

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



**TESE DE DOUTORADO**

**O PAPILOMAVIRUS HUMANO E LESÕES DO COLO UTERINO**

**MARIA INÊS DA ROSA**

**Orientadora: Profa. Dra. MARY CLARISSE BOZZETTI**

**Co-orientador: Profa. Dra. JANDYRA MARIA GUIMARÃES FACHEL**

**Porto Alegre, setembro de 2007**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**



**TESE DE DOUTORADO**

**O PAPILOMAVIRUS HUMANO E LESÕES DO COLO UTERINO**

**MARIA INÊS DA ROSA**

**Orientador:** Profa. Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A apresentação desta tese é exigência do Programa de Pós-graduação em Medicina: Epidemiologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, para obtenção do título de Doutor.

**Porto Alegre, Brasil.**

**2007**

## **BANCA EXAMINADORA**

1. Prof. Dr. José Geraldo Ramos - Professor do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FAMED/UFRGS.
2. Profa Dra. Alice Zelmanovich - Oncologista, professora da ULBRA.
3. Prof. Dr. Alvaro Vigo - Professor do Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da UFRGS.

*Dedico esta tese de doutorado, a minha primeira professora, HELENA (minha mãe), pois foi lá que tudo começou, desde muito cedo ensinou-me a importância do ser e do saber.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus pelo *intelligent design*.

Aos meus pais, Percival e Helena, meus eternos incentivadores, os mais profundos agradecimentos por suas sábias lições de vida.

Aos meus filhos, Fábio e Bruno e meu marido Napoleão, pelo amor e compreensão de minhas ausências.

À Profa Dra Mary Clarisse Bozzetti pela orientação, dedicação e fundamental contribuição científica para o desenvolvimento desse trabalho.

À Profa Dra Jandyra Fachel, pela co-orientação, paciência e pela excelência dos seus conhecimentos.

Ao amigo Prof Dr. Davi Rumel, que acreditou no meu potencial e foi um eterno incentivador, mesmo de longe, acompanhando cada passo dessa trajetória.

À Profa Maria Inês Schimidt, Bruce B. Ducan, Álvaro Vigo e demais professores do PPG pelos preciosos ensinamentos.

À amiga e colega Lídia Rossi, pela amizade e preciosa contribuição neste trabalho.

À nova amiga Daniela Dornelles pela valiosa ajuda.

As amigas e colegas, Iara, Andréia, Stela, Ângela, Eliana, Juliana, Roselaine e Anaelena, pelo carinho, ajuda e pelos bons momentos que passamos juntas.

À colega Cristine pela contribuição na parte laboratorial e coleta de dados.

Aos funcionários Carmem e Rodrigo, e aos bolsistas Gabriela e Fernando, por toda ajuda prestada ao longo dessa jornada.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente colaboraram com esse trabalho.

Enfim, a todas as mulheres que participaram desta pesquisa.

## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>07</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>09</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>11</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>13</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>14</b>
<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>15</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>16</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>20</b>
2.1 O Papilomavirus humano e neoplasia cervical.....	20
2.1.1 Estrutura viral.....	20
2.1.2 Classificação.....	21
2.1.3 Patologia da infecção pelo HPV.....	22
2.1.5 Co-fatores na evolução da neoplasia cervical.....	25
2.1.5.1 Uso de anticoncepcional oral.....	25
2.1.5.2 Paridade.....	27
2.1.5.3 Tabagismo.....	29
2.1.5.4 Nutrientes antioxidantes e IMC.....	31
2.1.5.5 Co-infecções.....	34
2.1.5.6 Imunossupressão.....	35
2.1.6 História natural do Papilomavírus humano.....	36
2.1.6.1 Prevalência da infecção pelo HPV.....	36
2.1.6.2 Transmissão e aquisição.....	38
2.1.6.3 Persistência e cura.....	39

2.1.6.4 Progressão para câncer cervical.....	41
2.1.7 Quadro clínico.....	44
2.1.8 Diagnóstico.....	45
2.2 Telomerase e câncer cervical.....	47
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>52</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>
3.1 Objetivos gerais.....	83
3.2 Objetivos específicos.....	83
<b>4 ARTIGO 1.....</b>	<b>84</b>
<b>5 ARTIGO 2.....</b>	<b>110</b>
<b>6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>135</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>138</b>
Anexo a - Projeto.....	139
Anexo b - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	182
Anexo c - Questionário.....	183
Anexo d - Termo de consentimento informado.....	189
Anexo e - Fluxograma de Seguimento as participantes do estudo.....	195
Anexo f - Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence.....	196

## RESUMO

Analisamos uma coorte de mulheres no sul do Brasil, com objetivo de identificar associações epidemiológicas para persistência e cura da infecção pelo HPV e realizamos uma metanálise para determinar a acurácia da telomerase nas lesões precursoras do câncer cervical.

**Métodos:** O estudo de coorte foi iniciado em fevereiro de 2003. Foram coletados espécimes cervicais para citologia oncológica e para detecção do DNA HPV na entrada do estudo e no seguimento. O desfecho foi dividido em quatro categorias: (1) persistência, (2) conversão (3) cura. A quarta categoria (referência) eram mulheres negativas no início que permaneceram negativas. Foram usados o teste  $\chi^2$  de Pearson, regressão logística multinomial e Kaplan-Meier para análise estatística. Para a metanálise foram incluídos estudos que comparavam o teste de telomerase (TRAP) e anatomopatológicos, obtidos por biópsias cervicais para diagnóstico de lesões cervicais. **Resultados:** A incidência de HPV foi 12,3%. O HPV16 foi o tipo mais encontrado (18,6%), entre as 501 mulheres do estudo. Trinta e quatro mulheres (6,78%) ficaram persistentemente infectadas pelo HPV, estando essa categoria associada à idade da sexarca inferior a 21 anos (OR = 3,14, IC 95%, 1,43-6,87) e a quatro ou mais parceiros durante a vida (OR = 2,48 IC 95%, 1,14-5,41). No período mediano de 19 meses, 80,7 % das mulheres tinham curado o HPV, a cura foi significativamente associado à cor preta (OR= 3,44 IC 95%, 1,55-7,65), co-infecção com *C. trachomatis* no arrolamento (OR= 3,26, IC 95%, 1,85-5,76) e história de já ter realizado exame de Papanicolaou (OR= 3,48, IC 95%, 1,51-8,00). Na metanálise dez estudos foram analisados, os quais incluíram 1069 mulheres. Para lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) vs. normal ou lesões benignas, encontrou-se uma positividade do teste da telomerase, sendo que o resultado da odds ratio para diagnóstico (DOR) foi de (DOR = 3,2, IC 95%,1,9-5,6). Nas lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) vs LIEBG, normal ou benigna: (DOR = 5,8, IC 95%, 3.1-10. )]. Encontrou-se uma DOR



elevada de 8,1 (IC 95%: 3,2-20) nas lesões de câncer cervical vs LIEAG. Da mesma forma, nas lesões de câncer cervical vs. LIEBG, a razão de chance foi elevada, com uma DOR de 40,9 (IC 95%: 18,2-91). **Conclusões:** A persistência da infecção pelo HPV foi associada com a sexarca precoce e ao número de parceiros sexuais na vida, sugerindo que estratégias de orientação sexual podem modificar as taxas de persistência do HPV. A associação da cura do HPV com história prévia de realização de Papanicolaou salienta a importância de aprimorar os programas de rastreamento de câncer cervical. Futuros estudos da associação de infecções ginecológicas com cura da infecção pelo HPV são necessários. Na metanálise nossos dados suportam a corrente hipótese da atividade da telomerase como um evento precoce na carcinogênese e que poderia estar associado ao início e à progressão de lesões cervicais.

**Palavras chaves:** Infecção pelo Papilomavírus humano. Câncer cervical. Infecções ginecológicas. Fatores de risco. Telomerase. Revisão sistemática. Metanálise. Acurácia.

## ABSTRACT

**Objective:** We analysed a cohort of women in Southern Brazil with the aim to identify epidemiological correlates for persistence and clearance of cervical HPV infection. A quantitative systematic review was performed to estimate the accuracy of telomerase assay in cervical lesions. **Methods:** A cohort study was started on February 2003. Cervical smears were collected to perform Pap cytology and HPV DNA detection at baseline and during the follow up. The outcome was constructed in four categories (1) persistence of HPV DNA; (2) conversion; (3) clearance of HPV. Pearson's  $\chi^2$  test, multinomial logistic regression and univariate analysis using the log-rank test were performed. Meta-analysis studies that evaluated the telomerase test (telomerase repeated amplification protocol) for the diagnosis of cervix lesions and compared it to paraffin-embedded sections as the diagnostic standard were included. **Results:** Incidence of HPV DNA: 12.3%. HPV16 was the most frequent type (18.6%) among 501 women in the study. Thirty-four women were persistently infected with HPV, which was associated with age below 21 years at first intercourse (OR 3.14, 95% CI, 1.43-6.87) and  $\geq 4$  sexual partners during lifetime (OR 2.48, 95% CI, 1.14-5.41). In a median period of 19 months, 80.7% of women had clearance of HPV, which was associated with black race (OR 3.44, 95% CI, 1.55-7.65), co-infection with *C. trachomatis* at baseline (OR 3.26, 95% CI, 1.85-5.76) and history of previous Pap smear (OR 3.48, 95% CI, 1.51-8.00). In meta-analysis ten studies were analyzed, which included 1,069 women. The diagnostic odds ratio (DOR) for a positive telomerase test for Lo-SIL vs. normal or benign lesions was 3.2 (95% CI, 1.9-5.6). The DOR for a positive telomerase test for Hi-SIL vs. Lo-SIL, normal or benign lesions was 5.8 (95% CI, 3.1-10). For cervix cancer vs. Hi-SIL, the DOR for a positive telomerase test was 8.1 (95% CI, 3.2-20.3) and for cervix cancer vs. Lo-SIL, normal or benign lesions, it was 40.9 (95% CI, 18.2-91). **Conclusions:** Persistence of HPV infection was

associated with early age at first intercourse and number of sexual partners during lifetime, suggesting that strategies for sexual orientation may modify the rates of HPV persistence. The association of HPV clearance with a history of previous Pap smear screening highlights the importance of improving cervical screening programs. Further studies on the association of gynaecological infections with HPV clearance are needed. In meta-analysis our data support the current hypothesis that telomerase may activate an early event in cervical carcinogenesis, that could be associated with the initiation and progression of cervical lesions.

**Key words:** Human papillomavirus infection. Cervix cancer. Gynaecological infections. HPV clearance. Risk factors. Accuracy. Diagnosis. Meta-analysis. Systematic review. Telomerase.

## LISTA DE ABREVIATURASE SIGLAS

ANVISA - Agência Nacional e Vigilância Sanitária

ASCUS - Atipia Escamosa de Significado Indeterminado

AUC - *Area under the curve*

CANCERLIT - Produzido pelo *International Cancer Research DataBank Branch (ICRDB) of the US National Cancer Institute*

CAPES/PROF - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

CDCT - Centro de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CIN - Cervical intraepithelial neoplasia

CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COX2 - Antiinflamatórios não esteróides inibidores da cicloxigenase-2

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

DOR - Diagnostic Odds ratio

DST - Doença Sexualmente Transmissível

E1-E7 - Regiões Precoces do Genoma Viral

EMBASE -

FDA - *Food and Drug Administration*

FAPERGS - Fundação de Amparo à Pesquisa do Rio Grande do Sul

FPR - *False positive rate*

FEPPS - Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde

FIGO - *Federation International of Gynecology and Obstetrics*

FIPE - Fundo de Incentivo à Pesquisa do HCPA

GHC - Grupo Hospitalar Conceição

HC - Hospital Conceição

HCPA - Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Hi-SIL High - *Grade squamous intraepithelial lesions*

HPV - Papilomavírus humano

hTERT - *Human telomerase reverse transcriptase*

IARC - *International Agency for Research on Cancer*

IMC - Índice de massa corporal

INCA - Instituto Nacional do Câncer

L1/L2 - Proteínas Tardias que Compõem o Capsídeo Viral

LACEN - Laboratório Central

LCR - *Long Control Region-região regulatória longa*

LIEAG - Lesão intraepitelial de alto grau

LIEBG - Lesão intraepitelial de baixo grau

LILACS - Literatura Latino-Americana em Ciências da Saúde

Lo-SIL - *Low-grade squamous intraepithelial lesions*

MEDLINE - *Medical literature Retrieval System Online*

MeSH - *Medical Subjects Headings*

NIC (I-II-III) - Neoplasia Intraepitelial Cervical (Graus I, II e III)

OR - Odds Ratio (Razão de Chances)

ORF - *Open Reading Frame* (fase aberta de leitura)

p53 - Gene constitutivo do genoma humano protetor à indução do câncer

PCR - Reação em Cadeia da Polimerase

pRb - Proteína Retinoblastoma

PUBMED - Banco de dados de informações bibliográficas na área da ciência, desenvolvido pela *National Center for Biotechnology Information (NCBI) at the National Library of medicine*.

RNA - Ácido Ribonucleico

ROC - *Receiver operator characteristic*

UFRGS - Universidade Federal do Rio Grande do Sul

TRP - True positive rate

## LISTA DE FIGURAS

### Revisão da Literatura

- Figura 1:** Representação esquemática do genoma do Papilomavírus humano.....21
- Figura 2:** História natural das lesões precursoras do câncer de colo uterino.....42
- Figura 3:** Eventos moleculares envolvidos na carcinogênese cervical.....43

### Artigo 1

- Figure 1:** Kaplan-Meier estimates of proportion of women remaining positive for any types human papillomavirus and for HPV16. Only women positive at enrollment were included in this analysis .....109

### Artigo 2

- Figure 1:** Study selection process.....133
- Figure 2:** ROC curve Hi-SIL vs. Lo-SIL, normal or benign lesion.....134
- Figure 3:** ROC curve of cervical cancer vs. Hi-SIL.....134

## LISTA DE TABELAS

### Revisão da Literatura

<b>Tabela 1:</b> Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação de ACO e carcinogênese cervical.....	27
<b>Tabela 2:</b> Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação da paridade e carcinogênese cervical.....	29
<b>Tabela 3:</b> Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação de tabagismo e carcinogênese cervical.....	31
<b>Tabela 4:</b> Relação da terminologia atual e antiga do Sistema Bethesda, para lesões precursoras do câncer de colo uterino.....	44

### Artigo 1

<b>Table 1:</b> Baseline characteristics of 501 women included in a cohort study between the years 2002-2006.....	106
<b>Table 2:</b> Distribution of women according to HPV DNA testing (n=501).....	107
<b>Table 3:</b> Multinomial logistic regression analysis with crude and adjusted odds ratios (OR) for conversion and clearance of HPV infection in asymptomatic women.....	108

### Artigo 2

<b>Table 1:</b> Participant characteristics and scoring criteria in studies included.....	129
<b>Table 2:</b> Distribution of histological types in cervical tissue according to diagnosis in paraffin-embedded blocks.....	130
<b>Table 3:</b> Contingency tables for Lo-SIL, Hi-SIL and cervical cancer.....	131
<b>Table 4:</b> Accuracy of telomerase for Lo-SIL vs. normal or benign lesion; Hi-SIL vs Lo-SIL, normal or benign lesion; cervical cancer vs Hi-SIL and cervix cancer vs Lo-SIL, normal or benign lesion.....	132

## APRESENTAÇÃO

Este trabalho consiste na tese de doutorado, apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, em 2007, e analisa a história natural do Papilomavírus humano em uma coorte de 501 mulheres, cujo desfecho foi dividido em quatro categorias: (1) persistência, (2) cura, (3) aquisição e (4) permanecer negativa durante o arrolamento e o seguimento, sendo esta última a categoria de referência. Foi realizada também uma metanálise diagnóstica para avaliar a acurácia da telomerase como marcador nas lesões precursoras do câncer cervical.

A revisão de literatura foi dividida em duas partes: (1) Papilomavírus humano (HPV) e neoplasia cervical contendo: estrutura viral, classificação, patologia da infecção pelo HPV, O HPV e o controle do ciclo celular, co-fatores na evolução da neoplasia cervical, História natural do HPV, quadro clínico, diagnóstico e (2) Telomerase e câncer cervical.

Os resultados são apresentados em forma de dois artigos. Um artigo analisa a persistência e cura da infecção pelo HPV num estudo de coorte prospectivo. O outro artigo consiste em uma revisão sistemática de estudos observacionais sobre acurácia da telomerase no diagnóstico de lesões precursoras do câncer cervical. As considerações finais discutem os principais achados dos artigos.

Documentos de apoio, incluindo o Projeto de Pesquisa, estão apresentados nos anexos.



## 1 INTRODUÇÃO

---

O câncer cervical é um dos mais comuns do mundo, sendo responsável por 6% de todas as neoplasias das mulheres. (Parkin, 2001). Cerca de 470.000 novos casos são diagnosticados a cada ano. Aproximadamente 231 mil mulheres morrem anualmente por câncer cervical invasivo, sendo que 80% dessas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos. (Parkin, 2001). A média de idade para desenvolver o câncer cervical é de 52 anos, e a distribuição dos casos é bifásica, com picos entre 35-39 anos e 60-64 anos. (Boring *et al*, 1994).

Nas últimas duas décadas, o enigma do câncer cervical começou a ser elucidado e atualmente foi identificada a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) como seu agente etiológico, transmitido sexualmente. (Franco *et al*, 1999; Bosh *et al*, 2002; Bosh *et al*, 2003; Castellsagué e Muñoz, 2003; Van der Graaf *et al*, 2002). Em 1995, a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) avaliou todos os dados relevantes da carcinogênese do HPV e concluiu que existiam evidências suficientes que o HPV16 e HPV18 sejam causadores do câncer cervical. (IARC, 1995).

A IARC, em 1995, conduziu um estudo multicêntrico de casos e controles com 2000 casos de câncer cervical e 2000 controles, na Espanha, Colômbia, Brasil, Paraguai, Marrocos, Mali, Filipinas e Tailândia. A análise de todos os resultados revelou uma forte associação entre câncer cervical e a presença de qualquer HPV. A razão de chances (OR) ajustada por idade de todos os países foi de (OR= 60 IC 95%, 49-73) com intervalo de confiança de 95%, sendo a menor na Colômbia OR=17 e maior nas Filipinas OR=156. (Walboomers *et al*, 1999). Observa-se que o risco relativo da associação entre HPV e câncer cervical em alguns estudos é maior que 100. (Bosh *et al* 2002; Franco *et al*, 2001). Nenhum outro fator para neoplasia cervical tem magnitude comparável. (Duarte-Franco e Franco,

2004). Entretanto, a infecção pelo HPV é necessária, mas não suficiente, para causa do câncer cervical (Walboomers *et al*, 1999; Ferenczy e Franco, 2002), sendo que a vasta maioria das mulheres infectadas pelo HPV oncogênico nunca desenvolverão câncer, sugerindo fatores adicionais que agem em conjunto para o desenvolvimento da doença.

A incidência e mortalidade do câncer cervical têm diminuído na América do Norte nos últimos 50 anos, devido ao incremento dos programas de rastreamento através da citologia. (Franco *et al*, 2001).

No Brasil, vem se tentando implementar um programa de rastreamento para o câncer cervical, pois esse tipo de programa foi realizado com êxito em diversos países, nos quais se observou um declínio significativo da incidência e mortalidade.

O Ministério da Saúde divulgou oficialmente, no Brasil, o Programa "Assistência Integral à Saúde da Mulher" (PAISM), em 1983, com linhas de ação e estratégias muito bem definidas: modelo assistencial que abrangia a integralidade e a equidade, incluindo ações educativas, promocionais, preventivas, de diagnóstico e de recuperação da saúde. Entre outras metas para a Ginecologia estavam o controle e prevenção das DST/AIDS e o controle e prevenção do câncer ginecológico. Em 1999, o INCA iniciou o processo de consolidação e organização de uma base geopolítica gerencial para o Programa Nacional de Controle do Câncer do Colo do Útero e de Mama. Além disso, o INCA definiu as diretrizes de implantação nacional do Programa visando a reduzir a desigualdade de acesso à rede de serviços, melhorar a qualidade do atendimento, aumentar a eficiência da rede de atenção ao câncer em todo o território brasileiro e motivar a mulher a cuidar de sua saúde (Viva Mulher).

O rastreamento do câncer de colo baseado na citologia de Papanicolaou é internacionalmente apontado como o mais adequado, levando-se em conta o baixo custo e a aceitação pelas mulheres a que se destinam e é oferecido gratuitamente na rede pública de todo o Brasil, com reforços de campanhas nacionais.

Tendo em vista os índices de incidência e de mortalidade pelo câncer do colo uterino, fica difícil entender a alta incidência desse agravo em nosso país, passados mais de 15 anos da oficialização dos programas. A realidade da saúde da população brasileira demonstra através de indicadores que, apesar de bem formuladas, as políticas não têm sido implementadas.

O câncer de colo tem uma significativa magnitude, conforme demonstram os indicadores, com uma transcendência no contexto social e econômico de alto impacto e com vulnerabilidade e factibilidade altas, pois é evitável por rastreamentos simples e baratos, contanto que eficazes. Os países desenvolvidos que implementaram os programas de rastreamento nos últimos 40 anos, experimentaram marcada redução das taxas da doença. (Smith *et al*, 2000, Sarakanarayanan *et al*, 2005). O câncer de colo pode ser evitado quando estratégias e serviços são bem planejados e manejados, com controle de qualidade, além disso, também o acesso aos usuários deve ser levado em conta. (Saranarayanan *et al*, 2005, Bradley *et al* 2005, Agurto *et al*, 2005).

A causalidade do câncer cervical já é conhecida, porém o Papilomavírus humano é causa necessária, mas não suficiente, para evoluir para lesões pré-neoplásicas ou câncer, havendo fatores que contribuem para a persistência e integração do vírus no DNA do hospedeiro. A vacina recombinante quadrivalente contra o papilomavírus humano - HPV - tipos 6, 11, 16 e 18, internacionalmente conhecida como Gardasil, já aprovada pelo FDA (*Food and Drug Administration*) e pela ANVISA representa um grande passo rumo à cura do câncer cervical. A vacina foi indicada para a prevenção de lesões pré-cancerosas de alto grau e câncer de colo do útero não-invasivo, associados ao HPV (papilomavírus humano) tipos 16 e 18, responsáveis por aproximadamente 70% dos casos de câncer do colo do útero e para a prevenção de câncer vaginal, câncer vulvar e verrugas genitais associadas ao HPV dos tipos 6,

11, 16 e 18. A faixa etária de indicação da vacina é de 9 a 26 anos de idade, em mulheres. (CDC, 2007; FDA, 2007).

Pretende-se, com esse estudo, contribuir com dados epidemiológicos populacionais no entendimento de possíveis fatores associados à cura, aquisição ou persistência do vírus, assim como fazer uma revisão sistemática da sensibilidade e especificidade da enzima telomerase para a detecção de neoplasia intra-epitelial de alto grau e câncer cervical.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1 O Papilomavirus humano e neoplasia cervical

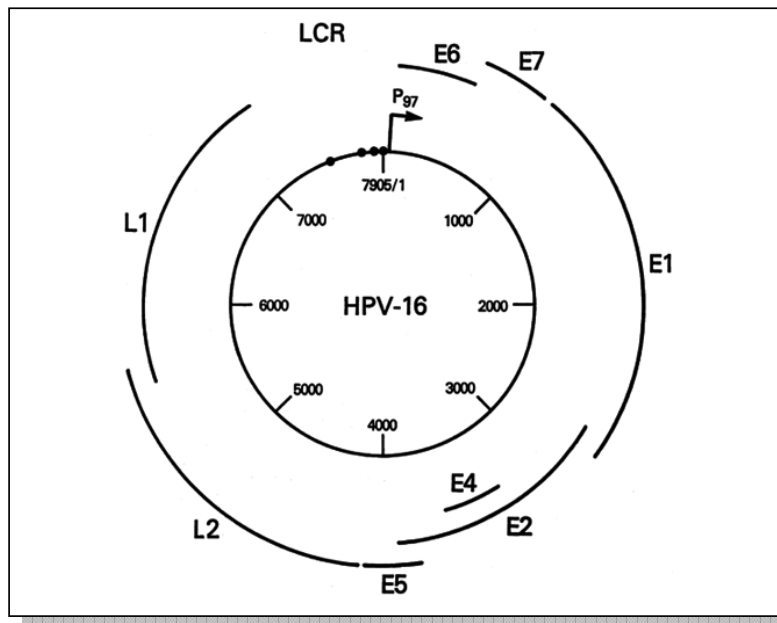
#### 2.1.1 Estrutura viral

Os papilomavirus são pequenos vírus pertencentes à família *Papovaviridae*. Seu genoma é composto por uma dupla hélice de DNA circular, com aproximadamente oito mil pares de bases. O genoma é pequeno e contém apenas alguns genes, todos codificados na mesma cadeia. O capsídeo é icosaédrico, com um diâmetro de 50 a 60 nm, e não é revestido por envelope lipídico. (Collier *et al*, 1998; Finnem *et al*, 2003).

O genoma do HPV decompõe-se em três regiões: a região não codificante – LCR (*Long Control Region*) – que contém a origem de replicação (ORI) e a maioria dos promotores de transcrição. As regiões codificadoras são denominadas ORF (*open reading frames*), que são divididas nas seqüências precoce e tardia. A região precoce é composta por genes precoces (*early*). São sete regiões ditas precoces (E1 a E7), assim chamadas por serem responsáveis por processos iniciais da replicação viral, no controle de sua transcrição e na transformação celular; destacam-se E1, E2, E6 e E7 (Southern e Herrington, 1998). A região tardia, contém dois genes tardios (*late*) – L1 e L2, responsáveis pelas etapas finais da replicação do vírus, como a síntese de proteínas estruturais do capsídeo. (Park *et al* 1995; Collier *et al*, 1998; Terhune *et al*, 2001).

Como se pode observar na Figura 1, algumas ORFs (*Open Reading Frames*) estão sobrepostas, por isso é necessário uma regulação específica para definir qual dos genes será expresso. O capsídeo do HPV é icosaédrico e composto por 72 subunidades denominadas capsômeros e por 12 proteínas L2. A quantidade de L2 é uma estimativa, havendo autores que

defendem 36 unidades. Cada um dos capsídeos resulta da associação de 5 proteínas L1. (Florin *et al*, 2002; Finnem *et al*, 2003).



**Figura 1:** Representação esquemática do genoma do Papilomavírus humano.

Fonte: Howley, (1996).

### 2.1.2 Classificação

Existem inúmeros tipos de HPV, com mais de 40 tipos anogenitais, dos quais, aproximadamente 18 são oncogênicos. Os HPV genitais são tipicamente divididos em grupos de acordo com os presumíveis potenciais oncogênicos, consideram-se os HPV tipo 16, 18, 26, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 53, 56, 58, 59, 63, 66, 68 e 82 de risco oncogênico (Muñoz *et al*, 2003); os restantes tipos genitais, HPV 6, 11, 42, 43 e 44 são considerados de baixo risco ou sem qualquer risco oncogênico. (Lörincz *et al*, 1992, Clavel *et al*, 1999).

Excluído:

### 2.1.3 Patologia da infecção pelo HPV

O papilomavírus é epiteliotrópico por natureza, infectando o epitélio escamoso cervical, podendo penetrar por microabrasão através das camadas basais. O DNA do HPV se estabelece no núcleo da célula infectada, sem causar maiores danos nem estimular o sistema imune. (Schneider e Koutsky, 1992). Na camada basal, são expressos os genes precoces e nas camadas superficiais das células se expressam os genes tardios L1 e L2. Dessa forma, a infecção conduz para a coilocitose. As lesões podem regredir, persistir ou progredir. (Southern e Herrington, 1998).

No início de um estado replicativo, poucos vírus são encontrados nas células basais e parabasais, mas o número de partículas virais (VLPs) aumenta progressivamente quando o processo de maturação celular ocorre, até que, na superfície epitelial, o núcleo é substituído em grande parte, pelas partículas do virion completo. (Bosch *et al*, 1995).

Durante o processo de replicação viral, os genomas que estão mantidos de forma episossomal passam, em algum momento, a integrar o genoma da célula do hospedeiro, levando a alterações morfológicas da célula, alterando seu controle do ciclo celular, levando eventualmente a lesões precursoras do câncer cervical. A persistência do vírus é o principal fator de risco para desenvolver câncer cervical. (Jeon e Lambert, 1995). A infecção da mucosa genital pelo HPV leva freqüentemente ao aparecimento de uma alteração morfológica conhecida, desde os anos 50, por atipia coilocitótica. (Koss e Durfee, 1956). A coilocitose pode ser definida como a presença de células, exibindo alteração do núcleo, contornados por extensos halos claros com volume geralmente superior ao citoplasmático e, usualmente, ocorrendo em células preferencialmente superficiais. Constitui um sinal patognomônico em lesões associadas ao HPV. (Boon *et al*, 2005).

Basicamente o ciclo celular é o programa para o crescimento e divisão (proliferação) celular, composto de 4 estágios: G1 (e G0), S, G2 e M. Na fase G1 (*Gap 1*= interfase) a célula aumenta de tamanho e produz enzimas necessárias para a produção de DNA, outras proteínas e RNA preparam-se para copiar seu DNA. Durante a fase S (síntese), a célula replica seu DNA. Durante a fase G2 (*Gap 2*), a célula novamente cresce e sintetiza proteínas permitindo a ela o processo de divisão. Durante a fase M (mitose), a célula-mãe, aumentada, divide-se ao meio, originando duas células filhas, com o mesmo número de cromossomos, entrando na fase G1 ou podem tornar-se quiescentes, entrando em G0 (repouso). (Nurse, 1994; Lewin 1997).

Se esses processos não forem controlados, as células irão dividir-se continuamente. Existe uma série de proteínas que regulam e controlam o ciclo celular. O gene supressor de tumor p53 codifica uma proteína que é essencial para o controle do ciclo celular. A proteína p53 atua no ciclo celular nos pontos de controle G1 / S e G2 / M, levando a uma parada nesses pontos e permitindo o reparo de danos no DNA. Dessa forma é evitada a replicação de DNA, contendo alterações genéticas. A parada no ciclo celular em G1, após a ativação da p53, envolve a transcrição do gene codificante da proteína p21/WAF inibidora de cinases dependentes de ciclinas (CDKs). (Albrechtsen *et al*, 1999). O outro gene supressor de tumor é o pRb. A proteína P16 é uma proteína supressora de tumores que inibe as CDKs 4 e 6, que regulam o ponto de controle G1 do ciclo celular. As CDKs fosforilam a proteína Rb, provocando alteração estrutural que leva à liberação da Rb do complexo E2F. O efeito imediato da indução da p21 é a inibição da atividade da proteína do retinoblastoma (pRb). A pRb na fase G1 encontra-se hipofosforilada e ligada a fatores de transcrição da família E2F. Quando a pRb é fosforilada por cinases, dependente de ciclinas, tais fatores são liberados, resultando na transcrição de genes da fase S do ciclo celular. Nessa via, a p21 inibe o complexo de CDKs, resultando no acúmulo de pRb hipofosforilada, complexada a E2F,



parando o ciclo celular em G1. Essa parada é de fundamental importância para permitir o reparo do DNA danificado antes que ocorra sua duplicação na fase S. Mutações na p53 podem levar à carcinogênese. (Kastan e Bartec, 2004). Outro mecanismo de controle da divisão celular é o mecanismo da contagem do número limitado de vezes que uma célula pode se reproduzir. Nesse mecanismo, os telômeros marcam o número de divisões e, no momento certo, iniciam a senescência e morte celular. (Steenbergen *et al*, 2001).

No caso dos HPVs de alto risco, os genes E6 e E7 codificam as proteínas precoces E6 e E7, que são responsáveis pela transformação da célula hospedeira. Os genes tardios codificam as proteínas estruturais L1 e L2, que irão constituir o capsídeo. (Turek, 1994; Motoyama *et al*, 2004). A proteína E5 também tem potencial transformante, mas é mais reduzido. E6 e E7 são suficientes para provocar a transformação. A proteína E7 rompe o complexo ativo E2 F pRb, inativando o pRb, suprimindo esse gene supressor tumoral ficando a célula com um potencial para continuar se multiplicando. A E6, por sua vez, degrada o P53, promovendo também, de forma independente, um aumento da atividade da telomerase (Veldman *et al*, 2002), levando a uma imortalização celular. (Park e Androphy, 2002; Fehrmann e Laimins, 2003).

Portanto, o primeiro passo para a progressão para câncer cervical é que as oncoproteínas E6 e E7, produzidas pelos HPVs de alto risco, inativem os genes supressores tumorais p53 e Rb respectivamente, resultando prosseguimento do ciclo celular e divisões celulares. (Fehrmann e Laimins, 2003; Dey *et al*, 2002; Alunni-Fabroni *et al*, 2000; Pan *et al*, 2003). Estudos recentes também têm demonstrado que as duas oncoproteínas causam distúrbios no mecanismo de duplicação e segregação durante a mitose, causando instabilidade cromossômica severa. (Duensing e Munger, 2003; Wentzensen *et al*, 2004).

Existem outros fatores também importantes no ciclo celular. Apesar de estar bem estabelecida a ligação entre o processo da proliferação celular e apoptose, ainda não está bem

claro o papel da regulação do ciclo pelas células T *in vivo*. Especula-se que a p19<sup>ARF</sup> possa ser a chave de regulação da resposta dessas células. (Gao *et al*, 2002).

O locus INKA/ARF é um dos mais importantes loci de supressão tumoral e regula o ciclo celular através das proteínas p16<sup>INK4A</sup> e p 19<sup>ARF</sup>, atuando nas proteínas retinoblastoma (Rb) e p53 respectivamente (Sharpless e De Pinho, 1999; Carnero *et al*, 2000, Guo *et al*, 2002). O gene MHC tem papel importante na regulação imune (Maciag e Villa, 1999), sendo que um efeito protetor do HLA classe II é o mais consistente encontrado na literatura.

### 2.1.5 Co-fatores na evolução da neoplasia cervical

Vários co-fatores têm sido associados com o desenvolvimento do câncer cervical invasivo, como: paridade, uso de contraceptivo oral, tabagismo, imunossupressão, particularmente relatado em paciente com vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecções com outras doenças sexualmente transmissíveis, e deficiência nutricional. (Hildesheim *et al*, 2002). Porém seus verdadeiros papéis no desenvolvimento do câncer permanecem obscuros.

Excluído: ,

A idade da sexarca, número de parceiros sexuais, história de DSTs e outras características de atividade sexual estão ligadas ao processo de adquirir o vírus HPV e não são considerados co-fatores para a progressão da infecção pelo vírus. (Rousseau *et al*, 2003).

#### 2.1.5.1 Uso de anticoncepcional oral

A influência do comportamento sexual tem sido muito estudada como fator de risco para o câncer cervical. Alguns estudos (Lacey *et al*, 1999, Hildesheim *et al*, 2001, Muñoz

*et al.*, 2002) encontraram associação do uso de ACO e câncer de colo, porém existem controvérsias (Tabela 1). A contracepção hormonal por menos de 5 anos não aumenta o risco. Porém, mulheres que referem uso de ACO de 5 a 9 anos tiveram 2,8 vezes mais chances de desenvolver câncer em relação às que nunca o utilizaram. Esse risco aumenta quando a exposição ao fator é relatada pelo período de mais de 10 anos, passando a ser 4,0. Em recente metanálise, concluiu-se que o uso por longa duração aumenta o risco de câncer cervical. (Smith *et al.*, 2003). Os estudos não distinguem o uso de anticoncepcional oral e outros contraceptivos hormonais. Sabe-se que a maioria das mulheres que usam contraceptivos fazem uso do ACO. Algumas fazem uso de contracepção injetável trimestral com progesterona somente ou mensalmente com combinado (estrogênio e progesterona). A progesterona (acetato de medroxiprogesterona depo) trimestral não parece aumentar o risco de câncer de colo (WHO, 1993). Pouco se sabe sobre a ação na carcinogênese dos injetáveis mensais, que são muito utilizados na América Latina. (Skegg *et al.*, 1994).

Deacon *et al.*, (2000), num estudo de coorte em Manchester, não encontraram associação entre uso de ACO e NIC III nem em mulheres que relataram uso de ACO por mais de 8 anos. Em outro estudo prospectivo com 1675 mulheres, não foi encontrada associação entre câncer cervical e NIC III com o uso corrente de ACO comparado com mulheres que nunca o utilizaram. Atenção especial nesse estudo pela limitação relatada pelos autores, pelo fato de que a informação do uso de ACO foi no momento do arrolamento das pacientes, havendo a possibilidade da descontinuação ou início de uso de ACO durante o desenvolvimento do estudo. Também as usuárias de ACO tiveram um período de seguimento menor do que as não usuárias, havendo possibilidade de viés. (Castle *et al.*, 2002).

**Tabela 1:** Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação de ACO e carcinogênese cervical

Exposição / estudo	Lacey <i>et al</i> 2001 CIS, CC Noruega	Deacon <i>et al</i> , 2000 NIC III Manchester	Hildesheim <i>et al</i> , 2001 HISL, CC Costa Rica	Castle <i>et al</i> , 2002 NIC III, CC EUA-Portland	Muñoz <i>et al</i> , 2002 e Moreno <i>et al</i> 2002 CIS, CC, IARC
Uso de ACO OR - IC95%					
Sempre vs nunca	5,4 (0,7-43,4)	-	-		<b>1,4(1,0-2,0)</b>
No passado vs nunca	3,1(0,4-27,5)	1,2(0,6-1,6)	0,9(0,6-1,6)		-
Usando vs nunca	<b>17,1(1,5-188,2)</b>	1,3(0,7-2,5)	1,5(0,8-2,8)	0,8 (0,49-1,5)	-
Duração em anos OR (IC95%) vs nunca	[- de 2] 4,0(0,4-44,3) [-6] 4,8 (0,4-51,9) [≥7] 6,2(0,7-52,7)	[-3] 1,2 (0,6-2,4) [-8] 0,8 (0,4-1,5) [>8] 1,5 (0,8-2,9)	[-4]1,8(0,6-4,9) [≥5] <b>3,1(1,1-9,1)</b>		[1] 0,7(0,4-1,1) [-4] 0,8 (0,5-1,2) [-9] <b>2,8 (1,5-5,4)</b> [+10] <b>4,0(2,1-7,8)</b>

ACO- anticoncepcional oral, OR – Odds Ratio, IC- intervalo de confiança, HISL- Lesão intra-epitelial de alto Grau, CIS- carcinoma *In situ*, CC- câncer cervical, NIC- neoplasia cervical intra-epitelial, [ ] - tempo  
Fonte: Adaptado de Castellsagué e Muñoz, (2003).

O mecanismo pelo qual os hormônios influenciariam na carcinogênese do câncer cervical não está bem esclarecido. Os hormônios promoveriam integração do DNA do HPV no genoma do hospedeiro com desregulação da expressão do E6 e E7 (IARC,1995). Estudos experimentais em ratas, (Mitrani-Rosenbaum *et al* 1989; Arbeit *et al*, 1996), demonstram que existe sinergismo entre longo tempo de exposição ao estrogênio e carcinogênese cervical pelo HPV 16.

### 2.1.5.2 Paridade

Durante décadas, tem sido suspeitado que a multiparidade pudesse aumentar o risco do câncer cervical, porém confundia-se com o comportamento sexual. Atualmente alguns estudos de casos e controles confirmaram o papel independente da alta paridade com

carcinogênese cervical (Tabela 2). No estudo realizado em Costa Rica, Hildesheim *et al*, (2001) acharam um significativo aumento de câncer cervical e neoplasia epitelial de alto grau associado ao aumento do número filhos. Muñoz *et al*, (2002), avaliou oito estudos de casos e controles em quatro continentes, com 1465 pacientes com carcinoma cervical escamoso e 221 com carcinoma *In situ*, além de 124 casos de adenocarcinoma e analisou, controlando os fatores sexuais de confundimento. Constatou que existe uma associação direta entre o número de gestações a termo e risco de carcinoma escamoso cervical, encontrando (OR=3,8, IC 95%, 2,7-5,5) para seis ou mais gestações vs nulíparas. Com os dados do IARC, conclui-se que há um aumento linear de câncer *In situ* e câncer cervical com o aumento da paridade.

No estudo de Manchester, encontrou-se associação *boderline*, e no estudo de Castle *et al*, (2002), não foi encontrada associação. Poderia ser explicado pela baixa paridade da população estudada, e também porque os dados de paridade foram coletados no início da coorte (arrolamento). O estudo teve um seguimento de dez anos, e provavelmente nesse período houve mudança no número de gestações a termo nas mulheres do estudo.

Estado nutricional, hormonal, traumatismos e mecanismos imunológicos seriam hipóteses plausíveis para explicar associação entre paridade e neoplasia epitelial de alto grau e câncer cervical. As trocas hormonais induzidas pela gestação poderiam estar relacionadas à persistência ou à progressão. A soro-reatividade é mais alta na mulher não grávida, sugerindo uma redução da resposta imune-humoral contra o HPV, durante a gestação. (Sethi *et al* 1998; Muñoz *et al*, 2002). O declínio da paridade poderia explicar a redução de câncer cervical em alguns países.

**Tabela 2:** Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação da paridade e carcinogênese cervical.

Exposição / estudo	Deacon <i>et al</i> , 2000 NIC III Manchester	Hildesheim <i>et al</i> , 2001 HISL, CC Costa Rica	Castle <i>et al</i> , 2002 NIC III, CC EUA-Portland	Muñoz <i>et al</i> , 2002 e Moreno et al 2002 IARC CIS, CC
Paridade OR (IC95%)				
Nº filhos ou gestações vs nenhum filho	[1] 1,6 (0,9-2,8)	[-2] 1,0 (0,5-2,2)	[1-2] 1,1 (0,6-1,7)	[1-2] <b>1,8 (1,0-3,5)</b>
	[2] 1,1 (0,6-2,0)	[3] 1,5 (0,7-3,2)	[≥3] 0,7 (0,3-1,6)	[3-4] <b>2,6(1,3-4,9)</b>
	[≥3] 1,9 (0,9-3,8)	[4-5] <b>3,5 (1,7-7,2)</b>		[5-6] <b>2,9 (1,4-5,6)</b>
		[6-8] <b>2,2 (1,0- 5,0)</b>		[≥ 7] <b>3,9 (1,9-7,9)</b>
		[≥9] 1,4 (0,6-3,4)		

OR – Odds Ratio, IC- intervalo de confiança, HISL- Lesão intra-epitelial de alto Grau, CIS- carcinoma *In situ*, CC- câncer cervical, NIC- neoplasia cervical intra-epitelial, [ ] - tempo  
 Fonte: Adaptado de Castellsagué e Muñoz, (2003).

### 2.1.5.3 Tabagismo

Uma consistente associação entre tabagismo e câncer cervical tem sido demonstrada por diversos estudos. Revisões como de Kuper *et al*, (2002), e metanálise de Haverkos *et al*, (2003), concluíram que os dados evidenciam o papel do fumo como fator de risco para câncer cervical. O tabagismo passivo também pode estar associado à neoplasia cervical. Estudo de coorte realizado por Trimble *et al*, (2005), com dados coletados durante dois censos particulares sobre tabagismo ativo e passivo, em Washington, no período de 1963-1978 e 1975-1994, encontraram, para tabagismo passivo um (RR=2,1 IC 95%, 1,3-3,3) para a coorte de 1963, e (RR=1,4 IC 95%, 0,8-2,4) para a coorte de 1975, sendo estatisticamente significativa somente na primeira coorte. Os autores discutem a possibilidade de que a proporção de mulheres que trabalham fora aumentou nos últimos anos, diminuindo o tempo de exposição das mesmas ao efeito do tabagismo passivo. As limitações do estudo são com os possíveis fatores confundidores como paridade, DSTs, ACO e parceiros sexuais.

Nesse mesmo estudo, o tabagismo ativo obteve (RR=2,6, IC 95%, 1,7-4,1) e (RR =1,7 IC 95%, 1,1-2,6), nas coortes de 1963 e 1975 respectivamente. Resultados semelhantes foram encontrados por Wu *et al*, (2003), com mulheres tailandesas, concluindo que o tempo de exposição ao tabagismo passivo é o maior determinante para contrair câncer cervical.

A Tabela 3 demonstra alguns estudos que reportam algumas evidências do aumento do risco de desenvolver neoplasia intraepitelial de alto grau e câncer cervical em tabagistas. A OR de fumar alguma vez *vs* nunca foi de 2,2 em três estudos, (Deacon *et al*, 2000, Muñoz *et al*, Moreno *et al*, 2002), sendo que fumar onze ou mais cigarros ao dia *vs* nunca, deu uma OR= 5,9 (IC95%,10-36) e fumar por 10 anos ou mais aumenta para OR=7,5 (IC95%, 1,2-46) (Oslo *et al*, 1998).

Excluído: ,

A evidência biológica para elucidar esse fator ainda é obscura. A nicotina e outros carcinógenos específicos do tabaco foram encontrados nas células cervicais de tabagistas. (Prokopczyk *et al*, 1997). As células de Langerhans são componentes importantes na vigilância imunológica celular, pois são apresentadoras de antígeno e ativam especificamente os linfócitos T-CD4. A elevada concentração dos derivados do tabaco tem sido associada à depressão das células de Langerhans Alguns estudos observaram associação entre o fumo e redução da densidade dessas células (Poppe *et al* 1995; Barton *et al* 1998). Foi observado, em estudos experimentais, que os derivados do tabaco alteram as células de Langerhans, tornando-as arredondadas ou alongadas, com poucos dendritos e aparecimento de neoplasia, enquanto que a supressão do tabaco estava associada à regressão dos achados, mudando a morfologia das células e regressão do tumor. (Zeid e Muller, 1995).

**Tabela 3:** Sumário dos resultados de alguns estudos sobre associação de tabagismo e carcinogênese cervical.

Exposição/estudo	Oslon, <i>et al.</i> , 1998 NIC II, NIC III Noruega	Lacey, <i>et al.</i> 2001 CIS, CC EUA	Deacon <i>et al.</i> , 2000 NIC III Manchester	Hildesheim <i>et al.</i> , 2001 HISL, CC Costa Rica	Castle <i>et al.</i> , 2002 NIC III, CC EUA-Portland	Muñoz <i>et al.</i> , 2002 e Moreno <i>et al.</i> 2002 CIS, CC, IARC
Tabagismo OR (IC95%)						
Alguma vez vs nunca	4,6 (0,9-22,9)	1,5(0,7-3,0)	<b>2,2 (1,4-3,4)</b>	NR	NR	<b>2,2 (1,5-3,2)</b>
No passado vs nunca	4,2 (0,5-3,1)	1,2 (0,5-3,1)	1,7 (0,8-3,7)	1,7 (0,8-4,0)	<b>2,1 (1,1-3,9)</b>	1,8 (0,9-3,4)
fumando vs nunca	NR	1,6 (0,7-3,5)	NR	<b>2,3 (1,2-4,3)</b>	NR	<b>2,3 (1,3-4,0)</b>
Quantidade de cigarros (dia) vs nunca	[-10]3,3 (0,5-21) [≥11] <b>5,9 (10-36)</b>	[-19]1,6 (0,6-3,9) [≥20] 1,3 (0,6-3,0)	[-10]1,4 (0,7-2,5) [≥20] <b>2,2 (1,2-3,9)</b>	[-5] <b>1,8 (1,0-3,3)</b> [≥6] <b>3,1 (1,2-7,9)</b>	[-19] <b>2,2 (1,2-4,2)</b> [≥20] <b>2,9 (1,5-5,6)</b>	[-5] <b>1,9 (1,2-4,2)</b> [≥ 6] <b>2,2 (1,2-4,2)</b>
Duração em anos vs nunca	[-9]2,1 (0,3-12,3) [≥10] <b>7,5 (1,2-46)</b>	[-10] 1,2 (0,5-3,0) [-20] 3,2 (1,0-9,7) [≥20] 0,8 (0,3-2,7)	[-10] 1,8 (0,9-3,6) [-19] <b>2,0 (1,0-3,8)</b> [≥20] <b>3,1 (1,6-6,2)</b>	[-9] <b>2,2 (1,0-4,8)</b> [≥10] <b>2,0 (1,0-3,8)</b>	NR	[-9] <b>2,6 (1,4-4,7)</b> [≥20] <b>1,9 (1,0-3,5)</b>

OR – Odds Ratio, IC - intervalo de confiança, HISL- Lesão intra-epitelial de alto Grau, CIS- carcinoma *In situ*, CC- câncer cervical, NIC- neoplasia cervical intra-epitelial, [ ] - tempo  
Fonte: Adaptado de Castellsagué e Muñoz, (2003).

### 2.1.5.4 Nutrientes antioxidantes e IMC

Nos últimos tempos, tem-se investigado a relação entre consumo de vitaminas e de carotenóides na gênese de câncer. (Byers e Perry, 1992; van Poppel e van den Berg, 1997). A dificuldade dos estudos é pelo fato de saber-se que o processo de carcinogênese envolve



múltiplos fatores, sendo tarefa difícil isolar um único nutriente como fator causal. (Doll, 1999).

As vitaminas mais estudadas como substâncias quimio-preventivas para o câncer cervical são as vitaminas A, incluindo os carotenóides, e vitamina E, que funcionam como antioxidantes em sistemas biológicos. O beta caroteno é um dos mais de 600 carotenóides existentes conhecidos na natureza. Os carotenóides são os pigmentos que vão do amarelo ao vermelho e que são geralmente encontrados em vegetais. Cerca de 50% dos carotenóides podem resultar em vitamina A, sendo nomeada pró-vitamina A (Olson, 1989). O licopeno é o carotenóide mais abundante no plasma sem a atividade pró-vitamina A. (Krinsky, 2001).

A vitamina E é uma substância lipossolúvel e existente na natureza como tocoferóis e tocotrienóis em quatro formas diferentes ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  e  $\delta$ ), sendo que o  $\alpha$  tocoferol a forma antioxidante mais ativa e amplamente distribuída (Niki *et al*, 1995). Os óleos vegetais, margarinas, amêndoas, amendoim e gérmen de trigo constituem alimentos ricos em vitamina E.

Vários estudos têm examinado a relação entre a dieta e estado nutricional como fator de risco para o câncer cervical. Entretanto, poucos estudos controlam fatores como tabagismo e uso de ACO. Além disso, muitos estudos foram realizados antes do advento do método de cromatografia líquida de alta eficiência que separa e quantifica o caroteno e seus isômeros. (Castle e Giuliano, 2003).

Alguns estudos encontraram associação inversa entre  $\beta$ caroteno e carcinogênese cervical para risco de NIC (Goodman *et al*, 1998; Brock *et al*, 1996; Palan *et al*, 1996) e câncer invasivo. (Potischman *et al*, 1991; Batieha *et al*, 1993). Estudos que mediram outros carotenos (Palan *et al*, 1996; Potischman *et al*, 1991; Batieha *et al*, 1993; VanEenwyk *et al*, 1991; Nagata *et al*, 1999), encontraram também inversa associação entre licopeno e NIC; licopeno e persistência do HPV (Sedjo *et al*, 2003) e  $\alpha$  caroteno no soro e câncer cervical (Palan *et al*, 1991). Em estudos que pesquisaram a concentração de tocoferol (vitamina E)

quatro encontraram associação com risco de NIC (Palan *et al*, 1996; Palan *et al*, 1991; Cuzick *et al*, 1990, Kwasniewska *et al*, 1997) e um com risco para câncer invasivo (Kenekt, 1988). Entretanto, vários estudos observacionais não têm encontrado associação. (Giuliano e Gapstur, 1998).

Juntos, esses dados sugerem que alguns carotenóides podem influenciar a história natural da infecção pelo HPV, entretanto alguns estudos não encontram nenhuma associação. É importante notar que esses estudos têm um seguimento de tempo curto entre 6 a 12 meses.

Os radicais livres são átomos ou moléculas produzidas continuamente durante os processos metabólicos e atuam como mediadores para a transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando funções relevantes no metabolismo. (Méndez Filho e Rodriguez, 1997). Num organismo, a existência de um desequilíbrio em favor da geração excessiva de radicais livres, ou em detrimento da velocidade de remoção dessas espécies, é conhecida como estresse oxidativo e pode conduzir à oxidação maciça de substratos biológicos. A cronicidade desse estresse oxidativo, no ambiente celular, pode causar severos problemas metabólicos e estar envolvida na origem e no desenvolvimento de numerosas doenças. (Lucesoli e Fraga, 1995).

Os radicais livres são formados a partir do oxigênio. Dentre os radicais estão o superóxido, a hidroxila, o hidroperóxido, o óxido nítrico e o dióxido de nitrogênio. Desses, o radical hidroxila é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares e o peróxido de hidrogênio. Apesar de não ser considerado um potente radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA. (Anderson *et al*, 1996). O estresse oxidativo está relacionado às fases de iniciação e promoção do processo de carcinogênese (Cerutti, 1989, 1991).

Outros estudos são necessários para examinar a influência de nutrientes antioxidantes na persistência do HPV, preferencialmente em estudos prospectivos e períodos maiores de um ano. (Sedjo *et al*, 2003, Castle e Giuliano, 2003).

O índice de massa corporal não parece ser fator de risco para o câncer cervical. Estudo de caso e controle, incluindo 124 pacientes com adenocarcinoma, 139 com carcinoma escamoso e 307 controles, demonstrou associação somente com adenocarcinoma. (Lacey *et al*, 2003). Recente revisão sistemática, em relação a todos os cânceres ginecológicos, no que diz respeito a câncer de colo, aponta que a obesidade diminuiu a sobrevida que pode estar relacionada com co-morbidades ou respostas ao tratamento. Observou-se também um aumento de complicações cirúrgicas e radioterápicas, além de não haver consenso sobre as doses da quimioterapia em pacientes obesas. (Modesitt e van Nagell, 2005).

#### **2.1.5.5 Co-infecções**

Alguns estudos têm associado doenças sexualmente transmissíveis e carcinogênese cervical com o foco principal na *Chlamydia trachomatis*. Um estudo multicêntrico com 1238 casos e 1100 controles, em sete países diferentes, foi realizado, concluindo-se que o risco de carcinoma cervical escamoso foi elevado nas mulheres soro positivas para *C. trachomatis* (OR=1,8, IC 95%, 1,2-2,7). (Smith *et al*, 2004). A *Chlamydia trachomatis* de tipo “G” aumenta em 6,6 vezes o risco de desenvolvimento desse tipo de câncer (OR= 6,6, IC 95%, 1,6-27); o do tipo “I” em 3,8 vezes (OR= 3,8, IC 95%, 1,3-11,0) e o do tipo “D” em 2,7 vezes (OR =2,7 IC 95%, 1,3-5,6), segundo os pesquisadores do Instituto Nacional de Saúde Pública finlandesa e da Universidade de Helsinque. (Anttila *et al*, 2001).

Recente estudo de caso e controle encontrou forte evidência da associação do herpes vírus-2 com HPV (OR= 2,19 IC 95%, 1,41-3,4), tendo sido controlado os fatores de confundimento. (Smith et al, 2003).

Permanece ainda pouco entendido o papel das DSTs e seu efeito biológico no desenvolvimento de lesões precursoras e câncer de colo. O mecanismo mais provável é a indução da inflamação da cérvix uterina, levando a dano por metabólitos oxidativos. (Castle e Giulinao, 2003). As células com carcinoma cervical infectadas pela *Chlamydia trachomatis* secretam maior quantidade de citocinas, resultando um estado inflamatório mais profundo. (Rasmussen *et al*, 1997). O Herpes vírus também poderia ser por processo inflamatório. Não existem evidências de que o HPV sozinho induza um processo inflamatório.

A inflamação cervical crônica pode induzir lesão tecidual através da produção indireta de espécies reativas de oxigênio que desencadeia uma cascata inflamatória, diminui a imunidade celular e promove a angiogênese. Por isso recomenda-se utilizar antiinflamatórios não esteróides inibidores da cicloxigenase-2 (COX-2), inibindo a síntese de prostaglandinas G/H, sempre que houver um processo inflamatório. (O'Byrne e Dalglish, 2001). Castle *et al*, (2001), demonstraram associação entre cervicites e lesão intra-epitelial de alto grau. Também Kulkarni *et al*, (2001), encontrou aumento da expressão da COX-2 em câncer cervical, sugerindo relação entre processo inflamatório e câncer.

#### **2.1.5.6 Imunossupressão**

Já é conhecido que o vírus da imunodeficiência humana aumenta o risco de HPV associado a cânceres anogenitais comparados com indivíduos saudáveis. (Palefsky e Holly, 2003; Strickler *et al*, 2005). Num estudo, 7% das 400 mulheres HIV positivas apresentaram

neoplasia intra-epitelial de alto grau, comparada a apenas 1% das 307 mulheres controles (HIV negativas) ( $p < 0.001$ ). (Wright *et al*, 1994). Em outro estudo, foi detectada NIC em 42% das citologias realizadas em mulheres HIV positivas e em 8% em HIV negativas, sendo que a metade dos casos de NIC no grupo positivo foi neoplasia intra-epitelial de alto grau. (Conti *et al*, 1993).

As mulheres HIV positivas têm severa imunossupressão (definida como contagem de células CD4 abaixo de  $200 \times 10^6/L$ ), tendo grande risco de desenvolver NIC. (Conley *et al*, 2002; Wright *et al*, 1994; Conti *et al*, 1993). Dados atuais indicam que tanto homens como mulheres HIV positivos têm um aumento de risco de cânceres anogenitais, comparados à população em geral. (Fordyce *et al* 2000). O risco varia de acordo com a população. Na Europa, foi observado um aumento do risco no sul, particularmente entre usuárias de drogas injetáveis (Serraino *et al*, 2002), enquanto que nos Estados Unidos há um aumento no nordeste, particularmente na cidade de Nova Iorque. (Fordyce *et al* 2000).

## **2.1.6 História natural do Papilomavírus humano**

### **2.1.6.1 Prevalência da infecção pelo HPV**

Aproximadamente 40% das mulheres sexualmente ativas são infectadas pelo HPV. (Ho *et al*, 1998). A incidência, se literalmente forem levados em conta somente os casos novos, é de difícil determinação, devido à dificuldade de saber se a infecção não é recorrente ou reativação de uma fase latente. O termo certo seria incidência presumida. (Franco *et al*, 1999). A relação da incidência e prevalência é mediada pela duração da infecção e indica a

persistência, a qual é a chave prognóstica para a progressão de lesão cervical de alto grau. (Ho *et al*, 1995).

A curva da prevalência está relacionada, na maioria das regiões, a idade. A baixa prevalência em mulheres mais velhas comparada com as jovens é independente dos hábitos sexuais. Burk *et al*, (1996), em estudo de coorte observou que 36% das infecções estavam presentes antes dos 25 anos, e apenas 2,8% acima dos 45 anos. Outro estudo encontrou um pico máximo entre 20-24 anos. (Melkert *et al*, 1993). Numa coorte, de 20 810 mulheres, entre 16 a 94 anos, também se observou o decréscimo, com a idade, da infecção pelo HPV. (Sherman *et al*, 2003). Porém, na Costa Rica, Herrero *et al*, (2000) encontraram uma curva bimodal na prevalência de qualquer tipo de HPV estimada por idade. Observou-se prevalência de 20% até os 25 anos, decrescendo para aproximadamente 5% entre 35-54 anos, tornando a subir para próximo de 20% em mulheres com 65 anos ou mais. A explicação poderia ser reativação de infecções latentes e a possibilidade de alguma falha no sistema imunológico dessas mulheres e também infecção pelo HIV. Resultados semelhantes foram encontrados na Espanha e Colômbia (Munhoz *et al*, 1992). Estudo recente também corrobora com esses achados, indicando um segundo pico de infecção pelo HPV entre mulheres hispânicas. (Giuliano *et al*, 2005).

Recente revisão realizada na América do Sul, África, Europa e Ásia em 11 países diferentes, (Nigéria, Índia, Vietnã, Tailândia, Coreia, Colômbia, Argentina, Chile, Noruega, Itália e Espanha), compreendendo 15.613 mulheres entre 15 a 74 anos, concluiu que a prevalência (com idade padronizada), variou de 1,4 na Espanha a 25,6 na Nigéria, sendo que na África (25,6%) a prevalência foi cinco vezes maior que na Europa (5,2%), com prevalência intermediária na América do Sul (14,3%) e Ásia (8,7%). O tipo mais comum foi o HPV16, seguido pelo HPV 42, HPV 58, HPV31, HPV18, HPV56, HPV81, HPV35, HPV33 e HPV 45.

Das 1429 mulheres HPV-positivas, 1041 apresentaram somente um subtipo de HPV, e 388 foram infectadas com múltiplos subtipos, totalizando 2003 infecções pelo HPV, sendo 66% HPVs de alto risco. O HPV16 foi duas vezes mais comum em todos os países, com exceção da região da África (sub-Saara) onde o HPV35 foi igual ao HPV 16, mas foi 5 vezes mais prevalente do que em outras regiões. (Clifford et al, 2005).

No Brasil o HPV16 é o tipo predominante nos cânceres cervicais invasivos nas regiões sul, central, nordeste, norte e sudeste, 52%, 57%, 59%, 43,5% e 52,25 respectivamente. Nos outros tipos observam-se variações regionais, dos HPVs 18,31 e 33, sendo que na maioria das regiões o segundo mais prevalente é o HPV18, com exceção da região central em que predomina o HPV33, e na região nordeste o HPV31 ficou em segundo lugar na prevalência. (Lorenzato et al, 2000; Rabelo-Santos et al, 2003; Cavalcanti et al, 2000; Noronha et al, 1999; Bosch et al, 1995).

#### **2.1.6.2 Transmissão e aquisição**

A aquisição da infecção cervical pelo HPV é o principal precursor de uma série de eventos que leva ao câncer cervical e tem sido exaustivamente documentado por estudos epidemiológicos e experimentais durante os últimos 15 anos. Apenas a infecção pelo HPV não é capaz de levar a uma transformação maligna, sendo que, a história natural das mulheres com diagnóstico de lesões precursoras de baixo grau é caracterizada por regressão espontânea e apenas pequena percentagem persiste e evolui para câncer. (Wright *et al*, 2003).

Estudos epidemiológicos conduzidos durante os últimos 30 anos indicam consistentemente que o risco da aquisição é fortemente influenciado pelas medidas tomadas na atividade sexual: número de parceiros sexuais, a idade em que se dá a primeira relação

sexual e o comportamento sexual dos parceiros masculinos. (Wellings *et al*, 1994; Franco *et al*, 2001).

O vírus HPV pode ser transmitido por contato direto dos órgãos genitais durante a prática sexual, por relações anais que podem resultar em infecções virais e neoplasias anais, e ocasionalmente pelo sexo oral. (Ford *et al*, 2003).

### **2.1.6.3 Persistência e cura**

Devem ser levados em conta os fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus. Sabe-se que os HPVs oncogênicos são importantes na persistência e progressão, especialmente o HPV16, seguido pelo HPV18. (Hildesheim e Wang, 2002). Alguns estudos têm demonstrado associação entre a carga viral e aumento de câncer cervical. (Sherman *et al*, 2002; Sherman *et al*, 2003; Schiffman *et al*, 2000; Ylitalo *et al*, 2000). A integração do HPV parece ser um evento também importante na carcinogênese. Durante o processo de replicação viral, os genomas que estão mantidos de forma episossomal passam, em algum momento, a integrar o genoma da célula do hospedeiro, levando a alterações morfológicas da célula, alterando seu controle do ciclo celular, levando a lesões precursoras. (Klaes *et al*, 1999). Os fatores ligados ao hospedeiro compreendem a resposta imune individual: imunidade humoral, imunidade celular, imunidade inata e suscetibilidade genética. (Wang e Hildesheim, 2003).

Permanece ainda obscuro o porquê de somente em algumas pacientes haver a integração viral, situação necessária para a transformação maligna das células epiteliais, que se tornam imortais. (Southern e Herrington, 1998; Ferenczy e Franco, 2002; Schiffman e Kjaer, 2003). Outra questão que ainda precisa ser entendida é quanto tempo o vírus pode ficar no estado de latência. Os estudos da latência são embasados em indivíduos



imunossuprimidos, porém se desconhece a frequência em indivíduos imunocompetentes, qual o tempo, qual a causa da reinfecção e que fração transforma-se em câncer após o período de latência. (Schiffman e Kjaer, 2003).

A persistência pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes em um certo período, não havendo consenso de quanto tempo seria esse período. (Schiffman e Kjaer, 2003). A média seria de 6-12 meses (HO, 1998), sendo que o HPV oncogênico tipo 16 persiste por um período maior. (Liaw *et al*, 2001; Franco *et al*, 1999; Molano *et al*, 2003). Recentes estudos evidenciaram que a regressão da infecção pelo HPV está relacionada a alguns mecanismos imunológicos tanto humoral (Bontkes *et al*, 1999) como mediado por células. (De Gruijl *et al*, 1998). Fatores nutricionais também parecem estar relacionados ao tempo de cura. Sedjo *et al* (2003) concluíram que altas concentrações de trans e cis-licopeno reduzem significativamente o tempo de cura da infecção pelo HPV oncogênicos. A persistência da infecção é um preditor para a neoplasia cervical intra-epitelial, particularmente entre os HPVs tipo 16 e 18. (Schlecht *et al*, 2001).

Franco *et al*, (1999), realizaram uma coorte com 1425 mulheres com idade média de 33,3 anos, atendidas no Programa Materno-Infantil de São Paulo. A cada quatro meses, eram coletados exames para detecção do HPV (PCR). 357 mulheres foram positivas para HPV pelo menos em uma vez, a incidência presumida foi de 1,3 % novas infecções por mês, com 38% de positividade cumulativa por 18 meses. A probabilidade cumulativa de adquirir infecção com HPVs não oncogênicos em 18 meses foi de 22%, o dobro da probabilidade de adquirir HPVs oncogênicos (11,2%). Das 177 mulheres infectadas no início, apenas 35% permaneciam infectadas após 12 meses. A prevalência pontual foi menor para os tipos não oncogênicos (7,0 vs 8,4%), enquanto que a incidência foi maior para esse mesmo grupo, comparado ao grupo oncogênico (0,91% vs 0,68%/mês). Isso indica a tendência dos tipos

oncogênicos a serem mais persistentes, aumentando a prevalência pontual. O HPV53 foi o mais freqüente na incidência (0,16%/mês), seguido pelo HPV16 (0,14%).

Pelo Kaplan-Meier, a mediana da persistência da positividade (isto é, quando 50% dos casos deixaram de ser positivos), foi de 4,8 meses para os HPVs não oncogênicos e 8,1 para os oncogênicos. A média de duração calculada pela fórmula:  $Duração = \frac{Prevalência}{[Incidência \times (1 - Prevalência)]}$  foi de 8,2 e 13,5 meses para os não-oncogênicos e oncogênicos respectivamente. A média de idade não alterou a média de duração dos tipos oncogênicos, porém os não oncogênicos persistiram por maior tempo nas mulheres menores de 35 anos. (Franco *et al*, 1999).

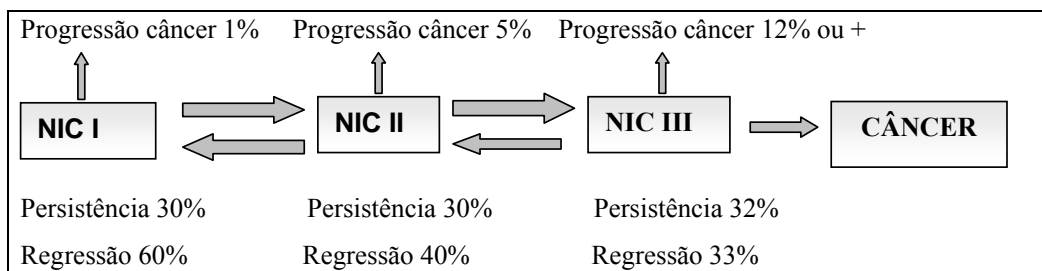
Giuliano (2002), numa coorte de 331 mulheres com média de idade de 24,2 anos no Arizona, encontrou uma taxa de infecção pelo HPV de 2,9% por mês, e a mediana de regressão variou de 9,8 meses para os tipos oncogênicos e 4,3 meses para os tipos não oncogênicos. Comparativamente os dois estudos têm a mediana de tempo semelhante na remissão, porém a taxa de aquisição é maior no segundo, talvez devido a média de idade ser menor.

#### **2.1.6.4 Progressão para câncer cervical**

Ambos os tipos de HPVs oncogênicos e não oncogênicos podem causar lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau, na cérvix uterina. Porém em mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e câncer cervical geralmente são positivas para os HPVs oncogênicos. (Baseman e Koutsky, 2005). Aproximadamente 70 % dos cânceres cervicais são causados pelo HPV 16 ou 18 (Muñoz *et al*, 2003) e 90% das verrugas vulvares são causadas pelos HPVs tipo 6 ou 11. (Greer *et al*, 1995).

Num estudo em que foram arroladas 20.810 mulheres, foram calculadas as taxas de incidência cumulativa no intervalo de 122 meses para o risco de NIC III ou mais, sendo 17,2% (11,2%-22,9%) para mulheres com HPV16; 13,6% (3,2%-23,7%) para mulheres HPV18 e somente 3,0% (1,9%-4,2%) em mulheres com outros tipos de HPV que não o HPV16 ou HPV18. Concluiu-se que a distinção entre HPV 16 e HPV 18 de outros tipos poderia identificar as mulheres com alto risco para desenvolver NIC III ou mais. (Khan *et al*, 2005).

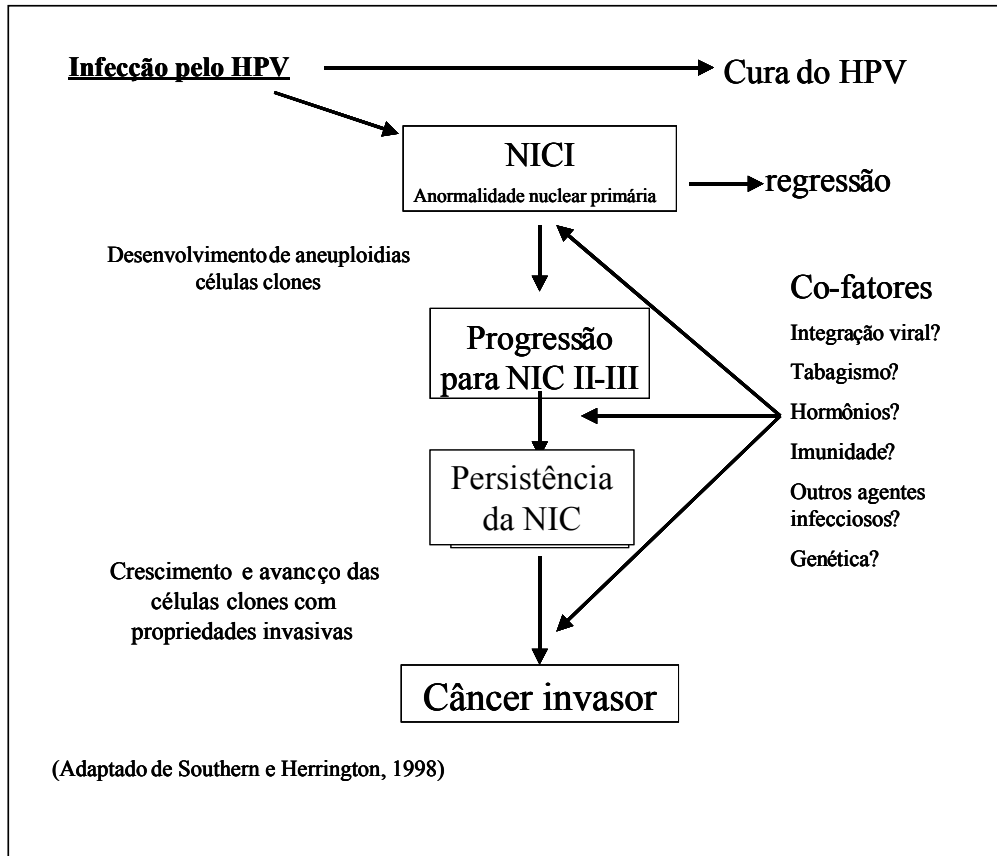
Conforme Figura 2, numa revisão crítica, realizada por Ostor (1993), com artigos publicados desde 1950, concluiu que a regressão da NIC I é de 60%, e a progressão para câncer invasor é baixa (1%), enquanto que a NIC II e NIC III, tem um risco 5% e 12% respectivamente de evoluir para carcinoma invasor.



**Figura 2:** História natural das lesões precursoras do câncer de colo uterino.

Fonte: Ostor, (1993).

A Figura 3 esquematiza os eventos moleculares envolvidos na carcinogênese cervical, levando em conta os co-fatores relacionados à progressão e à persistência da infecção pelo Papilomavírus humano.



**Figura 3:** Eventos moleculares envolvidos na carcinogênese cervical

A terminologia proposta pelo NCI (*National Câncer Institute*) - Bethesda 2001, para anormalidades celulares epiteliais de células escamosas é: (1) Células escamosas atípicas (ASC): ASC de significado indeterminado (ASC-US) e ASC que não se pode excluir lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (ASC-H); (2) Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau (LIEBG); (3) Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau (LIEAG); e (4) Carcinoma de células escamosas. (Apgar e Zoschnick, 2001). A Tabela 4 indica a relação entre as terminologias utilizadas para definir as lesões precursoras do câncer de colo uterino, pois embora o sistema Bethesda atual preconize LIEBG e LIEAG, muitos estudos ainda utilizam a terminologia de neoplasia cervical intra-epitelial (NIC), I, II e III.

**Tabela 4:** Relação da terminologia atual e antiga do Sistema Bethesda, para lesões precursoras do câncer de colo uterino.

ATUAL	LIEBG		LIEAG	
ANTIGA	NIC I	NIC II	NICIII	
	Displasia leve	Displasia moderada	Displasia severa	<i>Ca in situ</i>

LSIL- Lesão intra-epitelial escamosa de baixo grau, HSIL - Lesão intra-epitelial escamosa de alto grau, NIC – Neoplasia cervical intra-epitelial  
 Fonte: Apgar e Zoschnick, (2001).

Excluído: ¶

### 2.1.7 Quadro clínico

A maioria das infecções pelo HPV são assintomáticas ou inaparentes e podem apresentar-se clinicamente sob a forma de lesões exofíticas. A infecção pode também assumir uma forma denominada sub-clínica, visível apenas sob técnicas de magnificação e após aplicação de reagentes, como o ácido acético. Ainda, esse vírus é capaz de estabelecer uma infecção latente em que não existem lesões clinicamente identificáveis ou sub-clínicas, apenas sendo detectável seu DNA por meio de técnicas moleculares em tecidos contaminados. Não é conhecido o tempo em que o vírus pode permanecer nesse estado e quais fatores são responsáveis pelo desenvolvimento de lesões. Por esse motivo, não é possível estabelecer o intervalo mínimo entre a contaminação e o desenvolvimento de lesões, que pode ser de semanas ou décadas. Recente estudo realizado no Rio de Janeiro encontrou 25% de HPV de alto risco em pacientes com Papanicolaou normal. Isso pode caracterizar a infecção latente e 19,8% de HPV de alto risco em esfregaços inflamatórios, que também pode ser infecção latente ou lesão cervical incipiente. (Carvalho *et al*, 2005).

### 2.1.8 Diagnóstico

Pode ser feito, de maneira indireta, através do exame clínico, exames de rastreamento de Papanicolaou, colposcopia e anatomopatológico e, de maneira direta, através da identificação de seqüências de DNA de HPV com técnicas de hibridização molecular.

Apesar do sucesso do rastreamento, pela citologia, existem limitações, sendo a mais importante os resultados falso-negativos. (Petticrew *et al*, 2000; Franco *et al*, 2001).

Desses falso-negativos, um terço é atribuído a erro de interpretação e dois terços por amostra escassa e preparação das lâminas. (McCrorry *et al*, 1999). As evidências da eficácia do exame de Papanicolaou foram exaustivamente estudadas por vários estudos randomizados, consensos nacionais e internacionais, e revisões evidenciaram sua eficácia. (Smith *et al*, 2005; Lazcano-Ponce *et al*, 2003; Sankaranarayanan *et al*, 2005; Valdespino e Valdespino, 2006; IARC, 1986).

O risco de câncer invasivo é 2 a 10 vezes maior entre mulheres que nunca realizaram o exame, e esse risco também aumenta entre mulheres que têm muito tempo de intervalo entre os exames. (Franco *et al*, 2001). As estatísticas comprovam que a incidência do câncer e a mortalidade têm diminuído em países que incrementaram a cobertura dos rastreamentos, como os países escandinavos, Canadá e Estados Unidos. (Franco *et al*, 2001). Recentemente a citologia líquida foi introduzida como mais uma ferramenta para o exame de Papanicolaou, com a proposta de diminuir a freqüência de lâminas insatisfatórias. Numa revisão Davey *et al*, (2006) concluiu que não há evidência de que a citologia líquida reduz a proporção de lâminas insatisfatórias comparada com a citologia convencional.

A colposcopia constitui o segundo nível de rastreamento, na maioria dos protocolos do nosso país, permitindo identificar e localizar a lesão que originou as células alteradas, determinar a sua extensão e predizer o grau histológico dessa alteração. De maneira

geral é realizada em todas as pacientes com algum grau de alteração citológica detectado na citologia e está disponível na rede pública em nosso país, sendo um valioso instrumento para o diagnóstico e seguimento das lesões precursoras do câncer cervical. Esta realidade é diferente em outros países onde a colposcopia é muito dispendiosa tornando o seu emprego mais limitado, preferindo-se o teste de DNA para o HPV, que no Brasil, só está disponível na rede privada. (Carozzi *et al*, 2005; Kulasingam *et al*, 2006).

Os testes diagnósticos validados nos estudos epidemiológicos são a captura híbrida de segunda geração (HC-II), teste do DNA HPV e os métodos baseados na reação de polimerização em cadeia (PCR, *Polymerase Chain Reaction*). Estudo conduzido com 977 mulheres assintomáticas, em amostras da junção escamo-colunar, comparando as técnicas, concluiu-se que o HC-II é comparável ao PCR na detecção do DNA do HPV (Bozzetti *et al*, 2000). Novas técnicas para detecção de HPV em amostra cervicais estão sendo desenvolvidas: sistema MY09/11 (Gravitt *et al*, 1998), sistema GP5+/GP6+ (Jacobs *et al*, 1995), sistema SPF-PCR (Kleter *et al*, 1998), captura híbrida-III e sistema de captura rápida (Companhia Digene) (Obiso e Lorincz 2004), entre outros.

O teste ideal seria aquele que detectasse múltiplos tipos de HPV, identificasse os tipos individualmente e desse a informação sobre a carga viral de cada tipo encontrado e que fosse altamente sensível e específico (Iftner e Villa, 2003). Metanálise realizada em 2004, encontrou sensibilidade de 84% e especificidade de 77,6 para todos os tipos de testes para HPV. (Ayrbyn *et al*, 2004).

Cuzick e colaboradores concluíram, numa revisão sistemática, que os testes para detecção do HPV são mais sensíveis que a citologia para a detecção de neoplasia intraepitelial de alto grau, porém têm baixa especificidade, principalmente em mulheres jovens, mas não existe suporte para ser recomendado como rastreamento primário e sim como manejo para aqueles resultados *boderline* na citologia. (Cuzick *et al*, 1990).

O comitê australiano *Medical Services Advisory Committee* (2004) realizou revisão sistemática de artigos publicados, entre 1998 e 2003, em todas as bases de dados para determinar a acurácia e precisão dos testes diagnósticos (HC-II ou PCR) para monitorar lesão intra-epitelial de alto grau. Encontraram uma sensibilidade que variou de 29 a 100% e especificidade de 44 a 100% e valor preditivo positivo de 15 a 100%. O valor preditivo negativo foi de 95% em vários estudos, sugerindo que a ausência de HPV está associada com a baixa probabilidade de NIC. A recomendação é que poderia ser usado o teste em 12 e 24 meses, como acompanhamento da efetividade do tratamento de lesão intra-epitelial de alto grau, sendo bons os custos-benefícios desse procedimento em saúde pública. Por outro lado, o mesmo comitê achou que não há evidências suficientes que suportem o uso do teste em neoplasias epiteliais de baixo grau. (Medical Service, 2002).

## **2.2 Telomerase e câncer cervical**

Em células humanas, os telômeros são cerca de 2000 repetições da seqüência nucleotídica TTAGGG. Sabe-se ainda que, após cada mitose, as células humanas perdem 100 pares de bases e que a extinção dos telômeros ocorrem após 125 divisões mitóticas.

Um evento importante nas divisões celulares é o encurtamento dos telômeros, levando as células à senescência, sendo a enzima telomerase, mais especificamente sua unidade catalítica hTERT, responsável pela manutenção dos telômeros e, conseqüentemente a imortalidade celular. (Steenbergen *et al*, 2001). Inovações tecnológicas, incluindo mudanças na coleta das amostras da citologia oncológica até descobertas biológicas, estão sendo estudadas, para tentar entender a patogênese do câncer cervical. (Sherman, 2003). Mais recentemente a telomerase vem despertando interesse especial dos pesquisadores. (Wolf, *et al*, 2003; McDougall, 2001; Lange, 1994; Wang *et al*, 2003, Riethdorf *et al*, 2001, Nowak, 2000).



Ao fazer uma busca bibliográfica na MEDLINE, em 2006, com a palavra chave telomerase, chama a atenção que, até 1986, não existe nenhum artigo publicado. No ano de 1987, aparece o primeiro artigo publicado (Greider e Blackburn, 1987), sendo que até 1989 os estudos foram realizados no protozoário *tetrahymena* e, a partir de 1990, em fibroblastos humanos. Usando-se os descritores, telomerase, HPV, câncer cervical, somente em 1996 começam a aparecer trabalhos. Só para ilustrar, o ano em que houve maior número de publicações foi em 2003, num total de 21 publicações/ano.

Todos os cromossomos das células eucarióticas possuem telômeros em suas terminações cuja função é dar estabilidade, impedindo que sofram danos estruturais. (Blackburn, 1999; Fernandez, 1999; Perez *et al*, 2002). Os telômeros são estruturas especializadas que consistem em repetidas seqüências, nos mamíferos. Essa seqüência é 5'-TTAGGG-3' são replicadas pela ação da enzima telomerase. (Perez *et al*, 2002). A telomerase é ribonucleoproteína com dois componentes essenciais: um componente de RNA (TERC), contendo a seqüência complementar de aminoácidos, e um componente catalítico (TERT) com atividade de transcriptase reversa. (Cheong *et al*, 2003; Hang *et al*, 2003). O mecanismo de ação da telomerase foi elucidado em 1985 em estudos com o protozoário *Tetrahymena*. (Greider, 1987).

A telomerase não está presente em células somáticas do corpo em que não há renovação constante. A perda progressiva da seqüência telomérica varia com a idade e tem sido implicada na senescência celular. (Frenck *et al*, 1998). Esses dados têm estabelecido ligações entre taxa de metabolismo e longevidade. (Sharpless *et al*, 2004).

O controle do comprimento dos telômeros nas células telomerase-positivas parece depender de vários fatores, incluindo alterações nos níveis da atividade da telomerase. (Bryan *et al*, 1998).

A ausência de telomerase está associada ao encurtamento dos telômeros e envelhecimento celular, sendo considerado uma defesa natural contra o câncer. Quando os telômeros apresentam um tamanho crítico, passam a ter dificuldades para separar-se durante as mitoses gerando associações teloméricas e instabilidades cromossômicas capazes de gerar trocas genéticas importantes para o desenvolvimento neoplásico. (Countier *et al*, 1992). Os mecanismos que produzem tais associações teloméricas podem estar associados às falhas da atividade da telomerase. (Cottlia e Slavutsky, 2000). A atividade dessa enzima, cuja função é manter a integridade telomérica, estaria reprimida nos tecidos normais, com exceção dos tecidos germinativos (ovários e testículos) e hematopoiéticos, porém sua atividade é positiva em quase todos os tecidos tumorais malignos. (Kim *et al*, 1994; Dahse *et al*, 1997; Greider, 1999; Ureta *et al*, 2002; Countier *et al*, 1998; Chatziantoniou, 2001). Revisão de Meeker e Coffey em 1997 encontrou atividade da telomerase positiva em 84,9% dos casos de câncer (Meeker e Coffey, 1997). Ahmed encontrou alta atividade da telomerase em 90% das células cancerosas humanas, embora ainda seja obscura a explicação do mecanismo de reaparecimento da telomerase nessas células. (Ahmed e Tollefsbol, 2003).

Dados recentes sugerem que a unidade catalítica da telomerase hTERT (human telomerase reverse transcriptase) é a determinante da atividade da telomerase. (Nakamura *et al*, 2004; Chatziantoniou, 2001; Hiyama, 2002) e que a expressão ectópica de hTERT é suficiente para reativar a telomerase em células em que previamente não se detecta atividade da enzima. (Countier *et al*, 1998; Cong *et al*, 1999). Muitos fatores de transformação, incluindo produtos oncogênicos e produtos de genes supressores de tumores, são hábeis para alterar a unidade catalítica da telomerase durante o processo de carcinogênese. (Newbold, 2002; Horikawa e Barret, 2002). A hTERT é expressa não somente no núcleo, como se pensava antes, mas também pode ser encontrada no citoplasma das células cancerosas, o que poderia ser apenas uma translocação ou uma função ainda desconhecida. (Kyo *et al*, 2003).

Sabe-se que a transcriptase reversa tem um importante papel na replicação cromossômica e no crescimento celular, mas são necessários muitos estudos para um completo entendimento do complexo telomerase. (Nugent e Lundblad, 1998; Sherman, 2003).

O mecanismo de ativação da telomerase tem sido bastante estudado, principalmente vinculado a tumores. Atualmente sabe-se que o gene viral E6 do HPV-16, além de promover a degradação da proteína p53, responsável pela apoptose celular, (DeFilippis *et al*, 2003), promove também, de forma independente um aumento da atividade da telomerase (Veldman *et al*, 2003), sugerindo que a ativação da telomerase pela proteína E6 é p53- independente (Klingelhutz *et al*, 1996; McDougall, 2001, Horner *et al*, 2004), mas os fatores envolvidos nesse processo não estão bem elucidados. (McMurray e McCance, 2003).

Há relação entre os oncogenes sobre o Myc, responsável pela transcrição do RNA mensageiro da subunidade catalítica. Em queratinócitos, observou-se que, quando havia a amplificação da expressão do gene Myc, a telomerase era ativada, facilitando a formação tumoral. (Wang *et al*, 1998). Estudos estão sendo realizados com o foco de tratamento com inibidores da atividade da telomerase. (Yokoyama *et al*, 2004).

A detecção de telomerase em tecidos e/ou células cervicais de câncer ou de lesões precursoras de câncer de colo uterino tem sido mundialmente estudada por vários pesquisadores, a partir de 1996 (Zheng *et al*, 1997; Zheng *et al*, 2000; Yashima *et al*, 1998; Anderson *et al*, 1997; Nakano *et al*, 1998; Mitirangura *et al*, 1998; Wisman *et al*, 1998; Snijders *et al*, 1999; Kawai *et al*, 1998; Maláska *et al*, 2004; Zhang *et al*, 1999; Nair *et al*, 2000; van Duin *et al*, 2003; Park *et al*, 2003; Reesink-Peters *et al*, 2003; Reddy *et al*, 2001; Riethdorf *et al*, 2001; Wisman *et al*, 2000; Herbsleb *et al*, 2001; Cheah *et al*, 2002), embora no Brasil ainda não exista nenhum trabalho publicado explorando essa associação.

Nowak, numa revisão em 2000, concluiu que a atividade da telomerase está ativada na maioria dos cânceres cervicais escamosos, como acontece em todos os outros tipos

de neoplasias malignas. Pode ser detectada em muitas lesões pré-neoplásicas, porém essa significância não está bem clara, visto que células não neoplásicas proliferativas também apresentam atividade da telomerase. (Nowak, 2000).

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase, and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr* 2003;51: 116-122.
2. Altman D. Some common problems in medical research. In: Altman D. *Practical statistics for medical research*. 9nd ed. London, England: Chapman;1999:403-9.
3. Apgar BS, Zoschnick L. The 2001 Bethesda Sytem Terminology. *American Family Physicians*. 15 Nov 2003, v.68, n.10, p.1992-8.
4. Arbyn M, Buntinx F, Van Ranst M, Paraskevaidis E, Martin-Hirsch P, Dillner J. Virologic versus cytologic triage of women with equivocal Pap smears: a meta-analysis of the accuracy to detect high-grade intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst*. 2004 Feb 18;96(4):280-93.
5. Albrechtsen N, Dornreiter I, Grosse F, Kim E, Wiesmuller L, Deppert W. Maintenance of genomic integrity by p53: complementary roles for activated and non-activated p53. *Oncogene*. 1999 ; 13;18(53):7706-17
6. Alunni-Fabroni M, Littlewood T, Deleu L, Caldeira S, Giarrè M, Dell'Órco M, *et al*. Inducion of S phase and apoptosis by the human papillomavirus type 16 E7 protein are separable events in immortalized rodent fibroblasts.*Oncogene* 2000;19:2277-2285
7. Anderson S, Shera K, Ihle J, Billman L, Goff B, Greer B, *et al*. Telomerase activation in cervical cancer. *Am J Pathol* 1997;151:25-31.
8. Anderson D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. *Mutat Res*. 1996 Feb 19;350(1):103-8.

9. Anttila T, Saikku P, Koskela P, Bloigu A, Dillner J, Ikaheimo I, *et al.* Serotypes of *Chlamydia trachomatis* and risk for development of cervical squamous cell carcinoma. *JAMA*. 2001; 3;285(1):47-51.
10. Arbeit JM, Howley PM, Hanahan D. Chronic estrogen-induced cervical and vaginal squamous carcinogenesis in human papillomavirus type 16 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 2;93(7):2930-5.
11. Barton SE, Maddox PH, Jenkins D, Edwards R, Cuzick J, Singer A. Effect of cigarette smoking on cervical epithelial immunity: a mechanism for neoplastic change? *Lancet*. 1988; 17;2(8612):652-4.
12. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S16-24. Review.
13. Baticha AM, Armenian HK, Norkus EP, Morris JS, Spate VE, Comstock GW. Serum micronutrients and the subsequent risk of cervical cancer in a population-based nested case-control study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1993;2(4):335-9
14. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, *et al.* Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis*. 1993;20:274-278.
15. Blackburn E. The telomere and telomerase: How do they interact? *Mounth Sinai J Med* 1999;66(5):292-300.
16. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, *et al.* Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen Virol*. 1999; 80 ( Pt 2):409-17.

17. Boon ME, Boon LM, de Bosschere MJ, Verbruggen BS, Kok LP. Koilocytosis and squamous (pre)neoplasia as detected in population-based cervical screening: practice and theory. *Eur J Gynaecol Oncol*. 2005;26(5):533-6.
18. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin*. 1994 Jan-Feb;44(1):7-26.
19. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, *et al*. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *Natl Cancer Inst* 1995 Jun; 87 (11):796-802.
20. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol*. 2002; 55(4):244-65.
21. Bosh FX, Shiffman M, Salomon D. Introduction: Future Research directions in the epidemiology of huma papilomavirus and cancer. *J Natl Inst Monogr* 2003; 31:1-2.
22. Bozzetti M, Nonnenmacher B, Mielzinska I I, Villa L, Lorincz A, Breitenbach V V, Prolla J. Comparison between hybrid capture II and polymerase chain reaction results among women at low risk for cervical cancer. *Ann Epidemiol*. 2000 Oct 1;10(7):466.
23. Brock KE, Berry G, Mock PA, MacLennan R, Truswell AS, Brinton LA. Nutrients in diet and plasma and risk of in situ cervical cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1988; 15;80(8):580-5.
24. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM *et al*. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Ann Intern Med* 2003;138:40-5.

25. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 1996 Jul-Aug;23(4):333-41.
26. Bryan TM, Englezou A, Dunham MA, Reddel RR. Telomere length dynamics in telomerase-positive immortal human cell populations. *Exp Cell Res* 1998;239(2):370-8.
27. Byers T, Perry G. Dietary carotenes, vitamin C, and vitamin E as protective antioxidants in human cancers. *Annu Rev Nutr.* 1992;12:139-59.
28. Carnero A, Hudson JD, Price CM, Beach DH. P16<sup>INK4A</sup> and p19<sup>ARF</sup> act in overlapping pathways in cellular immortalization. *Nat Cell Biol* 2000:148-55
29. Carozzi FM, Confortini M, Cecchini S, Bisanzzi S, Cariaggi MP, Pontenani G, Raspollini MR, Sani C, Zappa M, Ciatto S. Triage with human papillomavirus testing of women with cytologic abnormalities prompting referral for colposcopy assessment. *Cancer.* 2005 Feb 25;105(1):2-7.
30. Carvalho MOO, Caretato FN, Perdigao PH, Xavier MPPT, Silva KC, Botelho MO *et al.* Human papillomavirus infection in Rio de Janeiro, Brazil: a retrospective study. *Braz J Infect Dis*, Oct. 2005, vol.9, no.5, p.398-404.
31. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:20-8.
32. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):29-34. Review.

Formatados: Marcadores e numeração



- [33.](#) Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, *et al.* An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(10):1021-7.
- [34.](#) Castle PE, Wacholder S, Lorincz AT, Scott DR, Sherman ME, Glass AG, *et al.* A prospective study of high-grade cervical neoplasia risk among human papillomavirus-infected women. *J. Natl Cancer* 2002;94;1406-14.
- [35.](#) Cavalcanti SM, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 2000 Jan;40(1):80-7.
- [36.](#) Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available at: <http://www.cdc.gov/std/hpv/STDFact-HPV-vaccine.htm>. Accessed on June 25, 2007.
- [37.](#) Cerutti PA. Oxidant stress and carcinogenesis. *Eur J Clin Invest.* 1991;21(1):1-5.
- [38.](#) Cerutti PA. Mechanisms of action of oxidant carcinogens. *Cancer Detect Prev.* 1989;14(2):281-4.
- [39.](#) Chatziantoniou VD. Telomerase: Biological function and potential role in cancer management. *Pathol Oncol Reserch* 2001; 7(3):161-70.
- [40.](#) Cheah PL, Looi LM, Ng MH, Sivanesaratnam V. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients. *J Clin Pathol.* 2002;55(1):22-6.
- [41.](#) Cheong C, Hong KU, Lee H-W. Mouse models for telomerase and telomerase biology. *Exp Mol Med* 2003; 35(3):141-53.

[42.](#) Clavel C, Masure M, Bory JP, Putaud I, Mangeonjean C, Lorenzato M *et al.* Hybrid Capture II-based human papillomavirus detection, a sensitive test to detect in routine high-grade cervical lesions: a preliminary study on 1518 women. *Br J Cancer*. 1999; 80(9):1306-11.

[43.](#) Cochrane Methods Working Group on Systematic Reviews of Screening and Diagnostic Tests. Recommended methods. Available at: <http://www.cochrane.org/cochrane/sadtdoc1.htm>. Accessed January 25, 2007.

[44.](#) Collier, B, Goobar-Larsson, L, Sokolowsky, M, Schwartz, S,. Translational Inhibition in Vitro of Human Papillomavirus Type 16 L2 mRNA Mediated through Interaction with Heterogenous Ribonucleoprotein K and Poly(rC)-binding Proteins 1 and 2. *J BIO CHEM*, 1998. 273: 22648-22656.

[45.](#) Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, [Prevalence](#) Surveys Study Group Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet*. 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.

Excluído: *et al.*

[46.](#) 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(1):137-42.

[47.](#) Conley LJ, Ellerbrock TV, Bush TJ, Chiasson MA, Sawo D, Wright TC. HIV-1 infection and risk of vulvovaginal and perianal condylomata acuminata and intraepithelial neoplasia: a prospective cohort study. *Lancet* 2002;359:108-13

- [48.](#) Conti M, Agarossi A, Parazzini F, Muggiasca ML, Boschini A, Negri E, *et al.* HPV, HIV infection, and risk of cervical intraepithelial neoplasia in former intravenous drug abusers. *Gynecol Oncol* 1993;49:344-8.
- [49.](#) Cottliar ASH, Slavutsky IR. Telomeros y actividad de telomerasa: su participacion en el envejecimiento y desarrollo neoplasico. *Medicina* 2000; 60: 335-42.
- [50.](#) Countier C, Meyerson M, Eaton EN, Ellisen LW, Caddle SD, Haber DA, *et al* Telomerase activity is restored in human cells by ectopic expression of hTERT, the catalytic subunit of telomerase. *Oncogene*, 1998; 1217-22.
- [51.](#) Countier CM, Avillon AA, Le Feuvre CL, Stewart NG, Greider CW *et al.* Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J* 1992; 11:1921-9.
- [52.](#) Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J. Use of PGMY Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):902-907.
- [53.](#) Cuzick J, De Stavola BL, Russell MJ, Thomas BS. Vitamin A, vitamin E and the risk of cervical intraepithelial neoplasia. *Br J Cancer.* 1990;62(4):651-2.
- [54.](#) Cuzick J, Sasieni P, Davies P, Adams J, Normand C, Frater A *et al.* A systematic review of the role of human papilloma virus (HPV) testing within a cervical screening programme: summary and conclusions. *Br J Cancer.* 2000 Sep;83(5):561-5.
- [55.](#) Dahse R, Fielder W, Ernest G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance. *Clinical Chemist* 1997; 43(5): 708-14.

- [56.](#) Davey E, Barret A, Irwig L, et al. Effect of study design and quality on unsatisfactory rates, cytology classifications, and accuracy in liquid-based versus conventional cervical cytology: a systematic review. *Lancet* 2006; 367: 122-132
- [57.](#) Deacon JM, Evans CD, Yule R, Desai M, Binns W, Taylor C, *et al.* Sexual behaviour and smoking as determinants of cervical HPV infection and of CIN3 among those infected: a case-control study nested within the Manchester cohort. *Br J Cancer* 2000;83:1565-72.
- [58.](#) Deekes JJ, Altman DG, Bradburn MJ. Statistical methods for examining heterogeneity and combining results from several studies in meta-analysis. In: Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health care: Meta-analysis in context*. 2nd. ed. London, England: BMJ Publishing; 2001:248-82.
- [59.](#) De Filippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol.* 2003;77(2):1551-63
- [60.](#) de Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, et al. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;58(8):1700-6.
- [61.](#) Dey D, Dahl J, Cho S, Benjamin TL. Induction and bypass of p53 during productive infection by polyomavirus. *J Virol* 2002; 76(18) 9526-32.
- [62.](#) Doll R. The Pierre Denoix Memorial Lecture: nature and nurture in the control of cancer. *Eur J Cancer.* 1999;35(1):16-23.

- [63.](#) Duarte-Franco E, Franco EL. Cancer of the Uterine Cervix. BMC Womens Health. 2004 Aug 25;4 Suppl 1:S13.
- [64.](#) Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. Prog Cell Cycle Res. 2003;5:383-91.
- [65.](#) Fehrman F, Laimins LA. Human papillomaviruses: targeting differentiating epithelial cells for malignant transformation. Oncogene 2003;22(33):5201-7.
- [66.](#) Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. Lancet Oncol 2002 Jan;3(1):11-6.
- [67.](#) Fernandez RAH. Telomeros y telomerasas. Rev Cubana Invest Biomed 1999;18(2)121-9.
- [68.](#) Figo. Staging of cervical carcinomas. TNM Classification of malignant tumours. L. Sobin and Ch Wittekind (eds.), UICC International Union against Cancer, Geneva, Switzerland. pp155-157; 6th ed. 2002. Available at: <http://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php>. Accessed May 15, 2005.
- [69.](#) Finnen RL, Erickson KD, Chen XS, Garcea RL, Interactions between Papillomavirus L1 and L2 Capsid Proteins. J Virol, 2003; 77: 1410-4826.
- [70.](#) Florin L, Sapp C, Streeck RE, Sapp M. Assembly and Translocation of Papillomavirus Capsid Proteins. J Virol, 2002;76: 10009-10014.
71. Food and Drugs Administration (FDA). Available at: <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>. Accessed on June 25, 2007.

- [72.](#) Ford K, Reed B, Wirawan D, Muliawan P, Sutarga M, Gregoire L, . The Bali STD/AIDS Study: human papillomavirus infection among female sex workers. *Int J STD AIDS*, 2003; 14: 681–687.
- [73.](#) Fordyce EJ, Wang Z, Kahn AR, GalIEAGher BK, Merlos I, Ly S, Schymura M, *et al* . Risk of cancer among women with AIDS in New York City. *AIDS Public Policy J*. 2000 Fall-Winter;15(3-4):95-104.
- [74.](#) Franco EL, Rohan TE, Villa LL. Epidemiologic evidence and human papillomavirus infection as a necessary cause of cervical cancer. *J Natl Cancer Inst* 1999; 91:506-11.
- [75.](#) Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy, A .Cervical câncer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *CMAJ*, 2001; 164(7): 1017-1025.
- [76.](#) Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis*. 1999 Nov;180(5):1415-23.
- [77.](#) Frenck Jr RW, Blackburn EH, Shannon KM. The rate of telomerase sequence loss in human leukocytes varies with age. *Cell Biology* 1998; 95: 5607-10.
- [78.](#) Gao X, Svaren J, Suresh M. Role of cell regulator p19<sup>ARF</sup> in regulating T cell responses. *Cell Immun* 2002;219:119-130
- [79.](#) Giuliano AR, Papenfuss M, Nour M, Canfield LM, Schneider A, Hatch K. Antioxidant nutrients: associations with persistent human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997 Nov;6(11):917-23.
- [80.](#) Giuliano AR, Gapstur S. Can cervical dysplasia and cancer be prevented with nutrients? *Nutr Rev*. 1998 Jan;56(1 Pt 1):9-16.

- [81.](#) Giuliano AR, Papenfuss MR, Denman CA, de Zapien JG, Abrahamsen M, Hunter JB. Human papillomavirus prevalence at the USA-Mexico border among women 40 years of age and older. *Int J STD AIDS*. 2005 Mar;16(3):247-51.
- [82.](#) Goodman MT, Kiviat N, McDuffie K, Hankin JH, Hernandez B, Wilkens LR, *et al.* The association of plasma micronutrients with the risk of cervical dysplasia in Hawaii. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998;7(6):537-44.
- [83.](#) Gravitt PE, Peyton CL, Apple RJ, Wheeler CM Genotyping of 27 human papillomavirus types by using L1 consensus PCR products by a single-hybridization, reverse line blot detection method. *J Clin Microbiol*. 1998 Oct;36(10):3020-7.
- [84.](#) Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H, Langenberg A, *et al.* Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol*. 1995; 33(8):2058-63.
- [85.](#) Greider CW, Blackburn; EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell*, 1985, 43(2): 405-413
- [86.](#) Greider CW, Blackburn EH. The telomere terminal transferase of Tetrahymena is a ribonucleoprotein enzyme with two kinds of primer specificity. *Cell*. 1987 24;51(6):887-98.
- [87.](#) Greider CW. Telomerase activation. One step on the road to cancer? *Trends Genet* 1999 Mar;15(3):109-12.
- [88.](#) Guo F, Gao Y, Wang L, Zheng Y. p19<sup>ARF</sup> p53 Tumor suppressor pathway regulates cell motility by suppression of phosphoinositide 3-kinase and Rac1 GTPase activities. *J Biol Chem* 2003;278:14414-19.

- [89.](#) Hachen Jr DS. The Competing Risks Model. A Method for Analysing Processes with Multiple Types of Events. *Sociological Methods & Research*, 1988; vol. 17, No. 1, pp 21-54.
- [90.](#) Hang HS, Chiou JF, Fong Y, Hou CC, Lu YC, Wang JY, et al. Activation of human telomerase reverse transcriptase expression by derivatives of the anthraquinone. *J Med Chem* 2003; 46(15): 3300-7.
- [91.](#) Haverkos HW, Soon G, Steckley SL, Pickworth W. Cigarette smoking and cervical cancer: Part I: a meta-analysis. *Biomed Pharmacother.* 2003 Mar;57(2):67-77.
- [92.](#) Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, Bichel P, Norrild B, Knudsen A, et al. Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 2001;109(9):607-17.
- [93.](#) Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, et al. Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Mar 15;92(6):464-74.
- [94.](#) Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2001 May 4;84(9):1219-26.
- [95.](#) Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research* 2002; 89:229-240.
- [96.](#) Hiyama E, Hiyama K. Clinical utility of telomerase in cancer. *Oncogene* 2002;21:643-49.



- [97.](#) Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, *et al* .Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Sep 20;87(18):1365-71.
- [98.](#) Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998; 12;338(7):423-8.
- [99.](#) Horner SM, DeFilippis RA, Manuelidis L, DiMaio D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol.* 2004 Apr;78(8):4063-73.
- [100.](#) Horikawa I, Barret JC. Transcriptional regulation of telomerase hTERT gene as a target for cellular and viral oncogenic mechanisms. *Carcinogenesis* 2003; 24(7):1167-1176.
- [101.](#) Howley PM. Papillomaviridae: the viruses and their replication. In: Fields BN; Knipe DM; Howley PM, Fields ed. Philadelphia: Virol Lippincot-Raven 1996; 3:2045-76
- [102.](#) IARC Working Group on Evaluation of Cervical Cancer Screening Programmes. Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies, *British Medical Journal*, 1986, 293(4):659–664.
- [103.](#) Iftner T, Villa LL. Chapter 12: Human papillomavirus technologies. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003;(31):80-8.
- [104.](#) Instituto Nacional do Câncer. Estimativas de Incidência e Mortalidade No Brasil, 2006. Acessado em 29/03/2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/versaofinal.pdf>, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=mapa.asp&ID=5>

- [105.](#) International Agency for Research on Cancer (IARC). Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans. Vol 65. Human papillomavirus. Lyon (France): IARC;1995
- [106.](#) Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL., for the evidence-based working group. User's guides to the medical literature. II. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of study valid? *JAMA* 1994;271:389-91.
- [107.](#) Jacobs MV, de Roda Husman AM, van den Brule AJ, Snijders PJ, Meijer CJ, Walboomers JM. Group-specific differentiation between high- and low-risk human papillomavirus genotypes by general primer-mediated PCR and two cocktails of oligonucleotide probes. *J Clin Microbiol.* 1995 Apr;33(4):901-5.
- [108.](#) Jeon S, Lambert PF. Integration of human papillomavirus type 16 DNA into the human genome leads to increased stability of E6 and E7 mRNAs: implications for cervical carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Feb 28;92(5):1654-8.
- [109.](#) Koss LG, Durfee GR. Unusual patterns of squamous epithelium of the uterine cervix: cytologic and pathologic study of koilocytotic atypia. *Ann N Y Acad Sci.* 1956 Mar 30;63(6):1245-61.
- [110.](#) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, *et al* . The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1072-9
- [111.](#) Kastan MB, Bartc J. Cell cycle checkpoints and cancer. *Nature*, 2004; 432:316-323

Formatados: Marcadores e numeração

- [112.](#) Kawai K, Yaginuma Y, Tsuruoska M, Hayashi M, Ishikava M. telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and esophageal cancers. *Eur J Cancer* 1998;13:2083-86.
- [113.](#) Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, *et al* . The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1072-9.
- [114.](#) Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, *et al* . Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
- [115.](#) Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, *et al* . Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 15;59(24):6132-6.
- [116.](#) Kletter B, van Doorn LJ, ter Schegget J, Schrauwen L, van Krimpen K, Burger M, *et al* . Novel short-fragment PCR assay for highly sensitive broad-spectrum detection of anogenital human papillomaviruses. *Am J Pathol.* 1998 Dec;153(6):1731-9.
- [117.](#) Klingelutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380(6569):79-82
- [118.](#) Knekt P. Serum vitamin E level and risk of female cancers. *Int J Epidemiol* 1988; 17:281-6.
- [119.](#) Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition* 2001; 17:815-7

120. Kulasingam SL, Kim JJ, Lawrence WF, Mandelblatt JS, Myers ER, Schiffman M, Solomon D, Goldie SJ; ALTS Group. Cost-effectiveness analysis based on the atypical squamous cells of undetermined significance/low-grade squamous intraepithelial lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst.* 2006 Jan 18;98(2):92-100.

[121.](#) Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al . Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res.* 2001 Feb;7(2):429-34.

Formatados: Marcadores e numeração

[122.](#) Kuper H, Boffetta P, Adami HO. Tobacco use and cancer causation: association by tumour type. *J Intern Med.* 2002 Sep;252(3):206-24.

[123.](#) Kwasniewska A, Tukendorf A, Semczuk. Content of alpha-tocopherol in blood serum of human Papillomavirus-infected women with cervical dysplasias. *Nutr Cancer.* 1997;28(3):248-51.

[124.](#) Kyo S, Masutomi K, Maida Y, Kayana T, Yatabe N, Nakamura M, et al. Significance of immunological detection of human telomerase reverse transcriptase. *Am J Pathol* 2003;163:859-67.

[125.](#) Lacey JV Jr, Brinton LA, Abbas FM, Barnes WA, Gravitt PE, Greenberg MD, et al. Oral contraceptives as risk factors for cervicar adenocarcinomas and squamous cell carcinomas. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 1999;8:1079-85

[126.](#) Lacey JV Jr, Swanson CA, Brinton LA, Altekruse SF, Barnes WA, Gravitt PE, et al. Obesity as a potential risk factor for adenocarcinomas and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Cancer.* 2003 Aug 15;98(4):814-21.

- [127.](#) Lange T. Activation of telomerase in a human tumor. Proc Natl Acad Sci 1994; 91:2882-5.
- [128.](#) Lazcano-Ponce E, Alonso P, Ruiz-Moreno JA, Hernandez-Avila M. Recommendations for cervical cancer screening programs in developing countries. The need for equity and technological development. Salud Publica Mex. 2003;45 Suppl 3:S449-62.
- [129.](#) Lewin B. Cell cycle growth and regulation. In: Genes VI. Oxford University Press and Cell Press, New York, 1997: 1089-1129.
- [130.](#) Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, *et al.* A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. J Infect Dis. 2001; 183(1):8-15.
- [131.](#) Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, Van der Meulen JHP, *et al.* Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999;282:1061-6.
- [132.](#) Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, *et al.* The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). Int J Gynecol Cancer. 2000 Mar;10(2):143-150.
- [133.](#) Lorincz AT, Reid R, Jenson AB, Greenberg MD, Lancaster W, Kurman RJ Human papillomavirus infection of the cervix: relative risk associations of 15 common anogenital types. Obstet Gynecol. 1992;79(3):328-37
- [134.](#) Lucesoli F, Fraga C. Evaluación del estrés oxidativo. Antioxid Calid Vida 1995; 1(4):8-

Formatados: Marcadores e numeração

- [135.](#) Maciag PC, Villa L. Genetic susceptibility to HPV infection and cervical cancer. *Braz J Med Biol Res* 1999;32:915-22
- [136.](#) Maláska J, Kunická Z, Borsky M, Sklenicková M, Novotná M, Fajkusová L, *et al.* Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2004;51(2):90-6.
- [137.](#) McCrory DC, Matchar DB, Bastian L, Datta S, Hasselblad V, Hickey J, Myers E, Nanda K. Evaluation of cervical cytology. *Evid Rep Technol Assess (Summ)*. 1999 Jan;(5):1-6.
- [138.](#) McDougall JK. Telomerase activity and cellular immortalization. *Dev Biol Basel* 2001;106:267-273.
- [139.](#) McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*. 2003;77(18):9852-61.
- [140.](#) Meeker AK, Coffey DS, Telomerase a promising marker of biological immortality of germ, stem and cancer cells. A review. *Biochemistry* 1997;62:1323-31.
- [141.](#) Medical Services Advisory Committee. Human papillomavirus testing (HPV) to monitor effectiveness of treatment of high-grade intraepithelial abnormalities of the cervix. MSAC, application 12e. Canberra Austrália, 2004. Acessado em: 30/05/2006. Disponível em: <http://www.msac.gov.au/>.
- [142.](#) Medical Services Advisory Committee. Human papillomavirus testing in women with cytological prediction of low-grade abnormality .MSAC reference 12b. Canberra Austrália, 2002. Acessado em: 30/05/2006. Disponível em: <http://www.msac.gov.au/>

- [143.](#) Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP, *et al.* Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer*. 1993 Apr 1;53(6):919-23.
- [144.](#) Méndez Filho JD, Rodríguez HGR. Sobre los beneficios de los radicales libres. *Rev Med IMSS* 1997; 35(4):309-13.
- [145.](#) Mitirangura A, Sriuranpong V, Termrungraunglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, *et al.* Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer* 1998;78(7):933-9.
- [146.](#) Mitrani-Rosenbaum S, Tsvieli R, Tur-Kaspa R. Oestrogen stimulates differential transcription of human papillomavirus type 16 in SiHa cervical carcinoma cells. *J Gen Virol*. 1989 Aug;70 ( Pt 8):2227-32.
- [147.](#) Modesitt SC, van Nagell JR Jr The impact of obesity on the incidence and treatment of gynecologic cancers: a review. *Obstet Gynecol Surv*. 2005 Oct;60(10):683-92
- [148.](#) Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, *et al.* Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol*. 2003 1;158(5):486-94.
- [149.](#) Moreno V, Bosch FX, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV, Walboomers JM, *et al.* Effect of oral contraceptives on risk of cervical cancer in women with human papillomavirus infection: the IARC multicentric case-control study. *Lancet*. 2002 Mar 30;359(9312):1085-92.

150. Motoyama S, Ladines-Llave CA, Luis Villanueva S, Maruo T. The role of human papilloma virus in the molecular biology of cervical carcinogenesis. *Kobe J Med Sci.* 2004;50(1-2):9-19
151. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1085-92.
152. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6;348(6):518-27
153. Nagata C, Shimizu H, Yoshikawa H, Noda K, Nozawa S, Yajima A, Sekiya S, Sugimori H, Hirai Y, Kanazawa K, Sugase M, Kawana T. Serum carotenoids and vitamins and risk of cervical dysplasia from a case-control study in Japan. *Br J Cancer.* 1999;81(7):1234-7.
154. Nair P, Jayaprakash PG, Nair MK, Pillai MR. Telomerase, p53 and human papillomavirus infection in the uterine cervix. *Acta Oncol* 2000;39(1):65-70.
155. Nakamura M, Kyo S, Kanaya T, Yatabe N, Maida Y, Tanaka M, Ishida Y, *et al.* hTERT-promoter-based tumor-specific expression of MCP-1 effectively sensitizes cervical cancer cells to a low dose of cisplatin. *Cancer Gene Ther* 2004;11(1):1-7
156. Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998;153(3):857-64.

Formatados: Marcadores e numeração



- [157.](#) Newbold RF. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis* 2002; 17: 539-550.
- [158.](#) Niki E, Noguchi N, Tsuchihashi H, Gotoh N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and beta-carotene. *Am J Clin Nutr.* 1995 Dec;62(6 Suppl):1322S-1326S.
- [159.](#) Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, et al. Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999 May-Jun;32(3):235-40.
- [160.](#) Nowak J. Telomerase, cervical cancer, and human papillomavirus. *Clinics in Laboratory Medicine* 2000;20: 369-382.
- [161.](#) Nugent CI, Lundblad V. The telomerase reverse transcriptase: components and regulation. *Genes Development* 1998; 12:1073-85.
- [162.](#) Nurse P. Ordering S phase and M phase in the cell cycle. *Cell*, 1994; 79:547-550
- [163.](#) O'Byrne KJ, Dalglish AG. Chronic immune activation and inflammation as the cause of malignancy. *Br J Cancer.* 2001;17;85(4):473-83.
- [164.](#) Obiso R, Lorincz A . Digene Corporation. *Pharmacogenomics.* 2004 Jan;5(1):129-32.
- [165.](#) Olson JA. Provitamin A function of carotenoids: the conversion of beta-carotene into vitamin A. *J Nutr.* 1989;119(1):105-8.
- [166.](#) Ostor AG. Natural history of cervical intraepithelial neoplasia: a critical review. *Int J Gynecol Pathol.* 1993; 12:186-92)

- [167.](#) Palan PR, Mikhail MS, Basu J, Romney SL. Plasma levels of antioxidant beta-carotene and alpha-tocopherol in uterine cervix dysplasias and cancer. *Nutr Cancer*. 1991;15(1):13-20.
- [168.](#) Palan PR, Mikhail MS, Goldberg GL, Basu J, Runowicz CD, Romney SL. Plasma levels of beta-carotene, lycopene, canthaxanthin, retinol, and alpha- and tau-tocopherol in cervical intraepithelial neoplasia and cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 Jan;2(1):181-5.
- [169.](#) Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunosuppression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr*. 2003;(31):41-6.
- [170.](#) Palefsky JM, Holly EA. Chapter 6: Immunossupression and co-infection with HIV. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:41-6
- [171.](#) Pan W, Datta A, Adami GR, Raychaudhuri P, Bagchi S. P19ARF inhibits the functions of the HPV 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 2003; 22: 5496-5503.
- [172.](#) Park TW, Riethdorf S, Schulz G, Riethdorf L, Wright T, Loning T. Clonal expansion and HPV-induced immortalization are early molecular alterations in cervical carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23(1A):155-60
- [173.](#) Park TW, Fujiwara H, Wright TC. *Cancer*. 1995 Nov 15;76(10 Suppl):1902-13.
- [174.](#) Parkim DM. Global cancer statistics in year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-43.
- [175.](#) Perez MR, Dubner D, Michelin S, Gisone P, Carosella E. Telomeros y reparacion de daño genómico su implicancia en patologia humana. *Medicina* 2002;62:593-603.

176. Petticrew MP, Sowden AJ, Lister-Sharp D, Wright K. False-negative results in screening programmes: systematic review of impact and implications. *Health Technol Assess.* 2000;4(5):1-120.

177. Phillips B, Ball C, Sackett D, et al. Oxford Centre for evidence-based Medicine Level of evidence Grades of recommendations (may 2001). Available at <http://www.cebm.net/background.asp>. Accessed February 23, 2004.

Formatados: Marcadores e numeração

178. Poppe WA, Ide PS, Drijkoningen MP, Lauweryns JM, Van Assche FA. Tobacco smoking impairs the local immunosurveillance in the uterine cervix. An immunohistochemical study. *Gynecol Obstet Invest.* 1995;39(1):34-8.

179. Potischman N, Herrero R, Brinton LA, Reeves WC, Stacewicz-Sapuntzakis M, Jones, et al. A case-control study of nutrient status and invasive cervical cancer. II. Serologic indicators. *Am J Epidemiol.* 1991; 1;134(11):1347-55.

180. Prokopczyk B, Cox JE, Hoffmann D, Waggoner E. Identification of tobacco-specific carcinogen in the cervical mucus of smokers and nonsmokers. *J Natl Cancer Inst.* 1997 Jun 18;89(12):868-73.

181. Obiso R, Lorincz A. Digene Corporation. Obiso R, Lorincz A. *Pharmacogenomics.* 2004 Jan;5(1):129-32.

182. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2003 Mar; 98(2):181-84.

- [183.](#) Rasmussen SJ, Eckmann L, Quayle AJ, Shen L, Zhang YX, Anderson DJ, *et al.* Secretion of proinflammatory cytokines by epithelial cells in response to Chlamydia infection suggests a central role for epithelial cells in chlamydial pathogenesis. *J Clin Invest.* 1997; 1;99(1):77-87.
- [184.](#) Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase-A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer.* 2001 Mar-Apr;11(2):100-6.
- [185.](#) Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, *et al.* . Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol.* 2003;56(1):31-5.
- [186.](#) Riethdorf S, Riethdorf L, Schulz G, Ikenberg H, Janicke F, Loning T, *et al.* Relationship between telomerase activation and HPV 16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20(2):177-85.
- [187.](#) Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE, Franco EL. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2003 Oct;12(10):1029-37.
- [188.](#) Sarakanarayanan R, Gaffikin L, Jacob M, Sellors J, Robles S. A critical assement of screening methods for cervical neoplasia. *Int J Gynecol Obst,* 2005;89:S4-S12.
- [189.](#) Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital humam papillomavirus infection and neoplasia. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:14-9.

- [190.](#) Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*. 2000; 5;283(1):87-93.
- [191.](#) Schlecht NF, KuLIEAGa S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001 Dec 26;286(24):3106-14.
- [192.](#) Schneider A, Koutsky LA. Natural history and epidemiological features of genital HPV infection. *IARC Sci Publ*. 1992;(119):25-52.
- [193.](#) Sedjo RL, Roe DJ, Abrahamsen M, Harris RB, Craft N, Baldwin S, Giuliano AR. Vitamin A, carotenoids, and risk of persistent oncogenic human papillomavirus infection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11(9):876-84.
- [194.](#) Sedjo RL, Papenfuss MR, Craft NE, Giuliano AR. Effect of plasma micronutrients on clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection (United States). *Cancer Causes Control*. 2003;14(4):319-26.
- [195.](#) Serraino D, Dal Maso L, La Vecchia C, Franceschi S. Invasive cervical cancer as an AIDS-defining illness in Europe. *AIDS*. 2002; 29;16(5):781-6.
- [196.](#) Sethi S, Muller M, Schneider A, Blettner M, Smith E, Turek L, et al. Serologic response to the E4, E6, and E7 proteins of human papillomavirus type 16 in pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 1998;178(2):360-4.
- [197.](#) Sharpless NE, DePinho RA. Telomeres, stem cells, senescence, and cancer. *J Clin Invest* 2004;113(2):160-8.

- [198.](#) Sherman ME. Chapter 11: Future directions in cervical pathology. J Natl Cancer Inst Monogr 2003; 31:72-9.
- [199.](#) Sherman ME, Kurman RJ, Glass AG, Anderson SM, Schiffman M, Lomg JS. A Graphical Method for the Interpretation of Multinomial Logit Analysis. Sociological Methods & Research, 1987; 15( 4): 420-446.
- [200.](#) Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev. 2003;12(10):1038-44.
- [201.](#) Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). J Natl Cancer Inst. 2002; 16;94(2):102-7.
- [202.](#) Sherman ME, Lorincz AT, Scott DR, Wacholder S, Castle PE, Glass AG, *et al* Baseline cytology, human papillomavirus testing, and risk for cervical neoplasia: a 10-year cohort analysis. J Natl Cancer Inst. 2003 Jan 1;95(1):46-52.
- [203.](#) Skegg DCG. Monthly combined injectable contraceptives and neoplasia. Contraception 1994; 49:435-39.
- [204.](#) Smith JS, Green J, Berrington de Gonzalez A, Appleby P, Peto J, Plummer M, Franceschi S, *et al*. Cervical cancer and use of hormonal contraceptives: a systematic review. Lancet. 2003 Apr 5;361(9364):1159-67.

205. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. IARC multicentric case-control study. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004 Sep 1;111(3):431-9.

206. Smith RA, Cokkinide V, Eyre HJ. American Cancer Guidelines for early detection of cancer. *CA Cancer J Clin*, 2005; 55:31-44.

207. Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res*. 1998;58(17):3812-8.

208. Southern SA, and Herrington CS. Molecular events in uterine cervical cancer. *Sex Transm Infect*. 1998;74(2):101-9. Review.

Excluído: ,

209. Steenbergen RD, Kramer D, Meijer CJ, Walboomers JM, Trott DA, Cuthbert AP, *et al* . Telomerase suppression by chromosome 6 in a human papillomavirus type 16-immortalized keratinocyte cell line and in a cervical cancer cell line. *J Natl Cancer Inst*. 2001;93(11):865-72.

210. Strickler HD, Burk RD, Fazzari M, Anastos K, Minkoff H, Massad LS, et al. História natural e possível reativação do papilomavírus humano em mulheres infectadas pelo vírus da imunodeficiência humana *J Natl Cancer Inst*. 2005 Apr 20;97(8):577-86

211. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. Randon effects methods for combining study estimates. In: Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F.

Methods for Meta-Analysis in Medical Research. 1st ed. Chichester, England: John Wiley; 2000: 73-86.

[212.](#) Terhune SS, Hubert WG, Thomas JT, Laimins LA. Early polyadenylation signals of human papillomavirus type 31 negatively regulate capsid gene expression. *J Virol.* 2001 Sep;75(17):8147-57.

[213.](#) Trimble CL, Genkinger JM, Burke AE, Hoffman SC, Helzlsouer KJ, Diener-West M, et al. Active and passive cigarette smoking and the risk of cervical neoplasia. *Obstet Gynecol.* 2005;105(1):174-81.

[214.](#) Turek LP. The structure, function, and regulation of papillomaviral genes in infection and cervical cancer. *Adv Virus Res,*1994; 44:305-56.

[215.](#) Ureta HC, Saldaña HAB, Rogriguez HGM. La telomerasa: una enzima con múltiples aplicaciones en la investigación del cáncer. *Rev Invest Clin* 2002;54(4): 342-8

[216.](#) Valdespino VM, Valdespino VE. Cervical cancer screening: state of the art. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2006 Feb;18(1):35-40.

[217.](#) Van der Graaf I, Molijn A, Doornwaard H, Quint W, van Doorn L-J, van den Tweel J. Human Papillomavirus and long risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 2002 Jul 15;156(2):158-64.

[218.](#) Van Duin M, Steenbergen RD, de Wilde J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Risse EK, Meijer CJ, Snijders PJ. Telomerase activity in high-grade cervical lesions is associated with allelic imbalance at 6Q14-22. *Int J Cancer* 2003;105(5):577-82.

[219.](#) Van Poppel G, van den Berg H. Vitamins and cancer. *Cancer Lett.* 1997; 114(1-2):195-202.



- [220.](#) VanEenwyk J, Davis FG, Bowen PE. Dietary and serum carotenoids and cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Cancer*. 1991; 48(1):34-8.
- [221.](#) Veldman T, Liu X, Yuan H, Schiegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAS*;2003;100(14):8211-16.
- [222.](#) Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
- [223.](#) Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon G. Myc activates telomerase. *Genes Development* 1998; 12:1769-74.
- [224.](#) Wang SS, Hildesheim. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 35-40.
- [225.](#) Wellings K, Field J, Johnson A, Wadsworth J. Sexual behaviour in Britain - the national survey of sexual attitudes and lifestyles. England: Penguin, 1994.
- [226.](#) Wentzensen N, Vinokurova S, von Knebel Doeberitz M. Systematic review of genomic integration sites of human papillomavirus genomes in epithelial dysplasia and invasive cancer of the female lower genital tract. *Cancer Res*. 2004 ;64(11):3878-84.
- [227.](#) Wisman GB, De Jong S, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, de Vries EG, *et al.* Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Hum Pathol* 2000;31(10):1304-12.
- [228.](#) Wisman GB, Hollema H, de Jong S, ter Schegget J, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MH, *et al.* Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings

and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J Clin Oncol* 1998;16(6):2238-45.

229. Wolf JK, Franco EL, Arbeit JM, Shroyer KR, Wu TC, Runowicz CD, *et al.* Innovations in understanding the biology of cervical cancer. *Cancer*. 2003; 98(9 Suppl):2064-9. Review.

230. World Health Organization. Depot-medroxyprogesterone acetate (DPMA) and cancer: memorandum from a WHO meeting. *Bull World Health Organ* 1993;71:669-76

231. Wright TC Jr, Ellerbrock TV, Chiasson MA, Van Devanter N, Sun XW. Cervical intraepithelial neoplasia in women infected with human immunodeficiency virus: prevalence, risk factors, and validity of Papanicolaou smears. New York Cervical Disease Study. *Obstet Gynecol* 1994;84:591-7.

232. Wright TC, Cox T, Massad S, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:295-304.

233. Wu MT, Lee LH, Ho CK, Liu CL, Wu TN, Wu SC, *et al* .Lifetime exposure to environmental tobacco smoke and cervical intraepithelial neoplasms among nonsmoking Taiwanese women. *Arch Environ Health*. 2003 Jun;58(6):353-9.

234. Yamaguchi K. Event History Analysis. Applied Social Research Methods Series, 1991. 28 Sage Publications.

235. Yashima K, Ashfaq R, Nowak J, Von Gruenigen V, Milchgrub S, Rathi A. Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1998;82(7):1319-27.

Excluido: , et al

- [236.](#) Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, et al. Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000; 355(9222):2194-8.
- [237.](#) Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Pater A, Iwasaka T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):197-204.
- [238.](#) Zamora J, Muriel A, Abaira V. Meta-DiSc for Windows: A Software package for the Meta-analysis of Diagnostic Tests. XI Cochrane Colloquium. Barcelona, 2003. (Available at [http://www.hrc.es/investigacion/metadisc\\_en.htm](http://www.hrc.es/investigacion/metadisc_en.htm)).
- [239.](#) Zeid NA, Muller HK. Tobacco smoke condensate cutaneous carcinogenesis: changes in Langerhans' cells and tumour regression. *Int J Exp Pathol*. 1995;76(1):75-83.
- [240.](#) Zhang DK, Ngan HY, Cheng RY, Cheung AN, Liu SS, Tsao SW. Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999;35(1):154-60.
- [241.](#) Zheng PS, Iwasaka T, Yokoyama M, Nakao Y, Pater A, Sugimori H. Telomerase activation in in vitro and in vivo cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 1997;66(2):222-6.
- [242.](#) Zheng PS, Iwasaka T, Zhang ZM, Pater A, Sugimori H. Telomerase activity in Papanicolaou smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic human papillomaviruses. *Gynecol Oncol* 2000;77(3):394-8.

### **3 OBJETIVOS**

---

#### **3.1 Objetivos gerais**

1. Descrever as características associadas à infecção pelo Papilomavírus humano e evolução dessa infecção num mínimo de seis meses após o diagnóstico inicial.
2. Determinar a acurácia da telomerase no diagnóstico das lesões pré-cancerosas escamosas do colo e no câncer de colo uterino invasor.

#### **3.2 Objetivos específicos**

1. Estimar a prevalência e incidência do HPV e de seus subtipos.
2. Avaliar a taxa de persistência, aquisição e regressão da infecção pelo Papilomavírus humano.
3. Avaliar as associações das variáveis estudadas (demográficas, reprodutivas e de comportamento sexual) com os desfechos.
4. Proceder a uma revisão sistemática de estudos com enfoque diagnóstico, para avaliar a atividade da telomerase em lesões pré-neoplásicas e câncer cervical.

**4 ARTIGO 1\***

---

**Persistence and Clearance of human Papillomavirus infection (HPV): a  
prospective cohort study**

**Persistence and clearance of human papillomavirus infection (HPV): a prospective cohort study**

Rosa MI<sup>1,2</sup>, Fachel JMG<sup>1,3</sup>, Rosa DD<sup>4</sup>, Medeiros LR<sup>1</sup>, Igansi CN<sup>1</sup>, Bozzetti MC<sup>1,5,6</sup>

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Epidemiology at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Medical School at University of Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil

<sup>3</sup>Department of Statistics, Institute of Mathematics, Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, United Kingdom

<sup>5</sup>Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>6</sup>Department of Social Medicine, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

This research was funded by the National Council of Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil; MC Bozzetti is a recipient of a research award from the CNPq

**Corresponding author:**

Maria Inês da Rosa, MD, MSc

Rua Cruz e Souza, 510. Bairro Pio Correa- CEP 88811-550 – Criciúma-SC- Brazil

Phone: + 48 34339976 Fax: + 48 34335766

E-mail: mir@unesc.net

**Abstract**

**Objective:** We analysed a cohort of women in Southern Brazil with the aim to identify epidemiological correlates for persistence and clearance of cervical HPV infection. **Methods:** A cohort study was started on February 2003. Cervical smears were collected to perform Pap cytology and HPV DNA detection at baseline and during the follow up. **Outcomes analysed:** (1) persistence of HPV DNA; (2) conversion; (3) clearance of HPV. Pearson's  $\chi^2$  test, multinomial logistic regression analysis and univariate analysis using the log-rank test were performed. **Results:** Incidence of HPV DNA: 12.3%. HPV16 was the most frequent type (18.6%) among 501 women in the study. Thirty-four women were persistently infected with HPV, which was associated with age below 21 years at first intercourse (OR 3.14, 95% CI, 1.43-6.87) and  $\geq 4$  sexual partners during lifetime (OR 2.48, 95% CI, 1.14-5.41). In a median period of 19 months, 80.7% of women had clearance of HPV, which was associated with black race (OR 3.44, 95% CI, 1.55-7.65), co-infection with *C. trachomatis* at baseline (OR 3.26, 95% CI, 1.85-5.76) and history of previous Pap smear (OR 3.48, 95% CI, 1.51-8.00). **Conclusions:** Persistence of HPV infection was associated with early age at first intercourse and number of sexual partners during lifetime, suggesting that strategies for sexual orientation may modify the rates of HPV persistence. The association of HPV clearance with a history of previous Pap smear screening highlights the importance of improving cervical screening programs. Further studies on the association of gynaecological infections with HPV clearance are needed.

**Key words:** human papillomavirus infection, cervix cancer, gynaecological infections, HPV clearance, risk factors.

## Resumo

Objetivo: Analisamos uma coorte de mulheres no sul do Brasil, com objetivo de identificar associações epidemiológicas para persistência e cura da infecção pelo HPV. Métodos: O estudo de coorte foi iniciado em fevereiro de 2003. Foram coletados espécimes cervicais para citologia oncótica e para detecção do DNA HPV na entrada do estudo e no seguimento. O desfecho foi dividido em quatro categorias: (1) persistência, (2) conversão (3) cura. A quarta categoria (referência) eram mulheres negativas no início que permaneceram negativas. Foi usado o teste  $\chi^2$  de Pearson, regressão logística multinomial e Kaplan-Meier para análise estatística. Resultados: A Incidência de HPV foi 12,3%. O HPV16 foi o tipo mais encontrado (18,6%), entre as 501 mulheres do estudo. Trinta e quatro mulheres ficaram persistentemente infectadas pelo HPV, sendo associado com idade da sexarca inferior a 21 anos (OR =3,14, IC 95%,1,43-6,87) e 4 ou mais parceiros durante a vida (OR= 2,48, IC 95%, 1,14-5,41). No período mediano de 19 meses, 80,7 % das mulheres tinham curado o HPV, e foi significativamente associado à /cor preta (OR=3,44, IC 95%, 1.55-7.65), co-infecção com *C. trachomatis* no arrolamento (OR=3,26, IC 95%, 1,85-5,76) e história de já ter realizado exame de Papanicolaou (OR =3,48, IC 95%,1,51-8,00). Conclusões: A persistência da infecção pelo HPV foi associada com a sexarca precoce e ao número de parceiros sexuais na vida, sugerindo que estratégias de orientação sexual podem modificar as taxas de persistência do HPV. A associação da cura do HPV com história prévia de realização de Papanicolaou salienta a importância de aprimorar os programas de rastreamento de câncer cervical. Futuros estudos da associação de infecções ginecológicas com cura da infecção pelo HPV são necessários.

**Palavras chaves:** infecção pelo Papilomavírus humano, câncer cervical, infecções ginecológicas, HPV, fatores de risco



## **Introduction**

Human papillomavirus (HPV) infection has been established as the most important cause of cervical cancer (1, 2). The annual incidence of cervical cancer varies among different regions of the world, estimated to be around 11,000 in the United States of America (USA) (3) and 19,000 in Brazil (4).

HPV infection is usually a transient phenomenon leading to no visible lesions or to low-grade lesions that often regress spontaneously (5, 6). Cofactors such as parity, use of oral contraceptives, tobacco smoking, immunosuppression, coexistent sexually transmitted diseases and poor nutrition have all been associated with the development of cervical cancer (7-13). The persistence of an HPV infection appears to be a prerequisite for the development of cervical intraepithelial neoplasia (CIN) (5, 14). Viral, host and environment factors may also influence the course of the HPV infection (15).

The objectives of the present study were to identify epidemiological correlates of persistence and clearance of cervical HPV infection among women in Southern of Brazil.

## **Materials and Methods**

**Study design and population:** A cohort study was started on February 2003 to explore potential risk factors for persistence and clearance of cervical HPV infection. Lifestyle, behavioural and reproductive factors were investigated. The study population was defined as asymptomatic women attending a primary care clinic in the city of Porto Alegre, Southern Brazil, which has a population of about 2 million people. Women were eligible to participate in the cohort if they lived in Porto Alegre, were not pregnant, had not been submitted to hysterectomy and had already been sexually active, with no previous diagnostic of cervical

cancer. At enrolment, study participants completed a questionnaire with their demographic characteristics, smoking habits, contraceptive practices (including current oral contraceptive use) and reproductive history. Cervical smears were collected from all participants to perform HPV DNA testing and Pap cytology at baseline and during the follow up. Samples were then stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ . The present study included 501 women enrolled in the cohort that returned up to August 2006 following study protocol. Cervical specimens were taken to perform HPV-DNA testing and Pap cytology to follow up of HPV and cytology status.

**HPV DNA detection:** The samples were centrifuged at 7000 rpm for 10 minutes, re-suspended, and digested in 200mg/ml pf proteinase K<sup>®</sup> (Boehringer Mannheim, Mannheim, Germany) for 18h at  $37^{\circ}\text{C}$ . The DNA was then heated at  $94^{\circ}\text{C}$  for 10 minutes and used as a template in a polymerase chain reaction (PCR) amplification. The conserved region L1 of the HPV gene was amplified by PCR using the primers My09 (5'-CGT CCA/C AAA/G GGA A/TAC TGA TC-3') and My11 (5'-GCA/C CAG GGA/T CAT AAC/T AAT GG -3'). For HPV DNA detection, it was used the technique of PCR previously described by Bauer et al (16) and Coutlée et al (17). To control the functionality of PCR reactions, primers of  $\beta$ -globin housekeeping gene were tested simultaneously in all samples. HPV genotyping was done with specific primers designed to detect HPV types 16, 18 and 31. T

***Chlamydia trachomatis* DNA detection:** Primer CT1 (5'-TAGTAACTGCCACTTCATCA-3') and primer CT2 (5'-biotin-TTCCCCTTGTAATTCGTTGC-3') were used. They amplify a 201-bp PCR product from *C. trachomatis* plasmid *orf2* DNA. This primer pair has been described previously (18, 19). The final reaction mixture (50  $\mu\text{l}$ ) contained 1.5 U of *Taq Platinum* DNA polymerase (Invitrogen); 12.5 pmol of each primer, 3.0 mM  $\text{MgCl}_2$ , 200  $\mu\text{M}$  of each DNTP (Invitrogen), 10 mM Tris-HCl (pH 8.3), 50 mM KCl, 5  $\mu\text{l}$  of DNA and  $\text{H}_2\text{O}$ . PCRs were performed with a MJ Research PTC 96 thermoblock as follows: 1 min at  $94^{\circ}\text{C}$ ; 4

min at 95°C; 40 cycles each consisting of 1 min at 95°C, 1 min at 66°C, and 1 min at 72°C; and a final elongation step of 4 min at 72°C. PCR products were analysed in 1.5% agarose gel in TBE buffer with 0.5 µg/ml of ethidium bromide. To control the functionality of PCR reactions, primers of  $\beta$ -globin housekeeping gene were tested simultaneously in all samples, together with positive and negative controls.

**Statistical analysis:** The outcome was constructed in four categories: (1) women with HPV DNA-positive at baseline which persisted positive at follow-up (persistence of infection); (2) women with HPV DNA-positive at follow-up only (conversion); (3) women with HPV DNA-positive at baseline only (clearance of infection); and (4) women with HPV DNA-negative both at baseline and at follow-up (reference category). Pearson's chi-square test was used to verify the association between all independent variables with the response variable. Multinomial logistic regression analysis was performed to estimate adjusted odds ratios and 95% confidence intervals for confounding variables (20). This method calculates odds ratios for a dependent variable with more than two categories, evaluating the effect of each explanatory variable. All variables associated to the outcome with  $P < 0.05$  remain in the final model. Kaplan-Meier curves were performed to estimate the median time to HPV clearance among women who were HPV-positive at baseline comparing with women who remained HPV-positive until the end of follow up. The curves were compared by means of the log-rank test. Women who remained HPV-positive were considered "censored cases" and those who had cleared the HPV infection were considered "events". Time to event was defined as the time between the first HPV-positive exam (detected at baseline) and the first follow-up visit. Cox regression analysis was performed to analyse viral clearance. Statistical analyses were performed using the statistical software SPSS for Windows (version 12.0).

This study was approved by the Hospital Nossa Senhora da Conceição Ethics Committee in January, 2002.

## RESULTS

### Characteristics of the cohort

Until February 2006, the 1500 participants enrolled in the cohort originated the study sample for the present analysis. A total of 69 women who did not reach the eligibility criteria were excluded from the study, remaining 1431 participants. The overall prevalence of HPV-DNA was 24.6% (352/1431) at entrance of the study. The present study included 501 women enrolled in the cohort that returned up to August 2006 following study protocol. Cervical specimens were taken to perform HPV-DNA testing and Pap cytology to follow up of HPV and cytology status. Some individuals enrolled in the cohort did not return within the expected period following the protocol of the study. However, these women were comparable to the rest of the cohort with respect to race ( $P=0.11$ ), education ( $P=0.48$ ), parity ( $P=0.13$ ), contraceptives methods ( $P=0.19$ ), condom use ( $P=0.86$ ), marital status ( $P=0.50$ ), age ( $P=0.61$ ) and sexarca ( $P=0.93$ ).

Five hundred and one women consecutively entered this study, from which 177 (35.3%) had positive HPV DNA at baseline. Three oncogenic HPV DNA subtypes were analysed, from which the HPV16 was the most frequent type (18.6%), followed by HPV31 (15.8%) and HPV18 (4.1%). For 112 women the subtype of HPV was unknown. The prevalence of infections with more than one HPV subtype was 2.4% at baseline. Black women had higher rates of HPV infection at baseline when compared with non-black women ( $P=0.002$ ). Black subjects were comparable to the rest of the cohort with respect to all other variables analysed. The baseline characteristics of all participants are described in table 1.

### **Persistence of HPV infection (group 1; table 2)**

A total of 34 women (19%) were persistently infected with HPV, defined as positive HPV DNA by PCR at two consecutive visits with the same oncogenic type. Co-infection with multiple HPV subtypes did not correlate with persistence of HPV infection. The multinomial logistic regression analysis showed that age at first intercourse below 21 years and four or more sexual partners during lifetime were associated with persistence of HPV infection. (Table 3).

### **Incidence of HPV DNA infection (group 2; table 2)**

The presumed incidence of DNA HPV was 12.3%. Among the 40 incident cases, 36 (90%) had normal cervical cytology and 4 (10%) had atypical squamous cells of undetermined significance at baseline. None of the studied variables were associated with acquisition of HPV in the multinomial logistic regression. Also, there was no significant association between age and incidence of HPV infection.

### **Viral clearance in HPV DNA-positive women (group 3; table 2)**

Among 177 women HPV DNA positive at baseline, 143 (80.7%) had clearance of the infection in a median period of 19 months (95% CI, 17-21). The median retention time for women with HPV16 subtype infection was higher than for those without HPV16 in the cervical smear (log rank test,  $P= 0.0006$ ). For HPV16, the median duration of infection was 22 months (95%CI, 19-31) (figure1). The estimated unadjusted hazard ratio (HR) for clearance of viral infection, estimated by Cox proportional hazard model, was 2.19 (95% CI, 1.35-3.57) for women without the HPV subtype 16 when compared with those with HPV16 infection. Age did not influence the rate of definitive viral clearance.

The factors associated with clearance in the multinomial logistic regression were black race, co-infection with *Chlamydia trachomatis* at baseline and history of previous Pap smear screening. There was a positive association between *C. trachomatis* and HPV infection at baseline, which was present in 59.2% of women ( $p < 0.001$ ). Women submitted to a previous screening Pap smear had a 3.4 times more chance of clearing HPV infection than women who had not been submitted to previous cytological screening. The former had more stable marriages ( $P = 0.03$ ), had had less pregnancies ( $P < 0.001$ ), had a higher income ( $P = 0.03$ ), were older ( $P < 0.001$ ) and had a lower prevalence of HPV infection at baseline than the latter ( $P = 0.03$ ).

## **Discussion**

We found HPV16 as the most frequent subtype causing infection in cervical smears. Our results are in accordance with the literature, where a worldwide report showed that HPV16 was two times more common than other subtypes in all regions of the world, with the exception on Sub-Saharan Africa, where HPV 35 is equally common, but four to five times less prevalent than HPV 16 in other regions (21). In Brazil, HPV16 is also the predominant subtype recovered from invasive cervical cancer (22-26).

In this study, the true incidence of HPV infection in the population was not calculated, since distinguishing a new infection from a recurrent or reactivated latent infection was not possible. For this reason, the present report measured the presumed incidence rate (6), which was lower (12.3%) than the incidence found in other reports: 23% in Brazil (6), 32,3 - 43% in the USA (5, 27) and 38% in England (28). The median time to clear the infection is around 5 months for non-oncogenic HPV subtypes and 8 to 12 months for oncogenic subtypes (5, 6, 29-32). The literature shows that 52-69% of women infected with HPV have clearance of the infection within the first year after diagnosis (32, 33). We showed that 81% of infected

women had clearance of HPV in a median time of 19 months. This result was found by analysing the Kaplan-Meier curve and also by assuming a constant incidence and using the formula “duration = prevalence / [incidence x (1 – prevalence)]” (34). The median time was higher for clearance of infection caused by the HPV16 subtype.

Our study showed two factors associated with persistence of HPV infection: age below 21 years at first intercourse and four or more sexual partners during lifetime. Age at first intercourse seems to be a useful marker for risky sexual behaviour (35). In a study with more than 4,000 single women Greenberg et al (35) found that women who became sexually active between the ages of 10 and 14 years were 2-4 times more likely to report risky sexual behaviour (having 5 or more sexual partners in the past year, having sex with bisexual, intravenous drug-using, or human immunodeficiency virus-infected men and reporting a history of sexual transmitted diseases within the last 5 years) compared with women who had their first intercourse at the age of 17 years or older.

The factors associated with clearance in the multinomial logistic regression were black race, co-infection with *Chlamydia trachomatis* at baseline and history of previous Pap smear screening. We found higher rates of clearance of HPV infection for black women when compared with non-black women. Race seems to be associated with both risk of acquisition of HPV (36) and clearance of the infection (37). A cohort of patients infected with the human immunodeficiency virus (HIV) showed that non-white race was independently associated with HPV infection (36). Richardson et al. (37) showed that black women from African or Caribbean descent cleared their high-risk HPV infections more rapidly than white women. In this study, white subjects were more likely to have started sexual activities at an earlier age (less than 16 years) than other women (P<0.001). Xi et al (38) reported that African American women infected with HPV subtypes 16 or 18 tended to be infected with HPV variants that first cropped up in Africa, and white women tended to be infected with variants first seen in

Europe. African American women who were infected with the European-type HPV variant tended to clear the infection more rapidly. When the same women were infected with HPV from African origin, the infection tended to persist, suggesting that the differences between persistence and clearance patterns could be related to the virus' ability to adapt to host immunity (38).

Presence of *Chlamydia trachomatis* co-infection at baseline seemed to increase the probability of HPV clearance. One could speculate that infection with *C. trachomatis* may cause immunologic reactions that could somehow assist in the clearance of HPV. Some authors support a biological mechanism showing a protective effect of *C. trachomatis* against the carcinogenic effect of HPV16 (39, 40). Another possible explanation for the effect of *C. trachomatis* infection is that treatment with azithromycin would eliminate other sexually transmitted diseases, cervicitis and vaginosis that could be associated with HPV infection. It seems that chronic infection with various sexually transmitted agents may contribute to cervical cancer risk through inflammation of the cervix leading to genotoxic damage by reactive oxidative metabolites (41-44). Some studies found association between *C. trachomatis* infection and cervical cancer risk among HPV DNA-positive women, although this evidence is still not clear (45-47). Women infected with *C. trachomatis* in our study received treatment with azithromycin just after baseline evaluation, what may have contributed to clearance of HPV infection.

A history of previous Pap smear screening was found to be associated with clearance of HPV infection in our study, what is in accordance with the literature (32). A possible explanation for this finding is that women who use appropriately the health system and are submitted to screening tests may be more concerned about their health, having different lifestyle and dietary patterns than women who do not seek health care. A history of previous screening for cervical cancer, defined as having had at least one previous non-diagnostic cervical smear,



was associated with a 54% reduction in the risk of developing squamous cell carcinoma of the cervix (48). The risk of invasive cervical cancer is 2-10 times higher among women who had never had a screening Pap smear and the risk increases among women who had had longer intervals between two screenings (49). The incidence and mortality of the cervical cancer have significantly decreased in developed countries who improved screening with the Pap smear test, like the Scandinavian countries, Canada and USA (49). In our study, women previously submitted to Pap smear screening had a higher income and more stable marriages than women who have not being submitted previously to screening.

The cellular immune responses to HPV seem to play an important role in cervical carcinogenesis. However, the main targets involved in the responses as well as the types of responses that mediate HPV clearance are yet not well established (50).

We should also address the limitations of our study. We analysed a single follow up visit, what could have prevented meaningful analysis of associations between cervical pathology and persistence or clearance of HPV. The variations in the length of time between baseline evaluation and follow up may also have biased our estimated time to clearance of HPV infection. And finally, we performed an analysis without grouping different types of genital infections into high-risk and low-risk groups for HPV persistence, what could have masked certain type-specific effects of these genital infections.

In conclusion, we found that the persistence of HPV infection were strongly associated with early age at first intercourse and high number of sexual partners during lifetime. This may suggest that the development of strategies for sexual orientation of teenagers, explaining the risks associated with cervical cancer, may modify the rates of persistence of HPV infection. Nowadays, primary prevention is possible via immunization of young teenage females with highly efficacious HPV vaccines to prevent cervical cancer and genital warts (51-53). Although universal vaccination of teenagers and young women is a desirable policy, costs

remain a key obstacle, mainly in developing countries as Brazil (51). The association of a higher clearance of HPV infection in women with a history of previous Pap smear screening highlights the importance of improving cervical screening programs to cover the whole population. We may also suggest that treatment of gynaecological infections seems to be important in increasing the clearance rates of HPV infection, although further studies on the association of *Chlamydia trachomatis* and other infections with clearance of HPV are still needed.

### **Conflicts of Interests**

The authors disclose no conflicts of interests.

### **Acknowledgments**

The authors wish to thank Professor Álvaro Vigo for the statistical support given for this work. Dr Daniela D.Rosa has received a post-doctoral grant from CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), Brazil.

### **Figure Legend**

**Figure 1** - Kaplan-Meier estimates of proportion of women remaining positive for any type of human papillomavirus infection and for HPV16. Only women positive at baseline were included in the analysis. The circles in the curves represent censored cases.

## REFERENCES

1. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV, et al. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):12-9.
2. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol.* 2002 Jan;3(1):11-6.
3. AmericanCancerSociety. *Cancer Facts and Figures 2007.* Atlanta, Ga: American Cancer Society; 2007.
4. INCA. *Estimativa 2006 - Incidência de Câncer no Brasil.* Rio de Janeiro: Instituto Nacional do Câncer; 2006.
5. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med.* 1998 Feb 12;338(7):423-8.
6. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, et al. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1415-23.
7. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, et al. HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer.* 2001 May 4;84(9):1219-26.
8. Munoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, et al. Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet.* 2002 Mar 30;359(9312):1093-101.
9. Castle PE, Giuliano AR. Chapter 4: Genital tract infections, cervical inflammation, and antioxidant nutrients--assessing their roles as human papillomavirus cofactors. *J Natl Cancer Inst Monogr.* 2003(31):29-34.

10. Goodman MT, Kiviat N, McDuffie K, Hankin JH, Hernandez B, Wilkens LR, et al. The association of plasma micronutrients with the risk of cervical dysplasia in Hawaii. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jun;7(6):537-44.
11. Haverkos HW. Multifactorial etiology of cervical cancer: a hypothesis. *MedGenMed.* 2005;7(4):57.
12. Misra JS, Das V, Srivastava AN, Singh U. Role of different etiological factors in progression of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Cytopathol.* 2006 Oct;34(10):682-5.
13. Berrington A, Jha P, Peto J, Green J, Hermon C. Oral contraceptives and cervical cancer. *Lancet.* 2002 Aug 3;360(9330):410.
14. Schlecht NF, Kulaga S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, et al. Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *Jama.* 2001 Dec 26;286(24):3106-14.
15. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Res.* 2002 Nov;89(2):229-40.
16. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, Glass AG, Rush BB, Scott DR, et al. Determinants of genital human papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 1993 Sep-Oct;20(5):274-8.
17. Coutlee F, Gravitt P, Kornegay J, Hankins C, Richardson H, Lapointe N, et al. Use of PGM1 primers in L1 consensus PCR improves detection of human papillomavirus DNA in genital samples. *J Clin Microbiol.* 2002 Mar;40(3):902-7.
18. Griffais R, Thibon M. Detection of *Chlamydia trachomatis* by the polymerase chain reaction. *Res Microbiol.* 1989 Feb;140(2):139-41.

19. Pannekoek Y, Westenberg SM, de Vries J, Repping S, Spanjaard L, Eijk PP, et al. PCR assessment of *Chlamydia trachomatis* infection of semen specimens processed for artificial insemination. *J Clin Microbiol.* 2000 Oct;38(10):3763-7.
20. Hamilton LC. Interpreting multinomial logistic regression. *Stata Tech Bull.* 1993;13:24-8.
21. Clifford GM, Gallus S, Herrero R, Munoz N, Snijders PJ, Vaccarella S, et al. Worldwide distribution of human papillomavirus types in cytologically normal women in the International Agency for Research on Cancer HPV prevalence surveys: a pooled analysis. *Lancet.* 2005 Sep 17-23;366(9490):991-8.
22. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer.* 2000 Mar;10(2):143-50.
23. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhaes AV. Human papillomavirus prevalence among women with cervical intraepithelial neoplasia III and invasive cervical cancer from Goiania, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003 Mar;98(2):181-4.
24. Cavalcanti SM, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 2000 Jan;40(1):80-7.
25. Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, et al. [Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions]. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999 May-Jun;32(3):235-40.
26. Bosch FX, Manos MM, Munoz N, Sherman M, Jansen AM, Peto J, et al. Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International biological study on cervical cancer (IBSCC) Study Group. *J Natl Cancer Inst.* 1995 Jun 7;87(11):796-802.

27. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *Am J Epidemiol.* 2003 Feb 1;157(3):218-26.
28. Woodman CB, Collins S, Winter H, Bailey A, Ellis J, Prior P, et al. Natural history of cervical human papillomavirus infection in young women: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 2001 Jun 9;357(9271):1831-6.
29. Dalstein V, Riethmuller D, Pretet JL, Le Bail Carval K, Sautiere JL, Carbillet JP, et al. Persistence and load of high-risk HPV are predictors for development of high-grade cervical lesions: a longitudinal French cohort study. *Int J Cancer.* 2003 Sep 1;106(3):396-403.
30. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, et al. A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis.* 2001 Jan 1;183(1):8-15.
31. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol.* 2003 Sep 1;158(5):486-94.
32. Syrjanen S, Shabalova IP, Petrovichev N, Kozachenko VP, Zakharova T, Pajanidi A, et al. Clearance of high-risk human papillomavirus (HPV) DNA and PAP smear abnormalities in a cohort of women subjected to HPV screening in the New Independent States of the former Soviet Union (the NIS cohort study). *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2005 Apr 1;119(2):219-27.

33. Sellors JW, Karwalajtys TL, Kaczorowski J, Mahony JB, Lytwyn A, Chong S, et al. Incidence, clearance and predictors of human papillomavirus infection in women. *Cmaj*. 2003 Feb 18;168(4):421-5.
34. Freeman J, Hutchison GB. Prevalence, incidence and duration. *Am J Epidemiol*. 1980 Nov;112(5):707-23.
35. Greenberg J, Magder L, Aral S. Age at first coitus. A marker for risky sexual behavior in women. *Sex Transm Dis*. 1992 Nov-Dec;19(6):331-4.
36. Hankins C, Coutlee F, Lapointe N, Simard P, Tran T, Samson J, et al. Prevalence of risk factors associated with human papillomavirus infection in women living with HIV. Canadian Women's HIV Study Group. *Cmaj*. 1999 Jan 26;160(2):185-91.
37. Richardson H, Abrahamowicz M, Tellier PP, Kelsall G, du Berger R, Ferenczy A, et al. Modifiable risk factors associated with clearance of type-specific cervical human papillomavirus infections in a cohort of university students. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 May;14(5):1149-56.
38. Xi LF, Kiviat NB, Hildesheim A, Galloway DA, Wheeler CM, Ho J, et al. Human papillomavirus type 16 and 18 variants: race-related distribution and persistence. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Aug 2;98(15):1045-52.
39. Kjaer SK, Munk C, Winther JF, Jorgensen HO, Meijer CJ, van den Brule AJ. Acquisition and persistence of human papillomavirus infection in younger men: a prospective follow-up study among Danish soldiers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2005 Jun;14(6):1528-33.
40. Luostarinen T, Lehtinen M, Bjorge T, Abeler V, Hakama M, Hallmans G, et al. Joint effects of different human papillomaviruses and *Chlamydia trachomatis* infections on risk of squamous cell carcinoma of the cervix uteri. *Eur J Cancer*. 2004 May;40(7):1058-65.



41. Gravitt PE, Castle PE. Chlamydia trachomatis and cervical squamous cell carcinoma. *Jama*. 2001 Apr 4;285(13):1703-4; author reply 5-6.
42. Shields TS, Brinton LA, Burk RD, Wang SS, Weinstein SJ, Ziegler RG, et al. A case-control study of risk factors for invasive cervical cancer among U.S. women exposed to oncogenic types of human papillomavirus. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004 Oct;13(10):1574-82.
43. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, et al. An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2001 Oct;10(10):1021-7.
44. Kulkarni S, Rader JS, Zhang F, Liapis H, Koki AT, Masferrer JL, et al. Cyclooxygenase-2 is overexpressed in human cervical cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 Feb;7(2):429-34.
45. Smith JS, Munoz N, Herrero R, Eluf-Neto J, Ngelangel C, Franceschi S, et al. Evidence for Chlamydia trachomatis as a human papillomavirus cofactor in the etiology of invasive cervical cancer in Brazil and the Philippines. *J Infect Dis*. 2002 Feb 1;185(3):324-31.
46. Smith JS, Bosetti C, Munoz N, Herrero R, Bosch FX, Eluf-Neto J, et al. Chlamydia trachomatis and invasive cervical cancer: a pooled analysis of the IARC multicentric case-control study. *Int J Cancer*. 2004 Sep 1;111(3):431-9.
47. Madeleine MM, Anttila T, Schwartz SM, Saikku P, Leinonen M, Carter JJ, et al. Risk of cervical cancer associated with Chlamydia trachomatis antibodies by histology, HPV type and HPV cofactors. *Int J Cancer*. 2007 Feb 1;120(3):650-5.
48. InternationalCollaborationofEpidemiologicalStudiesofCervicalCancer. Comparison of risk factors for invasive squamous cell carcinoma and adenocarcinoma of the cervix: collaborative reanalysis of individual data on 8,097 women with squamous cell carcinoma and 1,374 women with adenocarcinoma from 12 epidemiological studies. *International*

- Collaboration of Epidemiological Studies of Cervical Cancer. *Int J Cancer*. 2007 Feb 15;120(4):885-91.
49. Franco EL, Duarte-Franco E, Ferenczy A. Cervical cancer: epidemiology, prevention and the role of human papillomavirus infection. *Cmaj*. 2001 Apr 3;164(7):1017-25.
50. Konya J, Dillner J. Immunity to oncogenic human papillomaviruses. *Adv Cancer Res*. 2001;82:205-38.
51. Franco EL, Ferenczy A. Cervical cancer screening following the implementation of prophylactic human papillomavirus vaccination. *Future Oncol*. 2007 Jun;3(3):319-27.
52. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). Available at : <http://www.cdc.gov/std/hpv/STDFact-HPV-vaccine.htm>. Accessed on June 25, 2007. 2007 [cited; Available from:
53. Food and Drugs Administration (FDA). Available at : <http://www.fda.gov/bbs/topics/NEWS/2006/NEW01385.html>. Accessed on June 25, 2007. 2007.

**Table 1:** Baseline characteristics of 501 women included in a cohort study in Brazil, years 2002-2006.

<b>Variables</b>	<b>n (%)</b>
<b>Age</b> (mean/standard deviation)	43(±13)
<b>Race</b>	
Black	38 (7.5)
Non Black	467(92.5)
<b>Education</b>	
Elementary school or below	254(50.3)
High school or above	251(49.7)
<b>Marital status</b>	
Married/cohabitating	292(57.8)
Single/Divorced/Widowed	213(42,2)
<b>Smoking</b>	
Ever	135(26.7)
Never	370(73.3)
<b>Age at first intercourse</b>	
≥ 21 years old	161(31.9)
≤ 20 years old	344(68.1)
<b>Number of lifetime sexual partners</b>	
≤ 3	149(29.5)
≥ 4	356(70.5)
<b>Oral contraceptive use</b>	
Ever	480(95.0)
Never	25(5.0)
<b>Condom use</b>	
Ever	29(5.7)
Never	417(82.6)
<b>History of genital warts</b>	
Yes	56(11.1)
No	441(87.3)
<b>Partners with genital warts</b>	
Yes	48(9.5)
No	457(90.5)
<b>Partner with other sexually transmitted diseases</b>	
Yes	36(7.7)
No	465(92.3)
<b>Age at first pregnancy</b>	
≤ 22 years old	218(43.2)

Continua =&gt;

≥23 years old	287(56.8)
<b>Number of pregnancies</b>	
≥ 3	177(35.0)
≤ 2	328(65.0)
<b>Previous Pap test</b>	
Ever	470(93.1)
Never	35(6.9)
<b>HPV subtypes</b>	
HPV 16	33(18.6)
HPV 31	28(15.8)
HPV18	6(3.3)
Other subtypes	112(64.7)
<b>Chlamydia trachomatis DNA test</b>	
Positive	71(14.8)
Negative	409(85.2)

**Table 2:** Distribution of women according to HPV DNA testing (n=501)

HPV DNA status	HPV DNA at baseline	HPV DNA at follow-up	Number at follow up / number at baseline (%)
Persistence of infection (group 1)	(+)	(+)	34 / 177 (19.2%)
Conversion (group 2)	(-)	(+)	40 / 324 (12.3%)
Clearance of infection (group 3)	(+)	(-)	143 / 177 (80.8%)
Negative (group 4) *	(-)	(-)	284 / 324 (87.7%)

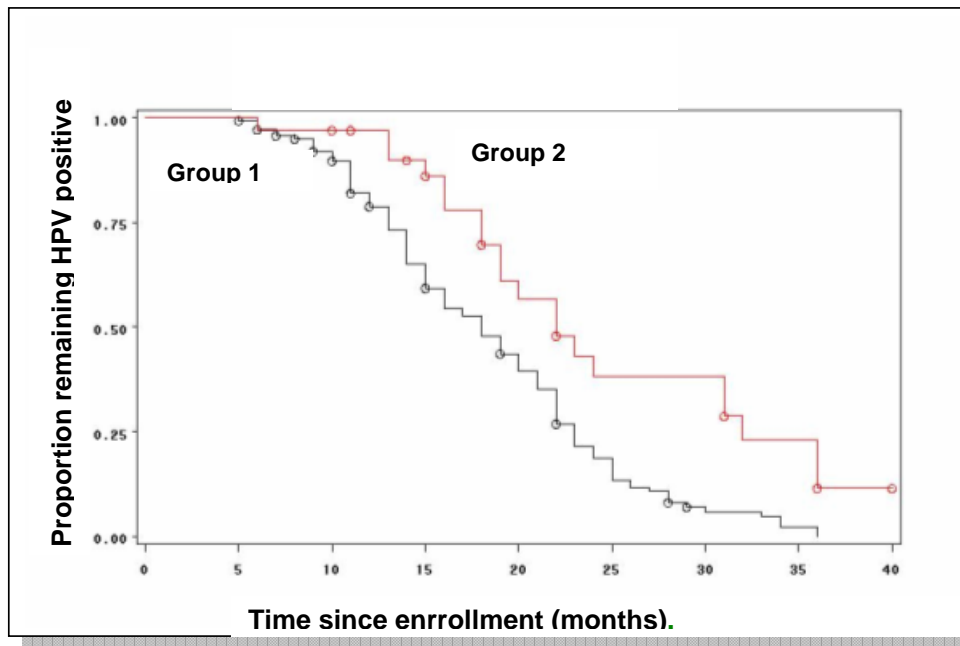
\*Reference category

**Table 3:** Multinomial logistic regression analysis with crude and adjusted odds ratios (OR) for conversion and clearance of HPV infection in asymptomatic women\* (N=501).

Variables	HPV+ HPV+	HPV- HPV+	HPV+ HPV-
	OR crude OR adjusted (95%CI) N=34	OR crude OR adjusted (95%CI) N=40	OR crude OR adjusted (95%CI) N=143
<b>Race</b>			
Black	2.02(0.54-7.47) 2.08(0.54-8.05)	1.69(0.46-6.21) 2.02(0.53-7.63)	<b>3.19(1.53-6.67)</b> <b>3.44(1.55-7.65)</b>
Non Black	1.00	1.00	1.00
<b>Age at first intercourse</b>			
≤20 years old	<b>2.15(1.05-4.42)</b> <b>3.14(1.43-6.87)</b>	1.30(0.64-2.62) 1.31(0.63-2.70)	1.22(0.79-1.88) 1.55(0.96-2.50)
≥ 21 years old	1.00	1.00	1.00
<b>Sexual partners in the life.</b>			
≥ 4	<b>1.78(0.86-3.70)</b> <b>2.48(1.14-5.41)</b>	0.63(0.28-1.44) 0.73(0.32-1.70)	1.21(0.78-1.87) 1.29(0.80-2.09)
≤ 3	1.00	1.00	1.00
<b>Chlamydia test</b>			
Positive	1.97(0.75-5.19) 2.29(0.85-6.21)	0.48(0.11-2.10) 0.50(0.11-2.22)	<b>3.09(1.78-5.36)</b> <b>3.26(1.84-5.76)</b>
Negative	1.00	1.00	1.00
<b>Previous PAP test</b>			
Ever	1.30 (0.28-6.04) 2.10(0.43-10.32)	2.32(0.62-7.49) 2.03(0.53-7.71)	<b>2.63(1.23-5.62)</b> <b>3.48(1.51-8.00)</b>
Never	1.00	1.00	<b>1.00</b>

\* The reference category is HPV DNA-negative at baseline and during follow-up (N=284).


\* Adjusted for all variables of the model.





**Figure 1:** Kaplan-Meier estimates of proportion of women remaining positive for any types human papillomavirus and for HPV16. Only women positive at enrollment were included in this analysis: group 1- Non-HPV16 and group 2- HPV 16. The circles are right- censored data.

## 5 ARTIGO 2\*\*

**Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review**

1: [Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review.](#)  
**Autores:** Rosa MI, Medeiros LR, Bozzetti MC, Fachel J, Wendland E, Zanini RR, Moraes AB, Rosa DD  
 **Revista:** Int J Gynecol Cancer (International journal of gynecological cancer : official journal of the International Gynecological Cancer Society). **Idioma:** Inglês  
Volume: Páginas: Data: 2007 May 15  
**PubMed ID:** 17506842. [PubMed - as supplied by publisher]

 [Ler Resumo](#)

 **Full Text at**  
Blackwell Synergy

*\*\*Aceito para publicação em 28/02/2007 – International Journal of Gynecological Cancer*

**Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review**

**Author:** Maria Inês da Rosa, MD, MSc<sup>(1,2)</sup>

Address:

Rua Cruz e Souza, 510. Bairro Pio Correa- CEP 88811-550 – Criciúma-SC- Brazil

Phone: + 48 34339976 Fax: + 48 34335766 E-mail: mir@unesc.net

**Co-authors:**

Lidia Rosi Medeiros, MD, MSc<sup>(1)</sup>

Mary Clarisse Bozzetti, MD, PhD<sup>(1,2,3)</sup>

Jandyra Fachel, PhD<sup>(1)</sup>

Eliana Wendland, MD, MSc<sup>(1)</sup>

Roselaine Ruviaro Zanini, MSc<sup>(1)</sup>

Anaelena Bragança de Moraes, MSc<sup>(1)</sup>

Daniela Dornelles Rosa, MD, PhD<sup>(4)</sup>

Affiliations of all authors:

<sup>1</sup>Postgraduate Program in Epidemiology at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>2</sup>Medical School, University of Extremo Sul Catarinense, Criciúma, Brazil

<sup>3</sup>Postgraduate Program in Medicine: Medical Sciences at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>4</sup>Department of Social Medicine, Faculty of Medicine at Federal University of Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil

<sup>5</sup>Paterson Institute for Cancer Research, Manchester, Unites Kingdom



## Abstract

The detection of telomerase activity in cervix may provide information on cervical carcinogenesis, and may be a marker to monitor cervical intraepithelial neoplasia transition. A quantitative systematic review was performed to estimate the accuracy of telomerase assay in cervical lesions. Studies that evaluated the telomerase test (telomerase repeated amplification protocol) for the diagnosis of cervix lesions and compared it to paraffin-embedded sections as the diagnostic standard were included. Ten studies were analyzed, which included 1,069 women. The diagnostic odds ratio (DOR) for a positive telomerase test for Lo-SIL *vs.* normal or benign lesions was 3.2 (95% CI, 1.9-5.6). The DOR for a positive telomerase test for Hi-SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions was 5.8 (95% CI, 3.1-10). For cervix cancer *vs.* Hi-SIL, the DOR for a positive telomerase test was 8.1 (95% CI, 3.2-20.3) and for cervix cancer *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions, it was 40.9 (95% CI, 18.2-91). Our data support the current hypothesis that telomerase may activate an early event in cervical carcinogenesis that could be associated with the initiation and progression of cervical lesions.

KEYWORDS: cervical intraepithelial neoplasia, diagnosis, meta-analysis, systematic review, telomerase.

## Resumo

**Introdução:** A detecção da atividade da telomerase na cervix pode informar sobre a carcinogênese cervical e pode ser um marcador para monitorar a transição das NICs. Foi realizada uma revisão sistemática para estimar a acurácia do teste da telomerase nas lesões cervicais. **Métodos:** Foram incluídos estudos que comparavam o teste de telomerase (TRAP)

e anatomopatológicos, obtidos por biópsias cervical para diagnóstico de lesões cervicais.

**Resultados:** Dez estudos foram analisados, os quais incluíram 1069 mulheres. Para lesões intraepiteliais de baixo grau (LIEBG) vs. normal ou lesões benignas, encontrou-se uma positividade do teste da telomerase, sendo que o resultado da odds ratio para diagnóstico (DOR) foi de (DOR = 3,2, IC 95%, 1,9-5,6). Nas lesões intraepiteliais de alto grau (LIEAG) vs LIEBG, normal ou benigna: (DOR = 5,8, IC 95%, 3.1-10. )]. Encontrou-se uma DOR elevada de 8,1 (IC 95%, 3,2-20) nas lesões de câncer cervical vs LIEAG. Da mesma forma, nas lesões de câncer cervical vs. LIEBG, a razão de chance foi elevada, com uma DOR de 40,9 (IC 95%, 18,2-91). **Conclusão:** nossos dados suportam a corrente hipótese da atividade da telomerase como um evento precoce na carcinogênese e que poderia estar associado com o início e a progressão de lesões cervicais.

**Palavras-Chaves:** telomerase, neoplasia intra-epitelial cervical, revisão sistemática, metanálise, acurácia, diagnóstico

### Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review

#### Introduction

Cancer of the uterine cervix is an important cause of death, with 500,000 new cases diagnosed each year<sup>(1)</sup>, being a major cause of death in developing countries<sup>(2)</sup>. Human papillomaviruses are the etiological agents of almost all cases of cervical squamous cell carcinomas and high-grade dysplasia<sup>(3)</sup>. In the natural process of cervical carcinogenesis, the lesions can be

classified into three grades: low-grade squamous intraepithelial lesions (Lo-SIL), high-grade squamous intraepithelial lesions (Hi-SIL) and carcinoma of the cervix<sup>(4)</sup>.

Telomerase is a ribonucleoprotein complex that synthesizes telomeric DNA and contributes to the maintenance of telomeres<sup>(5,6)</sup>. The activity of this enzyme is frequently up-regulated in cancer tissues and immortalized cell lines<sup>(6)</sup>. Review of the literature indicates that telomerase is activated in the majority of cervical squamous cell carcinomas, as it is in most malignant neoplasms. Advances in telomere biology and telomerase inhibition have led to the development of new tools for clinical diagnosis, prognosis, and treatment of cancer<sup>(7)</sup>.

Therefore, we undertook a systematic quantitative review of the literature to ascertain the accuracy of telomerase in the diagnose of precursor cervical lesions and cervical intraepithelial neoplasia and to explore the reasons for the ongoing controversies about this issue.

## **Materials and Methods**

### **Identification of studies**

A comprehensive search of the MEDLINE, CANCERLIT, LILACS and EMBASE databases was made from January 1990 to February 2007. The medical subjects heading (MeSH) and text words for the terms “*cervix neoplasm*”, “*human papilloma virus*”, “*cervix cancer*”, “*cervix diseases*”, “*Dysplas\**”, “*Papillomavirus\**”, “*Papillom Virus\**”, “*Papovavirida\**” and “*telomerase*” were combined with the MeSH term *diagnosis* (“sensitivity and specificity”). The search was limited to human studies, with no language restrictions. In addition, the Cochrane Library was searched. Reference lists of all available primary studies were reviewed to identify additional relevant citations.

## Selection Criteria

This review focused on observational studies in which the telomerase diagnostic test were compared with a reference standard. Women submitted to cervical biopsy who presented with SIL, carcinoma *in situ* or squamous cervical cancer, in accordance with the guidelines of the FIGO, were studied. The diagnostic test consisted on the analysis of telomerase in the lesions and the reference test was the histologic evaluation in paraffin-embedded sections. To comply with the inclusion criteria, it was necessary have a paraffin-embedded section assessment to designate each case as normal or benign cervical lesions, Lo-SIL, Hi-SIL, carcinoma *in situ* or squamous cervical cancer. For data extraction in this systematic review, CIN 1 were classified as Lo-SIL, and carcinoma *in situ* and squamous cervical cancer (microinvasive or invasive) were classified as cervical cancer. In addition, we used only results from studies were the telomerase test was carried out by the telomerase repeated amplification protocol assay. We excluded studies comparing the accuracy of telomerase with the histology in paraffin-embedded sections that described only three grades of CINs 1, 2 and 3, those that described only cervical cancer, those evaluating other tumors (noncervical) and also the studies that lacked data to construct 2 x 2 contingency tables.

The positive telomerase diagnoses in CIN and cervical cancer were compared in four categories: (1) Lo-SIL *versus* normal or benign cervical lesion, (2) Hi-SIL *versus* Lo-SIL, normal or benign lesions (3) cervical cancer *versus* Lo-SIL, normal or benign lesions (4), cervical cancer *versus* Hi-SIL. To calculate the diagnostic accuracy, cases that were deferred because of uncertain diagnoses in each study were excluded. The primary outcome was the accuracy of the telomerase test to diagnose Lo-SI and normal or benign lesions, Hi-SIL and cervical cancer. The secondary outcome was evaluation of the distribution of histological types of cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer according to histologic

diagnosis. The reviewed studies were identified independently by four investigators (M.I.R, L.R.M, E.W and D.D.R). Final inclusion or exclusion was made with a standard checklist. Disagreements about study inclusion or exclusion were solved by consensus and, when this was not possible, by arbitration with a fifth reviewer (M.C.B). Four reviewers (R.R.Z, A.B.M, J.F and LRM) performed the statistical analysis. The statistics for agreement among reviewers were computed.

### **Quality Assessment**

All articles that met the eligibility criteria were assessed for methodological quality. This assessment involved the study design, features of the patient population, the diagnostic test and the reference standard<sup>(8,9,10,11)</sup>, including data collection and patient selection methods, description of results of the telomerase test (positive or negative), histology and presence of verification bias<sup>(9,10)</sup>. The quality assessment for the included studies are summarized in the “*Scoring of Study Quality*” column in Table 1<sup>(8)</sup>. The studies were further assessed for methodological quality with reference to the *Oxford Centre for Evidence Based Medicine Level of Evidences Classification* rubric. Only studies with Oxford Evidence Levels 1 to 3, considered to be of high quality, were included. Those with levels 4 and 5 were excluded<sup>(12)</sup>.

### **Data Abstraction**

Four investigators (M.I.R, L.R.M, E.W and D.D.R) independently abstracted the data. The assessment of English-language articles was performed by 3 reviewers (M.I.R, L.R.M, E.W) while assessment of those articles published in languages other than English were performed independently by 2 other reviewers (M.C.B, D.D.R). Any disagreement was resolved by

consensus. Four diagnostic outcomes were considered for a positive telomerase test: normal or benign cervical lesion, Lo-SIL, Hi-SIL and cervical cancer. Lesions with Lo-SIL were compared with normal and benign lesions. Data for Lo-SIL were abstracted as 2 x 2 tables regarding the telomerase diagnosis (positive *versus* negative for Lo-SIL) and the histologic diagnosis (Lo-SIL *versus* normal and benign lesion). Similarly, contingency tables were produced for Hi-SIL and cervical cancer cases. In addition, for cervical cancer cases the telomerase diagnosis (positive *versus* negative cervical cancer) were compared with the histologic diagnosis (cervical cancer *versus* Lo-SIL, normal and benign cervical lesions) (Table 2).

### **Data Synthesis and Statistical Analysis**

To evaluate the agreement between study eligibility and assessment of methodological quality, as well as between the results of telomerase test and paraffin-embedded section analyses, the observed percentage of agreement and the  $\kappa$  coefficient for inter-rater reliability were calculated<sup>(13)</sup>. For each study, 2 x 2 contingency tables were constructed, in which all biopsies were classified as normal or benign lesion, Lo-SIL, Hi-SIL or cervical cancer. The true-positive (sensitivity) and the false-positive rates (1 – specificity) were calculated. When 2 x 2 tables had 0 cells, the value of 0.5 was added to each cell to enable calculations to be made; when a study contained two cells with the 0 value, it was excluded from the analysis.

The summary weighted sensitivity and specificity were calculated as the sum of sensitivities and specificities reported for each study, multiplied by the number of subjects in the study, divided by the total number of subjects in all studies. The 95% CIs for mean weighted results were calculated using the exact method. The association between sensitivity and specificity for normal or benign cervical lesions, Lo-SIL, Hi-SIL and cervical cancer was calculated with

the *Spearman's correlation coefficient test* <sup>(14)</sup>. When there was no correlation, pooling sensitivities and specificities were calculated, since there were two categories of results (negative or positive test)<sup>(15)</sup>. In the case of correlation, a summary receiver operating characteristic curve (ROC) was generated using data from all thresholds, by the Littenberg and Moses method <sup>(15)</sup>.

The diagnostic odds ratio (DOR) can relate to different combinations of sensitivity and specificity. It can change according to the threshold and ROC curve used to define an abnormal examination resulted in the expected trade-off between sensitivity and specificity. Also, the area under the curve (AUC) can summarize the inherent capacity of a test for discriminating a diseased from a non-diseased subject. Perfect tests usually have AUCs close to 1 and poor tests usually have AUCs close to 0.5<sup>(15)</sup>. The heterogeneity of the sensitivities and specificities of the studies were assessed using the  $Q_T$  (Cochran) test for  $\chi^2$  distributions with k-1 degrees of freedom. Since sensitivity and specificity were heterogeneous, a random effect model was used and the terms were pooled with a 95% CI<sup>(15,16)</sup>. The statistical analysis was performed with the software Meta-DiSc® (version Beta 1.1.1, Unit of Clinical Biostatistics, Ramón y Cajal Hospital;Madrid, Spain). Two reviewers (R.R.Z, A.B.M) calculated the test reproducibility.

### **Sensitivity Analysis**

To assess whether the quality of the studies affected the diagnostic accuracy, studies that met less than 50% of the quality criteria and that were sub-level 3 in accordance with the *Oxford Centre for Evidence Based Medicine Level of Evidence Classification*<sup>(12,16)</sup> were excluded.

The robustness of the results was tested by repeating the analysis with a different statistical model (random effects model)<sup>(16,17)</sup>.

## **Results**

### **Study identification and eligibility**

The process of study selection is summarized in Figure 1. The initial search identified 134 potentially relevant papers, 85 from Medline (PubMed) and 49 from EMBASE. Eighteen were duplicated in two databases. The authors excluded 93 published studies after reviewing their titles and abstracts, because they did not relate to the question under review. Forty-one full-text papers were retrieved including three with non-English-language (Chinese), which were translated. Thirty one were excluded after further scrutiny. Ten studies including 1066 women met the criteria for inclusion and were analyzed (Table 1)<sup>(18-26)</sup>. Inter-rater agreement for study eligibility and methodological quality was 79% ( $\kappa=0.64$ ), indicating good agreement<sup>(13)</sup>.

### **Studies Description**

Details of the participants, interventions, and quality assessments of the studies selected for meta-analysis are summarized in Table 1. The mean age of participants was reported from only one study<sup>(19)</sup>. All studies were non-blinded and retrospective, with a small population, but included sufficient experimental details, proper diagnostic tests and diagnostic reference



standards. Of the ten studies included, four <sup>(19,21,22,24,25)</sup> had high methodological quality, satisfying  $\geq 55\%$  of the criteria for study quality and with an Oxford Evidence Level of 2B<sup>(11)</sup>. However, six studies<sup>(19,21,22,24,25)</sup> were classified as level 3B, because details of the patients, including age, were not reported and because they met  $< 50\%$  of the quality criteria.

The distribution of histological diagnosis from paraffin-embedded blocks was calculated from ten of the trials<sup>(19-28)</sup> (Table 2). Normal or benign lesions were found in 255 patients (24.2%), Lo-SIL in 191 patients (18.1%), Hi-SIL in 358 patients (34%) and cervical cancer in 246 patients (23.4%). Table 3 shows the contingency tables (false negative, false positive, true positive, and true positive) from each study considered. In Wisman *et al.*<sup>(27)</sup>, 16 cases were not included, as the results for benign lesion (1), Lo-SIL (3) and Hi-SIL (12) were not accessible. There were no significant correlations between sensitivity and specificity for normal or benign lesions *vs.* Lo-SIL ( $r_s = 0.37$ ;  $p = 0.33$ ), Lo-SIL, normal or benign lesions *vs.* Hi-SIL ( $r_s = 0.58$ ;  $p = 0.074$ ), Hi-SIL *vs.* cervical cancer ( $r_s = 0.14$ ;  $p = 0.70$ ) and Lo-SIL, normal or benign lesions *vs.* cervical cancer ( $r_s = 0.45$ ;  $p = 0.18$ ).

### Sensitivity

Telomerase test was better at detecting cervical cancer when compared with Lo-SIL and Hi-SIL with a pooled sensitivity of 0.90 (IC95% 0.85-0.93). Nevertheless, the telomerase test had low sensitivity for Lo-SIL *vs.* normal or benign lesion and Hi-SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions (Table 4). The estimates for heterogeneity were highly consistent across studies: for normal or benign lesion *vs.* Lo-SIL ( $Q_T = 25.0$ ,  $p = 0.002$ ), Hi-SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions ( $Q_T = 83.2$ ,  $p = 0.0001$ ), Hi-SIL *vs.* cervical cancer ( $Q_T = 36.9$ ,  $p = 0.0001$ ). Cervical cancer *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions ( $Q_T = 36.9$ ,  $p = 0.0001$ ).

## Specificity

In general, specificity was higher for normal or benign lesion *vs.* Lo-SIL (0.84; IC 95% 0.79-0.88). For Hi- SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions and cervical cancer *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions, the specificity was the same (0.77; IC 95% 0.73-0.81). Specificity was better among women who did not have cervical lesions (Table 4).

## Diagnostic odds ratio

The DOR between cervical cancer *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions was 40.9 (IC95% 18.3-91.7;  $Q_T= 16.0$ ,  $p=0.067$ ). However, between Hi-SIL *vs.* cervical cancer, Lo-SIL *vs.* normal or benign lesion, Hi-SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions, the DOR was 7.8 (IC95% 3.1-19;  $Q_T= 24.4$ ,  $p=0.004$ ), 3.3 (IC95% 1.9-5.7;  $Q_T= 8.5$ ,  $p=0.388$ ) and 5.8 (IC95% 3.2-10.6;  $Q_T= 20.1$ ,  $p=0.017$ ), respectively (Table 4). ROC curves were constructed in cases of heterogeneity in the DOR<sup>(15)</sup>. For HI-SIL *vs.* Lo-SIL, normal or benign lesions the AUC was 0.7920, but in the pooled sensitivity it was 51.1%, due to heterogeneity (Figure 2). In cases of cervical cancer *vs.* Hi-SIL the AUC was 0.8563 (lower than the AUC for pooled sensitivity: 89.8%, probably due to heterogeneity between studies)<sup>(15)</sup> (Figure 3). The AUC for the ROC curve was estimated by trapezoidal rule (Meta-DiSc®; version Beta 1.1.1).

## Sensitivity Analysis

The robustness of the results was tested by repeating the analysis using a different statistical model (i.e., the random effects model)<sup>(16,27)</sup>. There was heterogeneity for both sensitivity and

specificity among the ten studies for the following groups: Lo-SIL vs. normal or benign lesion; Hi-SIL vs. Lo-SIL, normal or benign lesions; cervical cancer vs. Hi-SIL; and cervical cancer vs. Lo-SIL, normal or benign lesions. Due to heterogeneity, only a random model was used. The DOR from the four studies<sup>(18,20,26,27)</sup> with high methodological quality (2B) were calculated, and a sensitivity analysis was performed. For Lo-SIL vs. normal or benign lesion, the DOR was the same but with a narrower confidence interval (3.2; 95%CI: 1.7-6.2). For HI-SIL vs. Lo-SIL, normal or benign lesions, the DOR was 6.1 (95% CI: 3.4-10), showing little modification. For cervical cancer vs. Hi-SIL, the DOR was 5.4 (95% CI: 1.3-21.3), very similar to the previous result. The DOR for cervical cancer vs. Lo-SIL, normal or benign lesions was 25 (95% CI: 4.8-132), with a larger 95% CI. The results for the four studies with high methodological quality (2B)<sup>(19,21-25)</sup> were very similar when the studies with 3B methodological quality<sup>(18-27)</sup> were included. Therefore, all 10 selected<sup>(19-28)</sup> studies were included in the meta-analysis.

## Comments

In summary, this systematic review showed that not only cervical cancer but also Lo-SIL and Hi-SIL may be detected by telomerase activity in the human cervix. However, telomerase activity was also found in Lo-SIL. Although the biological significance of telomerase activity expressed in cervical cancer remains unclear, it would be interesting to determine whether telomerase-positive Lo-SIL and Hi-SIL patients are at greater risk for developing cervical cancer than those patients in whom the telomerase test is negative<sup>(26)</sup>.

Telomerase is normally not active in mortal cells, but strongly activated in the majority of immortal cell populations. Consequently, activation of this enzyme is likely to be one of the

most common ways by which an immortal state is acquired<sup>(25)</sup>. The significance of telomerase activity in predicting the biological behavior of Lo-SIL and Hi-SIL lesions needs further attention. When the telomerase test is positive, depending on the time of follow-up and the degree of cervical cell dyskaryosis, percentages ranging from 10-80% have been found in women with Lo-SIL or Hi-SIL or cervical cancer<sup>(25)</sup>. The results indicate that telomerase activation is a relatively early event in cervical carcinogenesis and seems to be associated with the initiation and progression of cervical neoplasia.

Great heterogeneity in sensibility and specificity was found among studies. This is probably because low-grade and high-grade lesions are sometimes so small that biopsies might miss them altogether. Moreover, when lesions progress to the stage of invasive cancer, scraping samples may be contaminated with excessive blood or necrotic cells, possibly including telomerase inhibitors, what may cause false-negative results<sup>(26)</sup>.

This systematic review showed a higher frequency of telomerase activity in cervical cancer. However, the results suggest that telomerase activity is detectable in epithelial tissue not only in Hi-SIL and Lo-SIL, but also in benign cervical lesions<sup>(18-27)</sup>. Therefore, it is assumed that additional viral and cellular alterations are required for cervical carcinogenesis. One potential limitation of the study is the possibility that false-positive results could be produced by the presence of acute and chronic inflammatory cells in the test samples<sup>(24)</sup>.

Another possible limitation of this systematic review is that all trials were retrospective and there was a lack of blinding in their assessment; there was a small number of trials included and some of them had a low quality (nonconsecutive, insufficient population details)<sup>(19,20,22,23,24-28)</sup>. On the other hand, this meta-analysis complied with the criteria for performing a rigorous systematic review planned a priori<sup>(14,15,16)</sup>. These included the use of study quality assessments<sup>(7)</sup> and investigation of homogeneity with fixed and random models to test the robustness of the results<sup>(14,15,16)</sup>.

In conclusion, the present study support the current hypothesis that telomerase activation is a relatively early-stage event in cervical carcinogenesis, and this activation may be associated with the initiation and progression of cervical lesions. The results from this systematic review about accuracy of telomerase in cervix lesions could contribute to establishing telomerase as a progression marker for Lo-SIL, Hi-SIL and cervical cancer. Telomerase analysis could therefore be used to help decrease the rates of false-negative diagnoses in cervical cytology samples. Thus, better methods are required for improving the accuracy rates of cervical cancer diagnosis.

### **Acknowledgement**

The authors wish to thank Mr Hsu who translated tuials in Chinese language.

### **References**

1. Parkim DM. Global cancer statistics in year 2000. *Lancet Oncol* 2001; 2:533-43.
2. Park TK. Adjuvant therapy in cervical cancer patients with high risk factors. *Yonsei Medical Journal* 1997;38(5):255-60.
3. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 Apr;55(4):244-65
4. Apgar BS; ZOSCHNICK, Lauren. The 2001 Bethesda Sytem Terminology. *American Family Physicians.* 15 Nov 2003;68:1992-8.

5. Greider CW. Telomerase activation. One step on the road to cancer? *Trends Genet* 1999;15:109
6. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994; 266:2011-5.
7. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase, and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr* 2003; 51:116-122.
8. Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, Van der Meulen JHP, et al. Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999; 282:1061-6.
9. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL., for the evidence-based working group. User's guides to the medical literature. II. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of study valid? *JAMA* 1994; 271:389-91.
10. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, et al. Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Ann Intern Med* 2003; 138:40-5.
11. Cochrane Methods Working Group on Systematic Reviews of Screening and Diagnostic Tests. Recommended methods. Available at: <http://www.cochrane.org/cochrane/sadtdoc1.htm>. Accessed January 25, 2004.
12. Phillips B, Ball C, Sackett D, et al. Oxford Centre for evidence-based Medicine Level of evidence Grades of recommendations (May 2001). Available at <http://www.cebm.net/background.asp>. Accessed February 23, 2004.

13. Altman D. Some common problems in medical research. In: Altman D. *Practical statistics for medical research*. 9nd ed. London, England: Chapman; 1999:403-9.
14. Altman D. Relation between two continuous variables. In: Altman D. *Practical statistics for medical research*. 9nd ed. London, England: Chapman; 1999:277-99.
15. Deeks JJ. Systematic reviews of evaluation of diagnostic and screening tests. In: Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health care: Meta-analysis in context*. 2nd. ed. London, England: *BMJ* Publishing; 2001:248-82.
16. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. Random effects methods for combining study estimates. In: Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. *Methods for Meta-Analysis in Medical Research*. 1nd.ed. Chichester, England: John Wiley; 2000: 73-86.
17. Deekes JJ, Altman DG, Bradburn MJ. Statistical methods for examining heterogeneity and combining results from several studies in meta-analysis. In: Egger M, Smith GD, Altman DG. *Systematic Reviews in Health care: Meta-analysis in context*. 2nd. ed. London, England: *BMJ* Publishing; 2001:248-82.
18. Iwasaka T, Zheng PS, Yokoyama M, Fukuda K, Nakao Y, Sugimori H. Telomerase activation in cervical neoplasia. *Obstet Gynecol* 1998;91:260-2.
19. Mutirangura A, Sriuranpong V, Termrunggraunglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, Niruthisard S. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, pre-malignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer* 1998; 78:933-9.
20. Nagai N, Oshita T, Murakami J, Ohama K. Semiquantitative analysis of telomerase activity in cervical cancer and precancerous lesion. *Oncol Rep* 1999; 6:325-8.

21. Nair P, Jayaprakash PG, Nair MK, Pillai MR. Telomerase, p53 and Human papillomavirus infection in the uterine cervix. *Acta Oncol* 2000; 39:65-70.
22. Pao CC, Tseng CJ, Lin CY, Yang FP, Hor FP, Yao DS, Hsueh S. Differential expression of telomerase activity in human cervical cancer and cervical intraepithelial neoplasia lesions. *J Clin Oncol* 1997; 15:1932-7.
23. Riethdorf S, Riethdorf L, Schulz G, Ikenberg H, Jänicke F, Löning T, Park TW. Relationship between telomerase activation and HPV16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2001; 20:177-85.
24. Shroyer KR, Thompson C, Enomoto T, Eskens JL, Shroyer L, McGregor JA. Telomerase expression in normal epithelium, reactive atypia, squamous dysplasia, and squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Anat Pathol* 1998; 109:153-62.
25. Snijders PJ, Duin MV, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res* 1998; 58:3812-18.
26. Wang SZ, Sun JH, Zhang W, Jin SQ, Wang HP, Jin YS, QU P, *et al.* Telomerase activity in cervical intraepithelial neoplasia. *Chin Med J* 2004; 117:202-6.
27. Wisman GB, Hollema H, de Jong S, ter Schegget J, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MH, Krans M, et al. Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J Clin Oncol.* 1998 Jun; 16(6):2238-45.



28. Irwig L, Tosteson ANA, Gatsonis C, Lau J, Colditz G, Chalmers TC, *et al.* Guidelines for Meta-analysis evaluating diagnostic tests. *Ann Intern Med* 1994; 120:667-76.

## TABLES

**Table 1:** Participant characteristics and scoring criteria in studies included

Study, Year	Mean age (range)	Period of study	n*	Scoring of study quality <sup>(8)</sup>	Oxford evidence level <sup>(14)</sup>
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	43.6 (normal) 38.7 (SIL) 50.5 (cancer)	1996-1997	155	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 2B
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	Not reported	Not reported	103	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	Not reported	1996-1997	100	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 2B
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	Not reported	Not reported	72	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	Not reported	Not reported	56	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	Not reported	Not reported	112	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	Not reported	Not reported	137	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	Not reported	Not reported	65	Small population, verification complete, nonblinded, not reported if consecutive and prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 3B
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	37.2(SD±7,4)	1997-1999	105	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details sufficient	Cohort 2B
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998*	Not reported	1995-1997	161	Small population, verification complete, nonblinded, consecutive, prospective, test details sufficient, reference test details sufficient, population details insufficient	Cohort 2B

\* 16 cases were not assessable in the study of Wisman *et al.*,<sup>(27)</sup> 1998

**Table 2:** Distribution of histological types in cervical tissue according to diagnosis in paraffin-embedded blocks.

Study, year	Normal or benign lesion (n)	Lo-SIL (CIN1) (n)	Hi-SIL (CIN2,3) (n)	Cervical cancer (n)	Total N
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	62	27	36	30	155
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	37	6	20	40	103
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	16	25	36	23	100
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	14	20	18	20	72
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	11	4	16	25	56
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	28	14	41	29	112
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	50	43	23	21	137
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	8	10	23	24	65
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	20	16	48	21	105
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998*	9	26*	97*	13	145
<b>Total</b>	<b>255 (24.3%)</b>	<b>191 (18.2%)</b>	<b>358 (34.1%)</b>	<b>246 (23.4%)</b>	<b>1050 (100.0%)</b>

\*The total rate of histological types was calculated according to the total number in permanent sections (898 cases) and the calculated pretest odds for each outcome, excluding 16 cases from the study of Wisman *et al.*<sup>(27)</sup>.

**Table 3:** Contingency tables for Lo-SIL, Hi-SIL and cervical cancer

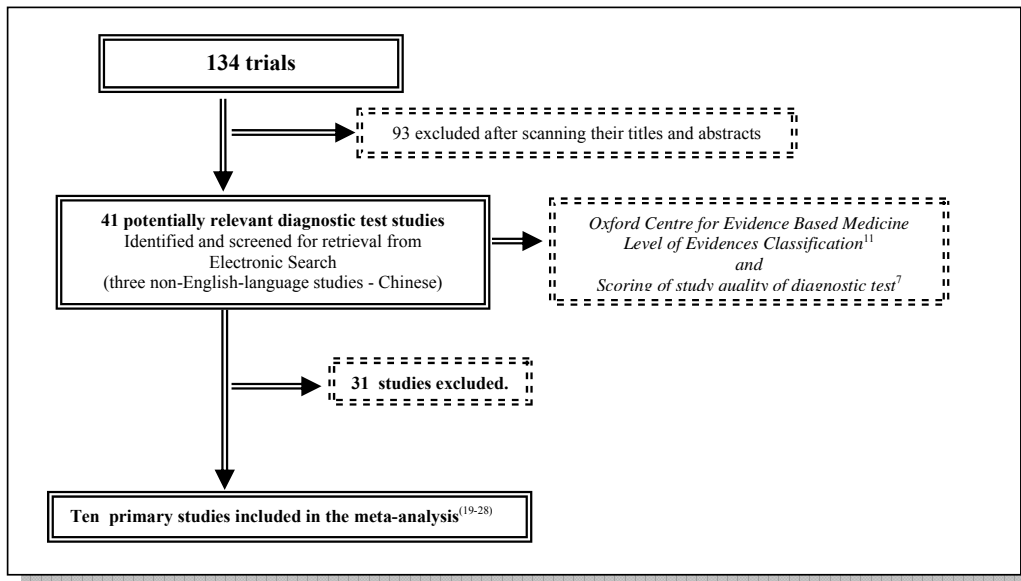
Study	Lo-SIL versus normal or benign cervical lesion			
	False positive	False negative	True negative	True positive
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	5	20	57	7
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	14	4	23	2
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	3	17	13	8
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	1	18	13	2
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	0	3	11	1
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	1	8	27	6
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	9	19	41	24
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	0	10	8	0
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	6	8	14	8
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998	1	23	8	3
<b>Total</b>	<b>40</b>	<b>130</b>	<b>215</b>	<b>61</b>
Study	Hi-SIL versus Lo-SIL and normal and benign lesions			
	False positive	False negative	True negative	True positive
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	12	17	77	19
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	16	12	27	8
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	11	15	30	21
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	3	7	31	11
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	1	12	14	4
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	7	10	35	31
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	33	1	60	22
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	0	17	18	6
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	14	12	22	36
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998*	4	71	31	26
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>174</b>	<b>345</b>	<b>184</b>
Study	Cervical cancer versus Hi-SIL			
	False positive	False negative	True negative	True positive
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	19	1	17	29
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	8	2	12	38
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	21	2	15	21
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	11	3	7	17
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	4	2	12	23
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	31	4	10	25
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	22	0	1	21
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	6	1	17	23
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	36	1	12	20
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998*	26	9	71	4
<b>Total</b>	<b>184</b>	<b>25</b>	<b>174</b>	<b>221</b>
Study	Cervical cancer versus Lo-SIL and normal and benign lesions			
	False positive	False negative	True negative	True positive
Iwasaka <i>et al.</i> , <sup>(19)</sup> 1998	12	1	77	29
Mutirangura <i>et al.</i> , <sup>(20)</sup> 1998	16	2	27	38
Nagai <i>et al.</i> , <sup>(21)</sup> 1999	11	2	30	21
Nair <i>et al.</i> , <sup>(22)</sup> 2000	3	3	31	17
Pao <i>et al.</i> , <sup>(23)</sup> 1997	1	2	14	23
Riethdorf <i>et al.</i> , <sup>(24)</sup> 2001	7	4	35	25
Shroyer <i>et al.</i> , <sup>(25)</sup> 1998	33	0	60	21
Snijders <i>et al.</i> , <sup>(26)</sup> 1998	0	1	18	23
Wang <i>et al.</i> , <sup>(27)</sup> 2004	14	1	22	20
Wisman <i>et al.</i> , <sup>(28)</sup> 1998	4	9	31	4
<b>Total</b>	<b>101</b>	<b>25</b>	<b>345</b>	<b>221</b>

\* In Wisman *et al.*<sup>(27)</sup>, 16 cases were not included in the results due to non-assessable benign lesion (1), Lo-SIL (3) and Hi-SIL (12).

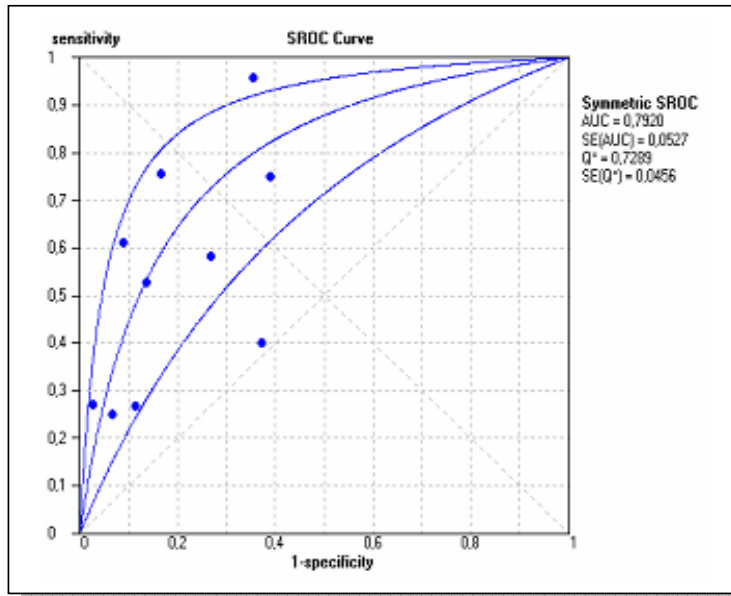
**Table 4:** Accuracy of telomerase for Lo-SIL vs. normal or benign lesion; Hi-SIL vs Lo-SIL, normal or benign lesion; cervical cancer vs Hi-SIL and cervix cancer vs Lo-SIL, normal or benign lesion.

Lo-SIL versus normal or benign cervical lesion				
Study	N	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	DOR (95%CI)
Iwasaka <i>et al.</i> <sup>(19)</sup> 1998	89	0.26 (0.11-0.46)	0.92 (0.82-0.97)	4.0 (1.1-14.0)
Mutirangura <i>et al.</i> <sup>(20)</sup> 1998	43	0.33 (0.04-0.78)	0.62 (0.45-0.78)	0.8 (0.1-5.1)
Nagai <i>et al.</i> <sup>(21)</sup> 1999	41	0.32 (0.15-0.54)	0.81 (0.54-0.96)	2.0 (0.5-9.2)
Nair <i>et al.</i> <sup>(22)</sup> 2000	34	0.10 (0.01-0.32)	0.93 (0.66-1.00)	1.4 (0.1-17.7)
Pao <i>et al.</i> <sup>(23)</sup> 1997	15	0.25 (0.01-0.81)	1.00 (0.72-1.00)	9.9 (0.3-300.4)
Riethdorf <i>et al.</i> <sup>(24)</sup> 2001	42	0.43 (0.18-0.71)	0.96 (0.82-1.00)	20.3 (2.1-193.9)
Shroyer <i>et al.</i> <sup>(25)</sup> 1998	93	0.56 (0.40-0.71)	0.82 (0.69-0.91)	5.8 (2.2-14.7)
Wang <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> 2004	36	0.50 (0.25-0.75)	0.70 (0.46-0.88)	2.3 (0.6-9.2)
Wisman <i>et al.</i> <sup>(28)</sup> 1998	35	0.12 (0.02-0.30)	0.89 (0.52-1.00)	1.0 (0.1-11.5)
<b>Total</b>	<b>428</b>	<b>0.34 (0.27-0.41)</b>	<b>0.84 (0.79-0.88)</b>	<b>3.3 (1.9-5.7)</b>
Hi-SIL versus Lo-SIL and normal and benign lesions				
	N	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	DOR (95%CI)
Iwasaka <i>et al.</i> <sup>(19)</sup> 1998	125	0.53 (0.36-0.70)	0.87 (0.78-0.93)	7.2 (2.9-17.5)
Mutirangura <i>et al.</i> <sup>(20)</sup> 1998	63	0.40 (0.19-0.64)	0.63 (0.47-0.77)	1.1 (0.4-3.4)
Nagai <i>et al.</i> <sup>(21)</sup> 1999	77	0.58 (0.41-0.75)	0.73 (0.57-0.86)	3.8 (1.5-9.9)
Nair <i>et al.</i> <sup>(22)</sup> 2000	52	0.61 (0.36-0.83)	0.91 (0.76-0.98)	16.2 (3.6-74.0)
Pao <i>et al.</i> <sup>(23)</sup> 1997	31	0.25 (0.07-0.52)	0.93 (0.68-1.00)	4.6 (0.4-47.6)
Riethdorf <i>et al.</i> <sup>(24)</sup> 2001	83	0.76 (0.60-0.88)	0.83 (0.69-0.93)	15.5 (5.3-45.6)
Shroyer <i>et al.</i> <sup>(25)</sup> 1998	116	0.96 (0.78-1.00)	0.65 (0.54-0.74)	40.0 (5.2-310.3)
Snijders <i>et al.</i> <sup>(26)</sup> 1998	41	0.26 (0.10-0.48)	1.00 (0.82-1.00)	13.7 (0.7-262.5)
Wang <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> 2004	84	0.75 (0.60-0.86)	0.61 (0.44-0.77)	4.7 (1.8-12.0)
Wisman <i>et al.</i> <sup>(28)</sup> 1998*	132	0.27 (0.18-0.37)	0.89 (0.73-0.97)	2.8 (0.9-8.8)
<b>Total</b>	<b>804</b>	<b>0.51 (0.46-0.56)</b>	<b>0.77 (0.73-0.81)</b>	<b>5.8 (3.2-10.7)</b>
Cervical cancer versus Hi-SIL				
	N	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	DOR (95%CI)
Iwasaka <i>et al.</i> <sup>(19)</sup> 1998	66	0.97 (0.83-1.00)	0.47 (0.30-0.65)	25.9 (3.2-211.5)
Mutirangura <i>et al.</i> <sup>(20)</sup> 1998	60	0.95 (0.83-0.99)	0.60 (0.36-0.81)	28.5 (5.3-152.9)
Nagai <i>et al.</i> <sup>(21)</sup> 1999	59	0.91 (0.72-0.99)	0.42 (0.26-0.59)	7.5 (1.5-36.9)
Nair <i>et al.</i> <sup>(22)</sup> 2000	38	0.85 (0.62-0.97)	0.40 (0.17-0.64)	3.6 (0.8-17.0)
Pao <i>et al.</i> <sup>(23)</sup> 1997	41	0.92 (0.74-0.99)	0.75 (0.47-0.92)	34.5 (5.5-216.0)
Riethdorf <i>et al.</i> <sup>(24)</sup> 2001	70	0.86 (0.68-0.96)	0.24 (0.12-0.40)	2.0 (0.6-7.2)
Shroyer <i>et al.</i> <sup>(25)</sup> 1998	44	1.00 (0.84-1.00)	0.04 (0.00-0.22)	2.9 (0.1-74.3)
Snijders <i>et al.</i> <sup>(26)</sup> 1998	47	0.96 (0.79-1.00)	0.74 (0.52-0.90)	65.2 (7.2-592.8)
Wang <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> 2004	69	0.95 (0.76-1.00)	0.25 (0.14-0.40)	6.7 (0.8-55.1)
Wisman <i>et al.</i> <sup>(28)</sup> 1998*	110	0.31 (0.09-0.61)	0.73 (0.63-0.82)	1.2 (0.3-4.3)
<b>Total</b>	<b>604</b>	<b>0.90 (0.85-0.93)</b>	<b>0.48 (0.43-0.53)</b>	<b>7.8 (3.1-19.?)</b>
Cervical cancer versus Lo-SIL and normal and benign lesions				
	N	Sensitivity (95% CI)	Specificity (95% CI)	DOR (95%CI)
Iwasaka <i>et al.</i> <sup>(19)</sup> 1998	119	0.97 (0.83-1.00)	0.87 (0.78-0.93)	186.1 (23.2-1495.8)
Mutirangura <i>et al.</i> <sup>(20)</sup> 1998	83	0.95 (0.83-0.99)	0.63 (0.47-0.77)	32.1 (6.8-151.1)
Nagai <i>et al.</i> <sup>(21)</sup> 1999	64	0.91 (0.72-0.99)	0.73 (0.57-0.86)	28.6 (5.7-142.8)
Nair <i>et al.</i> <sup>(22)</sup> 2000	54	0.85 (0.62-0.97)	0.91(0.76-0.98)	58.6 (10.6-322.5)
Pao <i>et al.</i> <sup>(23)</sup> 1997	40	0.92 (0.74-0.99)	0.93 (0.68-1.00)	161.0 (13.3-1943.2)
Riethdorf <i>et al.</i> <sup>(24)</sup> 2001	71	0.86 (0.68-0.96)	0.83 (0.69-0.93)	31.3 (8.3-118.3)
Shroyer <i>et al.</i> <sup>(25)</sup> 1998	114	1.00 (0.84-1.00)	0.65 (0.54-0.74)	77.7 (4.6-1323.1)
Snijders <i>et al.</i> <sup>(26)</sup> 1998	42	0.96 (0.79-1.00)	1.00 (0.82-1.00)	579.7 (22.3-15071.0)
Wang <i>et al.</i> <sup>(27)</sup> 2004	57	0.96 (0.79-1.00)	0.61 (0.44-0.77)	31.4 (3.8-261.1)
Wisman <i>et al.</i> <sup>(28)</sup> 1998	48	0.31 (0.09-0.61)	0.89 (0.73-0.97)	3.4 (0.7-16.6)
<b>Total</b>	<b>692</b>	<b>0.90 (0.85-0.93)</b>	<b>0.77 (0.73-0.81)</b>	<b>41.0 (18.3-91.7)</b>

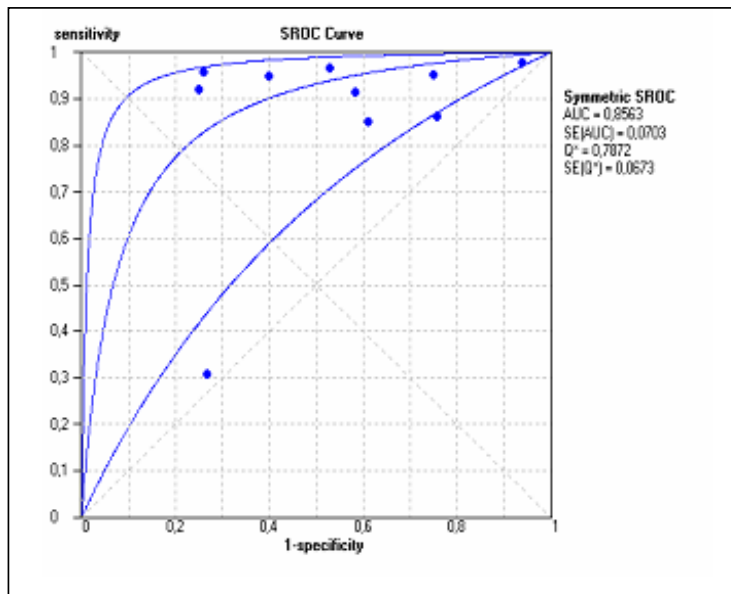
Snijders *et al.*<sup>25</sup> wasThe study was excluded in this analysis of Lo-SIL vs. normal or benign lesion because have two cells had the value “zero”.



**Figure 1:** Study selection process



**Figure 2:** ROC curve Hi-SIL vs. Lo-SIL, normal or benign lesion.



**Figure 3:** ROC curve of cervical cancer vs. Hi-SIL

## 6 CONCLUSÕES E CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Revela-se sobremaneira expressivo o impacto global do câncer de colo uterino causado pelo Papilomavirus humano e, embora seja uma doença evitável, o câncer cervical ainda constitui um grave problema de Saúde Pública mundial, principalmente nos países em desenvolvimento.

Encontramos no arrolamento uma prevalência de 35,3% e no seguimento, incidência de 12,3% de infecção pelo HPV, em estudo de coorte realizado com 501 mulheres assintomáticas. O HPV16 foi o subtipo mais prevalente seguido pelo HPV31. A persistência do HPV foi encontrada em trinta e quatro mulheres estando associada à sexarca inferior aos 21 anos e ter tido quatro ou mais parceiros sexuais na vida, enquanto que a cura esteve associada a realização de exame de Papanicolaou prévio, cor preta e ter PCR-positivo para *C. trachomatis* no arrolamento. Os dois últimos fatores estiveram associados positivamente ( $P < 0,05$ ) com a prevalência do HPV, ou seja, mulheres da cor preta e mulheres com PCR positivo para *C. trachomatis* no arrolamento tiveram mais chances de ter HPV-positivo quando comparadas às de cor não preta e àquelas com *C. trachomatis* negativas. Mais estudos são necessários para esclarecer a associação entre *C. trachomatis* e cor preta com a cura da infecção pelo HPV.

As limitações que devemos considerar em nosso estudo foram devidas ao pequeno número da amostra, analisamos um só seguimento que tiveram o tempo de retorno na maioria das vezes maior do que o protocolo original do estudo, e também que não separamos os subtipos de HPV em alto e baixo risco.



Os nossos achados salientam a importância de aprimorar programas de rastreamento pelo exame de Papanicolaou e educação em saúde na prevenção do câncer cervical com adolescentes, pois o comportamento sexual tem influência na persistência do vírus.

Persistem desafios muito grandes à adequada aplicação das estratégias de prevenção do câncer cervical. Dadas as dificuldades na implementação de programas de rastreamento, que, além das questões técnicas e políticas, esbarram em questões socioculturais e comportamentais.

Os marcadores tumorais são exames que podem auxiliar na detecção precoce de algum câncer. Realizamos uma metanálise inédita, com o objetivo de verificar a acurácia da telomerase em lesões cervicais e nossos dados suportam a corrente hipótese da atividade da telomerase como um evento precoce na carcinogênese e que poderia estar associado com o início e a progressão de lesões cervicais. Os resultados dessa revisão sistemática sobre a acurácia do teste da telomerase nas lesões cervicais poderia contribuir para o estabelecimento da telomerase como um precoce marcador para lesões intraepiteliais de baixo grau, lesões intraepiteliais de alto grau e câncer cervical. Deste modo, a análise da telomerase poderia auxiliar no decréscimo das taxas de diagnósticos falso-negativos em amostras de citologias cervicais.

As limitações da metanálise foram, o pequeno número de artigos incluídos (10 artigos), a baixa qualidade dos mesmos (retrospectivos e não-cegos), heterogeneidade e a possibilidade de falso-negativos do teste para detectar a telomerase em lesões cervicais necróticas ou com sangramento com possíveis inibidores da enzima.

Sabe-se que já é possível a prevenção primária dos tipos mais prevalentes de HPVs, através das vacinas profiláticas contra o HPV, de alta eficácia que poderiam ter, em médio e longo prazos, um impacto real e mais expressivo nas taxas de câncer do colo do útero

(e de lesões pré-malignas). Porém no Brasil, só está disponível na rede privada de saúde. Até o presente momento, o Ministério da Saúde não incluiu esta vacina no calendário anual de vacinação do governo e o principal entrave são os limitados recursos para a saúde e os valores elevados da vacina para HPV. Segundo o ministro da Saúde, José Gomes Temporão, todas as vacinas oferecidas pelo governo custam hoje R\$ 700 milhões por ano. Apenas a vacina contra o HPV, se dada às meninas brasileiras de 9 a 12 anos de idade, custaria R\$ 1,8 bilhão. (Jornal O Estado de S. Paulo, 26/06/2007).

Seria utopia pensar na erradicação do câncer de colo? Talvez não! Precisaria haver parcerias entre organismos internacionais, setores públicos, privados, ONGs, etc, citando o êxito de esforços conjuntos na erradicação de várias doenças no passado, como a poliomielite, se nos comprometermos com o futuro ao vacinar as meninas hoje.

**ANEXOS**

---

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**  
**FACULDADE DE MEDICINA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM EPIDEMIOLOGIA**

**O PAPILOMAVIRUS HUMANO E LESÕES DO COLO UTERINO**

Maria Inês da Rosa

**Projeto de pesquisa**

Orientador:  
Orientadora: Profª. Dra Mary Clarisse Bozzetti

Co-orientador: Prof. Dra Jandyra Fachel

Porto Alegre, 2006.

## REVISÃO DE LITERATURA

O câncer cervical é um dos mais comuns do mundo, sendo responsável por 6% de todas as neoplasias das mulheres. (Parkin, 2001). Cerca de 470 000 novos casos são diagnosticados a cada ano. Aproximadamente 231 000 mulheres morrem anualmente por câncer cervical invasivo, sendo que 80% destas mortes ocorrem em países subdesenvolvidos. (Parkin, 2001). A média de idade para desenvolver o câncer cervical é de 52 anos e a distribuição dos casos é bifásica, com picos entre 35-39 anos e 60-64 anos. (Boring *et al*, 1994).

Nas últimas duas décadas o enigma do câncer cervical começou a ser elucidado e atualmente foi identificada a infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) como seu agente etiológico, transmitido sexualmente. (Franco *et al*, 1999; Bosh *et al*, 2002; Bosh *et al*, 2003; Castellsagué e Muñoz, 2003; van der Graaf, *et al*, 2002). Em 1995 a *International Agency for Research on Cancer* (IARC) avaliou todos os dados relevantes da carcinogênese do HPV e concluiu que existiam evidências suficientes que o HPV16 e HPV18 sejam causadores do câncer cervical. (IARC, 1995).

### **Prevalência da infecção pelo HPV**

Aproximadamente 40% das mulheres sexualmente ativas são infectadas pelo HPV. (Ho *et al*, 1998). A incidência, se literalmente for levado em conta somente os casos novos, é de difícil determinação, devido à dificuldade de saber se a infecção não é recorrente ou reativação de uma fase latente, o termo certo seria incidência presumida (Franco, *et al*, 1999). A relação da incidência e prevalência é mediada pela duração da infecção e indica a

persistência, a qual é a chave prognóstica para a progressão de lesão cervical de alto grau. (Ho *et al*, 1995).

A curva da prevalência está relacionada, na maioria das regiões, com a idade. A baixa prevalência em mulheres mais velhas comparada com as jovens é independente dos hábitos sexuais. Burk *et al* (1996), em estudo de coorte observou que 36% das infecções estavam presentes antes dos 25 anos, e apenas 2,8% acima dos 45 anos. Outro estudo encontrou um pico máximo entre 20-24 anos. (Melkert *et al*, 1993). Numa coorte, de 20 810 mulheres, entre 16 a 94 anos, também se observou o decréscimo com a idade, da infecção pelo HPV (Sherman *et al*, 2003). Porém, na Costa Rica, Herrero *et al* (2000) encontraram uma curva bimodal na prevalência de qualquer tipo de HPV estimada por idade. Observou-se prevalência de 20% até os 25 anos, decrescendo para aproximadamente 5% entre 35-54 anos, tornando a subir para próximo de 20% em mulheres com 65 anos ou mais. A explicação poderia ser reativação de infecções latentes e a possibilidade de alguma falha no sistema imunológico destas mulheres e também infecção pelo HIV. Resultados semelhantes foram encontrados na Espanha e Colômbia (Munhoz *et al*, 1992). Estudo recente também corrobora com esses achados indicando um segundo pico de infecção pelo HPV entre mulheres hispânicas. (Giuliano *et al*, 2005).

No Brasil o HPV 16 é o tipo predominante nos cânceres cervicais invasivos nas regiões sul, central, nordeste, norte e sudeste, 52%, 57%, 59%, 43,5% e 52,25 respectivamente, os outros tipos observa-se variações regionais, dos HPV 18,31 e 33, sendo que na maioria das regiões o segundo mais prevalente é o HPV18, com exceção da região central que predomina o HPV33 e na região nordeste o HPV31 ficou em segundo lugar na prevalência. (Lorenzato *et al*, 2000; Rabelo-Santos *et al*, 2003; Cavalcanti *et al*, 2000; Noronha *et al*, 1999; Bosch *et al*, 1995).

A identificação de tipos específicos de HPV nas diferentes regiões tem implicações para prevenções estratégicas, inclusive na aplicação da vacina que em breve começará ser usada no Brasil.

### **Transmissão e aquisição**

A aquisição da infecção cervical pelo HPV é o principal precursor de uma série de eventos que leva ao câncer cervical e tem sido exaustivamente documentado por estudos epidemiológicos e experimentais durante os últimos 15 anos. Apenas a infecção pelo HPV não é capaz de levar a uma transformação maligna, sendo que a história natural das mulheres com diagnóstico de lesões precursoras de baixo grau é caracterizada por regressão espontânea e apenas pequena percentagem persiste e evolui para câncer. (Wright *et al*, 2003).

O vírus HPV pode ser transmitido por contacto direto dos órgãos genitais durante a prática sexual, por relações anais, que podem resultar em infecções virais e neoplasias anais, e ocasionalmente pelo sexo oral. (Ford *et al*, 2003).

### **Persistência e cura**

Devem ser levados em conta os fatores relacionados ao hospedeiro e ao vírus. Sabe-se que os HPVs oncogênicos são importantes na persistência e progressão, especialmente o HPV 16, seguido pelo HPV 18. (Hildeshein e Wang, 2002). Alguns estudos têm demonstrado associação entre a carga viral e aumento de câncer cervical. (Sherman *et al*, 2002; Sherman *et al*, 2003; Schiffman *et al*, 2000; Ylitalo *et al*, 2000). A integração do HPV

parece ser um evento também importante na carcinogênese. Durante o processo de replicação viral os genomas que estão mantidos de forma episossomal passam em algum momento integrar o genoma da célula do hospedeiro levando a alterações morfológicas da célula, alterando seu controle do ciclo celular levando a lesões precursoras. (Klaes *et al*, 1999). Os fatores ligados ao hospedeiro compreendem a resposta imune individual: imunidade humoral, imunidade celular, imunidade inata e suscetibilidade genética. (Wang e Hildeshein, 2003).

A persistência pode ser definida como a detecção de um mesmo tipo de HPV duas ou mais vezes em um certo período, não havendo consenso de quanto tempo seria esse período (Schiffman e Kjae 2003). A média seria de 6-12 meses (HO, 1998), sendo que o HPV oncogênico tipo 16 persiste por um período maior. (Liaw *et al*, 2001; Franco *et al*, 1999; Molano *et al*, 2003). Recentes estudos evidenciaram que a regressão da infecção pelo HPV está relacionada a alguns mecanismos imunológicos tanto humoral (Bontkes *et al*, 1999) como mediado por células. (De Gruijl *et al*, 1998). Fatores nutricionais também parecem estar relacionados ao tempo de cura. Sedjo, et al (2003) concluíram que altas concentrações de trans e cis- licopeno reduzem significativamente o tempo de cura da infecção pelo HPV oncogênicos. A persistência da infecção é um preditor para a neoplasia cervical intra-epitelial, particularmente entre os HPH tipo 16 e 18. (Schlecht, *et al*, 2001).

### **Progressão para câncer cervical**

Ambos os tipos de HPVs oncogênicos e não oncogênicos podem causar lesões intra-epiteliais escamosas de baixo grau, na cérvix uterina. Porém em mulheres com lesões intra-epiteliais escamosas de alto grau e câncer cervical geralmente são positivas para os HPVs oncogênicos. (Baseman e Koutsky, 2005). Aproximadamente 70 % dos cânceres



cervicais são causados pelo HPV 16 ou 18 (Muñoz *et al*, 2003) e 90% das verrugas vulvares são causadas pelos HPVs tipo 6 ou 11. (Greer *et al*, 1995).

Num estudo em que foram arroladas 20.810 mulheres foram calculadas as taxas de incidência cumulativa no intervalo de 122 meses para o risco de NIC III ou mais, sendo encontrado 17,2% (11,2%-22,9%) para mulheres com HPV16+; 13,6% (3,2%-23,7%) para mulheres HPV18+ e HPV18- e somente 3,0% (1,9%-4,2%) em mulheres com outros tipos de HPV que não o HPV16 ou HPV18. Das mulheres HPV - a incidência cumulativa foi de 0,8% (0,6%-1,1%). Concluindo-se que a distinção entre HPV 16 e HPV 18 de outros tipos poderia identificar as mulheres com alto risco para desenvolver NIC III ou mais (Khan *et al*, 2005).

## **2. Telomerase e câncer cervical**

O mecanismo de ativação da telomerase tem sido bastante estudado, principalmente vinculado a tumores. Atualmente sabe-se que o gene viral E6 do HPV-16, além de promover a degradação da proteína p53, responsável pela apoptose celular (DeFilippis, *et al*, 2003), promovem também, de forma independente um aumento da atividade da telomerase (Veldman *et al*, 2003), sugerindo que a ativação da telomerase pela proteína E6 é p53- independente (Klingelutz *et al*, 1996; McDougall, 2001, Horner, *et al*, 2004), mas os fatores envolvidos neste processo não estão bem elucidados (McMurray e McCance, 2003<sup>1</sup>). Há uma relação entre os oncogenes sobre o Myc, responsável pela transcrição do RNA mensageiro da subunidade catalítica. Em queratinócitos observou-se que quando havia a amplificação da expressão do gene Myc, a telomerase era ativada, facilitando a formação tumoral (Wang *et al*, 1998). Estudos estão sendo realizados também com o foco de tratamento com inibidores da atividade da telomerase. (Yokoyama *et al*, 2004).

A detecção de telomerase em tecidos e/ou células cervicais de câncer ou de lesões precursoras de câncer de colo uterino tem sido mundialmente estudada por vários pesquisadores, a partir de 1996 (Zheng *et al*, 1997; Zheng *et al*, 2000; Yashima *et al*, 1998; Anderson *et al*, 1997; Nakano *et al*, 1998; Mitirangura *et al*, 1998; Wisman *et al*, 1998; Snijders *et al*, 1999; Kawai *et al*, 1998; Maláska *et al*, 2004; Zhang *et al*, 1999; Nair *et al*, 2000; van Duin *et al*, 2003; Park *et al*, 2003; Reesink-Peters *et al*, 2003; Reddy *et al*, 2001; Riethdorf *et al*, 2001; Wisman *et al*, 2000; Herbsleb *et al*, 2001; Cheah *et al*, 2002), embora no Brasil ainda não exista nenhum trabalho publicado explorando essa associação.

**ARTIGO 1****Persistência do Papilomavírus humano em uma coorte de mulheres  
assintomáticas****Persistence of human Papillomavirus: a cohort study of asymptomatic women****Autor:** Maria Inês da Rosa, MD, MSc<sup>(1)</sup>

E-mail:

mir@unesc.net

**Co-autores:**Mary Clarisse Bozzetti, MD, PhD<sup>(1,2,3)</sup>Jandyra Fachel, PhD<sup>(1)</sup>

Afiliações dos autores:

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil<sup>3</sup>**Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil.****Autor:** Maria Inês da Rosa, MD, MSc<sup>(1)</sup>

E-mail: mir@unesc.net

## 1 Introdução

A infecção pelo Papilomavírus humano (HPV) está bem estabelecida como causa necessária, mas não suficiente do câncer cervical (Walboomers, *et al*, 1999; Ferenczy, Franco, 2002). Geralmente é uma infecção transitória, com regressão espontânea não resultando lesões cervicais ou levando a lesão cervical de baixo grau (Ho, *et al*, 1995; Franco, *et al*, 1999)

Vários co-fatores têm sido associados com o desenvolvimento do câncer cervical invasivo, como: paridade, uso de contraceptivo oral, tabagismo, imunossupressão, particularmente relatado em pacientes com vírus da imunodeficiência humana (HIV), infecções com outras doenças sexualmente transmissíveis, e deficiência nutricional (Hildeshein, *et al*, 2001; Muñoz, *et al*, 2002; Castle, *et al* 2001; Goodman, *et al*, 1998, Brock, *et al*, 1998, Palan, *et al*, 1996). A idade da sexarca, número de parceiros sexuais, história de DSTs e outras características de atividade sexual estão ligadas ao processo de adquirir o vírus HPV e não são considerados co-fatores para a progressão da infecção pelo vírus (Rousseau, *et al*, 2003)

A persistência da infecção pelo HPV parece ser um pré-requisito para o desenvolvimento de neoplasia intra-epitelial de alto grau (Ho, *et al*, 1995; Schelecht, *et al*, 2001). Os fatores virais, do hospedeiro e fatores ambientais podem influenciar no curso da infecção do HPV (Hildeshein, Wang, 2002).

O objetivo desse estudo foi de verificar os determinantes da aquisição, persistência e regressão da infecção pelo Papilomavírus humano, em mulheres do sul do Brasil.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Descrever as características associadas a infecção pelo Papilomavírus humano e evolução dessa infecção num mínimo de seis meses após o diagnóstico inicial.

### **2.2 Objetivos específicos**

1. Estimar a prevalência e incidência do HPV e de seus subtipos.
2. Avaliar a taxa de persistência, aquisição e regressão da infecção pelo Papilomavírus humano.
3. Avaliar as associações das variáveis estudadas (demográficas, reprodutivas e de comportamento sexual) com os desfechos.

## **3. Material e Métodos**

### **Delineamento da Pesquisa**

Estudo de coorte

### **Amostragem**

A população em estudo são todas as mulheres pertencentes à área geográfica de abrangência da Unidade de Saúde Jardim Leopoldina, Porto Alegre, que tenha iniciado vida

sexual, não tenha diagnóstico prévio de câncer de colo uterino, não tenha sido hysterectomizada e concordarem em participar do estudo,” projeto-mãe”: “A Distribuição de Papilomavírus Humanos Oncogênicos e sua associação com lesões do colo uterino” que vem sendo realizada desde fevereiro de 2003.

Até agosto de 2006 já haviam sido arroladas 1500 mulheres que realizaram o PCR para HPV.

### **Amostra**

Comporão a amostra desse estudo mulheres incluídas nessa coorte em andamento, que tiveram seu primeiro retorno até agosto de 2006.

### **Variáveis**

Dependente:

Infecção pelo Papilomavírus humano

Persistência (+ +)

Regressão (+ -)

Nova infecção (- +)

Não infecção (- -)

Independentes:

Variáveis demográficas (idade, escolaridade, renda)

Variáveis reprodutivas (menarca, gestações, filhos vivos, abortos, uso contraceptivos orais)

Variáveis de comportamento sexual (sexarca, parceiros sexuais, história de DSTs,)

## Tabagismo

### Análise estatística:

Serão realizadas análises descritivas de todas as variáveis. Serão utilizadas médias para variáveis quantitativas e porcentagens para variáveis qualitativas.

Duas propostas:

1. Fazer análise de sobrevida, utilizando Kaplan-Meier, dividindo-se em dois estratos:

As mulheres que iniciam positivas [(+ +) e (+ -)], considerando-se o negativo como a falha.

As mulheres que iniciam negativas [(- +) e (- -)], considerando-se o positivo como a falha

2. Regressão logística multinomial

Categorizar-se-á em 4 categorias:

HPV+	HPV+	(+ +)
HPV+	HPV-	(+ -)
HPV-	HPV+	(- +)
HPV-	HPV-	(- -)

(- -) referência

O método estatístico usado para investigar a influência de determinantes na infecção pelo HPV é um modelo multinomial para eventos discretos de riscos competitivos

(multinomial logist model for discrete-time competing risk events). Várias razões podem ser apontadas para justificar o uso de tal modelo (Hachen Jr, 1988; Yamaguchi, 1991).

A regressão logística multinomial ou modelo logístico politômico é uma generalização do modelo logístico binário. Enquanto que na regressão logística binária a variável resposta tem duas categorias, na logística multinomial a variável resposta tem mais de duas categorias.

Na análise da evolução da situação do HPV, dividiu-se em quatro categorias (+ -) (+ +) (- +) e (- -), sendo a última a categoria de referência. A primeira categoria significa mulheres com HPV+ no início do estudo e no retorno, a segunda, mulheres HPV+ no início e HPV- no retorno e a terceira HPV- no início que se tornou HPV+ no retorno. A quarta categoria representa a não ocorrência de nenhum dos eventos, ou seja, a mulher era HPV- no início e continua HPV- no retorno, sendo esta a categoria de referência. Para a estimação dos parâmetros utilizar-se-á o pacote SPSS13.0 .

### **Procedimentos utilizados na coorte em andamento**

Após serem arroladas, as participantes responderam questionário epidemiológico e tiveram amostras de cérvix uterina coletadas e examinadas para citologia convencional e para a testagem do HPV-DNA através dos métodos da Reação em Cadeia da Polimerase.

As participantes do estudo que apresentam alterações ao exame clínico e/ou citológico realizam colposcopia e biópsia de colo uterino quando indicado.

As mulheres com resultados positivos ao DNA do HPV são acompanhadas com frequência semestral para verificar a presença de alterações citológicas do colo uterino e sua evolução na tentativa de relacioná-las com os HPVs oncogênicos, em especial os tipos 16 e



18. As mulheres que foram diagnosticadas com alterações citológicas que necessitem tratamento imediato (NIC II, III, câncer *in situ*, câncer invasor) foram encaminhadas para o Serviço de Ginecologia do Hospital Conceição (HC) ou Hospital Femina (ambos do Grupo Hospitalar Conceição) para realizar os procedimentos indicados. As alterações citológicas do tipo “células escamosas de significância indeterminada” (ASCUS) ou com neoplasia intra-epitelial cervical de baixo grau (NIC I) tiveram vigilância semestral para acompanhamento da lesão.

O diagnóstico molecular do HPV a para a identificação dos subtipos específicos da amostra de mulheres positivas para o HPV foi realizada através do método da PCR no Laboratório Central de Saúde Pública – IPB-LACEN/RS da Fundação Estadual de Produção e Pesquisa em Saúde (FEPPS), da Secretaria de Saúde do Estado do Rio Grande do Sul. Através do método da PCR para verificar as mulheres HPV-DNA positivas e, entre estas aquelas com os subtipos 16 e 18 e outras através da análise de seqüências da região longa e por hibridização (*dot plot*) dos genes E6 e L1.

As lâminas com esfregaço para citologia e as biópsias foram processadas e analisadas junto ao laboratório de patologia do Hospital Nossa Senhora da Conceição. Além da leitura do laboratório em questão, todas as lâminas foram revistas por um leitor independente sem conhecimento prévio do diagnóstico dado pelo laboratório e com experiência neste tipo de leitura, com o objetivo de verificar a concordância no diagnóstico citológico. A classificação citológica utilizada foi a do Sistema de Bethesda. As colposcopias foram realizadas por profissionais médicos do HC com experiência neste procedimento diagnóstico com agendamento prévio específico e de frequência mensal para as participantes do estudo que tiverem indicação para a realização de tal exame. Foram indicadas para colposcopia as participantes do estudo que apresentarem achados citológicos (ASCUS ou +) e/ou forem HPV-DNA positivas.

A coleta de dados epidemiológicos (variáveis demográficas, de vida reprodutiva, de comportamento sexual e morbidades progressas) foi realizada através de um questionário padronizado e por entrevistadores treinados quando da entrada das participantes no estudo (Anexo 1). Um manual de preenchimento foi desenvolvido após a realização de um estudo piloto para adequação do instrumento.

A coleta de dados ocorreu junto à Unidade Jardim Leopoldina e foi realizada em um dia da semana (sexta-feira: manhã e tarde) em um consultório especificamente designado pela chefia da unidade para este fim. A coleta iniciou em fevereiro de 2003.

### **Técnica do PCR**

A técnica de PCR para o diagnóstico de HPV foi anteriormente descrita por Bauer *et al* (1993) e Coutlée *et al* (2002).

As amostras para a pesquisa de HPV-DNA e CT-DNA foram coletadas na Unidade de Saúde de Atenção Primária do Posto Jardim Leopoldina, utilizando-se escova do tipo “*cytobrush*” e estocadas à temperatura de -20°C em 2 ml de tampão TE (10mM Tris-HCl pH 8,5; 1mM EDTA) até a extração do DNA. O transporte das amostras foi realizado em condições de baixas temperaturas (-20°C).

Após descongelamento, as amostras foram submetidas à extração de DNA através de solução Proteinase K/TE-50 (200 µg/ml de proteinase K ‘DNase/RNa free’ Gibco, 2% Tween 20, 1mM EDTA, 10mM Tris-HCl pH 8,5) e deixadas em banho-maria por 18 horas. Após inativação a 94°C durante 10 min, 5µL de cada amostra desproteinizada foi submetida à amplificação por PCR (19, 20, 21). Para a detecção do HPV, utilizou-se como *primers*

*consensus* os seguintes oligonucleotídeos degenerados, complementares à região L1 do genoma viral do papilomavírus humano (1, 2, 20, 22, 23):

My 09 5'... CGT CC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> AA<sup>A</sup>/<sub>G</sub> GGA <sup>A</sup>/<sub>T</sub>AC TGA TC... 3'

My 11 5'... GC<sup>A</sup>/<sub>C</sub> CAG GG<sup>A</sup>/<sub>T</sub> CAT AA<sup>C</sup>/<sub>T</sub> AAT GG... 3'

As reações foram realizadas em volume final de 50 µL, contendo 2,5U da enzima *Taq* DNA polimerase (Invitrogen), *primers* na concentração de 50ng/µL cada, 3,0 mM de MgCl<sub>2</sub>, 200µM de cada DNTP (Invitrogen), 10mM de Tris-HCl pH 8,3, 50mM de KCl, 5µL de DNA e H<sub>2</sub>O q.s.p.

As seguintes condições foram utilizadas para amplificação em aparelho termociclador MJ Research PTC 96: 95°C por 13 min, para desnaturação; 40 ciclos subsequentes de 95°C por 1 min, 55°C por 1 min, 72°C por 1 min, para amplificação; 72°C por 5 min, para extensão final; 4°C para estoque dos produtos amplificados.

Os produtos de PCR foram analisados em géis de agarose 2,0%, em tampão TBE (Tris Ácido Bórico mais Ácido Etileno Diamino Tetraacético), contendo 0,5µg/ml de brometo de etídio, sob luz ultravioleta e comparados a um controle positivo de reação da PCR. As amostras que apresentaram um fragmento à mesma altura do controle positivo foram consideradas amostras positivas e as amostras que comparadas ao mesmo controle positivo da reação de PCR, e não apresentaram nenhum fragmento, foram consideradas como amostras negativas para o DNA de HPV. Nesta técnica foi utilizado um controle de reação negativo, que ao ser visualizado em gel de agarose, observou-se que as reações não estavam contaminadas, apresentando confiabilidade nos resultados. Um controle interno de reação, *primers β-globina*, foi utilizado para verificarmos a integridade do DNA extraído. Para a tipagem de HPV tipos 16, 18, 31 e 33 foram utilizados *primers* específicos para estes subtipos

**Dificuldades**

Entre as dificuldades do projeto podem ser destacados a adesão da população nos retornos para a coleta de material, tendo sido até 2005 retornos espontâneos e a partir de 2006 buscas ativa.

**Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição em 15 de janeiro de 2003, protocolo número 112/2002.

**ARTIGO 2****Acurácia da telomerase em lesões cervicais: uma revisão sistemática.****Accuracy of telomerase in cervical lesions: a systematic review**

**Autor:** Maria Inês da Rosa, MD, MSc<sup>(1)</sup>

E-mail:

mir@unesc.net

**Co-autores:**

Lidia Rosi Medeiros, MD, MSc<sup>(1)</sup>

Mary Clarisse Bozzetti, MD, PhD<sup>(1,2,3)</sup>

Jandyra Fachel, PhD<sup>(1)</sup>

Eliana Wendland, MD, MSc<sup>(1)</sup>

Roselaine Ruviaro Zanini, MSc<sup>(1)</sup>

Anaelena Bragança de Moraes, MSc<sup>(1)</sup>

Daniela Dornelles Rosa, MD, PhD<sup>(2)</sup>

Afiliações dos autores:

<sup>1</sup>Programa de Pós-graduação em Epidemiologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil

<sup>2</sup> Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas da da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil

<sup>3</sup>Departamento de Medicina Social, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto, Alegre Brasil

## **1 Introdução**

A telomerase é um complexo ribonucleoproteico que sintetiza o DNA telomérico e contribui para a manutenção dos telômeros (Greider, 1999; Kim *et al*, 1994). A atividade dessa enzima está frequentemente aumentada em tecidos cancerosos quando comparados aos tecidos normais (Ahmed, et al, 2003). Revisões indicam que a atividade da telomerase está aumentada na maioria dos cânceres cervicais escamosos. Avanços na biologia molecular dos telômeros e expressão da telomerase poderá contribuir tanto como diagnóstico, prognóstico ou para propor um tratamento para o câncer de colo uterino com substâncias inibidoras de telomerase(Lijmer, 1997).

Será realizada, uma revisão sistemática quantitativa para determinar a acurácia da telomerase no diagnóstico das lesões pré-cancerosas escamosas do colo e no câncer de colo uterino invasor.

## **2 Objetivos**

### **2.1 Geral**

Determinar a acurácia da telomerase no diagnóstico das lesões pré-cancerosas escamosas do colo e no câncer de colo uterino invasor.

### **2.2 Específico**

Proceder uma revisão sistemática de estudos com enfoque diagnóstico, para avaliar a atividade da telomerase em lesões pré-neoplásicas e câncer cervical.

### 3 Métodos

#### 3.1 Estratégias de busca

A pesquisa será realizada de maneira sistemática, no período de 1990 até fevereiro de 2007, nos bancos de dados do *Medline* (Ovid e PubMed), *Embase*, *Lilacs* e da *Cochrane Library*. Serão utilizadas as seguintes palavras chaves para busca: “*Cervix neoplasm*”, “*Human papilloma virus*”, “*Cervix Cancer*” e “*Cervix Diseases*”, “*Dysplas\**”, “*Papillomavirus\**”, “*PapillomVirus\**” e “*telomerase*”, combinando com termos de diagnóstico (“*sensitivity and specificity*”). O símbolo “\*” difere em cada banco de dados e permite recuperar todas as variações com sufixos das palavras de origem. A pesquisa será limitada para humanos e sexo feminino, mas não haverá restrição de idioma.

##### 3.1.1 Estratégia de busca no MEDLINE (PubMed)

“sensitivity and specificity” [all fields]  
 “sensitivity and specificity/standards” [all fields]  
 “specificity” [all fields]  
 “screening” [all fields]  
 “false positive” [all fields]  
 “false negative” [all fields]  
 #1 OR #2 OR #3 OR #4 OR #5 OR #6  
 “accuracy” [all fields]  
 “predictive value” [all fields]  
 “predictive value of tests” [all fields]  
 “reference value” [all fields]  
 “reference values” [all fields]  
 “reference values/standards” [all fields]  
 #7 OR #8 OR #9 OR #10 OR #11 OR #12 OR #13  
 “roc” [all fields]  
 “roc analysis” [all fields]  
 “roc and” [all fields]  
 “roc area” [all fields]  
 “roc auc” [all fields]  
 “roc characteristics” [all fields]

“roc curve” [all fields]  
 “roc curve method” [all fields]  
 “roc curves” [all fields]  
 “roc estimated” [all fields]  
 “roc evaluation” [all fields]  
 “likelihood ratio” [all fields]  
 #16 OR #17 OR #18 OR #19 OR #20 OR #21 OR #22 OR #23 OR #24 OR #25  
 OR #26  
 #14 OR #27  
 cervix neoplasms [mh]  
 Cervix Cancer [mh]  
 cervi\* [tw] AND dysplas\* [tw]  
 #29 OR #30 OR #31  
 telomerase [mh]  
 #32 AND #33  
 28# AND #34

RESTRINGIR A PARTIR DE 1990  
 SOMENTE ESTUDOS EM HUMANOS  
 MULHERES

### 3.1.2 Estratégia de busca no EMBASE

sensitivity AND specificity  
 sensitivity AND specificity\$ ADJ5 standards  
 specificity  
 screening  
 false ADJ5 positive  
 false ADJ5 negative  
 1 OR 2 OR 3 OR 4 OR 5 OR 6  
 accuracy  
 predictive ADJ5 value  
 predictive ADJ value ADJ5 tests  
 reference ADJ5 value  
 reference ADJ5 values  
 reference ADJ5 values\$ ADJ5 standards  
 8 OR 9 OR 10 OR 11 OR 12 OR 13  
 roc  
 roc ADJ5 analysis  
 roc ADJ5 area  
 roc ADJ5 auc  
 roc ADJ5 characteristics  
 roc ADJ5 curve  
 roc ADJ5 curve ADJ method  
 roc ADJ5 curves  
 roc ADJ5 estimated



roc ADJ5 evaluation  
 likelihood ADJ5 ratio  
 16 OR 17 OR 18 OR 19 OR 20 OR 21 OR 22 OR 23 OR 24 OR 25 OR  
 7 OR 14 OR 27  
 exp cervix neoplasms/  
 exp Cervix Cancer/  
 (cervi\$ adj5 tumo\$).tw  
 (cervi\$ adj5 neoplasm\$).tw.  
 (cervi\$ adj5 cancer).tw.  
 (cervi\$ adj5 carcino\$).tw.  
 (cervi\$ adj5 dysplas\$).tw.  
 (cervi\$ adj5 Papillomavirus\$).tw.  
 (cervi\$ adj5 Papovavirida).tw.  
 #28 OR #29 OR #30 OR #31 OR #32 OR #33 OR #34 OR #35 OR #36  
 telomerase.ti,ab,hw,tw.  
 #37 and #38  
 #27 AND #39  
 nonhuman/  
 animal/ not (human/and animal/)  
 #41 OR #42  
 40 not 43

### 3.1.3 Estratégia de busca na Cochrane Library e LILACS

Telomerase cervical cancer (and)

Telomerase HPV (and)

### 3.2 Critérios de seleção dos estudos

Esta revisão focalizará estudos observacionais prospectivos nos quais serão comparados os resultados do teste diagnóstico de interesse (telomerase) com os resultados de um padrão de referência.

### 3.2.1 Critérios de inclusão dos estudos

Para critérios de inclusão, em cada estudo será necessário que o exame histopatológico tenha uma das seguintes patologias descritas: neoplasia intra-epitelial e carcinoma invasor de colo uterino de acordo com a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia (FIGO, 2002). O teste diagnóstico da atividade da telomerase será comparado com o diagnóstico de referência resultado anatomopatológico das biópsias. O teste será considerado positivo ou negativo comparativamente ao padrão-ouro. O critério de inclusão será que cada estudo tenha anatomopatológico e que descreva os casos de achados normais ou lesões benignas, lesões de baixo grau, lesões de alto grau e câncer cervical. O diagnóstico positivo da atividade da telomerase na neoplasia intra-epitelial e câncer cervical será comparada de quatro formas: (1) LIEBG *versus* normais ou lesões cervicais benignas, (2) LIEAG *versus* LIEBG, (3) câncer cervical *versus* LIEBG normais ou lesões cervicais benignas e (4) câncer cervical *versus* LIEAG. O desfecho primário medirá a acurácia do diagnóstico de LIEBG e normal ou lesões cervicais benignas, LIEAG e câncer cervical. O desfecho secundário será a distribuição do tipo histológico obtido por biópsia, de neoplasia intra-epitelial e câncer cervical.

Os estudos revisados serão identificados independentemente por cinco investigadores (M.I.R., L.R. M, E.W e D.D. R.). A inclusão final ou exclusão dos estudos serão feitas de acordo com uma lista de critérios de seleção (*checklist*). Discordâncias sobre inclusão ou exclusão de estudos serão resolvidas inicialmente por consensos, e quando isto não for possível, eles serão resolvidos através de um sexto revisor (M.C. B). As análises estatísticas serão realizadas por revisoras (R.R.Z, A.B.M e J.F). As estatísticas de concordância serão computadas entre os revisores.

### **3.2.2 Critérios de exclusão dos estudos**

Serão excluídos estudos em que não seja possível construir tabela de contingência 2 x 2. Casos em que haja incerteza diagnóstica no exame de parafina, e estudos com nível 4 e 5 conforme *Oxford Evidence Levels*

### **3.3 Tipo de participantes**

#### **3.3.1 Critérios de inclusão**

Os estudos selecionados serão de mulheres tratadas cirurgicamente com lesões suspeitas no colo uterino para neoplasia intra-epitelial e câncer de colo uterino e que haviam sido submetidas a exame de colposcopia prévio. O teste diagnóstico será análise da presença de telomerase (positiva ou negativa) e a referência diagnóstica será o resultado posterior da análise histológica em parafina.

### **3.4 Avaliação de qualidade dos estudos**

Todos os artigos encontrados serão avaliados conforme os critérios de elegibilidade de qualidade metodológica. Esta avaliação envolve examinar cada estudo conforme as características da população de pacientes, o teste diagnóstico e o padrão de referência (Lijmer, 1999; Jaeschke, 1994; Bossuyt, *et al*, 2003; Cochrane, 2004).

Estas características incluem os métodos de coleção de dados e seleção de paciente, a descrição do método da pesquisa da expressão de telomerase e o padrão de referência histológico, com verificação de viés dentro de cada estudo (Jaeschke, 1994; Bossuyt, *et al*, 2003).

A avaliação de qualidade dos estudos incluídos será sumarizada através do escore de qualidade de cada estudo encontrado na Tabela 1 (Lijmer, 1999). A qualidade metodológica de cada estudo será verificada ainda conforme a classificação de evidência do *Oxford Centre for Evidence Based Medicine Level of Evidences Classification* (Phillips, 2004).

Somente estudos com enfoque diagnóstico considerados com alto nível de evidência (entre 1 e 3) conforme *Oxford Evidence Levels* serão incluídos, enquanto os com nível 4 e 5 serão excluídos (Phillips, 2004).

### **Abstração de dados**

Cinco investigadores de forma independente (M.I.R, L.R.M, E.W e D.D.R) abstrairão os dados de prevalência do HPV e da expressão de telomerase nas lesões de baixo grau, alto grau e câncer cervical

A avaliação dos artigos em inglês será executada por três revisoras (M.I.R, L.R.M, D.D.R), enquanto que a avaliação de artigos publicados em idiomas diferentes do inglês será executada de forma independentemente por dois outros revisores (M.C.B, D.D.R) sendo a tradução realizada quando necessário.

Qualquer discordância será resolvida por consenso tanto para artigos em inglês como em outro idioma. Os principais desfechos diagnósticos considerados serão: normal ou

lesões benignas, lesão intra-epitelial de baixo grau, lesão intra-epitelial de alto grau e câncer cervical. Lesões com baixo grau serão comparadas com normal ou lesões cervicais benignas e foi considerada como controle.

Os cálculos estatísticos serão realizados com programa de computador Meta-DiSc próprio para evoluir testes diagnósticos (Zamora, *et al*, 2003).

### **Síntese de dados e Análise Estatística**

Para avaliação da concordância entre a elegibilidade de cada estudo e a qualidade metodológica, assim como também a concordância da expressão da telomerase e o resultado histológico na parafina, será calculada a porcentagem observada de concordância através do coeficiente Kappa ( $\kappa$ ) (Altman, 1999). A tabela de contingência 2 x 2 será construída em cada estudo selecionado, nas quais todos os resultados das biopsias serão classificados em LIEAG, LIEBG e carcinoma cervical invasor. Serão calculadas as taxas de verdadeiros positivos, as taxas de falsos Quando na tabela de contingência houver alguma célula contendo “0”, será adicionado 0,5 a cada uma das células, viabilizando os cálculos, quando houver mais de duas células com zero este estudo será excluído.

Para produzir uma estimativa combinada da sensibilidade e especificidade dos estudos será realizada uma metanálise.

As estimativas combinadas serão calculadas com uma média ponderada. Os estudos individuais encontrados serão ponderados pelo tamanho da amostra. O intervalo de confiança de 95% para a média de pesos será calculado usando o método exato. A associação entre a sensibilidade e a especificidade será calculada com o coeficiente de correlação de Spearman para normal ou lesão benigna, LIEBG, LIEAG e câncer cervical (Altman, 1999)

A odds ratio diagnóstica (DOR) será utilizada para relatar as diferentes combinações de sensibilidade e especificidade. A DOR é uma medida para discriminar o poder do teste diagnóstico: a razão de odds de teste positivo entre doentes e o odds do teste positivo entre os não-doentes.

$$\text{DOR} = \frac{\text{sensibilidade} / (1 - \text{sensibilidade})}{(1 - \text{especificidade}) / \text{especificidade}}$$

A heterogeneidade das sensibilidades e especificidades dos diferentes estudos será analisada através do teste de Cochran ( $Q_T$ ) pela distribuição do  $\chi^2$  com N-1 graus de liberdade. No caso de correlação, uma curva ROC combinada (*receiver operating curve*) será gerada usando dados de todos os limiares, usando o método de Littenberg e Moses (Deeks, *et al*, 2001).

### **Análise de Sensibilidade**

A fim de avaliar se a qualidade metodológica afetará a precisão diagnóstica serão excluídos estudos com menos de 50% de critérios de qualidade para estudos com enfoque diagnóstico (Lijmer, 1999) e aqueles que estejam abaixo do nível 3 do *Oxford Centre for Evidence Based Medicine Level of Evidences Classification* (Phillips 2004).

A robustez dos resultados será testada repetindo a análise com um modelo estatístico diferente (modelo de efeitos randômicos) (Deekes, *et al*, 2001; Sutton, *et al*, 2000). O programa computacional estatístico utilizado será o Meta-DiSc® (version Beta 1.1.1). Dois revisores (R.R.Z, A.B.M) reproduzirão os testes.

**Cronograma**

ATIVIDADE	PERÍODO
Revisão da literatura	Março 2005/julho 2006
Apresentação do ante-projeto	Setembro/2005
Revisão do ante-projeto e apresentação do projeto	Agosto de 2006
Preparação do banco de dados	Agosto/2006-Setembro 2006
Análise estatística dos dados e interpretação dos resultados	Setembro2006-Outubro 2006
Exame de Qualificação	Julho/Agosto/2006
Elaboração dos artigos e da tese	Até junho 2007
Encaminhamento da tese ao PPGE	Julho/2007
Defesa da tese	setembro/2007

**ORÇAMENTO TOTAL DO ESTUDO**

1. Material de Consumo: US\$ (23/07)  
(US\$ 1,00 = R\$ 2,48)

**1.1. Etapa inicial do estudo (primeiros 2 anos)**

1. 2050 lâminas e lamínulas	1779,4 (unid.:0,868)
2. Luvas p/coleta do citológico (4000)	1936,0 (unid.:0,484)
3. 14 caixas para armaz. de lâminas (150 p/caixa)	347,20 (unid.:24,80)
4. 10 pctes. de papel A4 para questionários e Manual de instruções (pctes c/500)	99,20 (pcte.:9,92)
5. 800 tubos plásticos c/tampa para armazenamento sangue (40 ml) (unid. c/25)	5404,16(unid:168,88)
6. 800 seringas (50 ml) para coleta de sangue	1584,00 (unid: 1,98)
7. 23 kits captura híbrida II p/ 2000 testes p/HPV (alto risco)	23875,61(u.:1038,07)
8. 2250 coletores p/captura híbrida	3172,5 (u.:1,41)
9. 430 tubos para coleta material cervical p/PCR	3039,8(unid:168,88)
10. Reagentes p/a citologia	1674,00 (u.:0,670)

11. Containers para armazenamento e envio do material p/captura híbrida	200,00
<b>Total</b>	<b>42,911,71</b>

### **1.2. Segunda Etapa do estudo (últimos 3 anos)**

1. Material para o teste sorológico (ELISA):	
- a) 30 placas <i>microtiter</i> (96 orifícios) cx. c/5	558,00 (cx.: 93,00)
- b) Carbonato (tampão)	54,00
- c) VLPs (HPV 16 e 18) (p/reação antg/antic)	4500,00
- d) PBS	28,00
- e) IgG anti-humana (horseradish peroxidase-conjugated goat F(ab') <sub>2</sub> )	225,80
- f) leite em pó a 0,5%	35,00
- g) substrato ABTS	38,50
2. 430 escovas endocervicais	632,10 (unid.: 1,47)
3. Material p/PCR	
- DNTPs (oligonucleotídeos)	270,00 (100µl: 54,0)
- Taq DNA polimerase (10X)	48,00 (unid.: 24,00)
- MgCl <sub>2</sub>	33,40
- proteinase K	150,00 (5m- 75,00)
- brometo de etídio	144,00 (5ml- 72,00)
- primers p/HPV 16 e 18	1663,00
- Agarose 1%	64,00
- Ponteiras 1- $\frac{1}{4}$ (c/1000)	72,58 (cx.: 18,14)
<b>Total</b>	<b>8516,38</b>
2. Outros materiais	
Postagem p/remessa material p/laboratório DIGENE em São Paulo	992,00 (10 remes.)
<b>Total</b>	<b>992,00</b>
7.3. Recursos Humanos	
1. Bolsistas de iniciação científica (3)	--
2. Leitura Cito/histopatologistas	--
3. Diagnóstico Colposcópico	--
<b>Total geral</b>	<b>52420,09</b>



## FINANCIAMENTOS

### O estudo dispõe:

- ✓ Verba parcial para realização de algumas etapas do estudo fornecido pela Fundação de Auxílio à Pesquisa do Rio Grande do Sul (FAPERGS) (valor: R\$ 4.000,00).
- ✓ Verba para a realização do método PCR de edital da SSMA/RS (valor: R\$ 6.000,00).
- ✓ Verba CAPES/PROF: PPG Clínica Médica (valor: R\$ 3.000,00); PPG Epidemiologia (valor: R\$ 3.000,00).
- ✓ Verba FIPE/HCPA: verba para realização de imuno-histoquímica para P16 (R\$4.000,00).
- ✓ Verba CNPQ/Edital 2003; valor R\$ 20.000,00
- ✓ Dispõem de 2 bolsas PIBIC/CNPq, 1 bolsa BIC/PROPESQ e 1 bolsa Produtividade em Pesquisa/CNPq.

## REFERÊNCIAS

1. Ahmed A, Tollefsbol T. Telomeres, telomerase, and telomerase inhibition: clinical implications for cancer. *J Am Geriatr* 2003;51: 116-122.
2. Altman D. Some common problems in medical research. In: Altman D. *Practical statistics for medical research*. 9nd ed. London, England: Chapman;1999:403-9.
3. Anderson S, Shera K, Ihle J, Billman L, Goff B, Greer B, *et al.* telomerase activation in cervical cancer. *Am J Pathol* 1997;151:25-31.
4. Baseman JG, Koutsky LA. The epidemiology of human papillomavirus infections. *J Clin Virol*. 2005 Mar;32 Suppl 1:S16-24. Review.

5. Bauer HM, Hildesheim A, Schiffman MH, *et al.* Determinants of genital papillomavirus infection in low-risk women in Portland, Oregon. *Sex Transm Dis.* 1993;20:274-278.
6. Bontkes HJ, de Gruijl TD, Walboomers JM, Schiller JT, Dillner J, Helmerhorst TJ, *et al.* Immune responses against human papillomavirus (HPV) type 16 virus-like particles in a cohort study of women with cervical intraepithelial neoplasia. II. Systemic but not local IgA responses correlate with clearance of HPV-16. *J Gen Virol.* 1999 ;80 ( Pt 2):409-17.
7. Boring CC, Squires TS, Tong T, Montgomery S. Cancer statistics, 1994. *CA Cancer J Clin.* 1994 Jan-Feb;44(1):7-26.
8. Bosch FX, Manos MM, Muñoz N, *et al.* Prevalence of human papillomavirus in cervical cancer: a worldwide perspective. International Biological Study on Cervical Cancer (IBSCC) Study Group. *Natl Cancer Inst* 1995 Jun; 87 (11):796-802.
9. Bosch FX, Lorincz A, Munoz N, Meijer CJ, Shah KV. The causal relation between human papillomavirus and cervical cancer. *J Clin Pathol.* 2002 ;55(4):244-65.
10. Bosh FX, Shiffman M, Salomon D. Introduction: Future Research directions in the epidemiology of huma papilomavirus and cancer. *J Natl Inst Monogr* 2003;31:1-2.
11. Bossuyt PM, Reitsma JB, Bruns DE, Gatsonis CA, Glasziou PP, Irwig LM, *et al.* Towards complete and accurate reporting of studies of diagnostic accuracy: the STARD initiative. *Ann Intern Med* 2003;138:40-5.
12. Brock KE, Berry G, Mock PA, MacLennan R, Truswell AS, Brinton LA. Nutrients in diet and plasma and risk of in situ cervical cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1988 ; 15;80(8):580-5.

13. Burk RD, Kelly P, Feldman J, Bromberg J, Vermund SH, DeHovitz JA, *et al.* Declining prevalence of cervicovaginal human papillomavirus infection with age is independent of other risk factors. *Sex Transm Dis.* 1996 Jul-Aug; 23(4):333-41.
14. Castellsagué X, Muñoz N. Chapter 3. Cofactors in human papillomavirus carcinogenesis – role of parity, oral contraceptives, and tobacco smoking. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:20-8.
15. Castle PE, Hillier SL, Rabe LK, Hildesheim A, Herrero R, Bratti MC, *et al.* An association of cervical inflammation with high-grade cervical neoplasia in women infected with oncogenic human papillomavirus (HPV). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(10):1021-7.
16. Cavalcanti SM, Zardo LG, Passos MR, Oliveira LH. Epidemiological aspects of human papillomavirus infection and cervical cancer in Brazil. *J Infect.* 2000 Jan;40(1):80-7.
17. Cheah PL, Looi LM, Ng MH, Sivanesaratnam V. Telomerase activation and human papillomavirus infection in invasive uterine cervical carcinoma in a set of Malaysian patients. *J Clin Pathol.* 2002;55(1):22-6.
18. Cochrane Methods Working Group on Systematic Reviews of Screening and Diagnostic Tests. Recommended methods. Available at: <http://www.cochrane.org/cochrane/sadtdoc1.htm>. Accessed January 25, 2006)
19. Coutlée F, Gravitt P, Kornegay J, *et al.* Use of PGM1 Primers in L1 Consensus PCR Improves Detection of Human Papillomavirus DNA in Genital Samples. *J Clin Microbiol.* 2002;40(3):902-907.

20. DeFilippis RA, Goodwin EC, Wu L, DiMaio D. Endogenous human papillomavirus E6 and E7 proteins differentially regulate proliferation, senescence, and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol.* 2003;77(2):1551-63
21. De Gruijl TD, Bontkes HJ, Walboomers JM, Stukart MJ, Doekhie FS, Remmink AJ, et al. Differential T helper cell responses to human papillomavirus type 16 E7 related to viral clearance or persistence in patients with cervical neoplasia: a longitudinal study. *Cancer Res.* 1998 Apr 15;58(8):1700-6.
22. Ferenczy A, Franco E. Persistent human papillomavirus infection and cervical neoplasia. *Lancet Oncol* 2002 Jan;3(1):11-6.
23. FIGO. Staging of cervical carcinomas. TNM Classification of malignant tumours. L. Sobin and Ch Wittekind (eds.), UICC International Union against Cancer, Geneva, Switzerland. pp155-157; 6th ed. 2002. Available at: <http://screening.iarc.fr/viaviliappendix1.php>. Accessed May 15, 2006.
24. Ford K, Reed B, Wirawan D, Muliawan P, Sutarga M, Gregoire L, . The Bali STD/AIDS Study: human papillomavirus infection among female sex workers. *Int J STD AIDS*,2003; 14: 681–687.
25. Franco EL, Villa LL, Sobrinho JP, Prado JM, Rousseau MC, Desy M, Rohan TE. Epidemiology of acquisition and clearance of cervical human papillomavirus infection in women from a high-risk area for cervical cancer. *J Infect Dis.* 1999 Nov;180(5):1415-23.
26. Giuliano AR, Papenfuss MR, Denman CA, de Zapien JG, Abrahamsen M, Hunter JB. Human papillomavirus prevalence at the USA-Mexico border among women 40 years of age and older. *Int J STD AIDS.* 2005 Mar;16(3):247-51.

27. Goodman MT, Kiviat N, McDuffie K, Hankin JH, Hernandez B, Wilkens LR, *et al.* The association of plasma micronutrients with the risk of cervical dysplasia in Hawaii. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(6):537-44.
28. Greer CE, Wheeler CM, Ladner MB, Beutner K, Coyne MY, Liang H, Langenberg A, *et al.* Human papillomavirus (HPV) type distribution and serological response to HPV type 6 virus-like particles in patients with genital warts. *J Clin Microbiol.* 1995; 33(8):2058-63.
29. Greider CW, Blackburn ;EH. Identification of a specific telomere terminal transferase activity in tetrahymena extracts. *Cell* , 1985, 43(2): 405-413
30. Greider CW. Telomerase activation. One step on the road to cancer? *Trends Genet* 1999 Mar;15(3):109-12.
31. Hachen Jr DS . The Competing Risks Model. A Method for Analysing Processes with Multiple Types of Events. *Sociological Methods & Research*, 1988; vol. 17, No. 1, pp 21-54.
32. Herbsleb M, Knudsen UB, Orntoft TF, Bichel P, Norrild B, Knudsen A, *et al.* Telomerase activity, MIB-1, PCNA, HPV 16 and p53 as diagnostic markers for cervical intraepithelial neoplasia. *APMIS* 2001;109(9):607-17.
33. Herrero R, Hildesheim A, Bratti C, Sherman ME, Hutchinson M, Morales J, *et al.* Population-based study of human papillomavirus infection and cervical neoplasia in rural Costa Rica. *J Natl Cancer Inst.* 2000 Mar 15;92(6):464-74.

34. Hildesheim A, Herrero R, Castle PE, Wacholder S, Bratti MC, Sherman ME, *et al.* HPV co-factors related to the development of cervical cancer: results from a population-based study in Costa Rica. *Br J Cancer*. 2001 May 4;84(9):1219-26.
35. Hildesheim A, Wang SS. Host and viral genetics and risk of cervical cancer: a review. *Virus Research* 2002; 89:229-240.
36. Ho GY, Burk RD, Klein S, Kadish AS, Chang CJ, Palan P, *et al.* Persistent genital human papillomavirus infection as a risk factor for persistent cervical dysplasia. *J Natl Cancer Inst*. 1995 Sep 20;87(18):1365-71.
37. Ho GY, Bierman R, Beardsley L, Chang CJ, Burk RD. Natural history of cervicovaginal papillomavirus infection in young women. *N Engl J Med*. 1998; 12;338(7):423-8.
38. Horner SM, DeFilippis RA, Manuelidis L, DiMaio D. Repression of the human papillomavirus E6 gene initiates p53-dependent, telomerase-independent senescence and apoptosis in HeLa cervical carcinoma cells. *J Virol*. 2004 Apr;78(8):4063-73.
39. IARC Working Group on Evaluation of Cervical Cancer Screening Programmes. Screening for squamous cervical cancer: duration of low risk after negative results of cervical cytology and its implication for screening policies, *British Medical Journal*, 1986, 293(4):659–664.
40. Jaeschke R, Guyatt G, Sackett DL., for the evidence-based working group. User's guides to the medical literature. II. How to use an article about a diagnostic test. A. Are the results of study valid? *JAMA* 1994;271:389-91.

41. Kawai K, Yaginuma Y, Tsuruoska M, Hayashi M, Ishikawa M. telomerase activity and human papillomavirus (HPV) infection in human uterine cervical cancers and esophageal cancers. *Eur J Cancer* 1998;13:2083-86.
42. Khan MJ, Castle PE, Lorincz AT, Wacholder S, Sherman M, Scott DR, *et al* . The elevated 10-year risk of cervical precancer and cancer in women with human papillomavirus (HPV) type 16 or 18 and the possible utility of type-specific HPV testing in clinical practice. *J Natl Cancer Inst.* 2005 Jul 20;97(14):1072-9.
43. Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, *et al* . Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266:2011-5.
44. Klaes R, Woerner SM, Ridder R, Wentzensen N, Duerst M, Schneider A, *et al* . Detection of high-risk cervical intraepithelial neoplasia and cervical cancer by amplification of transcripts derived from integrated papillomavirus oncogenes. *Cancer Res.* 1999; 15;59(24):6132-6.
45. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380(6569):79-82
46. Liaw KL, Hildesheim A, Burk RD, Gravitt P, Wacholder S, Manos MM, *et al* . A prospective study of human papillomavirus (HPV) type 16 DNA detection by polymerase chain reaction and its association with acquisition and persistence of other HPV types. *J Infect Dis.* 2001; 1;183(1):8-15.
47. Lijmer JG, Mol BW, Heisterkamp S, Bossel GJ, Prins MH, Van der Meulen JHP, *et al* . Empirical evidence of design-related bias in studies of diagnostic tests. *JAMA* 1999;282:1061-6.

48. Lorenzato F, Ho L, Terry G, Singer A, Santos LC, De Lucena Batista R, et al. The use of human papillomavirus typing in detection of cervical neoplasia in Recife (Brazil). *Int J Gynecol Cancer*. 2000 Mar;10(2):143-150.
49. Maláska J, Kunická Z, Borsky M, Sklenicková M, Novotná M, Fajkusová L, et al. Telomerase as a diagnostic and predictive marker in colorectal carcinoma. *Neoplasma* 2004;51(2):90-6.
50. McDougall JK. Telomerase activity and cellular immortalization. *Dev Biol Basel* 2001;106:267-273.
51. McMurray HR, McCance DJ. Human papillomavirus type 16 E6 activates TERT gene transcription through induction of c-Myc and release of USF-mediated repression. *J Virol*. 2003;77(18):9852-61.
52. Melkert PW, Hopman E, van den Brule AJ, Risse EK, van Diest PJ, Bleker OP, et al. Prevalence of HPV in cytomorphologically normal cervical smears, as determined by the polymerase chain reaction, is age-dependent. *Int J Cancer*. 1993 Apr 1;53(6):919-23.
53. Mitirangura A, Sriuranpong V, Termrungraunglert W, Tresukosol D, Lertsaguansinchai P, Voravud N, et al. Telomerase activity and human papillomavirus in malignant, premalignant and benign cervical lesions. *Br J Cancer* 1998;78(7):933-9.
54. Molano M, Van den Brule A, Plummer M, Weiderpass E, Posso H, Arslan A, et al. Determinants of clearance of human papillomavirus infections in Colombian women with normal cytology: a population-based, 5-year follow-up study. *Am J Epidemiol*. 2003 1;158(5):486-94.



55. Muñoz N, Franceschi S, Bosetti C, Moreno V, Herrero R, Smith JS, *et al.* Role of parity and human papillomavirus in cervical cancer: the IARC multicentric case-control study. *Lancet* 2002; 359:1085-92.
56. Muñoz N, Bosch FX, de Sanjose S, Herrero R, Castellsague X, Shah KV, Snijders PJ, Meijer CJ. Epidemiologic classification of human papillomavirus types associated with cervical cancer. *N Engl J Med* 2003 Feb 6;348(6):518-27
57. Nair P, Jayaprakash PG, Nair MK, Pillai MR. Telomerase, p53 and human papillomavirus infection in the uterine cervix. *Acta Oncol* 2000;39(1):65-70.
58. Nakano K, Watney E, McDougall JK. Telomerase activity and expression of telomerase RNA component and telomerase catalytic subunit gene in cervical cancer. *Am J Pathol* 1998;153(3):857-64.
59. Noronha V, Mello W, Villa L, Brito A, Macedo R, Bisi F, *et al.* Human papillomavirus associated with uterine cervix lesions. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1999 May-Jun;32(3):235-40.
60. Palan PR, Mikhail MS, Basu J, Romney SL. Plasma levels of antioxidant beta-carotene and alpha-tocopherol in uterine cervix dysplasias and cancer. *Nutr Cancer.* 1991;15(1):13-20.
61. Park TW, Riethdorf S, Schulz G, Riethdorf L, Wright T, Loning T. Clonal expansion and HPV-induced immortalization are early molecular alterations in cervical carcinogenesis. *Anticancer Res* 2003;23(1A):155-60
62. Parkim DM. Global cancer statistics in year 2000. *Lancet Oncol* 2001;2:533-43.

63. Phillips B, Ball C, Sackett D, et al. Oxford Centre for evidence-based Medicine Level of evidence Grades of recommendations (may 2001). Available at <http://www.cebm.net/background.asp>. Accessed February 23, 2004.
64. Rabelo-Santos SH, Zeferino L, Villa LL, Sobrinho JP, Amaral RG, Magalhães AV. Human Papillomavirus Prevalence among Women with Cervical Intraepithelial Neoplasia III and Invasive Cervical Cancer from Goiânia, Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro* 2003 Mar; 98(2):181-84.
65. Reddy VG, Khanna N, Jain SK, Das BC, Singh N. Telomerase-A molecular marker for cervical cancer screening. *Int J Gynecol Cancer*. 2001 Mar-Apr;11(2):100-6.
66. Reesink-Peters N, Helder MN, Wisman GB, Knol AJ, Koopmans S, Boezen HM, *et al.* Detection of telomerase, its components, and human papillomavirus in cervical scrapings as a tool for triage in women with cervical dysplasia. *J Clin Pathol*. 2003;56(1):31-5.
67. Riethdorf S, Riethdorf L, Schulz G, Ikenberg H, Janicke F, Loning T, *et al.* Relationship between telomerase activation and HPV 16/18 oncogene expression in squamous intraepithelial lesions and squamous cell carcinomas of the uterine cervix. *Int J Gynecol Pathol* 2001;20(2):177-85.
68. Rousseau MC, Abrahamowicz M, Villa LL, Costa MC, Rohan TE, Franco EL. Predictors of cervical coinfection with multiple human papillomavirus types. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003 Oct;12(10):1029-37.
69. Schlecht NF, KuLIEAGa S, Robitaille J, Ferreira S, Santos M, Miyamura RA, *et al.* Persistent human papillomavirus infection as a predictor of cervical intraepithelial neoplasia. *JAMA*. 2001 Dec 26;286(24):3106-14.

70. Schiffman M, Herrero R, Hildesheim A, Sherman ME, Bratti M, Wacholder S, et al. HPV DNA testing in cervical cancer screening: results from women in a high-risk province of Costa Rica. *JAMA*. 2000; 5;283(1):87-93.
71. Schiffman M, Kjaer SK. Chapter 2: Natural history of anogenital human papillomavirus infection and neoplasia . *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31:14-9.
72. Sedjo RL, Papenfuss MR, Craft NE, Giuliano AR. Effect of plasma micronutrients on clearance of oncogenic human papillomavirus (HPV) infection (United States). *Cancer Causes Control*. 2003;14(4):319-26.
73. Sherman ME, Schiffman M, Cox JT. Effects of age and human papilloma viral load on colposcopy triage: data from the randomized Atypical Squamous Cells of Undetermined Significance/Low-Grade Squamous Intraepithelial Lesion Triage Study (ALTS). *J Natl Cancer Inst*. 2002; 16;94(2):102-7.
74. Sherman ME, Wang SS, Wheeler CM, Rich L, Gravitt PE, Tarone R, Schiffman M. Determinants of human papillomavirus load among women with histological cervical intraepithelial neoplasia 3: dominant impact of surrounding low-grade lesions. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2003;12(10):1038-44.
75. Snijders PJ, van Duin M, Walboomers JM, Steenbergen RD, Risse EK, Helmerhorst TJ, et al. Telomerase activity exclusively in cervical carcinomas and a subset of cervical intraepithelial neoplasia grade III lesions: strong association with elevated messenger RNA levels of its catalytic subunit and high-risk human papillomavirus DNA. *Cancer Res*. 1998;58(17):3812-8.
76. Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F. Random effects methods for combining study estimates. In: Sutton AJ, Abrams KR, Jones DR, Sheldon TA, Song F.

- Methods for Meta-Analysis in Medical Research. 1st ed. Chichester, England: John Wiley; 2000: 73-86.
77. Van der Graaf I, Molijn A, Doornewaard H, Quint W, van Doorn L-J, van den Tweel J. Human Papillomavirus and long risk of cervical neoplasia. *Am J Epidemiol.* 2002 Jul 15;156(2):158-64.
78. Van Duin M, Steenbergen RD, de Wilde J, Helmerhorst TJ, Verheijen RH, Risse EK, Meijer CJ, Snijders PJ. Telomerase activity in high-grade cervical lesions is associated with allelic imbalance at 6Q14-22. *Int J Cancer* 2003;105(5):577-82.
79. Veldman T, Liu X, Yuan H, Schiegel R. Human papillomavirus E6 and Myc proteins associate in vivo and bind to and cooperatively activate the telomerase reverse transcriptase promoter. *PNAS*;2003;100(14):8211-16.
80. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, Bosch FX, Kummer JA, Shah KV. Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *J Pathol* 1999;189:12-19.
81. Wang J, Xie LY, Allan S, Beach D, Hannon G. Myc activates telomerase. *Genes Development* 1998; 12:1769-74.
82. Wang SS, Hildesheim. Chapter 5: Viral and host factors in human papillomavirus persistence and progression. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2003; 31: 35-40.
83. Wisman GB, Hollema H, de Jong S, ter Schegget J, Tjong-A-Hung SP, Ruiters MH, et al. Telomerase activity as a biomarker for (pre)neoplastic cervical disease in scrapings and frozen sections from patients with abnormal cervical smear. *J Clin Oncol* 1998;16(6):2238-45.

84. Wisman GB, De Jong S, Meersma GJ, Helder MN, Hollema H, de Vries EG, *et al.* Telomerase in (pre)neoplastic cervical disease. *Hum Pathol* 2000;31(10):1304-12.
85. Wright TC, Cox T, Massad S, Carlson J, Twigg LB, Wilkinson EJ. 2001 consensus guidelines for the management of women with cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Obstet Gynecol* 2003;189:295-304.
86. Yamaguchi K. Event History Analysis. Applied Social Research Methods Series, 1991. 28 Sage Publications.
87. Yashima K, Ashfaq R, Nowak J, Von Gruenigen V, Milchgrub S, Rathi A, *et al.* Telomerase activity and expression of its RNA component in cervical lesions. *Cancer* 1998;82(7):1319-27.
88. Ylitalo N, Sorensen P, Josefsson AM, Magnusson PK, Andersen PK, Ponten J, *et al.* Consistent high viral load of human papillomavirus 16 and risk of cervical carcinoma in situ: a nested case-control study. *Lancet*. 2000; 355(9222):2194-8.
89. Yokoyama M, Noguchi M, Nakao Y, Pater A, Iwasaka T. The tea polyphenol, (-)-epigallocatechin gallate effects on growth, apoptosis, and telomerase activity in cervical cell lines. *Gynecol Oncol* 2004;92(1):197-204.
90. Zamora J, Muriel A, Abraira V. Meta-DiSc for Windows: A Software package for the Meta-analysis of Diagnostic Tests. XI Cochrane Colloquium. Barcelona, 2003. (Available at [http://www.hrc.es/investigacion/metadisc\\_en.htm](http://www.hrc.es/investigacion/metadisc_en.htm))
91. Zhang DK, Ngan HY, Cheng RY, Cheung AN, Liu SS, Tsao SW. Clinical significance of telomerase activation and telomeric restriction fragment (TRF) in cervical cancer. *Eur J Cancer* 1999;35(1):154-60.

92. Zheng PS, Iwasaka T, Yokoyama M, Nakao Y, Pater A, Sugimori H. Telomerase activation in in vitro and in vivo cervical carcinogenesis. *Gynecol Oncol* 1997;66(2):222-6.
93. Zheng PS, Iwasaka T, Zhang ZM, Pater A, Sugimori H. Telomerase activity in Papanicolaou smear-negative exfoliated cervical cells and its association with lesions and oncogenic human papillomaviruses. *Gynecol Oncol* 2000;77(3):394-8.

## ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO GRUPO HOSPITALAR CONCEIÇÃO**  
**CEP - GHC**  
**RESOLUÇÃO**

Porto Alegre, 15 de janeiro de 2003.

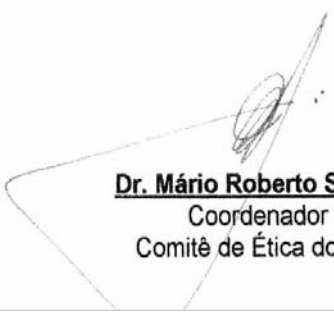
O Comitê de Ética em Pesquisa-CEP-GHC, em reunião ordinária em 15/01/2003 analisou o projeto de pesquisa:

**Nº 112/2002**

**Título:** A distribuição de papilomavirus humanos oncogênicos e sua associação com lesões do colo cervical.

**Pesquisador (es):** Mary Clarisse Bozzetti

Este trabalho, bem como o Termo de Consentimento livre e Esclarecido, no aspecto ético e metodológico, por estarem de acordo com as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Resolução 196/96) obtiveram o parecer **APROVADO**. O autor deverá encaminhar relatórios semestrais sobre o andamento do projeto. Projetos de áreas temáticas especiais não podem ser iniciados sem a aprovação da CONEP. Após conclusão do trabalho, o pesquisador deverá encaminhar relatório final ao Centro de resultados onde foi desenvolvida a pesquisa e ao Comitê de Ética em Pesquisa.



**Dr. Mário Roberto Silveira**  
 Coordenador  
 Comitê de Ética do GHC

### ANEXO C - Questionário

Ficha de Coleta de Dados – Questionário de Entrada no Estudo

#### PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

#### QUESTIONÁRIO DE ENTRADA NO ESTUDO

Endereço: \_\_\_\_\_

3. Telefone de contato: \_\_\_\_\_

4. Data de nascimento? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_ (dd/mm/aaaa) DNASC: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

5. Data da entrevista? \_\_\_ / \_\_\_ / \_\_\_\_ (dd/mm/aaaa) DENT: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_

6. Idade: \_\_ ( em anos) IDADE: \_\_

7. Estado marital: ESTMARIT: \_

(1) Casada ou com companheiro fixo há pelo menos 1 ano

(2) Com companheiro há menos de 1 ano (3)Solteira

(4) Divorciada/desquitada (5) Separada

(6) Viúva

8. Ocupação: \_\_\_\_\_ OCUP: \_\_

9. Cor da pele:

(1) branca (2) preta (3) mulata (4) amarela COR: \_

10. Escolaridade: ESCOLAR: \_

( 1 ) analfabeta ( 2 ) primeiro grau incompleto

( 3 ) primeiro grau completo ( 4 ) segundo grau incompleto

( 5 ) segundo grau completo ( 6 ) terceiro grau incompleto

( 7 ) terceiro grau completo ( 9 ) ignorado

11. Número de pessoas que residem na casa: \_\_ PCASA: \_\_

12. Renda da família (anotar a renda em reais) \_\_\_\_\_ RENDA: \_\_

13. Você fuma? (1) Sim (2) Não FUMO: \_

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 13 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 16

14. Se sim, há quanto tempo? \_\_ (em anos) TFUMO: \_\_

15. Se sim, quantos cigarros fuma por dia? \_\_ CIGDIA: \_\_



16. Idade da primeira menstruação: \_\_ MENARCA: \_\_  
 17. Seus ciclos menstruais são regulares? \_\_\_\_\_(intervalo) CMENST: \_  
 18. Você ainda menstrua? (1) Sim (2) Não MENOP1: \_

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 18 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 22

19. Se não, há quanto tempo? \_\_ (em anos) MENOP2: \_\_  
 20. Você faz ou já fez terapia de reposição hormonal? MENOP3: \_  
 (1) Sim (2) Não  
 21. Se sim, por quanto tempo? \_\_ (em anos) MENOP4: \_\_  
 22. Qual a idade da primeira relação sexual: \_\_ SEXARCA: \_\_  
 23. Qual o número de parceiros sexuais no último mês: \_\_ PARSEX1: \_\_  
 24. Qual o número de parceiros sexuais ao longo da vida: \_\_ PARSEX2: \_\_  
 25. Você utiliza ou utilizou algum método anticoncepcional? ACO1: \_  
 (1) Sim (2) Não  
 26. Qual o método anticoncepcional que utiliza ou utilizou? ACO2: \_\_  
 Anticoncepcional oral; (2) Anticoncepcional injetável;  
 Condon (camisinha); (4) Diaphragma;  
 (5) “Camisinha” feminina; (6) DIU/Mirena;  
 (7) Cirúrgico (LT); (8) Tabela; (9) Não sabe;  
 (10) Não se aplica; (11) Outro: \_\_\_\_\_  
 27. Já esteve grávida alguma vez? (1) Sim (2) Não GESTA1: \_

SE A RESPOSTA À QUESTÃO 27 FOR “NÃO” PULE PARA A QUESTÃO 33

28. Se sim, quantas vezes? \_\_ GESTA2: \_\_  
 29. Que idade tinha na primeira gestação? GESTA3: \_\_  
 30. Quantos filhos nasceram vivos? FVIVOS: \_\_  
 31. Já teve algum aborto? (1) Sim (2) Não ABO1: \_  
 32. Se sim, quantos? \_\_ ABO2: \_\_  
 33. Você já teve/tem alguma das seguintes doenças?  
 Sim; (2) Não; (9) Não sabe  
 Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_ COND: \_  
 AIDS/ HIV positiva: \_ HIV: \_  
 Sífilis: \_ SIFILIS: \_  
 Gonorréia: \_ GONO: \_  
 Candidíase genital: \_ CANDIDA: \_

- Clamídia genital: \_ CLAMIDIA: \_  
 Herpes genital: \_ HERPES: \_  
 Outra, qual?: \_\_\_\_\_ OUTDST: \_
34. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRAT1: \_  
 35. Se sim, qual? \_\_\_\_\_ TRAT2: \_
36. Seu marido ou companheiro já teve alguma das seguintes doenças? Sim; (2) Não; (9) Não sabe  
 Condiloma acuminado/Papilomavírus (verrugas genitais): \_ CONDM: \_  
 AIDS/ HIV positivo: \_ HIVM: \_  
 Sífilis: \_ SIFILISM: \_  
 Gonorréia: \_ GONOM: \_  
 Candidíase genital: \_ CANDIDAM: \_  
 Clamídia genital: \_ CLAMIDIAM: \_  
 Herpes genital: \_ HERPESM: \_  
 Outra, qual?: \_\_\_\_\_ OUTDSTM: \_
37. Se sim, você fez algum tipo de tratamento? TRATM1: \_  
 38. Se sim, qual? \_\_\_\_\_ TRATM2: \_
39. Você alguma vez já realizou o exame preventivo de colo uterino? (1) Sim; (2) Não; (9) Não sabe CP1: \_
40. Se sim, qual a data do último exame? \_\_\_ / \_\_\_ (mm/aaaa) DATCP: \_\_\_ / \_\_\_
41. Você costuma realizar auto-exame de mamas? MAMA1: \_  
 Sim (2) Não
42. Se sim, com que frequência? MAMA2: \_  
 diária; (2) semanal; (3) mensal; (4) Outra: \_\_\_\_\_
43. Você já teve ou tem alguns dos seguintes problemas de saúde? (1) Sim (2) Não (9) Não sabe  
 Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HDCV: \_  
 Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HLPCU: \_  
 Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HDEM: \_  
 Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HDR: \_  
 Doença psiquiátrica (depressão): \_ HDP: \_  
 Câncer ginecológico: \_ HCAG: \_  
 Outro tipo de câncer: \_ HC: \_
44. Se sim, você faz algum tipo de tratamento para o TRATPS1: \_

seu problema de saúde? (1) Sim (2) Não

45. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_ TRATPS2: \_\_

46. Alguém na sua família (lado materno ou paterno) tem ou teve algum dos seguintes problemas de saúde?

(1) Sim (2) Não (9) Não sabe

Doença cardiovascular (HAS, DIC): \_ HFDCV: \_

Lesões pré-invasivas de colo de útero: \_ HFLPCU: \_

Doença endócrino-metabólica (diabetes): \_ HFDEM: \_

Doença Respiratória (asma, dpoc): \_ HFDR: \_

Doença psiquiátrica (depressão): \_ HFDP: \_

Câncer ginecológico: \_ HFCAG: \_

Outro tipo de câncer: \_ HFC: \_

AIDS(HIV positivo): \_ HFAIDS: \_

47. Se sim, faz algum tipo de tratamento para o TRATPSF1: \_

este problema de saúde? (1) Sim (2) Não

48. Se sim, qual o tratamento? \_\_\_\_\_ TRATPSF2: \_\_

49. História de óbito na família nos últimos cinco anos?

(1) Sim (2) Não (3) Não sabe ÓBITOF: \_

50. Se sim, qual a idade da pessoa que foi ao óbito: \_\_ (anos) OBFIDAD: \_\_

51. Se sim, qual a causa da morte? \_\_\_\_\_ CAUSAOBF: \_\_

OBSERVAÇÕES DO ENTREVISTADOR:

---



---



---



---



---



---



---



---



---

## II. QUESTIONÁRIO DE DADOS DO EXAME E COLETA DE MATERIAL

### PREVENÇÃO E DETECÇÃO PRECOCE DE CÂNCER DE COLO UTERINO

NOTA: Toda informação será mantida sob estrita confidencialidade. Este questionário será armazenado em arquivos fechados. Seu número de identificação será a única conexão à informação coletada.

QUEST \_ \_ \_ \_ \_

1. Nome: \_\_\_\_\_

2. Foram realizados os seguintes exames na participante do estudo:

Coleta para exame citopatológico da cérvix uterina (CP):

(1) Sim (2) Não, porque? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultado do CP?

CP: \_ \_

(1) Normal; (2) AGUS; (3) ASCUS

(4) NIC 1; (5) NIC 2; (6) NIC 3;

(7) Ca in situ; (8) Ca invasivo; (9) Outro: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Coleta de material para PCR (PCR):

(1) Sim (2) Não, porque? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultado da PCR (HPV-DNA)?

HPVDNA: \_

(1) Positiva (2) Negativa

Se positiva, qual o tipo de HPV identificado? \_\_\_\_\_ THPV: \_

Coleta de sangue para a sorologia p/HPV(SORO):

(1) Sim (2) Não, porque? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema nesta coleta? Qual? \_\_\_\_\_

---

Resultado da sorologia para o HPV?

SOROHPV: \_

(1) Positiva (2) Negativa

Foi indicado colposcopia?

(1) Sim (data: \_\_\_\_\_) (2) Não

Foi realizada colposcopia?

(1) Sim (data: \_\_\_\_\_) (2) Não, porque?

Resultados da colposcopia?

COLPO: \_

Anormal com realização de biópsia;

Anormal sem realização de biópsia (porque? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_)

Normal

Se biópsia realizada, qual o resultado do exame histopatológico? HISTO: \_

(1) Normal (2) NIC 1 (3) NIC 2 (4) NIC 3

(5) Ca in situ (6) Ca invasor (7) Outro: \_\_\_\_\_

Se biópsia realizada, foi feita investigação de alterações no

Gene P16?

(1) Sim (2) Não, porque? \_\_\_\_\_

Foi encontrado algum problema para a realização desta

investigação? Qual? \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

Resultados Gene P16? \_\_\_\_\_

GENEP16: \_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

## **ANEXO D - Termo de Consentimento Informado**

A Distribuição de Papilomavírus Oncogênicos e Sua Associação Com Lesões do Colo Uterino

Protocolo nº: \_\_\_\_\_

Financiamento: CAPES-PROF (UFRGS); FIPE/HCPA; FAPERGS; LACEN/RS

Apoio: GSC/GHC

Investigador Principal: Dra. Mary Clarisse Bozzetti

A infecção genital pelo Papilomavírus Humano é uma das doenças sexualmente transmissíveis mais comuns. É causada pelo vírus conhecido como Papilomavírus Humano ou HPV. Este vírus é o principal agente causador do câncer de colo de útero. Pelo fato deste ser um câncer bastante comum entre as mulheres em nosso meio e, embora possa ser diagnosticado precocemente e as mulheres curadas, ele ainda é responsável por um grande número de mortes entre as mulheres em nosso meio. Por isso, a busca de métodos para um diagnóstico mais precoce e mais acessível à toda população têm sido tema de muitas pesquisas.

Nós planejamos um estudo que tem como principal enfoque a identificação e o acompanhamento de mulheres portadoras do HPV bem como de outras lesões associadas presentes no colo uterino. Por isso estamos convidando-a a fazer parte deste estudo, cujos objetivos, procedimentos, riscos e benefícios estão descritos a seguir.

### **Objetivos do estudo**

O presente estudo tem como objetivos verificar a presença e distribuição de acordo com a idade dos tipos de HPV que estão mais associados ao câncer de colo de útero. A presença deste vírus será estudada em material coletado no colo uterino e no sangue. A

identificação da presença deste vírus, a detecção de uma proteína chamada P16, presente em células com HPV ativo e o acompanhamento das mulheres que participarão do estudo permitirá entender melhor porque algumas mulheres evoluem para lesões de colo de útero de alto grau ou mesmo câncer.

### **Procedimentos**

As mulheres que concordarem em participar do estudo, serão inicialmente entrevistadas para responder algumas questões relacionadas à sua saúde, após será realizado um exame ginecológico no qual será coletado, através do uso de uma escova especial para este exame, material da parte externa e do canal do colo uterino. Deste material será realizado o exame citológico (preventivo do câncer de colo de útero) e material para investigar a presença do HPV.

As mulheres que tiverem o exame citológico alterado e/ou que tiverem a presença do HPV ao exame serão encaminhadas para a realização de uma colposcopia, que um exame semelhante ao exame ginecológico, onde se observa o colo do útero com lente de aumento. Se neste exame for constatada a presença de alguma lesão no colo do útero, será realizada uma biópsia desta lesão, que significa retirar um pequeno fragmento da lesão e encaminhar para um exame mais minucioso, chamado exame histopatológico e também, neste mesmo fragmento será estudado se existe alguma alteração na proteína P16.

Também será coletado nas mulheres que concordarem em participar do estudo, 20 ml de sangue. Deste sangue será isolado o soro, que será congelado e posteriormente será feita a verificação da presença do HPV.

As mulheres participantes do estudo serão acompanhadas de acordo com os resultados dos exames mencionados acima. A frequência de visitas médicas poderá ser no

mínimo semestral e no máximo anual. Sendo que os procedimentos em cada consulta serão os mesmos descritos acima.

### **Riscos e Desconfortos**

Os riscos e desconfortos às participantes deste estudo são aqueles associados aos procedimentos descritos acima, ou seja, a coleta de material para o exame citológico e para o HPV poderão, de modo pouco freqüente, causar um pequeno sangramento local, que cessará espontaneamente. Para as mulheres que necessitarem a realização de biópsia, poderá também ocorrer um pequeno sangramento com melhora espontanea e eventualmente poderá haver um pouco de dor local, também passageira. A coleta de sangue é de uma quantidade pequena (20 ml) e por isso dificilmente causará algum mal-estar geral (1 em cada 1000 pessoas), no entanto poderá haver dor no local da coleta e eventualmente um pequeno hematoma. Os demais procedimentos serão feitos em material já coletado e congelado para posterior exame e por isso não causarão desconfortos às participantes do estudo.

### **Benefícios**

Os benefícios diretos do estudo às participantes serão: estas terão a oportunidade de serem identificadas com lesões pré-cancerosas do colo de útero e tratadas antes da evolução destas lesões; aquelas que forem positivas a algum tipo de HPV de alto risco para o câncer de colo uterino e que não tiverem lesões aparentes, serão acompanhadas com uma freqüência maior visando acompanhar e tratar as possíveis lesões que se desenvolverem.

Como benefício indireto estas mulheres estarão contribuindo com informações fundamentais para ampliar o conhecimento desta doença e de sua evolução (prognóstico) para



o conhecimento científico, já que está é uma doença altamente prevenível e curável se detectada precocemente e que no entanto ainda está entre as causas de morte por câncer mais comuns entre as mulheres, especialmente em nosso meio.

### **Compensação financeira**

Não haverá nenhum pagamento às mulheres que concordarem em participar do estudo, bem como as participantes do estudo não terão nenhum custo adicional relacionado aos procedimentos e às visitas médicas.

### **Confidencialidade**

Toda a informação que será fornecida pelas participantes do estudo e os resultados advindos dos procedimentos realizados será considerada confidencial e será somente conhecida da equipe envolvida no estudo. Todos os questionários e materiais coletados serão identificados através de um código criado na entrada do estudo, este código será a única identificação utilizada no banco de dados do estudo que será utilizado para análise dos dados e divulgação dos mesmos no meio científico.

### **Perguntas e dúvidas relacionadas ao estudo:**

Este termo de consentimento explica de forma clara o estudo que estamos propondo e convidando as mulheres à participar, no entanto se houver alguma dúvida estas serão esclarecidas pela equipe do estudo, através da Dra. Mary Clarisse Bozzetti em qualquer momento do estudo pelo telefone 3333 8779.

**Em caso de danos**

Se a participante do estudo acha que teve algum problema de saúde relacionado com a sua participação no estudo ou se tem alguma pergunta sobre os cuidados médicos que necessita esta deverá contatar a coordenadora do estudo Dra. Mary Clarisse Bozzetti pelo seguinte telefone: 3333 8779.

Se houver algum dano à sua saúde resultante de sua participação, receberá os cuidados médicos necessários sem custos adicionais. Não haverá, no entanto, compensação financeira, apenas atendimento médico e hospitalar quando indicado.

**Participação voluntária**

A participação de cada mulher no estudo é voluntária, ou seja, que não quiser participar do estudo estará livre para fazê-lo sem que haja qualquer perda no atendimento de seus problemas de saúde a que tem direito.

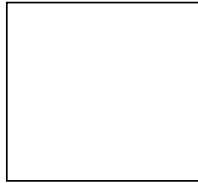
Se concordar em participar do estudo e mudar de idéia durante o decorrer do mesmo, estará livre para fazê-lo, e da mesma forma não sofrerá perdas relacionadas ao atendimento a que tem direito para seus problemas de saúde.

**O Significado de Sua Assinatura**

A sua assinatura abaixo significa que você entendeu a informação que lhe foi fornecida sobre o estudo e sobre este termo de consentimento. Se você assinar este documento significa que você concorda em participar do estudo.

## VOCÊ RECEBERÁ UMA CÓPIA DESTE TERMO DE CONSENTIMENTO

carimbo do estudo



---

Assinatura da paciente e/ou responsável (se menores de 18 anos) Data:

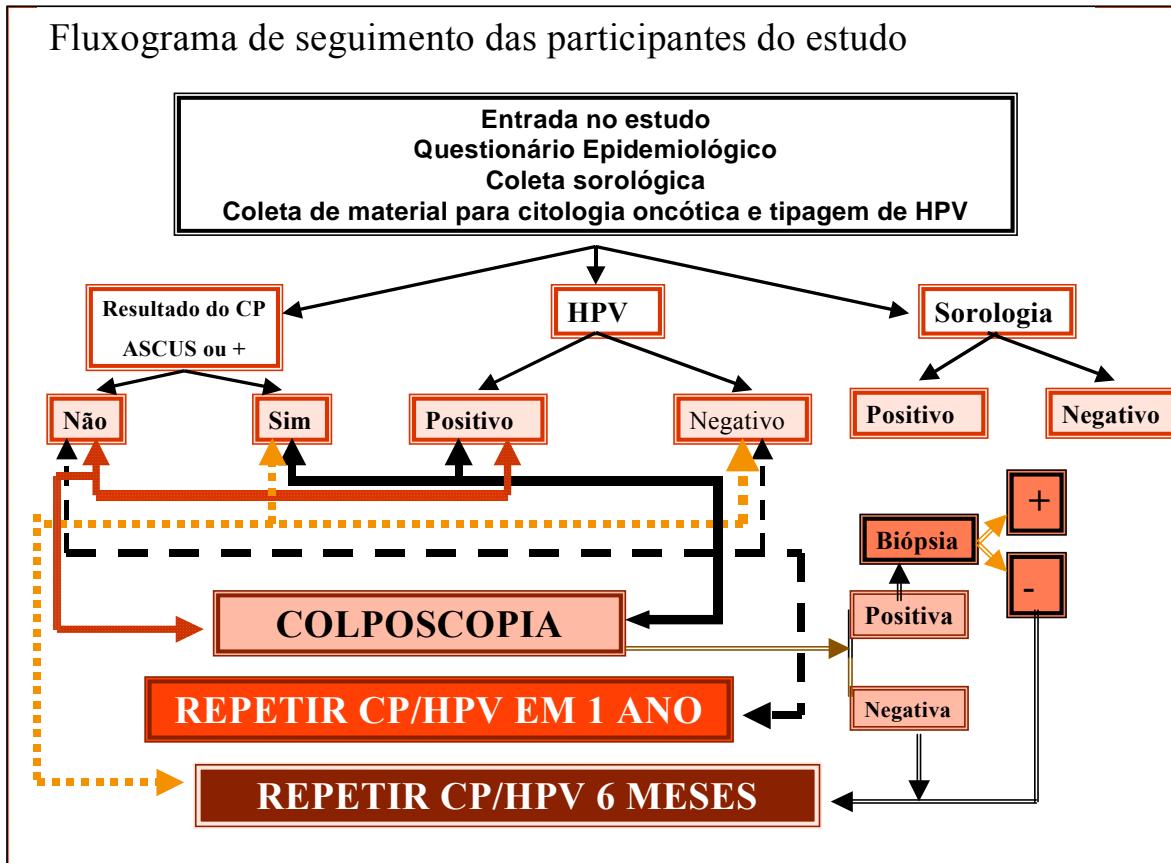
---

Assinatura da pessoa que obteve o consentimento Data:

---

Assinatura do coordenador do estudo Data:

## ANEXO E – Fluxograma de Seguimento as Participantes do Estudo



**ANEXO F - Oxford Centre for Evidence-based Medicine Levels of Evidence (May 2001)**

Level	Therapy/Prevention, Aetiology/Harm	Prognosis	Diagnosis	Differential diagnosis/symptom prevalence study	Economic and decision analyses
1a	SR (with <u>homogeneity*</u> ) of RCTs	SR (with <u>homogeneity*</u> ) of inception cohort studies; <u>CDR†</u> validated in different populations	SR (with homogeneity*) of Level 1 diagnostic studies; CDR† with 1b studies from different clinical centres	SR (with homogeneity*) of prospective cohort studies	SR (with homogeneity*) of Level 1 economic studies
1b	Individual RCT (with narrow <u>Confidence Interval‡</u> )	Individual inception cohort study with ≥ 80% follow-up; <u>CDR†</u> validated in a single population	Validating** cohort study with good††† reference standards; or CDR† tested within one clinical centre	Prospective cohort study with good follow-up****	Analysis based on clinically sensible costs or alternatives; systematic review(s) of the evidence; and including multi-way sensitivity analyses
1c	<u>All or none§</u>	All or none case-series	Absolute SpPins and SnNouts††	All or none case-series	Absolute better-value or worse-value analyses ††††
2a	SR (with <u>homogeneity*</u> ) of cohort studies	SR (with <u>homogeneity*</u> ) of either retrospective cohort studies or untreated control groups in RCTs	SR (with homogeneity*) of Level >2 diagnostic studies	SR (with homogeneity*) of 2b and better studies	SR (with homogeneity*) of Level >2 economic studies
2b	Individual cohort study (including low quality RCT; e.g., <80% follow-up)	Retrospective cohort study or follow-up of untreated control patients in an RCT; Derivation of <u>CDR†</u> or validated on split-sample§§§ only	Exploratory** cohort study with good††† reference standards; CDR† after derivation, or validated only on split-sample§§§ or databases	Retrospective cohort study, or poor follow-up	Analysis based on clinically sensible costs or alternatives; limited review(s) of the evidence, or single studies; and including multi-way sensitivity analyses
2c	"Outcomes" Research; Ecological studies	"Outcomes" Research		Ecological studies	Audit or outcomes research
3a	SR (with <u>homogeneity*</u> ) of case-control studies		SR (with homogeneity*) of 3b and better studies	SR (with homogeneity*) of 3b and better studies	SR (with homogeneity*) of 3b and better studies
3b	Individual Case-Control Study		Non-consecutive study; or without consistently applied reference standards	Non-consecutive cohort study, or very limited population	Analysis based on limited alternatives or costs, poor quality estimates of data, but including sensitivity analyses incorporating clinically sensible variations.
4	Case-series (and <u>poor quality cohort and case-control studies§§</u> )	Case-series (and <u>poor quality prognostic cohort studies***</u> )	Case-control study, poor or non-independent reference standard	Case-series or superseded reference standards	Analysis with no sensitivity analysis
5	Expert opinion without explicit critical appraisal, or based on physiology, bench research or "first principles"	Expert opinion without explicit critical appraisal, or based on physiology, bench research or "first principles"	Expert opinion without explicit critical appraisal, or based on physiology, bench research or "first principles"	Expert opinion without explicit critical appraisal, or based on physiology, bench research or "first principles"	Expert opinion without explicit critical appraisal, or based on economic theory or "first principles"

**Notes**

Users can add a minus-sign "-" to denote the level of that fails to provide a conclusive answer because of:

- EITHER a single result with a wide Confidence Interval (such that, for example, an ARR in an RCT is not statistically significant but whose confidence intervals fail to exclude clinically important benefit or harm)

- OR a Systematic Review with troublesome (and statistically significant) heterogeneity.
- Such evidence is inconclusive, and therefore can only generate Grade D recommendations.

*	By homogeneity we mean a systematic review that is free of worrisome variations (heterogeneity) in the directions and degrees of results between individual studies. Not all systematic reviews with statistically significant heterogeneity need be worrisome, and not all worrisome heterogeneity need be statistically significant. As noted above, studies displaying worrisome heterogeneity should be tagged with a "-" at the end of their designated level.
†	Clinical Decision Rule. (These are algorithms or scoring systems which lead to a prognostic estimation or a diagnostic category. )
‡	See note #2 for advice on how to understand, rate and use trials or other studies with wide confidence intervals.
§	Met when <u>all</u> patients died before the Rx became available, but some now survive on it; or when some patients died before the Rx became available, but <u>none</u> now die on it.
§§	By poor quality <u>cohort</u> study we mean one that failed to clearly define comparison groups and/or failed to measure exposures and outcomes in the same (preferably blinded), objective way in both exposed and non-exposed individuals and/or failed to identify or appropriately control known confounders and/or failed to carry out a sufficiently long and complete follow-up of patients. By poor quality <u>case-control</u> study we mean one that failed to clearly define comparison groups and/or failed to measure exposures and outcomes in the same (preferably blinded), objective way in both cases and controls and/or failed to identify or appropriately control known confounders.
§§§	Split-sample validation is achieved by collecting all the information in a single tranche, then artificially dividing this into "derivation" and "validation" samples.
††	An "Absolute SpPin" is a diagnostic finding whose <u>Specificity</u> is so high that a <u>Positive</u> result rules- <u>in</u> the diagnosis. An "Absolute SnNout" is a diagnostic finding whose <u>Sensitivity</u> is so high that a <u>Negative</u> result rules- <u>out</u> the diagnosis.
‡‡	Good, better, bad and worse refer to the comparisons between treatments in terms of their clinical risks and benefits.
†††	<u>Good</u> reference standards are independent of the test, and applied blindly or objectively to applied to all patients. <u>Poor</u> reference standards are haphazardly applied, but still independent of the test. Use of a non-independent reference standard (where the 'test' is included in the 'reference', or where the 'testing' affects the 'reference') implies a level 4 study.
††††	Better-value treatments are clearly as good but cheaper, or better at the same or reduced cost. Worse-value treatments are as good and more expensive, or worse and the equally or more expensive.
**	Validating studies test the quality of a specific diagnostic test, based on prior evidence. An exploratory study collects information and trawls the data (e.g. using a regression analysis) to find which factors are 'significant'.
***	By poor quality prognostic cohort study we mean one in which sampling was biased in favour of patients who already had the target outcome, or the measurement of outcomes was accomplished in <80% of study patients, or outcomes were determined in an unblinded, non-objective way, or there was no correction for confounding factors.
****	Good follow-up in a differential diagnosis study is >80%, with adequate time for alternative diagnoses to emerge (eg 1-6 months acute, 1 - 5 years chronic)

### Grades of Recommendation

<b>A</b>	consistent level 1 studies
<b>B</b>	consistent level 2 or 3 studies <i>or</i> extrapolations from level 1 studies
<b>C</b>	level 4 studies <i>or</i> extrapolations from level 2 or 3 studies
<b>D</b>	level 5 evidence <i>or</i> troublingly inconsistent or inconclusive studies of any level

*"Extrapolations" are where data is used in a situation which has potentially clinically important differences than the original study situation.*