway D. Identification of a novel telomerase repressor that interacts with the human papillomavirus type-16 E6/E6-AP complex. *Genes Dev* 2004;18:2269-2282.
10. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schlegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 2003;100:8211-8216.
11. Lv W, Zhang G, Sui L, Wang J. Study on the correlation between the different papillomavirus type and telomerase in cervical cancer. *Int J Gynecol Pathol* 2004; 23 (29):100-109.
12. Ly W, Zhang G, Sui L, Wang J. Study on the correlation between the different papillomavirus type and telomerase in cervical cancer. *Zhonghua Liu Xing Bing Xue Za Zhi* 2003; 24:924-927.
13. Reesink-Peters N, Helder M, Wisman G, Knol A, Koopmans S, Schuurung E, Hollema H, de Vries E, de Jong S, van der Zee A. Detection of telomerase, its components, and human papilloma virus in cervical scraping as a tool for triage in woman with cervical dysplasia. *J Clin Pathol*. 2003;56:31-35.
14. Bosh F, de Sanjose S. Human papillomavirus in cervical cancer. *Curr Oncol\_Rep*. 2002; 4:175-183.
15. Alonso P, Lazcano E, Hernández M. Cáncer Cervicouterino: Diagnóstico, preven-



- ción y control. México: Médica Panamericana. 2000.
16. Jenkis D. Diagnosing human papillomaviruses: recent advances. *Curr Opin Infect Dis* 2001; 14: 53-62.
  17. Mu X, Brien T, Roos J, Lowry C, McKenna B. Telomerase activity in benign and malignant cytologic fluids. *Cancer* 1999; 87:93-99.
  18. Urquidi V, Tarin D, Goodison S. Role of telomerase in cell senescence and oncogenesis. *Annu Rev Med* 2000; 51: 65-79.
  19. Ngan H, Cheung A, Liu S, Liu K, Tsao S. Telomerase assay and HPV 16/18 typing as adjunct to conventional cytological cervical cancer screening. *Tumour Biol* 2002; 23:87-92.
  20. Sen S, Reddy V, Guleria R, Jain S, Kapila K, Singh N. Telomerase a potential molecular marker of lung and cervical cancer. *Clin Chem Lab Med* 2002; 40: 994-1001.
  21. Jarboe E, Thompson L, Heinz D, McGregor J, Shroyer K. Telomerase and human papillomavirus as diagnostic adjuncts for cervical dysplasia and carcinoma. *Human Pathol* 2004; 35:396-402.
  22. Wright T, Cox J, Massad L, Twiggs L, Wilkinson E. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol*. 2003; 189:295-304.
  23. Kyo S, Takakura M, Kohama T, Inoue M. Telomerase activity in human endometrium. *Cancer Res* 1997; 57: 610-614.
  24. Rolf A, Schuller I, Fink U, Weber-Rolfs I. PCR: Clinical Diagnostics and Research. Germany: Verlag Berlin Heidelberg. 1992.
  25. Saiki R, Bugawan T, Horn G, Mullis K, Erlich H. Analysis of enzymatically amplified  $\beta$ -globin and HLA-DQ DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Letters to Nature* 1996; 324: 163-166.
  26. Karlsen F, Kalantri M, Jenkis A, Petterson E, Kristensen G, Holm R, Johansson B, Hagmal B. Use of multiple PCR primer sets for optimal detection of human papillomavirus. *J Clin Microbiol*. 1996; 34: 2095-2100.
  27. Zazove P, Reed B, Gregoire L, Ferenczy A, Gorenflo D, Lancaster W. Low false-negative rate of PCR analysis for detecting human papillomavirus-related cervical lesions. *J Clin Microbiol* 1998; 36: 2708-2713.
  28. Lapointe P. Reflections on cervical cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 2004; 25:671-672.
  29. Zheng P, Iwasaka T, Zhang Z, Pater A, Sugimori, H. Telomerase activity in papanicolaou smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic human papillomaviruses. *Gynecologic Oncology*. 2000; 77: 394-8.
  30. Pao C, Tseng C, Lin C, Yang F, Hor J, Yao D, Hsueh S. Differential expression of telomerase activity in human cervical intraepithelial neoplasia lesions. *J Clin Oncol* 1997; 15:1932-1937.
  31. Reddy V, Khanna N, Jain S, Das B, Singh N. Telomerase -A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer* 2001; 11: 100-106.
  32. Wisman B, Jong S, Meersma J, Helder M, Hollema H, de Vries E, Keith N, van der Zee A. Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Human Pathol* 2000; 31: 1304-1310.
  33. Yashima K, Ashfaq R, Nowak K, Von Gruenigen V, Milchgrub S, Rathi A, Albores-Saavedra J, Shay J, Gazdar A. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1998; 82: 1319-1326.
  34. McMurray H, McCance D. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol* 2003; 77: 9852-9861.
  35. Leng B, Bian M, Sun A, Fan M, Chen Q. Telomerase activity in cervical carcinoma and cervical intraepithelial neoplastic and its correlation to classification of koilocytosis. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2002; 82:262-266.
  36. Chen Y, Hunter D. *Molecular Epidemiology of Cancer*. CA Cancer J Clin 2005; 55:45-54.